

RODOLFO MARINHO

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE O PROCESSO
INFLAMATÓRIO E APOPTÓTICO EM NEURÔNIOS HIPOTALÂMICOS DE
CONTROLE DA FOME EM CAMUNDONGOS OBESOS INDUZIDOS POR DIETA
HIPERLIPÍDICA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciências da Motricidade.

Rio Claro

2015

RODOLFO MARINHO

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE O PROCESSO
INFLAMATÓRIO E APOPTÓTICO EM NEURÔNIOS HIPOTALÂMICOS DE
CONTROLE DA FOME EM CAMUNDONGOS OBESOS INDUZIDOS POR
DIETA HIPERLIPÍDICA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
do Campus de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências da Motricidade.

Orientador: Prof. Dr. José Rodrigo Pauli

Rio Claro

2015

796.19 Marinho, Rodolfo
M338e Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre o processo
inflamatório e apoptótico em neurônios hipotalâmicos de
controle da fome em camundongos obesos induzidos por dieta
hiperlipídica / Marinho, Rodolfo. - Rio Claro, 2016
84 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: José Rodrigo Pauli

1. Educação física adaptada. 2. Apoptose. 3. Inflamação.
4. Estresse de retículo endoplasmático. 5. Obesidade. I.
Título.

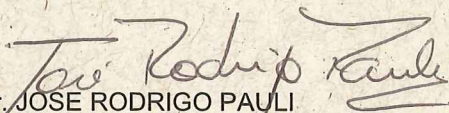
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre o processo inflamatório e apoptótico em neurônios hipotalâmicos de controle da fome em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica

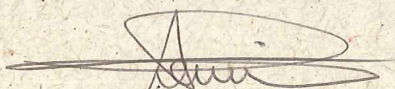
AUTOR: RODOLFO MARINHO

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE RODRIGO PAULI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE, Área: BIODINAMICA DA MOTRICIDADE HUMANA, pela Comissão Examinadora:

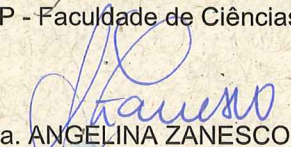

Prof. Dr. JOSE RODRIGO PAULI

UNICAMP - Faculdade de Ciências Aplicadas de Limeira - SP

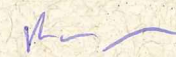


Prof. Dr. ANDRÉ RICARDO GOMES DE PROENÇA

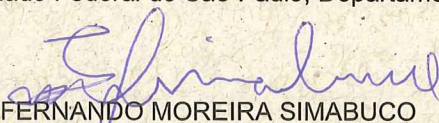
UNICAMP - Faculdade de Ciências Aplicadas de Limeira - SP


Profa. Dra. ANGELINA ZANESCO

Departamento de Educação Física / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP


Prof. Dr. RONALDO VAGNER THOMATIELI DOS SANTOS

Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Biociências - Baixada Santista - Santos/SP


Prof. Dr. FERNANDO MOREIRA SIMABUCO

UNICAMP - Faculdade de Ciências Aplicadas de Limeira - SP

Data da realização: 31 de agosto de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese de Doutorado à minha mãe, Cleusi Gama da Silva, que se doou integralmente para a educação e desenvolvimento de seus três filhos e que por motivos de saúde não pode realizar o seu sonho de ser Doutora. Esta Tese é para você, mãe.

AGRADECIMENTOS

Esta Tese de doutorado foi desenvolvida no programa de pós-graduação em Ciências da Motricidade, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processo número 2012/01750-0.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pelas bênçãos, saúde, sabedoria e muitas vezes, a paz que me deu para entender as situações, contextos, broncas, textos, artigos e força para superar as inúmeras adversidades que passei.

Gostaria de agradecer a minha amada, magnífica Mãe, Cleusi Gama da Silva, por ter sido uma MÃE de verdade. Uma mãe que nunca passou a mão na cabeça dos filhos, sempre foi severa e crítica, que lutou, por muitas vezes, sozinha, para que nunca faltasse nada para seus três filhos, principalmente para a educação dos três. Sou grato por todos os seus ensinamentos e por ter nos ensinado e nos cobrado para sermos honestos, sinceros, justos e seguir o caminho do bem, principalmente seguindo os passos e gestos de Jesus Cristo.

Ao meu Paizão, que sozinho, aos 14 anos precisou mudar para São Paulo-SP, teve que se virar, trabalhar arduamente e se transformou em homem, um rei. E com sua força de vontade e garra construiu um império e uma família. E, acima de tudo, ao ouvir uma frase sábia de um amigo judeu, a utilizou como diretriz para cuidar e educar seus filhos: “Dê aos seus filhos educação e conhecimento, isto nunca lhes poderá ser tirado. Diferente do que qualquer bem material.” E, mesmo longe, morando em Aracajú-SE, sempre se manteve presente e apoiando meus estudos e trabalhos, sempre em todos os finais de semana terminando com a mesma frase de motivação: “Jogue duro daí, que eu jogo duro daqui!”. Além disto, sempre foi muito sábio ao dar broncas e conselhos quando precisei e dos muitos, muitos ensinamentos e experiências de vida. Obrigado, pupus.

Aos meus dois irmãos, Arthur Marinho e Felipe Marinho, dois rapazes fortes, inteligentes e guerreiros, que por muitas vezes foram meus exemplos de pai, de homem e de pessoa. Nunca deixaram de me incentivar e de me dar broncas quando eu precisei.

Aos meus avós, principalmente, a Luzia Gama da Silva, uma senhora guerreira, lutadora, que mostrou para mim que na vida temos que ser mais duros que ela, que somos fortes e que conseguimos tudo que queremos. Ao meu falecido avô, Gentil Alves Gama da Silva, que sempre me ensinou a importância da disciplina e organização, me contava suas histórias de lutas e glórias, me deu meu primeiro apelido (Alegria-alegria) e me dizia

sempre uma frase, a qual levei para toda a minha vida: “Filho, se um dia eu tivesse como voltar no tempo, faria tudo exatamente igual. Não me arrependo de nada que fiz”!

A toda família Gama da Silva e Marinho, que sempre torceu por mim, me ajudou e me apoiou em todos os momentos da minha vida. Obrigado aos meus tios, primos, primas e avós.

À família Explícitu's, Alyson, Rafael, Wederley, João, Jean, André, Gustavo e Vitor, pela linda amizade e pelo exemplo de luta que sempre me deram e mostraram. Mesmo nas mais diversas adversidades e falta de oportunidades que tivemos que passar, um sempre apoiou o outro, demos um jeito de resolver os problemas, contornar as situações e todos estão bem formados, alguns mestres, outros doutores, mas todos, homens de verdade. Grandes guerreiros.

À minha amiga, Flora Mariotti, que sempre me apoiou e torceu por mim, me ajudou diversas vezes e, principalmente, em muitos momentos difíceis que passei. Muito obrigado.

À equipe Soviética, Gustavo Alonso, Felipe Carvalho, Rafael Falcão e Vitor Góes. Nós cinco sabemos muito bem o quanto ajudamos uns aos outros, o quanto que evoluímos e crescemos a partir do momento que nos conhecemos e começamos a conviver. Que vocês continuem a serem estes homens de bem, de família, irmãos.

Aos meus amigos Thiago Bozza, Marcelo (Tubarão), Evandro (Juninho), Alex (Leio), Marcelo (Cidão), Cíntia Maria, Válder (Floresta), Rodrigo (Milaré), Jair, Osmar, Talita, Renan, Gaúcho, Biro e Rogério (Paulistano F.C.) pelo incentivo, broncas, ajuda, risadas, conselhos e que torceram de verdade por mim. MUITÍSSIMO obrigado, amigos.

Aos meus amigos que frequentam o Praia Limeira e o Bar Floresta, que em muitos finais de semana me acolheram, me ajudaram a rir, discutir sobre política, economia e futebol. As diversas histórias que tivemos e a amizade que criamos. Muito obrigado, porque por muitas vezes e situações, vocês foram a minha família aqui em Limeira.

Aos meus amigos do Bongô F.C. e da República Bongô, Matheus Viana (Bob), Henrique (Kikão), Gustavo (Tog), Aurélio, Felipe Aguiar (Malek), Flávio Prado (Flabeça), Gabriel (Tropeço), Felipe Ferrari (Parça), André Ringel (Dé), André Cordeiro, Murilo (Dobby), Eri Douglas (Drogbinha), Eduardo Carvalho (Bolivininha), Andres

(Peruano), Bryan (Ryan Nadan), Douglas (Jaca), Fabio Cassiano e os demais integrantes da república, muito obrigado por toda torcida, força e incentivo nestes últimos três anos. Muito obrigado pelas conquistas em campo (futebol) e pessoais e profissionais.

Ao Leandro Pereira (*Berus*), que me ajudou do início ao fim do Doutorado, desde a minha matrícula na UNESP até os últimos experimentos. Você me serviu de exemplo como amigo e pesquisador, um pesquisador brilhante e divertido, que sempre foi determinado a conquistar seus objetivos. Parabéns por todas as conquistas também, você é um grande vencedor.

Aos meus amigos do Laboratório de Erro Inato do Metabolismo, principalmente, Leandro Fernandes, Allan Chiaratti Oliveira e Vânia D’Almeida. Todos ensinamentos aprendidos com vocês foram de fundamental ajuda para a realização deste trabalho e das pesquisas que realizei durante meu doutorado e mestrado.

A todos os alunos do LABMEX e do LABGEN, por todo apoio, colaboração e torcida, em destaque ao Carlos K. Katashima, Rodrigo Gaspar, Guilherme Formigari, Vitor Muñoz, Vanessa de Oliveira e Marcella Sant’Ana, pela grande amizade e que me mostraram que a vida pode ser mais leve e feliz. Muito obrigado, amigos. Amo vocês.

Ao meu amigo e irmão, Rafael Calais Gaspar, tenho muito orgulho de você e de um dia ter te conhecido. Muito obrigado por tudo que fez por mim, faz por mim e representa para mim. Continue sendo este menino de ouro, puro, bondoso e trabalhador.

Às minhas amigas, Fernanda Machado e Fernanda Minnitti, pelas broncas, críticas construtivas, ajuda e torcida, vocês duas me ajudaram a entender a vida, a voltar a gostar de viver, rezar, amar e se amar.

Aos dois integrantes da equipe dos “Mercenários”, Paulo Daubian e Lucas Dantas Maia Forte, que sempre me ajudaram, apoiaram e muitas vezes dividimos conhecimentos, alegrias, conflitos e tristezas. Muito obrigado amigos.

Ao grande Éber Magalhães, sem palavras para descrever o quanto este amigo é especial, o quanto ele ama fazer o bem, sem olhar a quem. Ao quanto ele se dedicou e sofreu para que todos pudessem ter um ensino e pesquisa de qualidade na FCA-UNICAMP. Você é brilhante demais, meu amigo. Continue assim, força!

Ao Ivan, Felipe e Walter, que em conjunto com o Éber formaram a Império, mais que uma república, ainda mais pela idade dos integrantes. Muito obrigado pelas risadas, jogos de futebol juntos, churrascos e apoio nas minhas conquistas e objetivos.

Aos funcionários da limpeza e da manutenção da FUNCAMP, os técnicos administrativos da FCA-UNICAMP, em especial às funcionárias da APEX, Bárbara, Marina e Luciamara, e da UNESP-RC, Ivana e Rose, por todo apoio e ajuda para a realização dos eventos, pesquisas, limpeza, manutenção e organização das Universidades e dos laboratórios. Além de terem me ajudado inúmeras vezes nestes meus três anos de Doutorado.

Aos professores Dr. Adelino e Dr. Claudio (Cafú) por toda ajuda e sabedoria, possibilitando que pudéssemos conduzir pesquisas e projetos de altíssima qualidade. Gênios, muito competentes e trabalhadores.

Aos professores, Dr. Dennys E.C. Cintra e Dr. Eduardo R. Ropelle, pelo exemplo de dedicação, humildade, inteligência e por amarem o que fazem. Por nunca cansarem de fazer o bem e de formar mais e mais professores e pesquisadores de bem. E muitas de suas ações são sem criarem expectativa, muito menos para ganhar dinheiro. Muito obrigado por estes últimos três anos de convivência e amizade. Por sentirem confiança em mim até para cuidar e brincar com seus filhos.

E, como não podia faltar, ao “capita”, Prof. Dr. José Rodrigo Pauli. Que homem fantástico, competente, esforçado, inteligente, dedicado, humilde, cristão e sincero. Tenho muito orgulho de um dia, em 2008, ter te conhecido e jogado futebol com você, desde aquele dia comecei a acompanhá-lo e tentar um dia chegar ao seu nível de sabedoria, esforço e competência. Muito obrigado por toda ajuda, broncas, discussões e orientações nestes últimos seis anos que trabalhamos juntos. Serei eternamente grato a você, professor. Você estendeu a mão para me tirar do buraco chamado depressão e confiou em mim e no meu potencial. E te desejo toda a saúde e força do mundo para cuidar do LABMEX e da sua linda família. Muitíssimo obrigado.

RESUMO

Objetivo: Investigar o papel do treinamento físico (TF) em regular os processos inflamatório, de estresse de retículo endoplasmático e principalmente de apoptose em neurônios hipotalâmicos responsáveis pelo controle da fome em camundongos obesos induzidos por dieta rica em gordura. **Metodologia:** Quarenta e cinco camundongos *Swiss* foram distribuídos em 3 grupos com 15 animais em cada (n=15): Controle - animais sedentários, alimentados com dieta padrão por 16 semanas; Obeso - animais sedentários, que receberam dieta hiperlipídica (DHL) por 8 semanas (OB); Obeso Treinado (OBT) - animais alimentados com DHL por 8 semanas e, concomitantemente, foram submetidos a um protocolo de TF. No início e ao final do experimento foram realizadas avaliações morfofisiológicas, moleculares e de ingestão alimentar nos animais. O protocolo de TF consistiu em corrida em esteira por 1h, 5 dias/semana, durante 8 semanas, a 60% da P_{máx} dos animais. Vinte e quatro horas após a última sessão do TF extraiu-se os hipotálamos dos animais para as análises do conteúdo, fosforilação e/ou associação das proteínas JAK2, STAT3, TNF- α , IL-6, IL-1 β , JNK, IKK, TLR4 e MyDD88, Bcl-2, Bax, Casp9, Casp8, FADD, APAF1, PERK, eIF2 α , NPY e POMC por imunoblot, imunoprecipitação e/ou PCR-RT. Para avaliar apoptose, aplicou-se a técnica de TUNEL. A ativação de macrófagos foi analisada pela marcação com F4/80. **Resultados:** A DHL foi capaz de aumentar a massa corporal total, o índice de Lee, a glicemia e os níveis de colesterol total e LDL nos animais obesos se comparado aos animais controles. Ao contrário, o TF foi capaz de atenuar estes parâmetros. O TF aumentou a fosforilação das proteínas da via de sinalização da leptina (p-JAK2/p-STAT3) em neurônios hipotalâmicos dos camundongos obesos quando comparados a seus pares não exercitados. Tais resultados foram acompanhados por menor conteúdo de TNF- α , IL-6, IL-1 β e TLR4 e redução da fosforilação da JNK e IKK nos animais obesos treinados, se comparado aos animais obesos que permaneceram sedentários no mesmo período. Na mesma direção, pode-se observar maior ativação de macrófagos, provenientes da marcação com F4/80, nos animais obesos sedentários em relação aos obesos exercitados. Também se observou elevada fosforilação de eIF2 α e PERK nos animais obesos sedentários, sendo que o TF atenuou este aspecto. Além disto, o grupo obeso apresentou aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas, BAX e PARP1, e maiores associações das proteínas APAF1/Casp9 e FADD/Casp8 e redução na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2

se comparado aos animais obesos exercitados. Ademais, os dados obtidos por meio da técnica de TUNEL, confirmaram o processo de apoptose de neurônios hipotalâmicos nos animais obesos sedentários. Por outro lado, o TF foi capaz de prevenir a fragmentação do DNA e aumentar o conteúdo de Bcl-2 nos animais treinados. Por fim, observou-se que o TF preveniu a diminuição da expressão do RNAm de POMC, o que explica o fenômeno da redução de ingestão alimentar por estes animais ao compará-los aos seus pares obesos sedentários. **Conclusões:** O TF pode reorganizar o controle do balanço energético através de respostas anti-inflamatórias e anti-apoptóticas em neurônios hipotalâmicos controladores da fome.

Palavras-chave: Treinamento físico. Inflamação. Estresse de retículo endoplasmático. Apoptose. Hipotálamo. Obesidade.

ABSTRACT

Objective: To investigate the role of physical training (PT) in regulating the inflammatory processes, endoplasmic reticulum stress and especially apoptosis in hypothalamic neurons responsible for controlling hunger in diet induce obese mice.

Methods: Forty-five Swiss mice were distributed into 3 groups of 15 animals each (n = 15): Control - sedentary animals fed a standard diet for 16 weeks; Obese - sedentary animals that received high fat diet (HFD) for 8 weeks (OB); Obese trained (OBT) - animals that received HFD for 8 weeks, and concomitantly, were subjected to a PT protocol. At the beginning and end of the experiment, morphophysiological variables, food intake and molecular biology were evaluated. The TF protocol consisted of treadmill running for 1 h, 5 days / week for 8 weeks, at 60% of Pmax of the animals. Twenty-four hours after the last session of the PT, the extraction of hypothalamus was done for analysis of the level, phosphorylation and / or association of, JAK2, STAT3, TNF- α , IL-6, IL-1 β , JNK, IKK, TLR4 and MyDD88, Bcl-2, Bax, Casp9, Casp8, FADD, APAF1, PERK, eIF2 α , NPY and POMC by immunoblot, immunoprecipitation and/or RT-PCR. The TUNEL technique was performed to evaluated apoptosis. In addition, the activation of macrophages was analyzed by labeling with F4/80. **Results:** DHL was able to increase total body weight, Lee's index, blood glucose and total cholesterol levels and LDL in obese animals compared to the control animals. Rather, PT was able to attenuate these aspects. PT increased phosphorylation of the proteins of leptin signaling pathway (p-JAK2/p-STAT3) in hypothalamic neurons of obese mice compared to not exercised mice. These findings were accompanied by lower content of TNF- α , IL-6, IL-1 β and TLR4 and reduced phosphorylation of JNK and IKK trained in the obese animals compared to the obese animals which have remained inactive during the same period. In the same way, it can be observed more macrophage activation in the inactive obese animals than obese exercised by marking with F4/80. It was also observed high phosphorylation of PERK and eIF2 α in obese sedentary animals, and PT attenuated this aspect. Moreover, the obese group showed increased expression of pro-apoptotic protein BAX and PARP1, increased associations of APAF1/Casp9 and FADD/Casp8 proteins, and decreased expression of the anti-apoptotic Bcl-2 compared to obese trained animals. Furthermore, the data obtained through TUNEL technique confirmed the apoptosis process of hypothalamic neurons in sedentary obese animals. PT was able to prevent DNA fragmentation and

increase the Bcl-2 levels in the obese trained animals. Finally, the PT prevented the decrease in POMC mRNA expression, which explains the phenomenon of the reducing of food intake in these animals when compare them to their inactive obese pairs.

Conclusions: The PT can rearrange the control of energy balance through anti-inflammatory and anti-apoptotic neurons in hypothalamic controlling hunger.

Keywords: Physical training. Inflammation. Endoplasmic reticulum stress. Apoptosis. Hypothalamus. Obesity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo da via de sinalização da leptina e seu <i>cross-talk</i> com a via da insulina no hipotálamo.....	23
Figura 2A-2B. Inflamação, estresse de retículo endoplasmático e resistência à insulina e leptina.....	26
Figura 3. Vias de apoptose no hipotálamo.....	30
Figura 4. Desenho experimental.....	37
Figura 5. Análise de bioinformática da relação entre as vias inflamatórias e de apoptose.....	44
Figura 6. Parâmetros de desempenho no teste de corrida em esteira.....	45
Figura 7. Ingestão alimentar de 12 horas em resposta ao estímulo com leptina.....	48
Figura 8A e 8B. Conteúdo e fosforilação das proteínas da via de sinalização da leptina no hipotálamo.....	49
Figura 9A e 9B. Via de sinalização inflamatória no hipotálamo.....	51
Figura 10A e 10B. Via de sinalização relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático e de apoptose no hipotálamo.....	53
Figura 11. Análise da fragmentação de DNA através da técnica do TUNEL.....	55
Figura 12. Marcação de F4/80 para avaliação da ativação de macrófagos no hipotálamo (microglia)	56
Figura 13. Expressão de RNAm dos neuropeptídeos reguladores da fome/saciedade, NPY e POMC.....	57
Figura 14. Modelo ilustrativo com os principais resultados do estudo.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP – *Agouti-related peptide*
Akt – Protein quinase B ou proteína serina/treonina quinase
APAF1 – *Apoptotic peptidase activating factor 1*
CART – Transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina
Casp8 – Caspase 8
Casp9 – Caspase 9
CRH – hormônio liberador de corticotrofina
DAMPS – *damage-associated molecular pattern molecule*
eIF2 α – *eukaryotic translation initiation factor 2A*
FADD – *Fas-Associated protein with Death Domain*
Foxo1 – *Forkhead box protein O1*
GLP-1 – *glucagon like peptide-1*
IKK – *Ikappa kinase*
IL-1 β – interleucina 1 β
IL-6 – interleucina 6
IL-10 – interleucina 10
IL-1R2 – receptor de interleucina 1, do tipo 2
IR – receptor de insulina
IRS-1 – substrato do receptor de insulina 1
IRS-2 – substrato do receptor de insulina 2
JAK2 – *Janus kinase 2*
JNK – *c-jun N-terminal kinase*
LCR – líquido cefalorraquidiano
MAPK – *Mitogen-activated protein kinases*
MyDD88 – *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NF κ B – *nuclear factor kappa B*
NPY – Neuropeptídeo Y
PAMPS – *pathogen-associated molecular patterns*
PERK – *PKR-like endoplasmic-reticulum kinase*
PI3k – fosfatidil inositol 3 quinase
POMC – Pró-opiomelanocortina

PTP1B – Proteína tirosina fosfatase 1B

SOCS3 – Proteína supressora da sinalização de citocinas

STAT3 – *Signal transducer and activator of transcription 3*

TLR4 – Receptor do Tipo *Toll Like* 4

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TNFRF1 – receptor de TNF- α 1

TRH – Hormônio liberador de tireotrofina

TRAF – receptor de TNF- α

TUNEL – Terminal *Deoxynucleotide Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Hipotálamo e controle da fome	20
1.2. Ação molecular da leptina e seu cross-talk com a via da insulina no hipotálamo	21
1.3. Adiposidade e disfunção hipotalâmica	23
1.4. Apoptose neuronal no hipotálamo atrelado a obesidade	27
1.5. Treinamento físico aeróbio no controle da ingestão alimentar	31
2. OBJETIVOS	34
2.1. Geral	34
2.2. Específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. ETAPA EXPERIMENTAL 1	36
3.1.1. Análise de bioinformática	36
3.2. ETAPA EXPERIMENTAL 2	36
3.2.2. Teste de Carga Incremental	37
3.2.3. Protocolo de treinamento físico	38
3.2.4. Avaliação de parâmetros da composição corporal e metabólicos	38
3.2.5. Teste de tolerância à insulina intraperitoneal	39
3.2.6. Investigação da ingestão alimentar de 12 horas após estímulo com leptina...	39
3.2.7. Eutanásia, coleta de sangue e extração do hipotálamo e tecido adiposo branco	39

3.2.8.	<i>Imunoprecipitação</i>	40
3.2.9.	<i>Imunoblot</i>	40
3.2.10.	<i>Extração nuclear</i>	41
3.2.11.	<i>Reagentes e anticorpos</i>	41
3.2.12.	<i>Imunohistoquímica</i>	42
3.2.13.	<i>TUNEL (Terminal Deoxynucleotide Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling)</i>	42
3.2.14.	<i>qPCR-RT mRNA</i>	43
3.2.15.	<i>Análise estatística</i>	43
4.	RESULTADOS	44
5.	DISCUSSÃO	58
6.	CONCLUSÃO	72
7.	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	83

1. INTRODUÇÃO

Estudos demonstram que o consumo de dieta rica em gordura promove resistência à insulina e à leptina no sistema nervoso central, suprimindo os efeitos anorexigênicos desses hormônios no hipotálamo (De Souza *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2007; Picardi *et al.*, 2008; Milanski *et al.*, 2009; Van De Sande-Lee *et al.*, 2011). Esta disfunção hipotalâmica aos efeitos da insulina e da leptina, por consequência, causa uma progressiva perda do balanço entre ingestão alimentar e termogênese, resultando em ganho excessivo de gordura corporal. O desarranjo na funcionalidade da insulina e da leptina no hipotálamo tem sido atrelado à ativação de proteínas intracelulares de ação pró-inflamatórias em resposta ao consumo de dieta rica em gordura, com prejuízos moleculares na transdução do sinal destas biomoléculas (De Souza *et al.*, 2005; Milanski *et al.*, 2009). Em especial, estão envolvidos ao processo inflamatório quatro mecanismos distintos, entre eles: (1) indução da expressão da proteína supressora da sinalização de citocinas (SOCS3), (2) ativação da c-jun N-terminal quinase (JNK), (3) ativação da *I*kappa kinase (IKK) e também (4) indução da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) (De Souza *et al.*, 2005; Picardi *et al.*, 2008; Milanski *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2009; Romanatto *et al.*, 2009; Chiarreotto-Ropelle *et al.*, 2013).

Tais proteínas apresentam efeito negativo sobre os sinais moleculares tanto da insulina, quanto da leptina, por mecanismos distintos, provocando prejuízo na percepção central dos estoques periféricos de energia, o que acarreta em controle precário da ingestão alimentar e do gasto energético adequado. O consumo de alimentos ricos em ácidos graxos saturados pode também causar à ativação das vias de apoptose em neurônios do hipotálamo envolvidos na regulação da fome e termogênese (Moraes *et al.*, 2009). Essa deve ser uma das explicações para o fato de que muitos indivíduos obesos são incapazes de controlar a quantidade de alimento ingerido. Em um estudo com humanos obesos, foi observado redução da resposta cerebral a ingestão de glicose e aumento de citocinas inflamatórias no líquido cefalorraquidiano (LCR), sugerindo que prejuízos permanentes ao sinal da insulina, por exemplo, podem acontecer nesses pacientes (Van De Sande-Lee *et al.*, 2011). Portanto, diante da obesidade, deve-se considerar e entender que alterações moleculares em neurônios do hipotálamo ocorrem em decorrência do excesso de gorduras saturadas ingeridas e, sendo assim, o sucesso do controle da ingestão alimentar será cada vez mais reduzido. Dessa forma, estratégias que interrompam ou atenuem o desenvolvimento da inflamação e, consequentemente da

apoptose de células neuronais hipotalâmicas se tornam essenciais à prevenção e tratamento da obesidade. Nesse contexto, o exercício físico tem se mostrado importante tanto no aumento do gasto energético, quanto na modulação de proteínas inflamatórias de efeito negativo sobre a via de sinalização da insulina em tecidos periféricos (Ropelle *et al.*, 2006; Schenk e Horowitz, 2007; Pauli *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2010; Ropelle *et al.*, 2013). No entanto, são poucos os estudos que investigaram o papel do exercício físico sobre a inflamação e apoptose de células hipotalâmicas envolvidas no controle da ingestão alimentar e termogênese. Além disso, ainda não é bem conhecido o papel do exercício físico em ativar proteínas de efeito anti-inflamatório e anti-apoptótico no hipotálamo. Tais descobertas poderão oferecer novos conhecimentos a respeito do papel do exercício físico sobre mecanismos centrais de controle da fome e permitir novas possibilidades terapêuticas contra a obesidade.

1.1. Hipotálamo e controle da fome

Nas últimas duas décadas houve aumento surpreendente do conhecimento científico a respeito dos fenômenos que participam do controle neural da fome e da termogênese (Cintra *et al.*, 2007). O ponto de partida para tais avanços foi a descoberta do hormônio leptina e posteriormente de suas ações no sistema nervoso central (Zhang *et al.*, 1994; Friedman e Halaas, 1998). A leptina é produzida pelo tecido adiposo branco em quantidade proporcional ao conteúdo de massa adiposa. Os principais sítios de ação da leptina são neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (Zhang *et al.*, 1994; Friedman e Halaas, 1998). Ao menos dois grupos distintos de neurônios estão presentes no núcleo arqueado, ambos apresentando receptores para leptina. São eles: neurônios produtores dos neurotransmissores NPY e AGRP (NPY/AGRPérgicos) que são orexigênicos, e neurônios produtores dos neurotransmissores POMC e CART (POMC/CARTérgicos) que são anorexigênicos (Cintra *et al.*, 2007).

Estes neurônios além de expressarem receptores para leptina, também expressam receptores para insulina. A insulina é um hormônio secretado pela célula beta pancreática, com importante efeito na modulação hipotalâmica da fome (Schwartz *et al.*, 2000). Pesquisas revelaram que tanto leptina, quanto insulina, mas principalmente ambos, agindo de forma combinada têm a capacidade de inibir neurônios NPY/AGRPérgicos e ativar neurônios POMC/CARTérgicos (Schwartz *et al.*, 2000; Carvalheira *et al.*, 2001; Torsoni *et al.*, 2003).

Na situação de jejum ou de redução da massa adiposa (emagrecimento), neurônios NPY/AGRPérgicos encontram-se ativados. Nestas circunstâncias conexões axonais entre neurônios do núcleo arqueado são projetadas para neurônios de segunda ordem localizados na região paraventricular e lateral do hipotálamo. Estas projeções provocam à inibição da produção de neurotransmissores anorexigênicos e ativadores da termogênese (TRH - hormônio liberador de tireotrofina) e (CRH - hormônio liberador de corticotrofina) no núcleo paraventricular, e ativação da produção de neurotransmissores orexigênicos e inibidores da termogênese (orexina e MCH) no núcleo hipotalâmico lateral (Cintra *et al.*, 2007). O resultado desta regulação é o aumento da fome e a redução da termogênese. Por outro lado, em períodos pós-prandiais, ou quando, estoques de energia no tecido adiposo são satisfatórios, há aumento dos níveis sanguíneos de insulina e leptina, o que induz inibição dos neurônios NPY/AGRPérgicos e ao estímulo dos neurônios POMC/CARTérgicos. O resultado é a inibição de neurônios do núcleo hipotalâmico lateral, produtores de orexina e MCH e estímulo de neurônios do núcleo paraventricular, produtores de CRH e TRH (Cintra *et al.*, 2007).

Nesta situação ocorrerá saciedade, acompanhada de aumento da termogênese (Schwartz *et al.*, 2000; Flier, 2004). Tal compreensão tem despertado o interesse de muitos pesquisadores a respeito de possíveis mecanismos de resistência hipotalâmica à sinalização da insulina e leptina como participantes da gênese da obesidade (Flier, 2004).

1.2. Ação molecular da leptina e seu cross-talk com a via da insulina no hipotálamo

Após a refeição, há um aumento da síntese e liberação de leptina. No hipotálamo, a leptina se liga ao seu receptor ObR, uma proteína transmembrana monomérica, que pertence à família dos receptores de citocinas do tipo 1. O ObR não apresenta atividade enzimática intrínseca e depende de sua associação com a proteína quinase JAK2 para a transdução do sinal da leptina. A ligação da citocina-receptor (leptina-ObR) promove a associação e fosforilação da JAK2, ativando-a. Por sua vez, a JAK-2 fosforila o receptor de leptina em tirosina. Ao fosforilar em tirosinano resíduo 1138, há o recrutamento do fator de transcrição STAT3 para o ObR, desencadeando a fosforilação em tirosina do STAT3 e sua translocação para o núcleo, revelando a ação direta da leptina para a expressão gênica. A fosforilação da STAT3 promove ação positiva para a transcrição de neurotransmissores anorexígenos, como a POMC. Além disso, a ativação da JAK2 desencadeia o recrutamento e a fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS1/2), promovendo a associação destes com a proteína PI3k, a qual se

torna ativa, configurando em comunicação comum entre as vias de sinalização da leptina e insulina (Velloso, 2006; Velloso *et al.*, 2008). Entretanto, vale a pena ressaltar que mesmo existindo este *cross-talk* entre as duas vias, apenas a via da leptina é quem consegue aumentar a transcrição de neurotransmissores anorexígenos via ativação da proteína STAT-3. Deste modo, é observado que a insulina desencadeia um efeito inibitório mais imediato sobre a fome, por atuar predominantemente sobre o ritmo de disparos neuronais, enquanto a leptina tem um efeito mais robusto, porém mais tardio, por controlar a transcrição gênica (Velloso, 2006). Segue abaixo, na figura 1, um desenho esquemático resumindo as vias moleculares de sinalização da leptina e sua comunicação com a via da insulina no hipotálamo.

Figura 1. Esquema ilustrativo da via de sinalização da leptina e seu *cross-talk* com a via da insulina no hipotálamo.

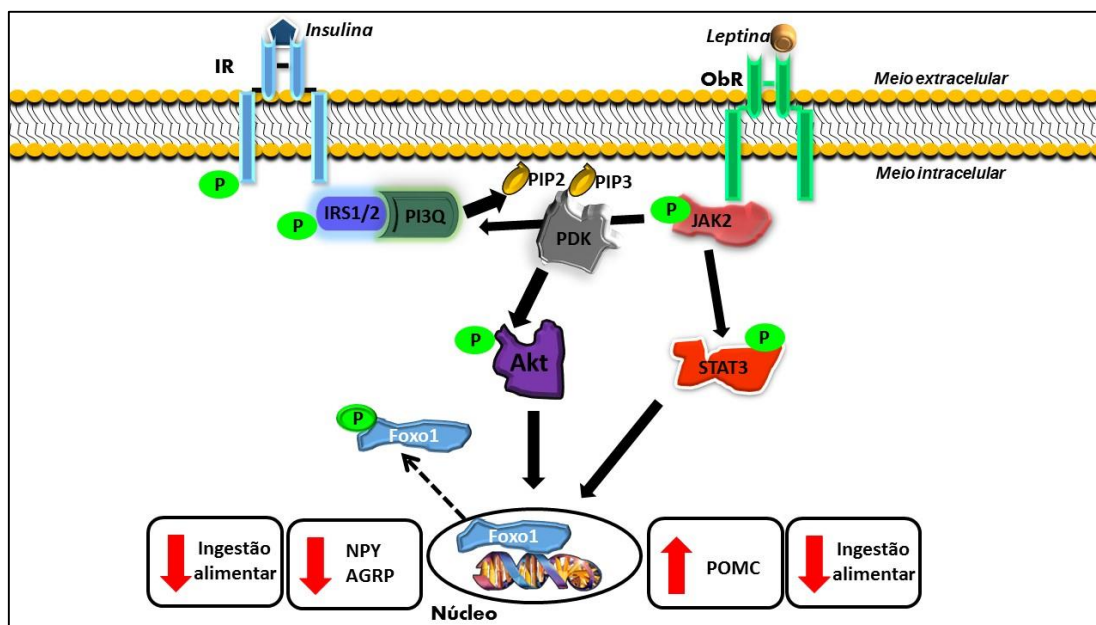


Figura 1. Sinalização das vias da insulina e leptina no hipotálamo. Depois de se ligar a leptina, o receptor de leptina (ObR) promove a atração e associação da proteína JAK2. Esta, por sua vez, é fosforilada em tirosina e se torna ativa. A JAK2, então, promove a fosforilação de um fator de transcrição chamado STAT3. Quando fosforilado, o STAT3 desencadeia sua ação nuclear, aumentando a transcrição de neuropeptídeos POMC, anorexígenos, diminuindo a ingestão alimentar. Sabe-se também que a JAK2 possui a capacidade de fosforilar e ativar a PI3k, proteína componente da via da insulina, e assim, promover um *cross-talk* entre as duas vias. Ao ativar a PI3k é desencadeado uma reação em cascata da via da insulina, estimulando assim a fosforilação da proteína Akt. Posteriormente, quando ativada a Akt promove a fosforilação e extrusão do fator de transcrição Foxo1, inibindo sua ação nuclear. A inibição de Foxo1 no núcleo leva a uma diminuição da expressão de neuropeptídeos NPY, orexígenos.

1.3. Adiposidade e disfunção hipotalâmica

Estudos com modelos experimentais têm identificado que na obesidade resultante tanto de defeitos genéticos, como camundongos *ob/ob* (portador de mutação no gene da leptina) ou *db/db* (portador de mutação no gene do receptor de insulina), quanto em animais obesos por ingestão de dietas hipercalóricas, a ação hipotalâmica da insulina e da leptina fica consideravelmente comprometida, aumentando a ingestão alimentar (Cintra *et al.*, 2007; Picardi *et al.*, 2008; Ropelle *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2009). Sabe-se agora que tais disfunções são provenientes da inflamação de baixo grau presente nos organismos com excesso de gordura corporal. Evidências preliminares verificaram maior expressão da proteína SOCS3 em animais obesos (De Souza *et al.*, 2005; Romanatto *et al.*, 2009). A SOCS3 pertence a uma família de reguladores da ação de citocinas. Sinais provenientes de citocinas ou hormônios, como a própria leptina, levam ao aumento da expressão do gene da SOCS3. Ela atua como bloqueador físico dos sinais gerados pelos hormônios, ao se ligar a sítios funcionalmente ativos dos respectivos receptores da insulina e leptina, ou de outras proteínas, que fazem parte das vias de sinalização destes hormônios ou citocinas. Pode-se dizer até que a SOCS3 é um sinal de *feedback* negativo para o sinal da Leptina, tendo em vista que a STAT3 participa da transcrição de SOCS3.

Algumas proteínas citoplasmáticas como os substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), que participam das vias de sinalização da leptina e da insulina, podem ser ligadas à SOCS3 e assim direcionadas para a degradação proteossômica, o que diminui a quantidade de intermediários das vias de sinalização e, portanto, reduz a propagação do sinal emitido, inicialmente, pela insulina. Portanto, reduzir a expressão de SOCS3 pode ser uma medida positiva na tentativa de atenuar a resistência à insulina e à leptina no hipotálamo.

A identificação de outros envolvidos na disfunção hipotalâmica gerada pela obesidade surgiu a partir de estudos nos quais a expressão gênica foi avaliada por meio de um arranjo gênico que investigou mais de 1000 genes no hipotálamo de animais expostos a dieta padrão e dieta hiperlipídica (De Souza *et al.*, 2005). Esta investigação identificou que aproximadamente 15% dos genes avaliados tinham sua expressão modulada pela ingestão de uma dieta rica em gordura. Uma parcela desses genes era composta por reguladores ou efetores da resposta imunológica, entre elas uma série de citocinas pró-inflamatórias. Este processo inflamatório tem origem logo após algumas semanas da oferta da dieta rica em gordura. No hipotálamo estas citocinas com função serina quinase, sendo elas a JNK e IKK previamente apresentadas, inativam alguns

relevantes mediadores das respostas anorexigênicas da insulina e da leptina, colaborando assim para a instalação da resistência a esses hormônios (De Souza *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2009). A JNK e a IKK causam a fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRSs) em serina 307, com efeito negativo na via de sinalização da insulina. Além disso, essas vias levam à produção de outros mediadores inflamatórios através do controle da transcrição genética. A ativação da IKK provoca a degradação do IKK e a dissociação do complexo IKK/NFκB. Este último se transloca para o núcleo, onde participa da transcrição gênica de proteínas inflamatórias como TNF- α , interleucinas 6 e 1 β (IL-6 e IL-1 β), iNOS, entre outras. Contudo, quando estas proteínas foram inativadas, seja por meios farmacológicos, como por métodos genéticos, ocorreu à reversão do fenótipo de obesidade induzido pela dieta e melhora na resposta à insulina e leptina em células hipotalâmica ou em tecidos periféricos (De Souza *et al.*, 2005; Pauli *et al.*, 2008; Milanski *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2009; Romanatto *et al.*, 2009).

Observou-se que animais obesos e diabéticos também apresentam elevada atividade da proteína PTP1B. A PTP1B catalisa a retirada de grupos fosfato de resíduos tirosina presentes em vários intermediários das vias de sinalização da insulina e leptina (Ropelle *et al.*, 2006; Picardi *et al.*, 2008; Chiarreotto-Ropelle *et al.*, 2013). Portanto, ao desfosforilar tais proteínas, a PTP1B, as tornam inativas. Similar a SOCS3, JNK e IKK, a PTP1B também é induzida através de mecanismos inflamatórios no hipotálamo. Quando inibida sua atividade, animais submetidos à dieta hiperlipídica são protegidos da obesidade (Picardi *et al.*, 2008).

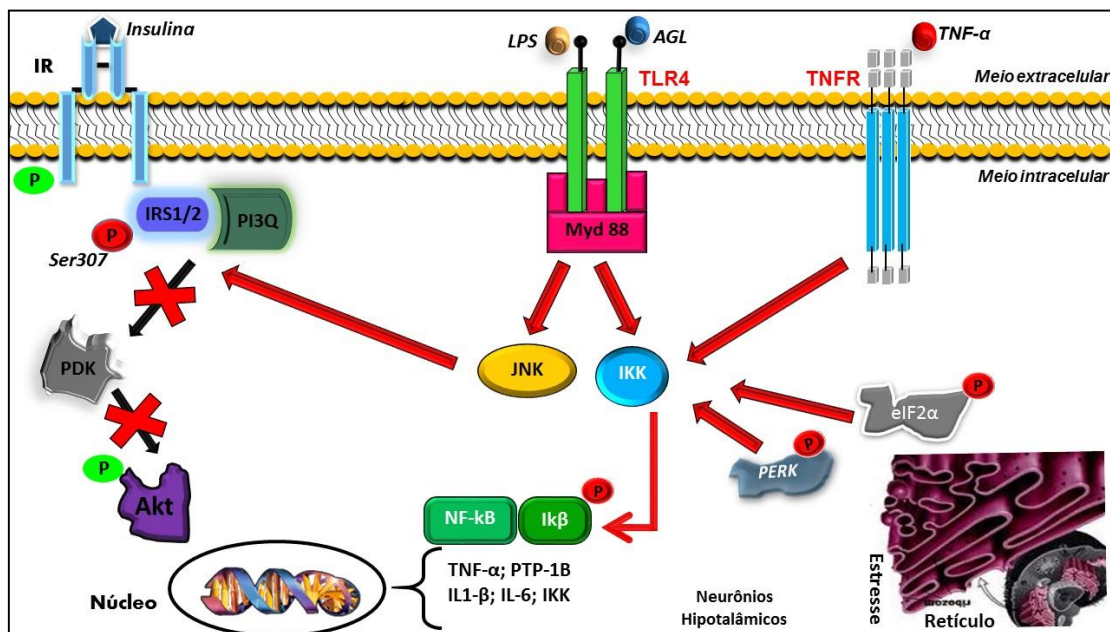
A ativação das proteínas JNK, IKK e iNOS parecem estar atreladas ao TLR-4 (*toll like receptor 4*), um tipo de receptor de membrana que é ativado na resposta imunológica na presença de lipopolissacarídeo (LPS – uma biomolécula presente em bactérias gramnegativas) e outros produtos microbianos (Tsukumo *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2009; Pauli *et al.*, 2009). No entanto, o TLR-4 também é sensível a nutrientes como os ácidos graxos. A ingestão elevada de gordura na dieta pode ativar esses receptores, mesmo na ausência de patógenos, uma resposta inflamatória capaz de interferir nos sinais mediados pelos hormônios controladores da fome e gasto energético, resultando em obesidade (Tsukumo *et al.*, 2007; Beutler, 2009; Milanski *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2009). Uma vez acionado o TLR-4 participa da resposta inflamatória, ativando proteínas como a JNK, IKK e iNOS. Portanto, a participação do TLR-4 parece ser importante neste processo inflamatório. Além disso, descobriu-se que vias de sinalização inflamatória podem também ser ativadas pelo estresse metabólico originado do interior da célula ou

de moléculas sinalizadoras extracelulares, neste âmbito, pode-se destacar o estresse de retículo endoplasmático. Foi demonstrado que a obesidade é capaz de sobrecarregar a capacidade funcional do retículo endoplasmático (RE) e que este “estresse do RE” leva à ativação de vias de sinalização inflamatórias e assim agrava a resistência à insulina (Ozcan *et al.*, 2004; Moraes *et al.*, 2009).

As principais proteínas responsivas ao estresse de RE são: IRE-1 (*inositol-requiring enzyme-1*), PERK (*PKR-like endoplasmic-reticulum kinase*) e ATF-6 (*activating transcription factor 6*). As duas principais vias inflamatórias que interferem na ação da insulina, JNK e IKK, são ativadas em resposta a IRE-1 e PERK, durante a resposta ao estresse de RE (Ozcan *et al.*, 2004; Moraes *et al.*, 2009). A análise de amostras obtidas a partir de biópsias feitas em pacientes magros e obesos demonstrou evidências claras de estresse de retículo no tecido adiposo e no fígado de obesos e que a expressão de proteínas envolvidas no estresse de RE é determinante para o desenvolvimento da resistência à insulina (Gregor *et al.*, 2009). Ao se estudar o hipotálamo de modelos animais de obesidade, também foi evidenciado o fenômeno de estresse de RE, desencadeando um prejuízo na sinalização da insulina e leptina (Moraes *et al.*, 2009; Ropelle *et al.*, 2010). Embora estes resultados sejam promissores, são necessárias novas investigações, sobretudo no hipotálamo, para determinar a real importância do estresse de RE no desenvolvimento da resistência à insulina e leptina na condição de obesidade. Nota-se, portanto, a existência de uma integrada rede de sinalização celular envolvida na resistência à ação da insulina e leptina. Um resumo destas vias inflamatórias e de estresse de retículo endoplasmático e suas ações negativas para as vias da insulina e leptina estão esquematizadas na figura 2.

Figura 2A-2B. Inflamação, estresse de retículo endoplasmático e resistência à insulina e leptina.

A



B

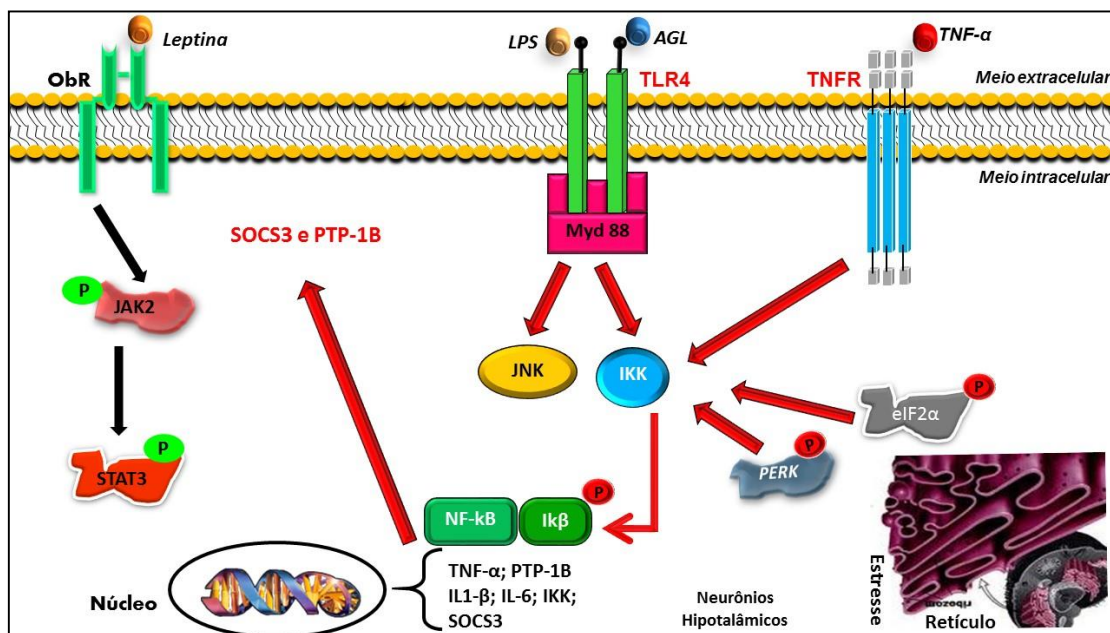


Figura 2A-2B. Vias inflamatórias e de estresse de retículo endoplasmático e seus reflexos nas vias de sinalização da insulina e leptina. Com a alimentação de uma dieta rica em ácidos graxos saturados e o aumento da síntese e liberação de TNF-α ocorre a ativação das vias inflamatórias do TLR-4, pelos ácidos graxos saturados, e do TNF-α, via a ligação do TNF-α em ao seu receptor. Quando ativadas, estas vias inflamatórias promovem a ativação de serinas quinases como a JNK e a IKK. Estas serina quinases promovem a fosforilação em serina tanto do receptor de insulina, bem como dos substratos do receptor de insulina. Além disto, a IKK ao estar ativada, desencadeia a fosforilação do Iκβ e deste modo, promove sua dissociação do fator de transcrição NFκB. Quando livre na célula, o NFκB se transloca para o núcleo e aumenta a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (IL1-β, IL-6, TNF-α) e de proteínas como a PTP-1B. Ademais, sabe-se que a

IL-6 promove a ativação da proteína STAT-3, que por sua vez, leva a um aumento de SOCS3. A SOCS3 consegue se ligar fisicamente a proteínas da via da leptina e impede que estas proteínas sejam ativadas. Por outro lado, a PTP-1B, por ser uma proteína tirosina fosfatase, desencadeia a desfosforilação das proteínas JAK2 e SOCS3, diminuindo a ativação da via da leptina e assim, sua ação inibitória sobre a fome.

A progressão do processo inflamatório sabidamente prejudica a sinalização destes hormônios (insulina e leptina), e mais do que isso, se mostra capaz de acionar mecanismos pró-apoptóticos. O consumo de dietas ricas especificamente em ácidos graxos saturados leva à ativação de apoptose em neurônios do hipotálamo, comprometendo talvez, de forma permanente, o mecanismo de controle da ingestão alimentar e gasto energético (Moraes *et al.*, 2009).

1.4. Apoptose neuronal no hipotálamo atrelado a obesidade

Apoptose ou morte celular programada é um fenômeno biológico comum a todos os organismos multicelulares. Este fenômeno pode ser retratado através de algumas características morfológicas observadas no momento em que a célula está em apoptose, sendo elas: condensação e fragmentação nuclear, deformação de membrana, fragmentação celular formando corpos apoptóticos, fagocitose da célula e ausência de resposta inflamatória subsequente. Os momentos finais, independente do motivo da morte celular, é geralmente o resultado da ativação de um conjunto de proteínas conhecidas como caspases 3, 6 e 7, também chamadas de executoras, que são proteases cisteinil aspartato específicas (*cysteinil aspartate-specific proteases*) e mediam seus efeitos por clivagem de substratos específicos na célula (Alberts, 2009).

As caspases e todos os componentes da maquinaria apoptótica, geralmente pré-existem em células saudáveis em formas inativas. A ativação destas caspases pelas caspases iniciadoras 8, 9 e 10 define as vias apoptóticas amplamente estudadas: a via intrínseca (ou mitocondrial), mediada pelas proteínas Bcl2, que contém tanto membros pró quanto anti-apoptóticos (Bax e Bcl-2, respectivamente), e a via extrínseca – dependente da ativação de receptores de morte: TNFR1 e FAS (Alberts, 2009).

A elevação dos níveis circulantes de ácidos graxos saturados, como ocorre durante o consumo de dietas com característica ocidental, ou seja, ricas em gorduras de origem animal, pode ativar vias inflamatórias e pró-apoptóticas através de diferentes mecanismos. Um desses mecanismos, ainda pouco explorado, decorre da ativação de receptores da família do TLR (Beutler, 2009; Moraes *et al.*, 2009). Como previamente descrito, no tópico anterior, os TLRs emergiram como componentes chaves na detecção

de patógenos e na indução de resposta antimicrobiana, preparando o sistema imunológico inato através da liberação de mensageiros solúveis e interações célula-célula, como previamente descritos. O patógeno mais bem descrito como ativador clássico do TLR-4, também conhecido como PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) é o LPS bacteriano. Existem também os agonistas TLRs endógenos, liberados do próprio organismo, os chamados DAMPs (*damage-associated molecular pattern*), como LDL oxidado, ácidos graxos e fibrinogênio, entre outros, os quais ao serem reconhecidos, amplificam as respostas dos TLR primariamente originadas de componentes exógenos, principalmente através de sinalização TLR-2 e 4.

Quando os ligantes encontram seus TLR específicos, há o início de uma ampla cascata de sinalização, através de várias interações e reações de fosforilação com outros adaptadores *downstream* (dependendo do TLR envolvido) que culminam na ativação do complexo proteico formado pelas proteínas IKK $\alpha/\beta/\gamma$ resultando na ativação do fator de transcrição NF- κ B. Também pode ocorrer a ativação das quinases JNK e p38. Como resultado, genes alvo inflamatórios como a COX-2 (ciclooxigenase 2) e iNOS são expressos (Pauli *et al.*, 2009; Schaffler e Scholmerich, 2010). É conhecida também a participação dos TLR na apoptose, uma vez que muitos genes envolvidos neste processo são também super regulados com a sinalização TLR. Um dos receptores da família dos *toll like* envolvidos na ativação da via de apoptose, é o TLR-4, cuja via de indução apoptótica se concentra primordialmente na via extrínseca, baseada nos receptores de morte, culminando na ativação das caspases 8 e 10, iniciadoras, e, posteriormente, na ativação da caspase executora, a caspase 3.

Evidências recentes mostram que a presença de ácidos graxos saturados no hipotálamo, como o ácido araquídico (ácido graxo saturado de 20 carbonos oriundos de dietas ricas em gordura) por via intracerebroventricular, ativa o receptor TLR-4, de maneira significativa, o que não é observado com os insaturados (Milanski *et al.*, 2009). Estudos experimentais recentes deixam claro que a dieta prevalente em gordura saturada leva à indução de apoptose em células hipotalâmicas, em regiões controladoras da fome, mais especificamente em neurônios-chave (neurônios anorexigênicos, que produzem o neuropeptídeo POMC) do núcleo arqueado e região hipotalâmica lateral, envolvidas no processo do controle alimentar e termogênese (Milanski *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2009).

O processo é mediado pelo receptor TLR-4, que no sistema nervoso central está presente em grande quantidade nas células da micróglia (monócitos diferenciados em macrófagos no sistema nervoso central) e não nos neurônios. Estas células percebem

através dos receptores *toll likes*, a presença de ácidos graxos saturados, e iniciam a sinalização que conduz à inflamação exacerbada local e promove resistência hipotalâmica à leptina e insulina, além da ativação de receptores TNFR1 em neurônios, levando à sua morte por indução primordial da via extrínseca da apoptose (Moraes *et al.*, 2009).

No entanto, este é um efeito tempo-dependente, ou seja, se o estímulo de gordura persiste, a sinalização TLR-4 pode se atenuar, como um mecanismo de controle de *feedback* negativo (Moraes *et al.*, 2009). Logo, ocorre apenas uma inflamação local modesta que passa a ser protetora, ao invés de pró-apoptótica. Experimentos em animais que não possuem TLR-4, após certo tempo sendo alimentados com dieta rica em gordura, apresentam aumento da apoptose neuronal (Moraes *et al.*, 2009). Ressalta-se que, mesmo ocorrendo esse *feedback* negativo, onde o TLR-4 passa a ser protetor, muitos neurônios já foram perdidos e com eles, o controle fino exercido pelo hipotálamo em balancear a ingestão e o gasto energético, aumentando assim, a propensão e desenvolvimento de quadros de hiperfagia, colaborando ainda mais para a obesidade. Esses resultados, ainda que obtidos em animais, são alarmantes e fortalecem a necessidade de ações urgentes em políticas preventivas em relação aos hábitos alimentares e de atividade física da população. Na figura 3, podemos ilustrar um desenho esquemático da interação das vias inflamatórias com a apoptose.

Figura 3. Vias de apoptose no hipotálamo.

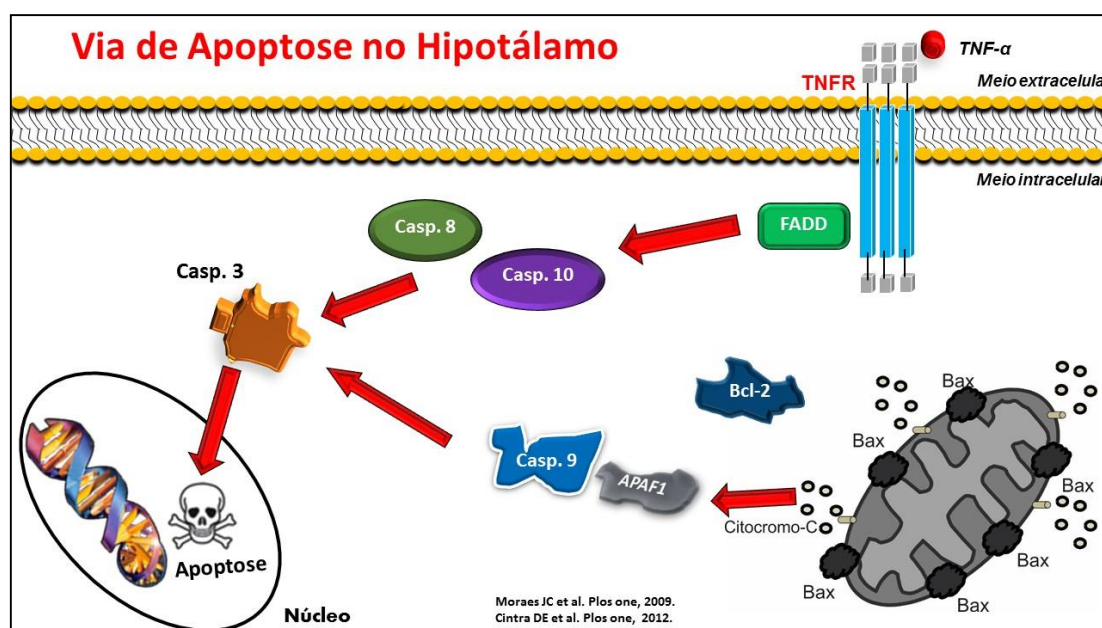


Figura 3. Vias de apoptose no hipotálamo. Sabe-se que existem duas vias principais para a ativação da apoptose, a via extrínseca e a via intrínseca. 1) via extrínseca: esta via pode ser ativada pelo processo inflamatório, como por exemplo na presença de TNF- α . Ao ativar o seu receptor, o TNF- α promove a atração e ativação do fator de associação de domínio de morte, o FADD. O FADD quando ativado consegue ativar as caspases efetoras, Caspase 8 e Caspase 10. Estas caspases, por sua vez, desencadeiam a ativação da caspase executora, a Caspase 3, responsável por ativar o processo apoptótico. 2) via intrínseca: quando há um aumento da expressão de Bax em relação a Bcl-2, ocorre um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial para a liberação e passagem de citocromos-C. Esta liberação de citocromos-C, quando em excesso, promove a associação das proteínas APAF1/Caspase9. Deste modo, também há uma sinalização para que se inicie o processo de apoptose.

Assim, a inflamação instalada no hipotálamo decorrente do ganho excessivo de massa adiposa corporal abre caminhos para perturbações na correta sinalização de neurônios altamente especializados nos diferentes núcleos controladores dos processos de fome e termogênese, prejudicando a sinalização de leptina e insulina, que trazem sinais adipostáticos e anorexigênicos da periferia para o sistema nervoso central, prejudicando assim a resposta adequada após a ingestão alimentar. Além disso, a inflamação pode ainda conduzir a respostas ainda mais críticas, como a apoptose neuronal. Nesse momento, um déficit neuronal pode ter representações definitivas sobre o fino controle na resposta da insulina e leptina. Por outro lado, o exercício físico tem se mostrado como uma ferramenta capaz de atenuar a inflamação em tecidos periféricos como músculo esquelético e fígado (Ropelle *et al.*, 2006; Schenk e Horowitz, 2007; Lima *et al.*, 2009; De Souza *et al.*, 2010). No entanto, teria o exercício físico capacidade de atuar positivamente protegendo ou

reduzindo a inflamação e a apoptose em células neuronais envolvidas no controle da fome e termogênese em animais obesos?

1.5. Treinamento físico aeróbio no controle da ingestão alimentar

Muito se tem estudado e tentado estabelecer uma compreensão sobre como ocorre a fina regulação entre o balanço energético e o controle da massa corporal. Apesar dos benefícios à saúde proporcionados pelos exercícios físicos estarem bem documentados, o impacto sobre a diminuição da massa adiposa e controle da ingestão alimentar ainda é controversa e necessita de maiores investigações, principalmente, no que tange as vias biomoleculares de regulação da fome/saciedade e da sinalização dos hormônios que regulam estes dois fenômenos, destacando neste sentido o papel da insulina e da leptina neste contexto.

Um dos primeiros estudos que analisou o efeito do exercício físico na modulação do balanço energético, foi o estudo de Monda e cols. de 1993 (Monda *et al.*, 1993). Neste estudo, Monda e colaboradores avaliaram a influência do exercício físico em ratos que tiveram a indução de obesidade devido a lesão na área do hipotálamo ventromedial (VMH). A lesão da área ventromedial do hipotálamo promove aumento da ingestão alimentar, declínio do metabolismo de repouso, da atividade motora, além de desencadear hiperinsulinemia e diminuição da atividade do sistema nervoso simpático, por isto a utilização deste tipo de lesão para a indução da obesidade. Monda e colaboradores observaram que mesmo depois de 21 dias de natação consecutivos, nos quais os animais nadaram por 30 min por dia, sem sobrecarga adicional, este protocolo não foi suficiente para reverter a obesidade causada pela lesão no VMH, apesar do aumento do gasto energético provocado pelo treinamento físico (Monda *et al.*, 1993).

Posteriormente, em 2005, Bi *et al.* ao estudar ratos Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF), linhagem esta que apresenta ausência do receptor de colecistoquinina A, e, possui fenótipo de obesidade, hiperfagia e diabetes, evidenciaram que os ratos OLETF expostos a roda de atividade por 12 semanas, podendo realizar exercícios físicos voluntariamente, apresentaram redução da ingestão alimentar, redução dos níveis de glicemia e leptinemia, quando comparados aos seus pares OLETF sedentários, revelando um papel importante do exercício físico em modular a ingestão alimentar e seu papel no tratamento da obesidade e diabetes (Bi *et al.*, 2005).

Contudo, apenas com o aprimoramento das técnicas de estudo de biologia molecular é que foi possível se iniciar um melhor entendimento sobre como o exercício

físico promove a modulação dos circuitos hipotalâmicos de controle da fome/saciedade e do gasto energético. Estudos recentes puderam observar que o exercício físico altera a expressão e/ou a atividade das proteínas envolvidas na transdução do sinal da insulina em hipotálamo após estímulo com leptina, ou insulina, em ratos submetidos a uma sessão aguda de exercício de natação (Ropelle *et al.*, 2010; Chiarreotto-Ropelle *et al.*, 2013). As infusões intracerebroventriculares de leptina ou insulina reduziram a ingestão alimentar nos ratos exercitados de forma mais acentuada do que se observou nos animais sedentários. Tanto a leptina, quanto a insulina, estimulou a fosforilação das proteínas IRS-1/2, assim como as associações destes substratos com a fosfatidil inositol 3 quinase (PI3k). Observou-se também, que a fosforilação hipotalâmica da Akt estava menor nos animais sedentários se comparados aos exercitados (Ropelle *et al.*, 2010; Chiarreotto-Ropelle *et al.*, 2013). Esses dados dão suporte à hipótese de que o exercício físico pode ter suas ações supressoras do apetite mediadas pela via hipotalâmica da PI3k.

Além disso, evidências científicas documentam que a IL-6 produzida no exercício é capaz de atuar como um sensor de demanda energética no músculo e possivelmente, também possa atuar em vias de sinalização no cérebro envolvida na homeostase energética. Quando ratos obesos foram pré-tratados com anticorpo anti-IL-6, os efeitos anorexigênicos da insulina e leptina administrada intracerebrovetricular não foram detectados. Desse modo, parece evidente que o exercício físico aumenta a sensibilidade à leptina e insulina no hipotálamo e isso, possivelmente, deve ocorrer, no mínimo em parte, pela produção de IL-6.

Outro ponto que também é observado a partir do aumento da produção da IL-6 induzida pelo exercício físico, é a sua ação de desencadear a síntese e liberação de outra citocina, a interleucina-10 (IL-10), de caráter anti-inflamatória. A IL-10 é considerada uma importante citocina imunorreguladora, classicamente anti-inflamatória com múltiplos efeitos biológicos (De Souza *et al.*, 2005; Ropelle *et al.*, 2010). De maneira interessante, o exercício físico através do aumento das citocinas IL-6 e IL10 podem reorganizar a ingestão alimentar e favorecer o equilíbrio de energia através da resposta anti-inflamatória nos neurônios do hipotálamo. Coletivamente, IL-6 e IL-10 são importantes interleucinas que contribuem para a ação central da insulina e leptina mediada pelo exercício (Ropelle *et al.*, 2010). O aumento de IL-10 por sua vez tem efeito supressor sobre o NFκB, atenuando a inflamação (Schottelius *et al.*, 1999). Em relação ao processo apoptótico foram poucos estudos que avaliaram o efeito do treinamento físico sobre este fenômeno. No entanto, aqueles que fizeram não foram direcionados ao

hipotálamo (Kim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013; Paula *et al.*, 2015). Tecidos como coração, pâncreas e hipocampo tiveram aumento na ativação de vias apoptóticas em resposta a oferta da dieta hiperlipídica, indução farmacológica ou após lesão cerebral traumática, respectivamente. Ao contrário o exercício físico foi capaz de atenuar esse processo nos respectivos tecidos nos animais (Kim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013; Paula *et al.*, 2015).

Além destas observações em modelos animais, Thivel e colaboradores demonstraram que apenas uma sessão de exercício físico é capaz de produzir um efeito sobre a ingestão alimentar em adolescentes obesos. Os autores observaram que o exercício físico de moderada a alta intensidade (75% $VO_{2máx}$) produz respostas positivas para o controle da ingestão alimentar nesta população. Os adolescentes obesos que realizaram exercício físico a 75% do $VO_{2máx}$ apresentaram redução da ingestão alimentar tanto no almoço, como no jantar, quando comparados aos seus pares sedentários e aos indivíduos obesos que realizaram exercício físico agudo de baixa intensidade (40% do $VO_{2máx}$) (Thivel *et al.*, 2012).

Uma das hipóteses para a melhora da sinalização da insulina está ilustrado nos estudos que identificaram que exercício físico está relacionado com a redução do processo inflamatório em tecidos periféricos. Animais obesos submetidos a uma sessão aguda de exercício de natação tiveram a expressão das proteínas IKK, JNK, PTP1B e iNOS diminuída no músculo esquelético em relação aos animais não exercitados (Ropelle *et al.*, 2006; Pauli *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2010; Pauli *et al.*, 2010). Tal descoberta é um indicativo de que o exercício físico talvez possa modular o processo inflamatório e reduzir o processo apoptótico em neurônios hipotalâmicos de animais obesos induzidos por dieta rica em gordura.

Cabe agora, investigar se o treinamento físico é capaz de prevenir, retardar ou reverter o processo inflamatório. Ademais avaliar, principalmente, se o exercício físico aeróbio de intensidade moderada é capaz de regular o processo de apoptose em células neuronais com papel crucial no controle da ingestão alimentar e na termogênese.

A realização deste estudo se justifica ao observarmos o quão prevalente está a obesidade e suas co-morbidades no mundo atual, gerando aumento de gastos públicos para os cuidados e tratamentos destas doenças. Além disto, este estudo tem como intuito descrever e entender melhor sobre como o exercício físico pode atuar sobre a obesidade, principalmente no que diz respeito ao controle da ingestão alimentar pelo hipotálamo, de modo a elucidarmos como ele pode ser utilizado como uma ferramenta não farmacológica para o tratamento desta doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar o papel do treinamento físico aeróbio sobre os mecanismos moleculares de inflamação, estresse de retículo endoplasmático e apoptose em neurônios hipotalâmicos de camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica.

2.2. Específicos

Dentre os objetivos específicos do presente estudo, primariamente, buscou-se através de ferramenta de bioinformática analisar as correlações entre biomoléculas relacionadas a via inflamatória com as moléculas inerentes às vias de apoptose. Assim o primeiro objetivo foi:

1. Analisar através de ferramenta de bioinformática as correlações entre a via de sinalização inflamatória e de apoptose.

A seguir, procurou-se investigar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico sobre diferentes variáveis da composição corporal, do metabolismo e de biologia molecular nos diferentes grupos experimentais, conforme descrito a seguir:

2. Avaliar variáveis da composição corporal (massa corporal total, comprimento, Índice de Lee e massa de tecido adiposo epididimal); metabólicas (insulinemia de jejum, glicemia de jejum e sensibilidade à insulina); do perfil lipídico (colesterol total, LDL, HDL e triacilglicerol) nos animais dos grupos experimentais;

3. Investigar o comportamento da ingestão alimentar em 12h após estímulo com leptina, durante o ciclo escuro (das 18h até 6h da manhã);

4. Mensurar o conteúdo e fosforilação das proteínas da via de sinalização da leptina (JAK2/STAT3) e das proteínas da via da insulina, que a leptina também consegue modular (IRS1 e IRS2) no hipotálamo;

5. Verificar a sinalização de proteínas envolvidas nas vias inflamatórias (JNK, IKK, SOCS3, IL1- β , IL-6, TNF- α , TLR4) por meio de imunoblots e imunoprecipitação, bem como a marcação da proteína F4/80, presente na superfície de macrófagos ativados, através de imunofluorescência no hipotálamo;

5. Mensurar o conteúdo e a fosforilação das proteínas mediadoras do estresse de retículo endoplasmático (PERK e eIF2 α) no hipotálamo;

6. Avaliar a fragmentação de DNA pela técnica de Túnel, e o conteúdo proteico e associação das proteínas das vias pró-apoptóticas, Bad, Bax, Caspase 3, Caspase 8, FADD, Caspase 9, APAF1 e PARP1, por imunoblot e imunoprecipitação, no hipotálamo.
7. Estimar o conteúdo da proteína anti-apoptótica, Bcl2, no hipotálamo;
8. Avaliar a expressão de RNAm dos neuropeptídeos POMC e NPY no hipotálamo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido em duas diferentes etapas de pesquisa. Com intuito de facilitar o entendimento do leitor, as etapas estão apresentadas separadamente, como descritas a seguir.

3.1. ETAPA EXPERIMENTAL 1

3.1.1. Análise de bioinformática

Foram utilizados os valores de expressão relativa de RNAm de hipotálamo das bases de dados de linhagens isogênicas de camundongos BXD (n=50), conforme previamente publicado por (Andreux *et al.*, 2012). Esses dados foram analisados utilizando o sistema de análise *Genenetwork*, as análises de correlação foram realizadas utilizando programa *PrismGraph* versão 5.0 e a análise de *Heat map* foi feita utilizando o *software Gene E*. A partir das informações coletadas neste sistema os próximos experimentos foram realizados como descritos a seguir.

3.2. ETAPA EXPERIMENTAL 2

3.2.1. Desenho experimental

Foram utilizados camundongos *Swiss* com 1 mês de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno individuais sob condições controladas de ciclo claro-escuro (12/12h), (luz ligada às 06:00h e desligada às 18:00h), temperatura controlada em 22 ± 2 °C, humidade relativa mantida em 45–55% e, ruídos no local inferiores a 85 decibéis. Foram utilizadas lâmpada de 100 W durante o período claro do dia (Phillips® soft white light; 2700 K; 565-590 nm; 60 lux). Os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes brasileiras para a prática e utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA) definidas pelo ministério da ciência, tecnologia e inovação e conselho nacional de controle de experimentação animal – CONCEA. O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela comissão de ética para uso de animais, sob o número de protocolo 2805-1.

Os animais tiveram livre acesso a água e ração convencional, ou dieta hiperlipídica (DHL) e hipercalórica. Esta DHL tem sido previamente utilizada (De Souza *et al.*, 2005; Pauli *et al.*, 2008) sendo adaptada e estruturada a partir de uma dieta padrão para roedores proposta pelo *American Institute of Nutrition* (AIN). Esta dieta hiperlipídica contém 35% de lipídios, sendo 4% oriundos do óleo de soja e os outros 31% de gordura

suína (banha). Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Controle (C, n=15), animais que receberam dieta padrão por 8 semanas; Obeso Sedentário (OB, n=15), animais que receberam dieta hiperlipídica (DHL) por 8 semanas; Obeso Treinado (OBT, n=15), animais alimentados durante 8 semanas a DHL, entretanto, durante este mesmo período eles também foram submetidos a um protocolo de treinamento físico. Segue-se abaixo, na figura 4, o desenho experimental proposto.

Figura 4. Desenho experimental

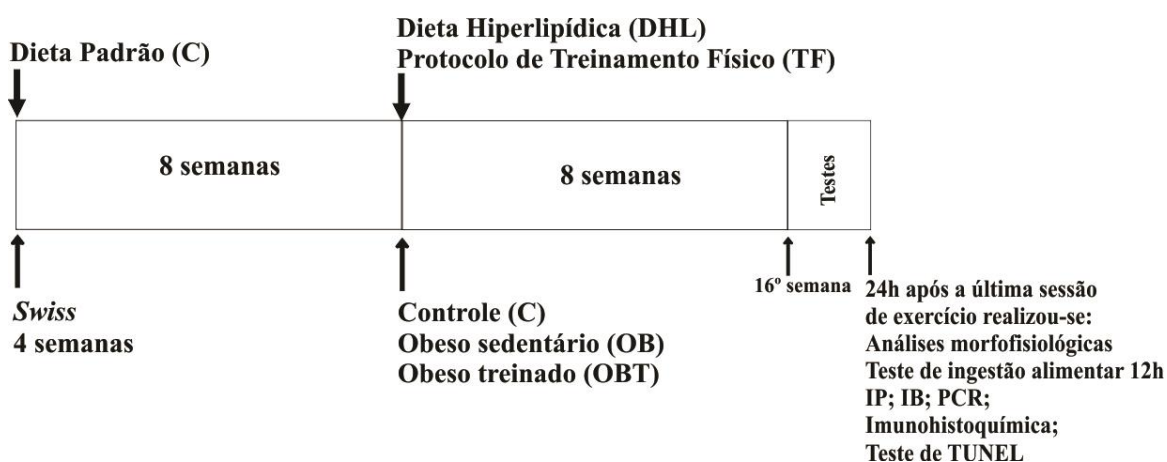


Figura 4. Desenho Experimental. Para as avaliações morfofisiológicas e para o teste de ingestão alimentar de 12h, utilizou-se n=15 para todos os grupos experimentais. Para as demais análises, houve uma distribuição do n=15, visando um melhor aproveitamento dos animais. Para as análises de imunoblot (IB) e imunoprecipitação (IP), utilizou-se um n=5 para cada grupo experimental. Na análise de q-PCR-RT (PCR) também foram utilizados 5 animais para cada grupo experimental. E, por fim, para as análises histológicas (Imunohistoquímica e Teste de Tunel) cada grupo experimental foi composto por 5 animais.

3.2.2. Teste de Carga Incremental

Os animais foram adaptados ao exercício em esteira rolante durante 5 dias, 10min/dia na velocidade de 3m/min, conforme padronizado por Ferreira e colaboradores (Ferreira *et al.*, 2007). O teste de carga incremental foi iniciado na velocidade de 6m/min, com 0% de inclinação e incrementos de 3m/min a cada 3 minutos até a exaustão voluntária dos camundongos, que ocorreu quando os mesmos encostaram 5 vezes no final da esteira no intervalo de 1min. A potência máxima (P_{máx}), definida como a velocidade (m/min) de exaustão do animal, foi utilizada para a prescrição de intensidade no protocolo de treinamento aeróbio. A esteira utilizada teve seu sistema de choque desligado. Animais

de todos os grupos que não se adaptaram a esse processo foram excluídos do treinamento. Desse modo, permaneceram no experimento todos aqueles que conseguiram realizar o teste. Não havendo distribuição de animais não corredores em nenhum grupo. O teste de carga incremental foi realizado no início (semana 0), na quarta semana (semana 4) e ao final da última semana (semana 8) de treinamento. A aplicação do teste na quarta semana teve como objetivo ajustar a carga de acordo com as adaptações do animal no período de treinamento e a última, avaliar se o treinamento foi eficiente em melhorar o desempenho dos animais.

3.2.3. Protocolo de treinamento físico

O protocolo de treinamento físico aeróbio foi baseado no estudo de Ferreira *et al.* (Ferreira *et al.*, 2007). As sessões foram realizadas sempre ao final da tarde (início as 18:00 horas). Considerando que este horário coincide com o ciclo de vigília e, portanto, mais ativo do animal.

O treinamento aeróbio foi composto por 8 semanas divididas em duas fases: Fase 1 (F1) - composta por 4 semanas em que o volume foi aumentado gradativamente; Fase 2 (F2) - o volume da última semana da F1 foi mantido pelas próximas 4 semanas. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso. Na tabela 1 é possível verificar as características de intensidade, volume, frequência, inclinação e intervalo entre as sessões do protocolo de treinamento.

Tabela 1. Protocolo de Treinamento Físico Aeróbio

<i>Semana de experimento</i>	<i>Fase do treinamento</i>	<i>Intensidade (%P_{max})*</i>	<i>Volume (min)</i>	<i>Sessões diárias</i>	<i>Inclinação (%)</i>	<i>Intervalo entre as sessões (h)</i>
1	F1	60	15	1	0	24
2	F1	60	30	1	0	24
3	F1	60	45	1	0	24
4	F1	60	60	1	0	24
5-8	F2	60	60	1	0	24

*P_{máx}, potência máxima.

3.2.4. Avaliação de parâmetros da composição corporal e metabólicos

Os camundongos foram avaliados semanalmente quanto à variação da massa corporal, através de balança analítica (Gehaka – BK 3000II, São Paulo - Brasil). O

comprimento dos animais foi avaliado no último dia de experimento, a partir da medida da distância naso-anal dos animais. A partir dos resultados de massa corporal final e de comprimento, seguiu-se o cálculo do Índice de Lee, utilizando a fórmula da razão entre a raiz cúbica da massa corporal e o comprimento dos animais, multiplicado por 10 (De Oliveira *et al.*, 2014).

3.2.5. *Teste de tolerância à insulina intraperitoneal*

No final do período experimental foi realizado o teste de tolerância à insulina intraperitoneal. Através de corte na extremidade da cauda do animal, foi realizada uma primeira coleta de sangue para a dosagem de glicemia equivalente ao tempo zero (t_0) do teste. Após isso, 1,5 U/kg de massa corporal de insulina (*Humulin R*) proveniente da *Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA)* foram injetadas intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas através da extremidade da cauda dos animais nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min para a determinação do comportamento da glicemia nestes tempos. A velocidade da constante do decremento da glicose (kITT) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose durante a fase de decaimento linear (Bonora *et al.*, 1989). A concentração de glicose foi determinada através da utilização de glicosímetro (*Advantage, Boehringer Mannheim, USA*).

3.2.6. *Investigação da ingestão alimentar de 12 horas após estímulo com leptina.*

Os camundongos foram privados de alimento por 12 horas (das 06:00h às 18:00h), mantendo acesso livre à água. Após este período, às 18:00 horas receberam injeção intraperitoneal (ip.) de leptina (10 μ l/g, 10^{-6} M) ou salina (10 μ l/g). Para a análise da ingestão alimentar, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas (modelo insight, EB 309) por 4 dias, para se adaptarem ao ambiente novo e minimizar o estresse. E, no quinto dia, após estímulo com salina ou leptina foi avaliado o consumo de ração no período de 12 horas (Moraes *et al.*, 2009; Ropelle *et al.*, 2010).

3.2.7. *Eutanásia, coleta de sangue e extração do hipotálamo e tecido adiposo branco*

Para os experimentos a seguir, os animais foram privados de alimentos por 6 horas. Os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de ketamina/diazepam na dose de 50/5 mg/kg e o controle da anestesia foi avaliado através

da perda dos reflexos das patas e da córnea. Posteriormente, a cavidade abdominal foi aberta e após a localização da veia cava inferior, amostras de sangue dos animais foram coletadas através de seringa de 1mL. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3.500 rpm, em centrífuga refrigerada *Eppendorf*, por 15 min e, o soro foi armazenado em freezer a -80°C para posterior determinação das concentrações de insulina e leptina através do método imunoensaio enzimático (ELISA), utilizando-se kits comerciais (*BioSource®*, *Camarillo, USA*). O perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e triacilglicerol) foi analisado por kits enzimáticos específicos (*LaborLab®*, São Paulo, Brasil).

O hipotálamo dos animais foi retirado e homogeneizado em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado a 12000 rpm durante 15 min. No sobrenadante, foi determinada a concentração de proteínas utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976) e posteriormente foi realizada a determinação do extrato total e o ensaio de imunoprecipitação com anticorpo específico. O tecido adiposo epididimal foi extraído e sua massa foi avaliada em balança de precisão.

3.2.8. *Imunoprecipitação*

Após determinação da concentração das proteínas, foi realizada a imunoprecipitação com anticorpo específico. Após incubação, os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A *Sepharose* 6 MB durante 2h a 4°C e decantados por centrifugação (11000 rpm) durante 20 minutos, também a 4°C. O precipitado foi lavado 3 vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem (2mM ortovanadato de sódio, 100mM Tris HCl; 1mM EDTA; 0,5% Triton X-100). O sobrenadante foi descartado, ficando-se apenas com as proteínas precipitadas (imunocomplexos) (De Souza *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2009).

3.2.9. *Imunoblot*

Os imunocomplexos foram ressuspenso em tampão de Laemmli, contendo 100mmol/L de DTT. Após rápida fervura, foram aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da *Bio-Rad*. A membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com anticorpo específico. A ligação

de anticorpo com proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10mmol/L de Tris; 150mmol/L de NaCl; 0,02% de Tween 20) por 1 hora. Após incubação com anticorpo primário para a proteína de interesse, foi realizada a incubação com anticorpo secundário conjugado a enzima HRP peroxidase em temperatura ambiente e, posteriormente, procedeu-se a revelação com exposição a filmes de RX Kodak. As bandas identificadas através da auto-radiografia foram quantificadas utilizando-se a densitometria óptica pelo programa *Un-Scan-it gel 6.1* (*Silk Scientific Corporation, USA*) (De Souza *et al.*, 2005; Ropelle *et al.*, 2008).

3.2.10. Extração nuclear

A expressão nuclear da proteína STAT3 foi obtida através de fragmentos do tecido hipotalâmico de animais não tratados e tratados 15 minutos antes com injeção de leptina intraperitoneal (ip.). Os fragmentos do hipotálamo foram homogeneizados em 2 vol. de tampão STE (0.32 M sacarose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM fluoreto de sódio, 100 mM pirofosfato de sódio, 10 mM ortovanadato de sódio, 1 mM PMSF, e 0.1 mg aprotinina/ml) a 4 °C, utilizando o Polytron homogeneizador. O homogenato foi centrifugado (1,000xg, 25 min, 4°C) para a obtenção dos *pellets*. Os *pellets* foram lavados uma vez e suspensos em tampão STE (fração nuclear). A fração nuclear foi solubilizada em tampão Triton [1% (v/v) Triton X-100/150 mM NaCl/10 mM Tris/HCl (pH 7,4)/1 mM EGTA/1 mM EDTA/0.2 mM ortovanadato de sódio /20 µM leupeptina A/0,2 mM PMSF/50 mM NaF/0.4 nM microcistina LR]. A fração foi centrifugada (15,000 g, 30 min, 4 °C), e o sobrenadante (extrato nuclear) foi armazenado a -80 °C. (Ropelle *et al.*, 2010). Em seguida foi utilizada a técnica de imunoblot para análise da expressão nuclear de STAT3 no hipotálamo.

3.2.11. Reagentes e anticorpos

Os reagentes e os aparelhos para o gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram provenientes da *Bio-Rad* (*Richmond, CA*). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, ditiotreitól (DTT), paraformaldeído da *Sigma Chemical Co.* (*St. Louis, MO*). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2µm) de *Schleicher & Schuell*. Os anticorpos utilizados foram anti-JAK2, anti-p-JAK2, anti-STAT3, anti-p-STAT3, anti-beta-Actin, anti-alfa-Tubulina, anti-SOCS3, anti-PARP1, anti-Bcl2, anti-Bax, anti-APAF1, anti-FADD, anti-Caspase 8,

anti-Caspase 9, anti-p-PERK, anti-PERK, anti-eIF2 α , anti-p-eIF2 α , anti-TLR-4, anti-Myd88, anti-TNF- α , anti-IL1- β , anti-IL-6, anti-JNK, anti-p-JNK, anti-p-IKK, anti-IKK da *Cell Signaling Technology, Inc. (USA)* e da Santa Cruz Biotecnologia.

3.2.12. Imunohistoquímica

Após perfusão com paraformaldeído a 10%, o hipotálamo foi extraído e mantido também em paraformol a 10%, por 24 horas. Posteriormente, para desidratação do tecido, o órgão foi processado com álcool em crescentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100%), xilol para diafanização, e parafina. Blocos de parafina foram constituídos. Posteriormente foram seccionados em micrótomo Olympus®, em cortes de 5,0 μ m e fixados em lâminas de microscopia. Após este procedimento, os cortes foram submetidos a marcação simples usando anticorpo F4/80 de acordo com protocolo previamente descrito (Torsoni *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2004; Moraes *et al.*, 2009). A Análise e documentação dos resultados foram realizadas utilizando o microscópio de imunofluorescência Leica FW4500B. A avaliação semi-quantitativa foi alcançada por contagem do número de células positivamente coradas, as quais foram contadas no núcleo arqueado e hipotálamo lateral, locais de coloração predominante dos anticorpos utilizados. Campos de dimensões iguais foram utilizados para delimitar a contagem, sempre em aumento de 200x ou magnificações de 100x.

3.2.13. TUNEL (*Terminal Deoxynucleotide Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling*)

Secções hipotalâmicas dos camundongos foram incluídas em parafina de acordo com o método previamente descrito (Torsoni *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2004; Moraes *et al.*, 2009). Após os processos de desparafinização e hidratação, os cortes foram lavados, colocados em câmara fechada e incubados com PBS 0,1M em pH 7,4 por 30 min em banho-maria a 37° C. Após, o PBS ser removido, as lâminas foram incubadas com proteinase K (uma parte de proteinase K para 24 partes de PBS) por 15-30 min a 37° C. Após, a reação da proteinase K ser interrompida com a lavagem das secções com PBS por 4x de 2 minutos, as lâminas então foram incubadas com 50 μ l por secção com TdT buffer por 5-10 min. Depois, são incubadas com 50 μ l do coquetel *TdT end-labeling* (TdT buffer, Biotina-dUTP e TdT na proporção de 90:5:5, respectivamente) por 60 min a 37° C. A seguir, as lâminas foram imergidas em TB buffer (*Tris borate buffer*) (1 parte de TB

buffer 10x com 9 partes de água destilada) por 5 min, em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS 4x de 2 min. Após a lavagem, foi aplicado 50 µl de *Blocking Solution* (uma parte de *blocking solution* com 3 partes de PBS) por 20 min em temperatura ambiente. Então, as lâminas foram incubadas com 50 µl de avidina-FITC (1 parte de avidina com 9 partes de *blocking buffer* previamente preparado) por 30 min no escuro a 37° C. As secções foram então lavadas por 2x de 15 min. no escuro e em temperatura ambiente. As lâminas então foram contracoradas com iodeto de propídeo em baixa concentração e posteriormente montadas com as lamínulas e esmalte. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência Leica FW4500 B. As células positivas foram expressas em % das células totais por campo.

3.2.14. *qPCR-RT mRNA*

A quantificação do mRNA dos neuropeptídeos orexígeno NPY e o anorexígeno POMC foram determinados por PCR em tempo real. Para tanto, as amostras de hipotálamo foram extraídas e preparadas através da homogeneização em Trizol e o RNA total foi isolado de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 3000 ng de RNA total foi utilizada para a síntese de cDNA com sistema de pré-amplificação *Superscript* (Life Technologies). Os *primers* usados foram adquiridos da Life Technologies.

3.2.15. *Análise estatística*

Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. O teste *Shapiro-Wilk's* foi aplicado para analisar a distribuição normal dos dados e, a homogeneidade foi confirmada pelo teste de Levene. Para a comparação entre os grupos experimentais foi utilizado o teste t de *Student*, quando comparou-se apenas dois grupos, e a análise de variância (ANOVA) *two-way*, seguida do teste *post hoc* de Tukey quando comparado mais de dois grupos. Quando necessário, aplicou-se o teste de ANOVA *one-way* para medidas repetidas, para avaliar o efeito do protocolo de treinamento físico sobre os resultados dos testes de desempenho (velocidade da P_{máx} e distância percorrida durante os testes). Foi adotado o nível de significância $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *PrismGraph* versão 5.0.

4. RESULTADOS

Para nortear os experimentos do presente estudo, foi utilizada a ferramenta de bioinformática para determinar a relação entre a sinalização inflamatória e apoptótica em células hipotalâmicas. Deste modo, utilizou-se uma base de dados de linhagens isogênicas de camundongos BXD (n=50), como previamente publicado (Andreux *et al.*, 2012). Essa análise de bioinformática revelou forte correlação positiva entre os níveis de RNAm de TNF (*Tnf*) com outros marcadores inflamatórios como *Traf1*, *Traf5* e *Il1r2* (Fig. 1A). Além disso, essa análise demonstrou correlação positiva entre os níveis de RNAm de *Tnf* com marcadores de apoptose como *Bad*, *Casp14* e *Card14* (Fig. 1A). De forma interessante, observa-se que as linhagens isogênicas com baixos níveis de RNAm de *Tnf* apresentaram um baixo *milieu* de marcadores apoptóticos, conforme demonstrado no gráfico de *Heat map* (Fig. 1B), sugerindo fortemente que a sinalização inflamatória está envolvida com a apoptose em hipotálamo de camundongos. Desse modo, deu-se seguimento as demais etapas de pesquisa, sendo a hipótese inicial do presente trabalho confirmada de que aumento nos níveis de proteínas inflamatórias, especialmente TNF está associado com ativação de proteínas de vias de apoptose.

Figura 5. Análise de bioinformática da relação entre as vias inflamatórias e de apoptose.

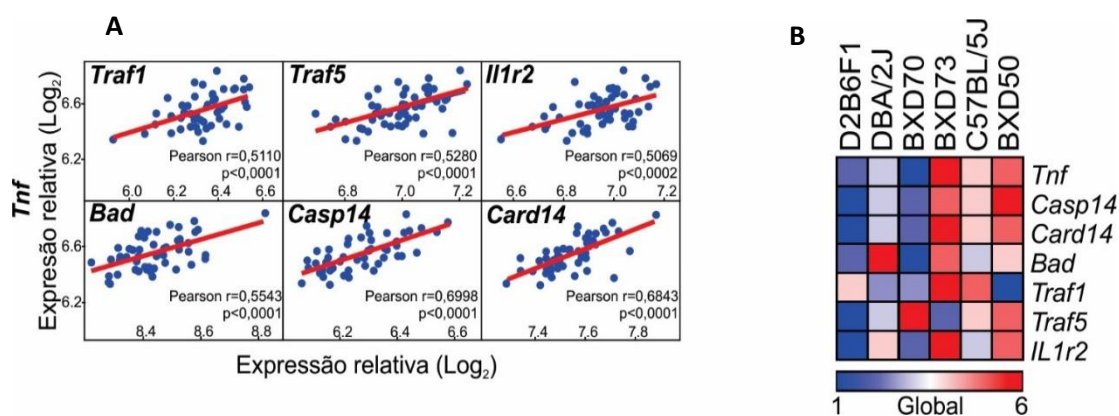


Figura 5. Análise de correlação entre os níveis hipotalâmicos de RNAm de *Tnf* e marcadores inflamatórios e de apoptose em linhagens de camundongos BXD (n=50) (**5A**). Foi utilizada a correlação de Pearson $r>0,05$ e $p<0,002$. O gráfico de *Heat map* foi realizado com 6 diferentes linhagens de camundongos BXD, utilizando o software *Gene E* (**5B**).

Após o período experimental e a aplicação do protocolo de treinamento físico com os animais obesos treinados, pode-se demonstrar, a partir dos resultados expressos na figura 6, coletados nos testes incrementais, que o protocolo de treinamento físico foi capaz de induzir melhora no desempenho dos animais treinados. Nota-se um aumento, tanto na velocidade máxima de corrida, quanto na distância total percorrida pelos animais durante o teste realizado ao final da oitava semana de treinamento (Figura 6).

Figura 6. Parâmetros de desempenho no teste de corrida em esteira.

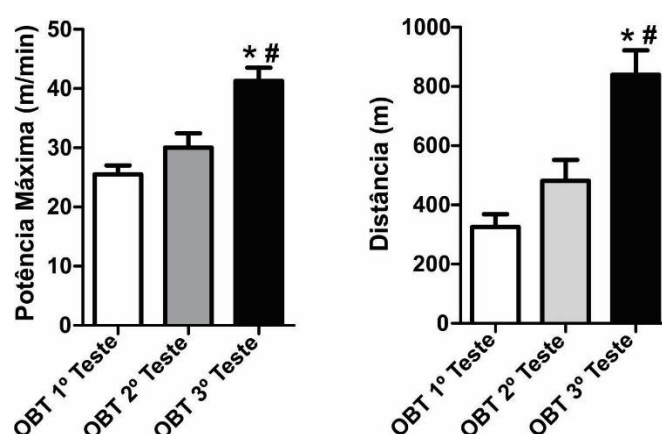


Figura 6. Parâmetros de desempenho avaliados no teste incremental de velocidade de corrida em esteira no grupo OBT, grupo obeso induzido por DHL ofertada por 8 semanas e concomitantemente submetidos ao protocolo de treinamento físico (n=15). Dados referentes às médias e erro padrão do grupo OBT nos diferentes períodos de avaliação. *diferente da P_{máx} e distância percorrida inicial e #diferente da P_{máx} e distância percorrida da quarta semana, p<0.05. P_{máx}, potência máxima de corrida.

Na Tabela 2, foram descritos os resultados referentes as variáveis da composição corporal e metabólicos dos diferentes grupos experimentais. Pode-se notar que os animais obesos sedentários (OB) apresentaram maior aumento da massa corporal do que os animais controles magros (C). Verifica-se que o grupo OBT teve um menor aumento da massa corporal total quando comparado ao grupo OB (Tabela 2). Nota-se que os valores iniciais de massa corporal eram muito similares entre os grupos. Resultados similares foram encontrados para o índice de Lee e gordura epididimal. O comprimento dos animais não diferiu entre os grupos.

Em relação aos parâmetros metabólicos, observa-se que a glicemia de jejum no grupo de animais obesos sedentários (OB) foi maior em relação ao grupo de animais controle (C). Ao contrário, verifica-se que os animais submetidos ao protocolo de treinamento físico (OBT) apresentaram redução da glicemia de jejum se comparado aos animais obesos sedentários (OB) (Tabela 2). A insulinemia dos animais obesos

sedentários também foi maior em relação ao grupo controle. Este parâmetro foi reduzido nos animais treinados (Tabela 2).

Na análise da sensibilidade à insulina obtida através do teste de tolerância à insulina intraperitoneal, nota-se que a taxa de decaimento da glicose (kITT) foi menor no grupo de animais obesos sedentários (OB) se comparado aos animais controles (C). Por outro lado, o treinamento físico crônico foi capaz de aumentar a sensibilidade à insulina (tabela 2).

Tabela 2. Variáveis da composição corporal e metabólicas

Variáveis	C	OB	OBT
Massa Corporal Inicial (g)	27,4 ± 0,6	27,9 ± 0,8	28,0 ± 1,1
Massa Corporal Final (g)	38,1 ± 0,9	54,3 ± 1,3*	45,9 ± 1,2*#
Ganho de Massa Corporal (g)	10,7 ± 1,1	26,4 ± 1,2*	17,9 ± 10,9*#
Comprimento (cm)	11,5 ± 0,6	11,8 ± 0,8	11,6 ± 0,5
Índice de Lee	2,9 ± 0,2	3,2 ± 0,2*	3,1 ± 0,2
Gordura epididimal (mg)	337,9 ± 29,0	497,9 ± 26,3*	366,4 ± 32,9#
Glicemia de jejum (mg/dL)	119,3 ± 5,9	276,6 ± 12,1*	177,1 ± 10,9*#
Insulinemia de jejum (ng/mL)	1,7 ± 0,3	5,3 ± 0,7*	2,5 ± 0,6*#
kITT (% min)	4,4 ± 0,4	2,3 ± 0,5*	3,6 ± 0,4*#

Tabela 2. Variáveis da composição corporal dos grupos: C, controle; OB, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica (DHL) ofertada por 8 semanas; OBT, grupo obeso induzido por DHL ofertada por 8 semanas e concomitantemente ao protocolo de treinamento físico (n=15 por grupo). *diferente do grupo Controle; #diferente do grupo OB.

Na tabela 3, estão descritos os valores das variáveis de perfil lipídico analisadas nos diferentes grupos experimentais. Verifica-se que os animais do grupo OB apresentaram aumento do nível de colesterol total e de LDL, quando comparados aos animais do grupo Controle (C). Em direção oposta, observa-se que o treinamento físico, grupo OBT, foi eficiente em reduzir a concentração desses dois parâmetros, quando comparou-se os animais obesos treinados aos seus pares sedentários. Para as demais variáveis do perfil lipídico (triacilgliceróis e HDL) não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Tabela 3. Variáveis do perfil lipídico.

Variáveis	C	OB	OBT
Colesterol Total (mg/dL)	98,3 ± 3,2	145,2 ± 4,1*	122,4 ± 2,8 [#]
Triacilglicerol (mg/dL)	66,0 ± 16	91,2 ± 21	73,4 ± 18,0
HDL (mg/dL)	75 ± 4,0	72,0 ± 5,0	77,0 ± 5,0
LDL (mg/dL)	30,0 ± 6,0	99,0 ± 12,0*	38,0 ± 6,0 [#]

Tabela 3. Variáveis do perfil lipídico nos grupos: C, grupo controle; OB, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica (DHL) ofertada por 8 semanas; OBT, grupo obeso induzido por DHL ofertada por 8 semanas e submetido concomitantemente ao protocolo de treinamento físico (n=15 por grupo). *diferente do grupo Controle; [#]diferente do grupo OB.

Na figura 7, está apresentado o resultado referente a ingestão alimentar de 12 horas após estímulo intraperitoneal com leptina. Pode-se observar que os animais obesos sedentários (OB) tiveram maior ingestão alimentar, em calorias, quando comparados aos animais controles magros (C). Por outro lado, os animais submetidos ao protocolo de exercício físico tiveram maior resposta ao estímulo com leptina se comparado aos animais obesos sedentários (Figura 7). Isso demonstra que o exercício físico foi capaz de preservar, ao menos em relação ao grupo obeso, a sensibilidade à leptina no hipotálamo, reduzindo a hiperfagia desses animais.

Figura 7. Ingestão alimentar de 12 horas em resposta ao estímulo com leptina.

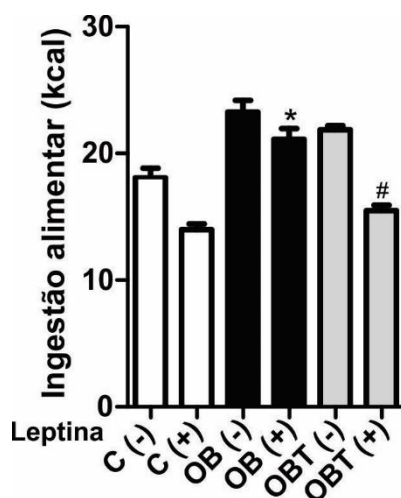


Figura 7. Ingestão alimentar de 12 horas após estímulo com leptina intraperitoneal nos grupos: C, grupo controle; OB, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica (DHL) ofertada por 8 semanas; OBT, grupo obeso induzido por DHL ofertada por 8 semanas e submetido ao protocolo de treinamento físico durante o mesmo período (n=15 por grupo). *diferente do grupo C(+) estimulado com leptina; #diferente do grupo OB(+) estimulado com leptina.

De acordo com os resultados encontrados na figura 8A, os animais obesos sedentários (OB) apresentaram diminuição da fosforilação das proteínas envolvidas na transdução do sinal da leptina (JAK2 e STAT3) se comparado aos animais controles (C) no hipotálamo. O conteúdo proteico de STAT3 nuclear foi maior no grupo controle se comparado ao grupo obeso. Ao contrário os animais obesos exercitados apresentaram maior fosforilação das proteínas da via de sinalização da leptina e conteúdo de STAT3 nuclear em relação a seus pares sedentários (Figuras 8B).

Figuras 8A. Conteúdo e fosforilação das proteínas da via de sinalização da leptina no hipotálamo.

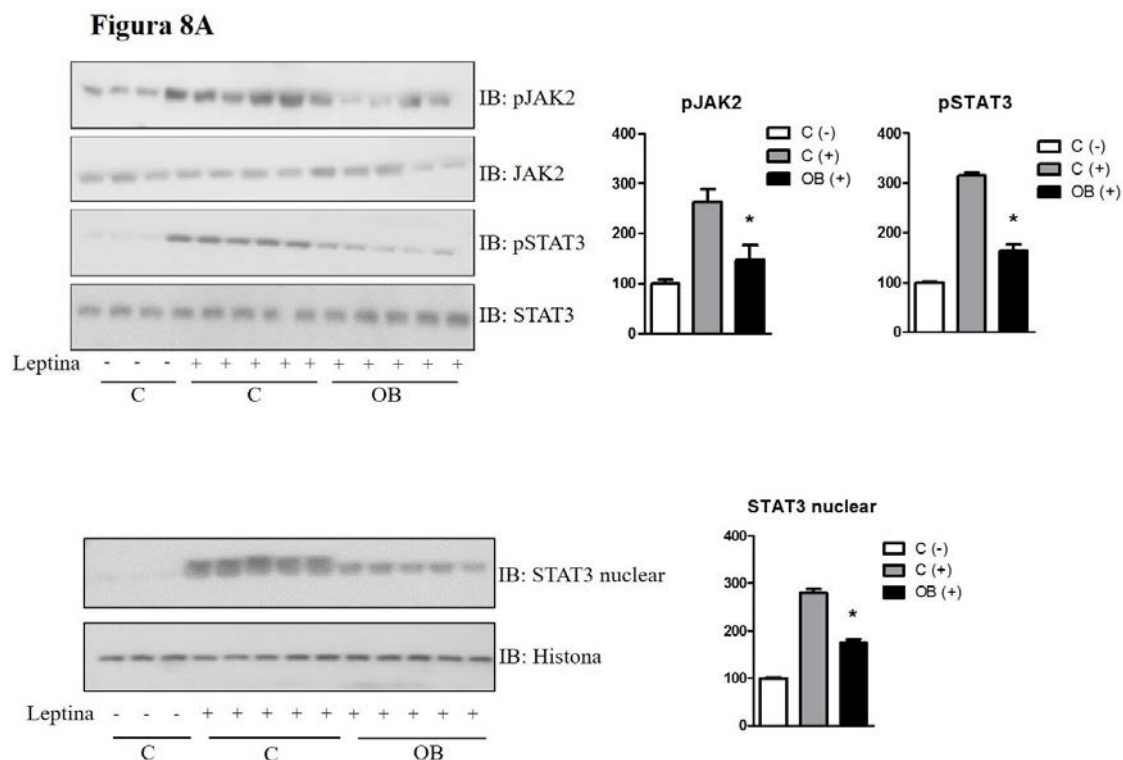


Figura 8A. Via de sinalização molecular da leptina no hipotálamo obtido através de experimentos de imunoblot e imunoprecipitação nos grupos C, grupo controle; OB, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica (DHL) ofertada por 8 semanas; (n=5 por grupo com estímulo com leptina e n=3 para o grupo sem estímulo com leptina). *diferente do grupo controle (C) estimulado com leptina; #diferente do grupo OB estimulado com leptina; $p < 0,05$.

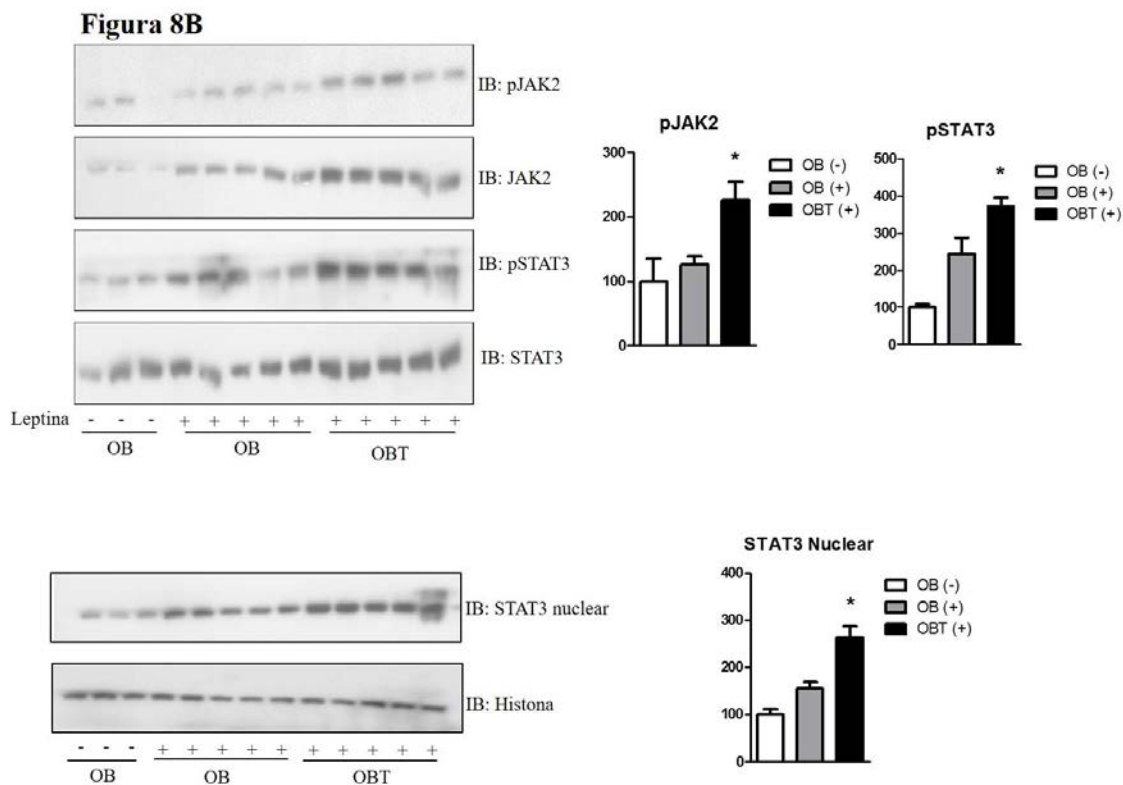


Figura 8B. Via de sinalização molecular da leptina no hipotálamo obtido através de experimentos de imunoblot e imunoprecipitação nos grupos OB, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica (DHL) ofertada por 8 semanas; OBT, grupo obeso induzido por DHL ofertada por 8 semanas e concomitantemente submetidos ao protocolo de treinamento físico (n=5 por grupo com estímulo com leptina e n=3 para o grupo sem estímulo com leptina). * diferente do grupo OB estimulado com leptina; $p<0,05$.

A seguir, foram avaliadas algumas proteínas envolvidas no processo inflamatório de baixo grau no hipotálamo (Figura 9A e 9B). Observa-se aumento no conteúdo de TNF- α , fosforilação de JNK e IKK, aumento no conteúdo proteico de IL1- β e IL-6, SOCS3 e TLR4, como também da associação TLR-4/MyDD88 no hipotálamo dos animais obesos (OB) em relação ao grupo controle (C). Por outro lado, notou-se que o protocolo de treinamento físico foi eficiente em reduzir o processo inflamatório quando comparado aos animais obesos sedentários (Figuras 9A e 9B).

Figura 9A. Via de sinalização inflamatória no hipotálamo

Figura 9A

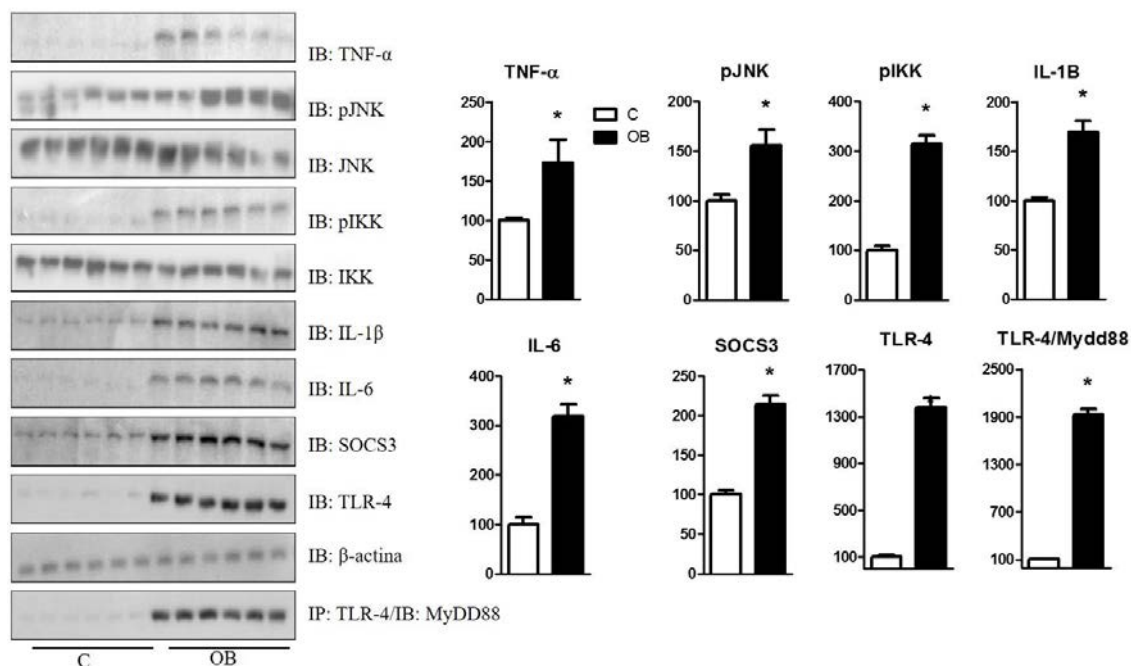


Figura 9A. Análise do conteúdo total, fosforilação e associação das proteínas da via inflamatória nos experimentos de imunoblot e imunoprecipitação dos diferentes grupos experimentais. C, grupo controle; OB, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica (DHL) ofertada por 8 semanas (n=6 por grupo). *diferente do grupo controle; $p < 0,05$.

Figura 9B. Via de sinalização inflamatória no hipotálamo.

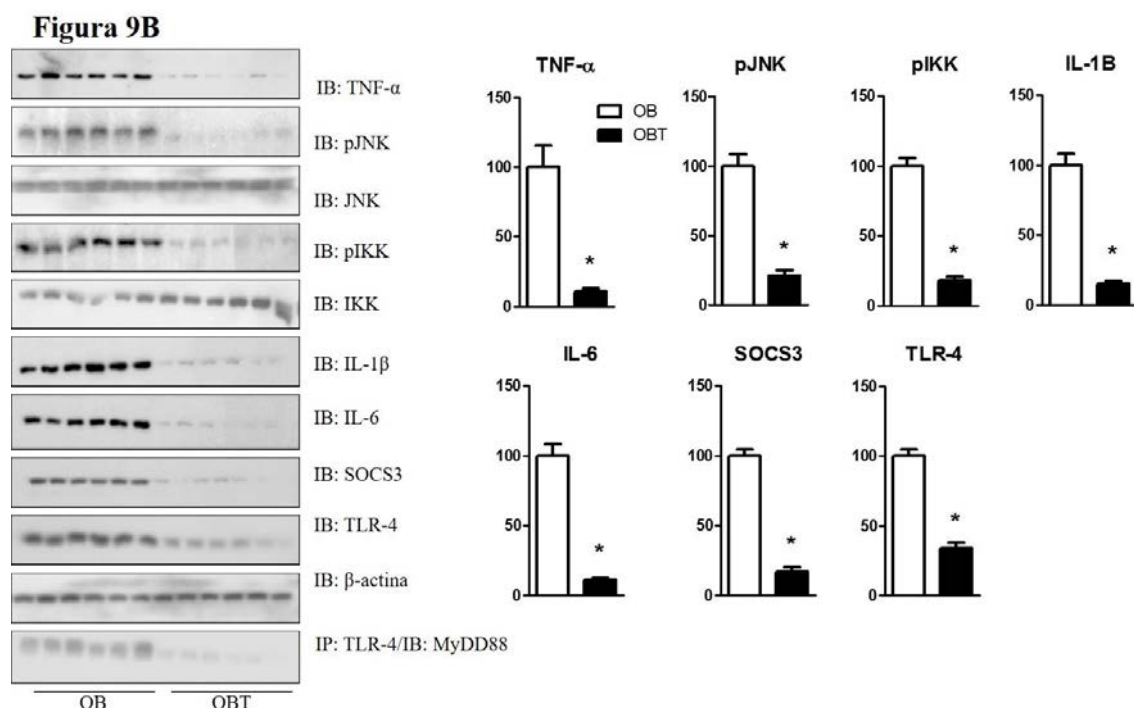


Figura 9B. Análise do conteúdo total, fosforilação e associação das proteínas da via inflamatória nos experimentos de imunoblot e imunoprecipitação dos diferentes grupos experimentais. OB, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica (DHL) ofertada por 8 semanas; OBT, grupo obeso induzido por DHL ofertada por 8 semanas e concomitantemente submetido ao protocolo de treinamento físico (n=6 por grupo). *diferente do grupo OB; p<0,05.

Depois da avaliação da via inflamatória, foram estudados os efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento físico sobre proteínas da via molecular de estresse de retículo e de apoptose no hipotálamo. Observa-se na figura 10A aumento na fosforilação das proteínas mediadoras do estresse de retículo, p-PERK e p-eIF2α nos animais obesos sedentários quando comparado aos animais controles (C). Por outro lado, o treinamento físico foi capaz de reduzir a fosforilação destas proteínas no hipotálamo (Figura 10B).

Além disso, verifica-se que os camundongos obesos sedentários apresentaram aumento do conteúdo e associação de proteínas de apoptose, tanto da via extrínseca, bem como da via intrínseca. Houve aumento do conteúdo proteico de Bax e PARP1 e uma elevada associação do FADD com a Caspase 8, e da APAF1 com a Caspase 9 nos animais obesos sedentários quando comparados aos animais do grupo controle. Em adição, nota-se que a obesidade induzida por DHL levou a uma diminuição do conteúdo proteico de Bcl-2, proteína com ação anti-apoptótica (Figura 10A).

Em contrapartida, o treinamento físico foi eficaz em reduzir o processo apoptótico, desencadeando uma diminuição na expressão das proteínas Bax e PARP1 e na associação das proteínas APAF1/Caspase9 e FADD/Caspase8. Os animais submetidos ao treinamento físico também apresentaram um aumento no conteúdo da proteína Bcl-2 no hipotálamo (Figura10B).

Figura 10A. Via de sinalização relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático e de apoptose no hipotálamo.

Figura 10A

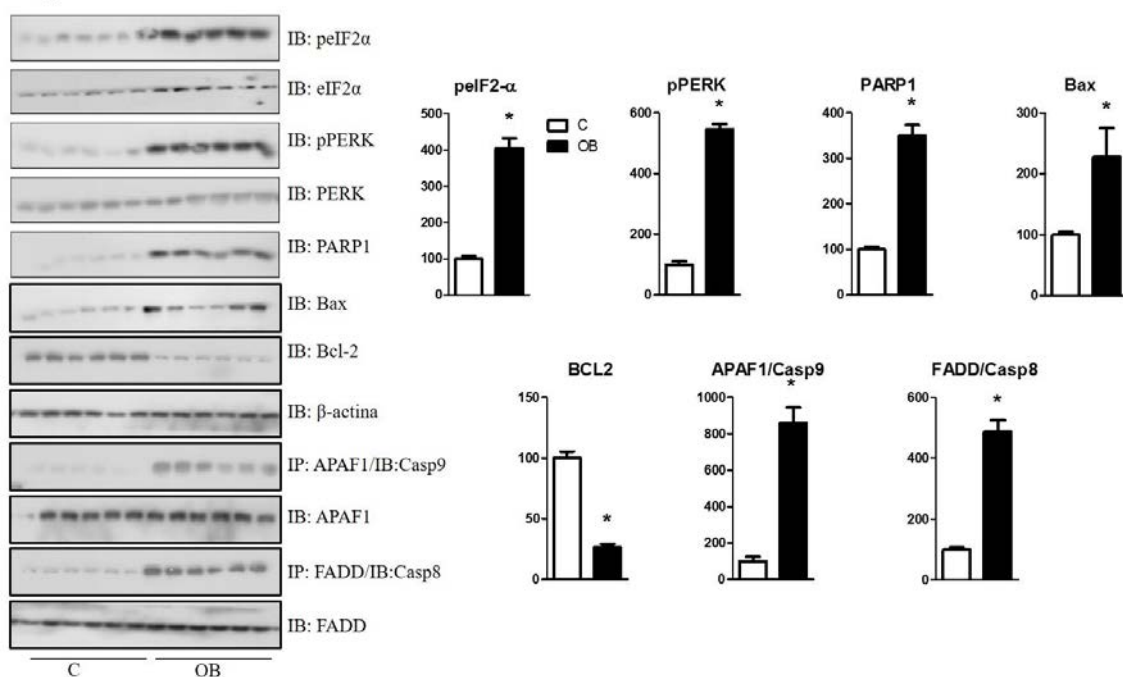


Figura 10A. Via de sinalização de proteínas relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático e de apoptose no hipotálamo obtidos através dos experimentos de imunoblot e imunoprecipitação dos grupos C, grupo controle; OB, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica (DHL) ofertada por 8 semanas; (n=6 por grupo). * diferente do grupo controle; p<0,05.

Figura 10B. Via de sinalização relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático e de apoptose no hipotálamo.

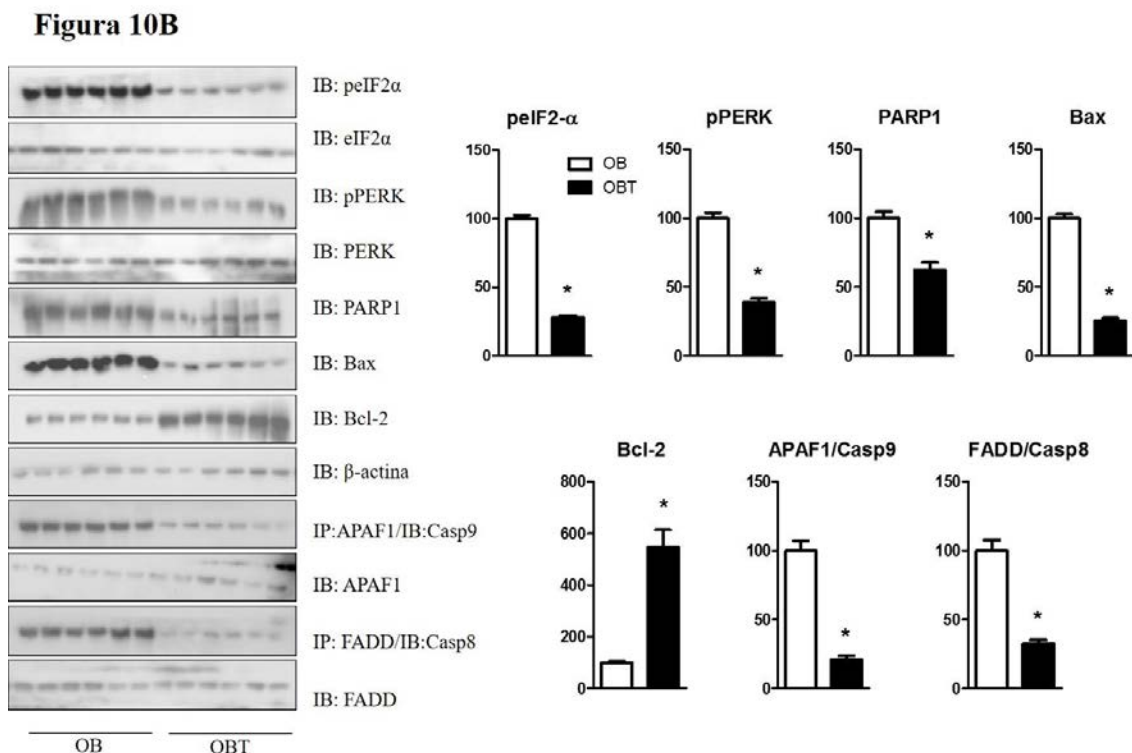


Figura 10B. Via de sinalização de proteínas relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático e de apoptose no hipotálamo obtidos através dos experimentos de imunoblot e imunoprecipitação dos grupos OB, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica (DHL) ofertada por 8 semanas; OBT, grupo obeso induzido por DHL ofertada por 8 semanas e concomitantemente submetido ao protocolo de treinamento físico (n=6 por grupo). * diferente do grupo OB; p<0,05.

Como segundo método para avaliar o dano celular e a indução do processo apoptótico foi realizado o ensaio com o teste do TUNEL, complementando os resultados de *imunoblot*. Esta técnica permite avaliar marcação da fragmentação de DNA, processo este inerente ao mecanismo de apoptose. As imagens obtidas através do TUNEL, mostra que os animais obesos sedentários tiveram aumento da fragmentação de DNA (apoptose) no hipotálamo se comparados aos camundongos controles. Por outro lado, o treinamento físico reduziu a fragmentação de DNA (Figura 11).

Figura 11. Análise da fragmentação de DNA através da técnica do TUNEL

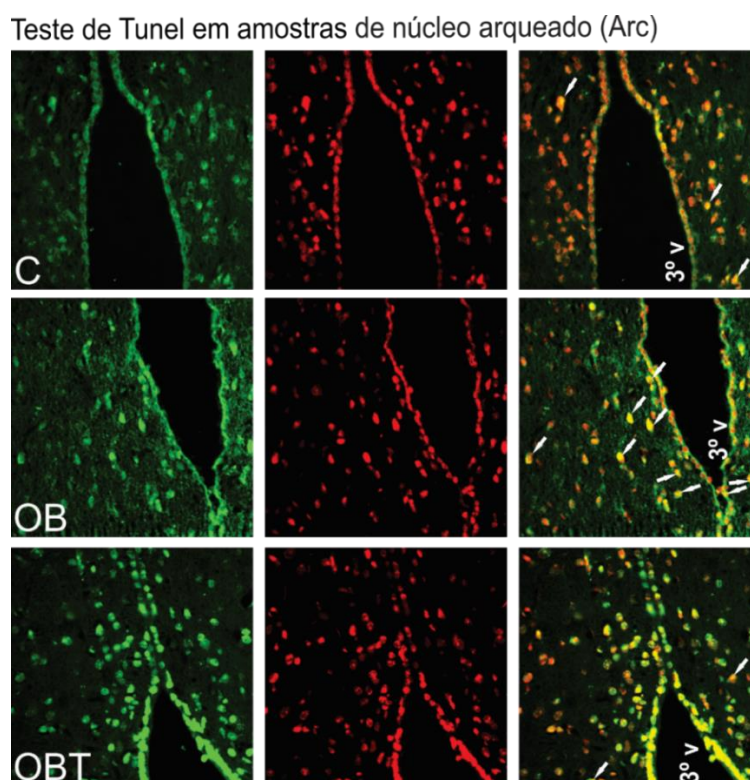


Figura 11. Análise da fragmentação de DNA através da Técnica de TUNEL dos diferentes grupos experimentais. C, grupo controle; OB, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica (DHL) ofertada por 8 semanas; OBT, grupo obeso induzido por DHL ofertada por 8 semanas e concomitantemente submetidos ao protocolo de treinamento físico (n=5 para cada grupo experimental). As setas brancas são as marcações no *merge* dos núcleos com fragmentação de DNA, marcados pelo TUNEL. As imagens estão amplificadas em 400x (barra de escala, 10µm).

Como complemento das análises prévias realizadas com objetivo de avaliação do processo inflamatório instalado no hipotálamo dos animais obesos, realizou-se a marcação da proteína F4/80, presente na superfície de macrófagos quando estão em atividade. Nota-se, na figura 12, que os animais do grupo OB tiveram um aumento na expressão da proteína F4/80, evidenciando uma maior ativação de macrófagos (micróglia) no hipotálamo dos animais obesos sedentários. Já, ao observar os resultados dos animais do grupo OBT, verifica-se que ocorreu uma redução da ativação de macrófagos, na micróglia, dos animais treinados, em comparação aos seus pares sedentários.

Figura 12. Marcação de F4/80 para avaliação da ativação de macrófagos no hipotálamo (microglia).

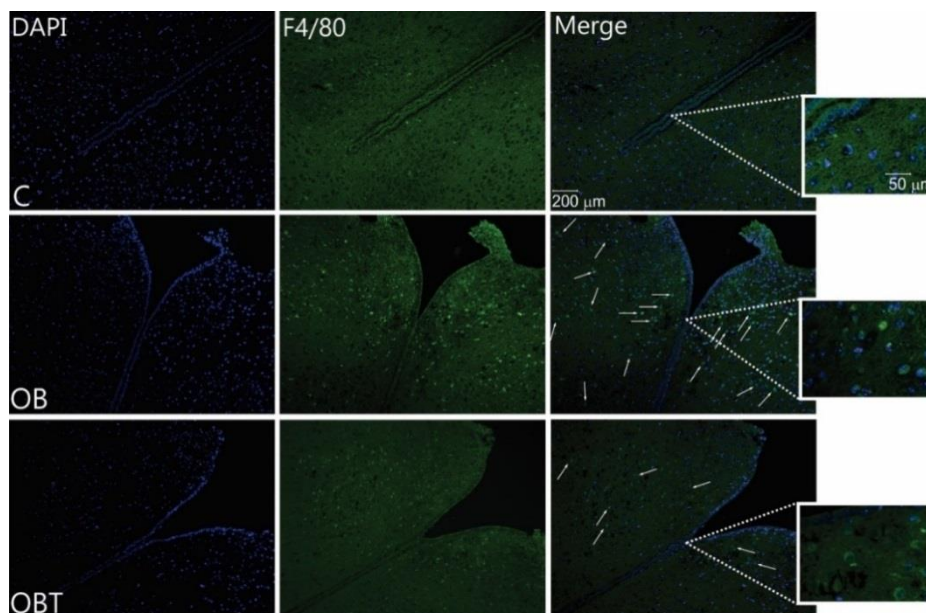


Figura 12. Análise da ativação de macrófagos pela marcação da proteína F4/80 nos grupos C, grupo controle; OB, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica (DHL) ofertada por 8 semanas; OBT, grupo obeso induzido DHL ofertada por 8 semanas e concomitantemente submetido ao protocolo de treinamento físico. Todos os grupos estavam distribuídos igualmente, com um $n=5$ por grupo. As setas brancas são as marcações no *merge* da proteína F4/80 presente na superfície de macrófagos ativados. As imagens encontram-se com uma amplificação de 400x (barra de escala de 200µm e 50µm).

Posteriormente, realizou-se a análise da expressão de RNAm dos neuropeptídeos reguladores da fome e da saciedade, NPY e POMC. Não houve diferença entre os grupos experimentais quando avaliou a expressão de RNAm de NPY. Contudo, os animais obesos sedentários apresentaram redução da expressão de RNAm de POMC em comparação aos seus pares magros, do grupo controle. Por outro lado, o treinamento físico foi eficiente em promover o aumento da expressão de RNAm do neuropeptídeo POMC nos animais obesos treinados, em comparação aos camundongos do grupo obeso sedentário.

Figura 13. Expressão de RNAm dos neuropeptídeos reguladores da fome/saciedade, NPY e POMC.

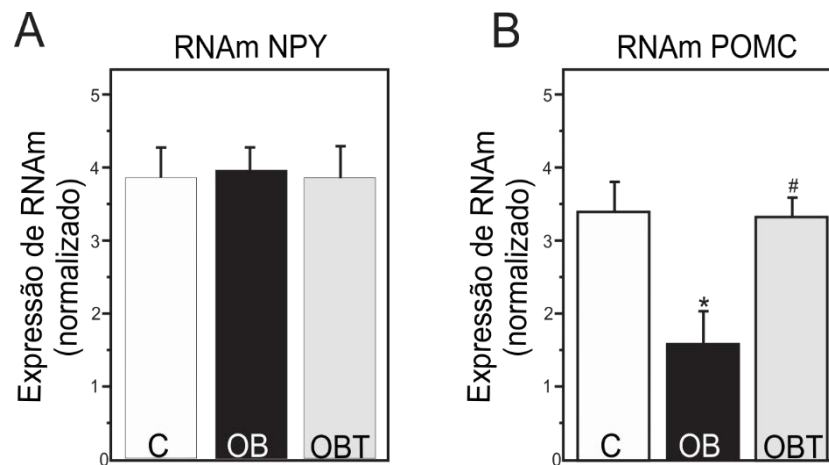


Figura 13A-13B. Análise da expressão de RNAm dos neuropeptídeos NPY (13A) e POMC (13B) dos diferentes grupos experimentais. C, grupo controle; OB, grupo obeso por dieta hiperlipídica ofertada por 8 semanas; OBT, grupo obeso induzido por dieta hiperlipídica ofertada por 8 semanas e concomitante submetido ao protocolo de treinamento físico (n=5 para cada grupo experimental). *diferente do grupo controle; #diferente do grupo OB; $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Estudos em modelos animais e humanos mostram que o consumo de dieta rica em gordura saturada leva a um estado de hiperfagia, aumento da massa corporal total e acréscimo do tecido adiposo (Moraes *et al.*, 2009; Ropelle *et al.*, 2010; Van De Sande-Lee *et al.*, 2011; Thaler *et al.*, 2012). Nesse contexto, cada vez mais tem se dado destaque ao estudo das funções e dos distúrbios relacionados ao hipotálamo, considerado o centro regulador da fome e da termogênese (Velloso, 2006). No entanto, no estado de obesidade, células adiposas e infiltradas por macrófagos secretam diversas biomoléculas como citocinas pró-inflamatórias e, outros fatores, que prejudicam as ações da insulina e da leptina, induzindo hiperfagia. Dentro deste contexto, no presente estudo, procurou-se investigar o papel do exercício físico sobre os processos de inflamação, estresse de retículo endoplasmático e apoptótico em camundongos obesos induzidos por uma dieta rica em gordura saturada. Considerando que esta seja uma estratégia não farmacológica, com efeitos relevantes sobre o hipotálamo e, portanto, de combate à obesidade, mas que ainda não está totalmente compreendido.

De modo a elucidar os fenômenos previamente apresentados, os experimentos foram distribuídos em duas etapas. Primariamente, procurou-se investigar na etapa 1, através da técnica de bioinformática, a correlação entre as proteínas inflamatórias, em especial do TNF- α sobre o processo de apoptose, analisando as proteínas envolvidas nas vias apoptóticas. Tal investigação auxiliou nas tomadas de decisões e, confirmaram as evidências na literatura de que o aumento da inflamação está associado com a ativação de proteínas pró-apoptóticas. Já, na etapa 2, procurou-se investigar os efeitos do exercício físico crônico (treinamento) aeróbico realizado concomitantemente a indução de obesidade sobre algumas variáveis da composição corporal, variáveis metabólicas e o comportamento alimentar após estímulo com leptina. Foram avaliados ainda nesta etapa os efeitos da dieta e do exercício físico sobre o perfil lipídico nos diferentes grupos de animais.

Os resultados encontrados permitem considerar que a dieta hiperlipídica induziu aumento da massa corporal total, índice de Lee e da gordura epididimal nos camundongos. Apenas os animais que receberam a dieta hiperlipídica e foram concomitantemente submetidos ao protocolo de treinamento físico tiveram essas variáveis reduzidas em relação aos animais obesos sedentários. Estes dados estão de acordo com diversos estudos que utilizaram de dieta similar ao do nosso trabalho para a

indução de obesidade em modelos animais (De Souza *et al.*, 2005; Milanski *et al.*, 2009; Ropelle *et al.*, 2010; Cintra *et al.*, 2012; Chiarreotto-Ropelle *et al.*, 2013; Ropelle *et al.*, 2013).

Corroborando com estes resultados de aumento da adiposidade, verifica-se que a taxa de decaimento da glicose a partir do estímulo com insulina no teste de tolerância à insulina foi menor nos grupos que receberam a dieta rica em gordura se comparados aos animais magros. A resistência à insulina também fica evidente pelos resultados de insulinemia e glicemia de jejum, que foi maior nos animais obesos sedentários. Este fenômeno pode ser explicado ao observar que a hiperinsulinemia no organismo de animais obesos é uma tentativa de se compensar a resistência a este hormônio. Ao se analisar a hiperglicemia de jejum, também se evidencia que a quantidade de insulina produzida pelas ilhotas pancreáticas não está sendo suficiente para suprir a resistência a este hormônio em tecidos insulino dependentes para a captação de glicose, conduzindo estes animais a este quadro de hiperglicemia. Dados muito semelhantes podem ser encontrados em estudos da literatura que fizeram uso de dieta hiperlipídica para indução de obesidade e observaram queda na taxa de utilização de glicose nos animais (Da Silva *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2010; Da Luz *et al.*, 2011; Marinho *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2013).

Sobre este tópico, a literatura é recorrente em demonstrar que o exercício físico é capaz de aumentar tanto a sinalização dependente de insulina (via IR/IRSs/PI3k/Akt), quanto a independente de insulina [via proteína quinase ativada por AMP (AMPK)] e cálcio-calmodulina) envolvidas com a captação de glicose no músculo esquelético (Ropelle *et al.*, 2005; Pauli *et al.*, 2009). Ademais, o exercício físico tem sido eficaz em reduzir o conteúdo de proteínas inflamatórias como TNF- α , IKK, JNK, entre outras em tecidos periféricos como por exemplo, no músculo esquelético, contribuindo com o aumento da sensibilidade à insulina do organismo de roedores obesos (Ropelle *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2010). Estes efeitos do exercício físico sobre variáveis relacionadas ao metabolismo da glicose em geral perduram por 24 a 48 horas após a última sessão de esforço físico (Chibalin *et al.*, 2000). Deve-se reforçar que muitos desses efeitos positivos do exercício físico sobre a sensibilidade à insulina são encontrados mesmo quando não há alteração no conteúdo de gordura corporal (Ropelle *et al.*, 2006; Pauli *et al.*, 2008; Marinho *et al.*, 2012).

As análises relacionadas ao perfil lipídico mostram que os valores de colesterol total e LDL foram maiores no grupo obeso sedentário comparado aos animais controles

magros. Entretanto, o grupo OBT, de animais obesos submetidos ao treinamento físico simultaneamente a oferta da dieta rica em gordura, teve os valores de colesterol total e LDL reduzidos quando comparado ao grupo obeso sedentário. Tanto o triacilglicerol, quanto os níveis de HDL, não foram modificados entre os grupos estudados. Reconhecidamente, a melhora da saúde metabólica (glicemia e sensibilidade à insulina) com redução na concentração de colesterol e LDL e menor aumento da massa adiposa promovem benefícios à saúde e previne as complicações associadas a obesidade (Park *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014). Os efeitos da atividade física no perfil lipídico envolvem a redução nos triacilgliceróis e um aumento no HDL, e ambos podem estar relacionados com redução da resistência à insulina. Embora tais evidências sejam encontradas em resposta ao treinamento físico, quase sempre estão associados a um maior tempo de treinamento ou maior volume de exercício (Kraus *et al.*, 2002).

Os efeitos do exercício sobre a trigliceridemia é obtida pelo estímulo à produção e atividade da lipoproteína lipase, o que promove a metabolização de quilomícrons e VLDL (Gabriel *et al.*, 2013; Freese *et al.*, 2014). Em consequência, há redução na formação de LDL pequenas e densas, com predomínio de uma fração maior de LDL, menos aterogênica (Halverstadt *et al.*, 2007; Sondergaard *et al.*, 2014). Em adição, pelo estímulo à ação da lipoproteína lipase, formam-se partículas nascentes de HDL (Olchawa *et al.*, 2004). Contudo, como previamente considerado, características específicas do exercício, como intensidade, frequência e duração das sessões são determinantes para o benefício conferido ao metabolismo lipídico. Por exemplo, o aumento dos níveis de HDL plasmática parece estar relacionado ao maior volume de treinamento aeróbio, quando comparado apenas ao aumento de intensidade deste tipo de exercício (Kraus *et al.*, 2002). Tal adaptação está também relacionado ao efeito do treinamento físico do tipo aeróbio que é capaz de aumentar o número de fibras de contração lenta (Tipo IIa e IIb), dotada de elevada capacidade de metabolizar ácidos graxos advindos das lipoproteínas ricas em triglicerídeos, através da ação da lipoproteína lipase. O referido mecanismo está associado ao aumento da concentração de HDL. Isto explica no mínimo em parte, por que em nossos resultados não foram encontradas alterações sobre variáveis do perfil lipídico, talvez a exposição por mais tempo a dieta hiperlipídica ou maior período de treinamento físico sejam necessários.

Cabe ressaltar, que a intensidade do protocolo de treinamento físico utilizado foi de 60% da potência máxima de corrida, por ser considerada uma velocidade equivalente, ou próxima do limiar anaeróbio dos animais, definida em experimentos prévios (Ferreira

et al., 2007). Portanto, este exercício é considerado de dificuldade moderada de execução, uma vez que a intensidade referente ao limiar anaeróbio representa o estágio no qual a produção e remoção de lactato se equivalem. Por isso, o protocolo de exercício foi realizado com aumento progressivo do volume, iniciando com 15 minutos até atingir 60 minutos, respeitando o princípio da sobrecarga do treinamento. Para garantir que esta intensidade fosse mantida ao longo do programa de 8 semanas de treinamento, na quarta semana do protocolo de treinamento, foi realizado um segundo teste de potência máxima, para que a carga fosse ajustada para cada animal. Os resultados obtidos mostram que a velocidade máxima de corrida e a distância percorrida aumentaram no último teste de potência máxima, realizado na oitava e última semana de treinamento, o que demonstra que o protocolo de exercício físico adotado foi eficiente em promover aumento de desempenho nos camundongos obesos treinados.

As próximas análises realizadas no presente estudo foram direcionadas a investigar os efeitos da dieta rica em gordura e do exercício físico sobre as respostas hipotalâmicas frente a estímulos com leptina e insulina. Entende-se, que os desarranjos moleculares que acontecem no hipotálamo inicialmente induzido por ingestão de dieta rica em gordura e subsequentemente pelo acúmulo excessivo de gordura (obesidade), promovendo a manutenção do tônus inflamatório sejam o principal aspecto relacionado ao desenvolvimento de uma constelação de anormalidades metabólicas que inclui a resistência à insulina, diabetes, dislipidemias e doenças cardiovasculares, todas elas presentes no risco cardiometabólico.

Na literatura observa-se tanto em modelos animais como em humanos, que distúrbios no hipotálamo podem desencadear hiperfagia e com isso a instalação e progressão da obesidade (De Souza *et al.*, 2005; Picardi *et al.*, 2008; Velloso *et al.*, 2008; Ropelle *et al.*, 2010; Van De Sande-Lee *et al.*, 2011; Thaler *et al.*, 2012). Por outro lado, o exercício físico tem se destacado como uma importante ferramenta não farmacológica com efeitos robustos sobre o hipotálamo atenuando a disfunção hipotalâmica associado a obesidade (Ropelle *et al.*, 2010; Chiarreotto-Ropelle *et al.*, 2013). Quando se analisa os resultados da ingestão alimentar com estímulo de leptina, pode-se notar que os animais obesos sedentários apresentaram maior resistência a esta citocina, identificado pela maior ingestão de alimento no período de 12 horas. No entanto, o grupo de camundongos submetidos ao treinamento físico apresentou menor ingestão quando comparado ao grupo de animais obesos sedentários quando estimulados com leptina. Através deste experimento foi possível observar que o treinamento físico teve efeito preventivo,

atenuando aos efeitos deletérios da dieta hiperlipídica sobre a via de sinalização da leptina. Isto foi confirmado pelo aumento da fosforilação das proteínas JAK2 e STAT3 no hipotálamo, proteínas inerentes a via de transdução do sinal da leptina.

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com os dados encontrados por Thivel e colaboradores. Ao investigar a ingestão alimentar de adolescentes obesos, Thivel e colaboradores encontraram que a realização de exercício físico agudo de moderada-alta intensidade (75% do $VO_{2\text{máx}}$) se mostrou eficiente em reduzir a ingestão alimentar de adolescentes obesos, tanto no almoço, quanto no jantar, quando comparados aos seus pares sedentários e aos que realizaram a sessão de exercício físico agudo de baixa intensidade (40% do $VO_{2\text{máx}}$) (Thivel *et al.*, 2012). Deste modo, pode-se notar que tanto em humanos, como em camundongos, o exercício físico possui efeito positivo para o controle da ingestão alimentar, promovendo redução da hiperfagia encontrada na condição de obesidade.

Em um outro estudo, também avaliando a ingestão alimentar em humanos com sobrepeso e obesidade, Martins e colaboradores evidenciaram que para exercícios isocalóricos, com gasto energético de 250 kcal, tanto o exercício intervalado intenso (tiros em cicloergômetro de perna de 8 segundos, atingindo 85 a 90% da frequência cardíaca máxima (FC $_{\text{máx}}$), com intervalos de recuperação de 12 segundos, pedalando de 20 a 30 rpm), quanto moderado (exercício em cicloergômetro de perna a 70% da FC $_{\text{máx}}$), tiveram as mesmas respostas para os hormônios reguladores da fome. Para estas duas intensidades, os indivíduos exercitados obtiveram redução dos níveis grelina e aumento dos níveis de *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), justificando, pelo menos em partes, a redução da ingestão calórica encontrada no estudo de Thivel e colaboradores (Martins *et al.*, 2015).

Na condição de obesidade, o tecido adiposo, especialmente localizado na região visceral do corpo secreta diversas biomoléculas como citocinas pró-inflamatórias e outros fatores, que estão envolvidos na indução da resistência à insulina e a leptina. Dado a severidade de complicações e o impacto deste tipo de gordura tem sido utilizado o termo adiposopatia (*Adiposopathy*) (Bays, 2012). O conhecimento adquirido nas últimas décadas permite agora considerar que o prejuízo na ação da insulina e da leptina pode ocorrer após a ingestão de alimentos ricos em lipídios, com predominância de ácidos graxos saturados, os quais são capazes de ativar receptores de membrana denominados receptores do tipo *Toll* (TLR), especificamente o TLR4, e acionar proteínas pró-

inflamatórias e de estresse de retículo endoplasmático (Milanski *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2009; Cintra *et al.*, 2012).

Do ponto de vista prático, esse receptor reconhece patógenos por apresentar afinidade à estrutura lipídica do LPS. Composto por ácidos graxos láurico (C12:0) e mirístico (C14:0), o LPS bacteriano dispara resposta inflamatória intensa e o sistema imune sinaliza para a destruição do micro-organismo invasor. Contudo, tais ácidos graxos estão presentes na alimentação humana (por exemplo, gordura saturada) e, em excesso, podem ativar os receptores TLR4, sem que haja, necessariamente, infecção bacteriana. No entanto, a ativação do TLR4 culminará com prejuízos na transdução do sinal da insulina e leptina (Milanski *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2009; Cintra *et al.*, 2012). Nesse sentido, a dieta ofertada para indução de obesidade aos animais em nosso estudo é constituída da sua fração lipídica de banha de porco, fonte de gordura saturada. Isso explica o caos metabólico observado nos animais tratados com a dieta hiperlipídica e a indução de inflamação.

Proteínas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , produzidas a partir de um estímulo oriundo do TLR, por exemplo, iniciam suas vias, ativando proteínas com atividade de serinas quinase como a *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) e a *Ikappa Kinase* (IKK), que por sua vez, desencadeiam a fosforilação tanto do receptor de insulina, como dos substratos do receptor de insulina em serina e não mais nos substratos de tirosina destas proteínas. Isto prejudica a transdução do sinal da insulina e seus efeitos biológicos intracelulares. A compreensão da fina regulação das proteínas envolvidas em tais vias é essencial para os desdobramentos na compreensão do distúrbio, a fim de propor estratégias mais eficientes contra a doença (Cintra *et al.*, 2012; Chiarreotto-Ropelle *et al.*, 2013). Além disso, a ativação do complexo IKK/NF κ B a partir da ativação do IKK pelo TLR, permite dissociação e a migração do NF κ B para o núcleo, onde este fator de transcrição exerce seu papel, desencadeando um aumento do conteúdo de proteínas inflamatórias, como por exemplo, a SOCS3, proteína que exerce efeito negativo na sinalização da leptina (Moraes *et al.*, 2009; Ropelle *et al.*, 2010; Cintra *et al.*, 2012; Chiarreotto-Ropelle *et al.*, 2013).

Os animais obesos deste trabalho apresentaram aumento de citocinas inflamatórias, quando comparado aos animais magros. Por outro lado, o treinamento físico foi capaz de reduzir o conteúdo proteico das proteínas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IKK, JNK, SOCS3 e TLR-4) nas células hipotalâmicas. Isto explica, ao

menos em parte, as respostas positivas obtidas com a injeção de leptina, reduzindo a ingestão alimentar nesses animais obesos treinados.

Resultados similares foram observados em resposta ao exercício físico agudo de baixa intensidade e longa duração em ratos obesos. Ropelle e colaboradores demonstraram que animais exercitados agudamente apresentam redução do conteúdo de proteínas inflamatórias em neurônios hipotalâmicos, que foi acompanhado por redução da hiperfagia (Ropelle *et al.*, 2010). Os resultados revelados por Ropelle e colaboradores apontam para um efeito anti-inflamatório do exercício físico obtido através do aumento da interleucina 6 e interleucina 10 (IL-6 e IL-10) a nível hipotalâmico. A IL-10 exerce efeito inibitório sobre o fator de transcrição NFκB e, portanto, do processo inflamatório de baixo grau (Schottelius *et al.*, 1999). Concomitante a redução da inflamação, os autores também mostraram redução do fenômeno de estresse de retículo endoplasmático, repercutindo positivamente para a melhora da sinalização intracelular da insulina e leptina (Ropelle *et al.*, 2010). Contudo, ainda não é totalmente esclarecido na literatura científica se estas respostas promovidas pelo exercício físico ocorrem a partir dos tecidos periféricos, como o músculo esquelético, e a partir dele é que há um reflexo no sistema nervoso central, ou se elas acontecem diretamente no sistema nervoso central (SNC), ou se há uma comunicação destes dois sistemas (SNC e periferia), onde uma melhora em um dos sistemas pode influenciar a resposta dos demais. Este conflito na literatura pode ser evidenciado no estudo de Kilic e colaboradores, que avaliaram a resposta das concentrações de IL-6 plasmáticas e no líquido após uma sessão exaustiva de exercício físico agudo (Kilic *et al.*, 2014).

Kilic e colaboradores submeteram três grupos de ratos Wistar a um exercício de natação exaustivo (determinando a exaustão quando os animais ficaram submersos por 10 segundos). Posteriormente, os autores avaliaram a concentração plasmática e no líquido dos animais 24h e 48h após esta sessão exaustiva. Os três diferentes grupos do estudo foram: controle sedentário (ratos Wistar que não realizaram um protocolo de treinamento prévio); grupo treinamento moderato (ratos Wistar que treinaram por 8 semanas, 1h por dia, 5 vezes por semana); grupo treinamento vigorosos (ratos que iniciaram seu treinamento nadando 30 min na primeira semana, com um aumento de 30 min em cada semana, até atingir 2,5h na quinta semana. A partir desta semana, o volume se manteve o mesmo até atingirem 8 semanas de treinamento (Kilic *et al.*, 2014).

Após este período de treinamento, realizou-se uma sessão exaustiva e as avaliações das concentrações plasmáticas e no líquido de IL-6. Os autores não observaram

diferença nas concentrações plasmáticas de IL-6, quando se comparou os grupos e os tempos avaliados. Entretanto, encontrou-se diferença na concentração de IL-6 no líquido dos animais que realizaram o treinamento vigoroso 24h após a sessão de exercício exaustiva em comparação aos seus pares controles sedentários e os que realizaram o protocolo de treinamento físico moderado (Kilic *et al.*, 2014).

Deste modo, fica claro que mais estudos são necessários para um melhor entendimento da ação do exercício físico em relação às citocinas produzidas pelo esforço físico e, principalmente, na existência, ou não, desta comunicação integrada entre a periferia e o sistema nervoso central.

Dados encontrados em nosso estudo apontam para uma redução do estresse de retículo endoplasmático nos animais treinados em relação aos animais obesos sedentários. Além disso, também foi possível observar uma diminuição da ativação de macrófagos no hipotálamo dos animais obesos treinados em relação aos seus pares obesos sedentários. Este resultado pode ser visto por uma menor marcação da proteína F4/80 em tecido hipotalâmico. Cabe reforçar, que o trabalho realizado por Ropelle e colaboradores avaliou apenas o efeito agudo do exercício físico e as análises foram feitas imediatamente após o término do exercício (Ropelle *et al.*, 2010). Os dados obtidos no presente estudo permitem considerar que a prevenção do aumento na adiposidade corporal dos animais mediante a realização de exercício físico é capaz de atenuar o processo inflamatório e de estresse de retículo em neurônios localizados no hipotálamo.

Em outro estudo, também utilizando o treinamento físico aeróbio, de intensidade moderada, durante 26 semanas, e a indução de obesidade por dieta rica em gordura, Yi e colaboradores evidenciaram que o treinamento físico conseguiu proteger a inflamação hipotalâmica existente na condição de obesidade (Yi *et al.*, 2012). Ao se utilizarem de camundongos deficientes do receptor de LDL (*ldlr* -/-), Yi *et al.* confirmaram que há um aumento da ativação da micróglia no hipotálamo dos camundongos que receberam dieta rica em gordura. Por outro lado, o grupo de camundongos *ldlr* -/- que recebeu dieta rica em gordura e que foi submetido a um protocolo de treinamento físico aeróbio, de intensidade moderada, por 26 semanas, teve redução da ativação da micróglia no hipotálamo (Yi *et al.*, 2012). Estes dados encontrados por Yi e colaboradores estão de acordo com os dados encontrados neste presente estudo, no qual observou-se aumento da marcação da proteína F4/80, indicando aumento da ativação de macrófagos (micróglia) em tecido hipotalâmico nos camundongos *swiss* obesos induzidos por dieta hiperlipídica,

enquanto houve uma redução da ativação macrofágica nos camundongos *swiss* obesos treinados.

O estresse de retículo endoplasmático leva à ativação de mediadores inflamatórios como o complexo IKK/NFκB, prejudicando a sinalização da leptina e da insulina no hipotálamo (Ozcan *et al.*, 2009). Curiosamente, embora a inibição do estresse de retículo endoplasmático no hipotálamo de camundongos obesos reduza a resistência à leptina, este não diminui a adiposidade (Milanski *et al.*, 2009; Ozcan *et al.*, 2009). A inter-relação entre a sinalização do TLR-4 e de estresse de retículo endoplasmático foi evidenciado em experimento que demonstrou que a oferta de dieta rica em gordura falhou em induzir estresse de retículo endoplasmático em camundongos nocautes do TLR-4 no fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (Pierre *et al.*, 2013).

Tomados em conjunto, estes dados sugerem que, no hipotálamo de roedores obesos, a disfunção de estresse de retículo endoplasmático surge como uma consequência da ativação TLR4 e pode ser modulada por citocinas anti-inflamatórias. O impacto da inibição do estresse do retículo endoplasmático sobre a disfunção hipotalâmica na obesidade é suficiente para reduzir parcialmente a resistência à leptina, mas não o suficiente para promover mudanças significativas na adiposidade (Milanski *et al.*, 2009; Ozcan *et al.*, 2009). Tais observações reforçam ainda mais a importância dos dados obtidos no presente estudo já que o treinamento físico proposto foi capaz de atenuar o aumento de massa corporal (adiposidade), que foi acompanhado por redução da ativação da via do TLR-4 e de estresse de retículo endoplasmático, restaurando a sinalização da leptina e da insulina.

Observa-se também que o treinamento físico quando aplicado concomitantemente com a oferta da dieta hiperlipídica teve efeito supressivo sobre o processo apoptótico no hipotálamo dos camundongos. Adicionalmente, revelou-se que o treinamento físico também aumentou o conteúdo da proteína Bcl-2, de efeito anti-apoptótico. Além disso, o protocolo de exercício proposto foi capaz de atenuar tanto a ativação de proteínas de vias extrínsecas (como a associação da FADD/Caspase 8), como também intrínsecas de apoptose (diminuição do conteúdo proteico de Bax e da associação entre APAF1/Caspase9). Complementando a análise sobre apoptose, observou-se também que o treinamento físico foi eficiente em reduzir a fragmentação de DNA, evidenciado por uma menor marcação do tecido hipotalâmico na técnica de TUNEL. Em resposta a essas adaptações promovidas pelo exercício físico, verificou-se maior expressão do RNAm de POMC (neuropeptídeo anorexigênicos) nos animais obesos exercitados em relação aos

animais obesos sedentários, o que corrobora com a diminuição da hiperfagia nos animais treinados.

Estudo conduzido por Ropelle e colaboradores mostrou que tanto uma sessão aguda de exercício aeróbio de natação (sessão de 6 horas de natação, composto por duas séries de 3 horas com intervalo de 45 minutos entre as séries, sem sobrecarga adicional aos animais), bem como de corrida (sessão aguda de 90 minutos, com velocidade de 7 a 10 m/min, com inclinação de 5%) foram eficientes em reduzir a ingestão alimentar de ratos obesos, resultados que corroboram com os achados do presente estudo. Além disto, Ropelle *et al.* encontraram que ao se exercitarem, os animais apresentaram maior expressão de RNAm de POMC se comparado aos animais obesos sedentários e menor expressão de RNAm de NPY, o que justifica esta redução da ingestão alimentar (Ropelle *et al.*, 2010). Contudo, neste presente estudo, apenas pode-se verificar o aumento de transcrição de RNAm de POMC nos animais obesos treinados, diferente do estudo de Ropelle e colaboradores, porém com o mesmo efeito sobre o controle da hiperfagia nos animais obesos treinados (Ropelle *et al.*, 2010). Entretanto, quando os autores investigaram os efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da leptina, observaram que após a realização de uma sessão de exercício físico aeróbio houve uma melhora na sensibilidade à leptina nos ratos obesos, aumentando a fosforilação em tirosina da JAK-2 e STAT-3 (Ropelle *et al.*, 2010). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados neste estudo, no qual os animais obesos treinados também apresentaram aumento da sensibilidade à leptina, e consequentemente, da ativação de sua cascata de sinalização. Porém, vale documentar que o protocolo de exercício físico agudo utilizado por Ropelle e colaboradores teve duração de 6 horas (3 horas de sessão, com 45 minutos de intervalo, e mais 3 horas de exercício) e baixa intensidade, sem carga. E, as análises ocorreram imediatamente após o término do esforço. Por outro lado, neste presente estudo, utilizamos de um protocolo de 1 hora em cada sessão de treino a 60% da P_{máx} (intensidade moderada), sendo este exercício mais facilmente tolerado pelos animais, permitindo num futuro próximo a aplicação e comparação com seres humanos.

Em outro estudo recente, Chiarreotto-Ropelle e colaboradores conseguiram observar um aumento da fosforilação e ativação das proteínas da via de sinalização intracelular da leptina, JAK2 e STAT3 no hipotálamo com exercício físico agudo. Esta melhora possibilitou um melhor controle da ingestão alimentar, e assim, do balanço energético dos animais obesos exercitados. Entretanto, diferente deste presente estudo, que utilizou o treinamento físico de esteira como protocolo de exercício físico, os autores

utilizaram um protocolo agudo de exercício físico, de natação com duração de 6 horas (2 sessões de 3 horas de natação com intervalo de 45 minutos entre elas), de intensidade baixa (sem carga sobre o animal), com análises realizadas logo ao final do esforço (Chiarreotto-Ropelle *et al.*, 2013).

Quanto ao processo inflamatório e de estresse de retículo endoplasmático, os resultados encontrados no trabalho de Milanski e colaboradores foram similares ao do presente trabalho. Em ambos os estudos foi observado que os animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica sedentários tiveram aumento dos níveis de TLR4 e de sua ativação, ou seja, sua associação com a proteína MyDD88. Ademais, a obesidade provocou um aumento do conteúdo proteico das citocinas inflamatórias, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e, por conseguinte, teve uma maior ativação das vias inflamatórias, evidenciada pelo incremento de fosforilação da JNK e das proteínas marcadoras de estresse de retículo, p-PERK e p-eIF2 α (Milanski *et al.*, 2009).

Em relação ao processo apoptótico foram poucos estudos que avaliaram o efeito do treinamento físico sobre este fenômeno. No entanto, aqueles que fizeram não foram direcionados ao hipotálamo. No estudo de Lee e colaboradores, os autores tiveram como objetivo mensurar o efeito do treinamento físico aeróbio em esteira sobre as vias apoptóticas no coração de ratos Zuckers obesos (Lee *et al.*, 2013). Os autores evidenciaram que o treinamento físico reduziu a fragmentação de DNA, analisada pela técnica de TUNEL, diminuiu os níveis proteicos de TNF- α , do domínio de morte associado a Fas (FADD), de Bax, caspase 9, caspase 8 e caspase 3 nos ratos Zuckers obesos submetidos a 12 semanas a um protocolo de treinamento físico aeróbio, quando comparado aos seus pares obesos sedentários. Todos estes parâmetros das vias de apoptose estavam aumentados nos animais obesos sedentários ao compará-los aos ratos Zucker magros (Lee *et al.*, 2013).

Em outro estudo, foi investigado o efeito do treinamento físico de esteira sobre a memória de curto prazo e sobre as vias apoptóticas no hipocampo de ratos com lesão cerebral traumática (Kim *et al.*, 2010). Kim e colaboradores aplicaram um protocolo de treinamento aeróbio de 10 dias consecutivos, com duração da corrida por 30 minutos/dia após dois dias que os ratos sofreram lesão cerebral traumática (LCT). Corroborando com os resultados encontrados neste presente estudo, Kim *et al.* também encontrou que o treinamento físico aeróbio provocou diminuição da fragmentação de DNA nos ratos com LCT ao compará-los aos seus pares sedentários e lesionados. Os autores também mostraram que o treinamento físico conseguiu levar a uma redução de Caspase 3 e Bax

no hipocampo dos animais lesionados. Além disto, o treinamento físico foi eficiente em aumentar a expressão da proteína anti-apoptótica, Bcl-2 (Kim *et al.*, 2010). Os resultados obtidos em nosso estudo apontam para mesma direção, no qual o treinamento físico conseguiu reduzir os níveis das proteínas pró-apoptóticas, Bax e PARP1, e também da associação e, por conseguinte, ativação das proteínas APAF1/Caspase 9 e FADD/Caspase 8. Adicionalmente, o treinamento físico aplicado aumentou os níveis de Bcl2 no hipotálamo dos animais obesos treinados.

Estudo mais próximo ao nosso foi conduzido por Borg e colaboradores (Borg *et al.*, 2014), que investigaram se os efeitos do exercício físico no aumento da sensibilidade à leptina no hipotálamo são dependentes da última sessão de exercício físico (Borg *et al.*, 2014). Contudo, ao analisar o efeito de um protocolo de treinamento físico aeróbio de corrida em esteira, aplicado nas últimas 6 semanas do período experimental, em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica por 12 semanas, os autores observaram que não houve alteração na sensibilidade à leptina, na ingestão calórica e na via de sinalização celular de leptina nos animais obesos e nos animais obesos treinados (Borg *et al.*, 2014).

Ao pensar em um estudo translacional, transpondo estes resultados para a aplicação do treinamento físico como forma de tratamento para a obesidade já instalada em humanos, pode-se refletir sobre o estudo de van de Sande-Lee (2011). Neste estudo, ao analisar o sangue e o líquido cefalorraquidiano (LCR) de indivíduos obesos pré e pós-cirurgia bariátrica, pôde-se notar que a redução de massa corporal induzida por este procedimento cirúrgico possibilitou uma diminuição dos níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias no sangue destes indivíduos, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Além disto, houve um decréscimo na concentração de IL-6 e aumento da citocina anti-inflamatória, IL-10, no LCR destes indivíduos após 238 dias da realização da cirurgia bariátrica (Van De Sande-Lee *et al.*, 2011). No entanto, a atividade cerebral em resposta a ingestão oral de uma solução de dextrose avaliada por procedimento de ressonância magnética funcional não foi normalizada mesmo após a realização da cirurgia bariátrica. Indicando que talvez possa ocorrer morte neuronal e o controle da ingestão alimentar seja perdido, dificultando as ações que visam o tratamento da obesidade.

Por outro lado, observa-se que no presente trabalho os animais que foram treinados concomitantemente a oferta de dieta rica em gordura tiveram redução de massa corporal em relação aos seus pares obesos sedentários e o processo apoptótico atenuado. Isso reforça a importância de um aumento de gasto calórico induzido pelo exercício físico,

reduzindo então o ganho de massa corporal e também de uma alimentação adequada e saudável para prevenir o aparecimento de distúrbios hipotalâmicos. Neste sentido, o exercício físico pode ser uma estratégia segura e eficaz para a prevenção do aumento da massa adiposa, com efeitos sobre circuitos chaves responsáveis pelo controle da fome.

Dentre as limitações do presente estudo pode-se destacar que ao processarmos as amostras de hipotálamo, para a realização dos experimentos de imunoblot e imunoprecipitação, não foi possível separarmos os neurônios das células da glia (microglia). Uma análise separada poderia trazer informações adicionais em relação a expressão de TLR4 ou se a inflamação no hipotálamo é decorrente da ativação apenas dos macrófagos do SNC, a microglia, ou se ela ocorre diretamente nos neurônios, levando ao prejuízo na via de sinalização da leptina.

Levando em conta tais limitações e considerando os resultados obtidos no presente estudo, é possível inferir que o treinamento físico aeróbio de corrida em esteira realizado concomitantemente a oferta de uma dieta rica em gordura atenua a inflamação de baixo grau, o estresse de retículo endoplasmático e o fenômeno de apoptose em neurônios hipotalâmicos de camundongos obesos, reorganizando o balanço energético e permitindo atenuação do aumento da massa corporal e adiposa. Na figura 14, está desenhado um esquema que ilustra os principais resultados encontrados neste presente estudo. Por fim, considerando que estudos prévios com animais e humanos indicam que o processo apoptótico pode acontecer em neurônios hipotalâmicos na condição de obesidade, induzindo distúrbios permanentes no controle da fome, os resultados obtidos no presente estudo se tornam ainda mais relevantes e permitem um novo conhecimento do papel do exercício físico como terapia não farmacológica para a prevenção da obesidade.

Figura 14. Modelo ilustrativo com os principais resultados do estudo

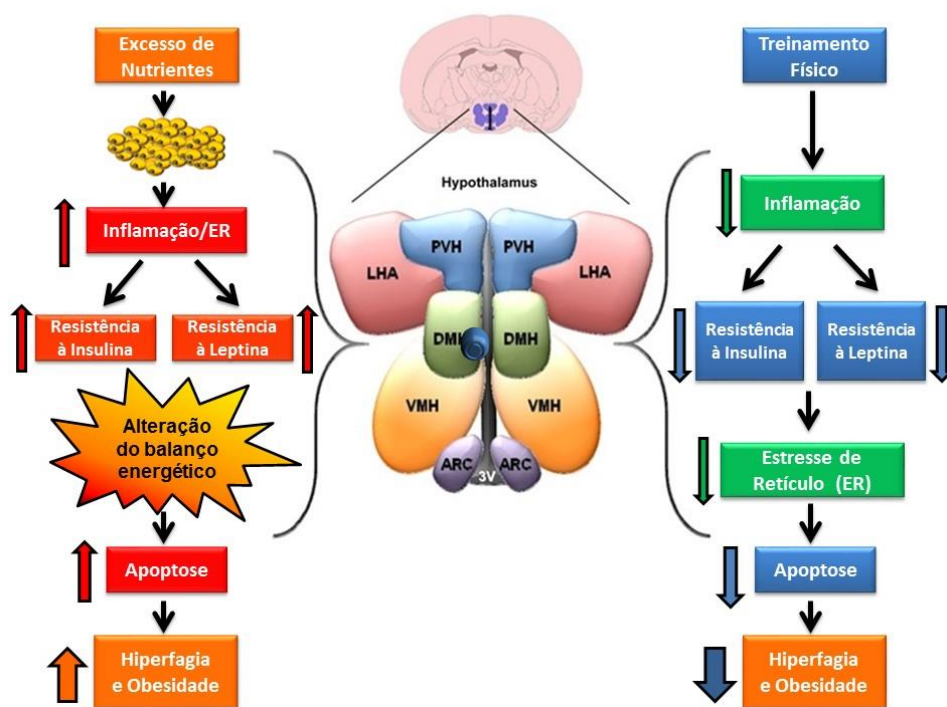


Figura 14. A obesidade induzida por dieta hiperlipídica desencadeou distúrbios no hipotálamo dos animais obesos, como a inflamação subclínica, estresse de retículo endoplasmático (ER), contribuindo para o desenvolvimento da resistência à insulina e leptina. Além disto, este aumento da ativação das vias inflamatórias desencadeou uma maior ativação das vias apoptóticas no hipotálamo dos animais obesos sedentários, provocando, por fim, um desequilíbrio no balanço energético destes animais. Por outro lado, o treinamento físico proposto foi eficiente em reduzir a inflamação e o estresse de retículo, melhorando a sensibilidade à insulina e leptina no hipotálamo dos animais obesos treinados. Deste modo, tanto por diminuir a ativação das vias apoptóticas, como por aumentar a atividade da via anti-apoptótica, mediada pela proteína Bcl-2, o treinamento físico foi capaz de melhorar a hiperfagia e a obesidade nos animais treinados em relação aos seus pares sedentários.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o treinamento físico foi eficiente em prevenir o aumento da adiposidade corporal, a inflamação, o estresse de retículo endoplasmático e o processo apoptótico induzidos pela oferta de uma dieta hiperlipídica no hipotálamo em camundongos Swiss. Tal fato reorganizou o controle do balanço energético e foi acompanhado pelo aumento da sensibilidade à leptina no hipotálamo dos animais exercitados.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. J., A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. v. 5ª edição, p. 1396, 2009.

ANDREUX, P. A.; WILLIAMS, E. G.; KOUTNIKOVA, H.; HOUTKOOPE, R. H.; CHAMPY, M. F.; HENRY, H.; SCHOONJANS, K.; WILLIAMS, R. W.; AUWERX, J. Systems Genetics of Metabolism: The Use of the BXD Murine Reference Panel for Multiscalar Integration of Traits. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1287-1299, Sep 14 2012.

ARAUJO, E. P.; AMARAL, M. E.; FILIPUTTI, E.; DE SOUZA, C. T.; LAURITO, T. L.; AUGUSTO, V. D.; SAAD, M. J.; BOSCHERO, A. C.; VELLOSO, L. A.; CARNEIRO, E. M. Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. **J Endocrinol**, v. 181, n. 1, p. 25-38, Apr 2004.

BAYS, H. E. Adiposopathy, diabetes mellitus, and primary prevention of atherosclerotic coronary artery disease: treating "sick fat" through improving fat function with antidiabetes therapies. **American Journal of Cardiology**, v. 110, n. 9 Suppl, p. 4B-12B, Nov 6 2012.

BEUTLER, B. A. TLRs and innate immunity. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1399-407, Feb 12 2009.

BI, S.; SCOTT, K. A.; HYUN, J.; LADENHEIM, E. E.; MORAN, T. H. Running wheel activity prevents hyperphagia and obesity in Otsuka long-evans Tokushima Fatty rats: role of hypothalamic signaling. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1676-85, Apr 2005.

BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 68, n. 2, p. 374-8, Feb 1989.

BORG, M. L.; ANDREWS, Z. B.; WATT, M. J. Exercise Training does not Enhance Hypothalamic Responsiveness to Leptin or Ghrelin in Male Mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 26, n. 2, p. 68-79, Feb 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

CARVALHEIRA, J. B.; SILOTO, R. M.; IGNACCHITTI, I.; BRENELLI, S. L.; CARVALHO, C. R.; LEITE, A.; VELLOSO, L. A.; GONTIJO, J. A.; SAAD, M. J. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. **FEBS Lett**, v. 500, n. 3, p. 119-24, Jul 6 2001.

CHIARREOTTO-ROPELLE, E. C.; PAULI, L. S.; KATASHIMA, C. K.; PIMENTEL, G. D.; PICARDI, P. K.; SILVA, V. R.; DE SOUZA, C. T.; PRADA, P. O.; CINTRA, D. E.; CARVALHEIRA, J. B.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R. Acute exercise suppresses hypothalamic PTP1B protein level and improves insulin and leptin signaling in obese rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 305, n. 5, p. E649-59, Sep 1 2013.

CHIBALIN, A. V.; YU, M.; RYDER, J. W.; SONG, X. M.; GALUSKA, D.; KROOK, A.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; ZIERATH, J. R. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 1, p. 38-43, Jan 4 2000.

CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; MORAES, J. C.; PAULI, J. R.; MORARI, J.; SOUZA, C. T.; GRIMALDI, R.; STAHL, M.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30571, 2012.

CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R. [Brain regulation of food intake and expenditure energy: molecular action of insulin, leptin and physical exercise]. **Rev Neurol**, v. 45, n. 11, p. 672-82, Dec 1-15 2007.

DA LUZ, G.; FREDERICO, M. J.; DA SILVA, S.; VITTO, M. F.; CESCONETTO, P. A.; DE PINHO, R. A.; PAULI, J. R.; SILVA, A. S.; CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; DE SOUZA, C. T. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 9, p. 2015-23, Sep 2011.

DA SILVA, A. S.; PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; OLIVEIRA, A. G.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 12, p. 2180-8, Dec 2010.

DE OLIVEIRA, C.; SCARABELOT, V. L.; DE SOUZA, A.; DE OLIVEIRA, C. M.; MEDEIROS, L. F.; DE MACEDO, I. C.; MARQUES FILHO, P. R.; CIOATO, S. G.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides. **Peptides**, v. 51, p. 46-53, Jan 2014.

DE SOUZA, C. T.; ARAUJO, E. P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R. L.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192-9, Oct 2005.

DE SOUZA, C. T.; FREDERICO, M. J. S.; DA LUZ, G.; CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; VELLOSO, L. A. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4 alpha pathway in insulin resistant mice. **Journal of Physiology-London**, v. 588, n. 12, p. 2239-2253, Jun 15 2010.

FERREIRA, J. C. B.; ROLIM, N. P. L.; BARTHOLOMEU, J. B.; GOBATTO, C. A.; KOKUBUN, E.; BRUM, P. C. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760-765, Aug 2007.

FLIER, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 337-50, Jan 23 2004.

FREESE, E. C.; GIST, N. H.; CURETON, K. J. Effect of prior exercise on postprandial lipemia: an updated quantitative review. **J Appl Physiol** (1985), v. 116, n. 1, p. 67-75, Jan 1 2014.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763-70, Oct 22 1998.

GABRIEL, B. M.; PUGH, J.; PRUNETTA-DELOCHE, V.; MOULIN, P.; RATKEVICIUS, A.; GRAY, S. R. The effect of high intensity interval exercise on postprandial triacylglycerol and leukocyte activation--monitored for 48 h post exercise. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82669, 2013.

GREGOR, M. F.; YANG, L.; FABBRINI, E.; MOHAMMED, B. S.; EAGON, J. C.; HOTAMISLIGIL, G. S.; KLEIN, S. Endoplasmic Reticulum Stress Is Reduced in Tissues of Obese Subjects After Weight Loss. **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 693-700, Mar 2009.

HALVERSTADT, A.; PHARES, D. A.; WILUND, K. R.; GOLDBERG, A. P.; HAGBERG, J. M. Endurance exercise training raises high-density lipoprotein cholesterol and lowers small low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein independent of body fat phenotypes in older men and women. **Metabolism**, v. 56, n. 4, p. 444-50, Apr 2007.

HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. **N Engl J Med**, v. 356, n. 3, p. 213-5, Jan 18 2007.

KILIC, M.; ULUSOY, O.; CIRRIK, S.; HINDISTAN, I. E.; OZKAYA, Y. G. Effect of exercise intensity on cerebrospinal fluid interleukin-6 concentration during recovery from exhaustive exercise in rats. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 101, n. 1, p. 21-31, Mar 2014.

KIM, D. H.; KO, I. G.; KIM, B. K.; KIM, T. W.; KIM, S. E.; SHIN, M. S.; KIM, C. J.; KIM, H.; KIM, K. M.; BAEK, S. S. Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury-induced hippocampal apoptosis. **Physiol Behav**, v. 101, n. 5, p. 660-5, Dec 2 2010.

KRAUS, W. E.; HOUMARD, J. A.; DUSCHA, B. D.; KNETZGER, K. J.; WHARTON, M. B.; MCCARTNEY, J. S.; BALES, C. W.; HENES, S.; SAMSA, G. P.; OTVOS, J. D.; KULKARNI, K. R.; SLENTZ, C. A. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **N Engl J Med**, v. 347, n. 19, p. 1483-92, Nov 7 2002.

LEE, D. C.; PATE, R. R.; LAVIE, C. J.; SUI, X.; CHURCH, T. S.; BLAIR, S. N. Leisure-time running reduces all-cause and cardiovascular mortality risk. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 64, n. 5, p. 472-81, Aug 5 2014.

LEE, S. D.; SHYU, W. C.; CHENG, I. S.; KUO, C. H.; CHAN, Y. S.; LIN, Y. M.; TASI, C. Y.; TSAI, C. H.; HO, T. J.; HUANG, C. Y. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 23, n. 6, p. 566-73, Jun 2013.

LIMA, A. F.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; FREDERICO, M. J.; PINHO, R. A.; VELLOSO, L. A.; DE SOUZA, C. T. Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice. **J Cell Physiol**, v. 221, n. 1, p. 92-7, Oct 2009.

MARINHO, R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; DA SILVA, A. S.; BERTOLI, F. C.; COLANTONIO, E.; D'ALMEIDA, V.; PAULI, J. R. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 7, p. 2917-26, Jul 2012.

MARTINS, C.; STENSVOLD, D.; FINLAYSON, G.; HOLST, J.; WISLOFF, U.; KULSENG, B.; MORGAN, L.; KING, N. A. Effect of moderate- and high-intensity acute exercise on appetite in obese individuals. **Med Sci Sports Exerc**, v. 47, n. 1, p. 40-8, Jan 2015.

MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D. E.; TSUKUMO, D. M.; ANHE, G.; AMARAL, M. E.; TAKAHASHI, H. K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H. C.; CARVALHEIRA, J. B.; BORDIN, S.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the

activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **J Neurosci**, v. 29, n. 2, p. 359-70, Jan 14 2009.

MONDA, M.; AMARO, S.; DE LUCA, B. The influence of exercise on energy balance changes induced by ventromedial hypothalamic lesion in the rat. **Physiol Behav**, v. 54, n. 6, p. 1057-61, Dec 1993.

MORAES, J. C.; COOPE, A.; MORARI, J.; CINTRA, D. E.; ROMAN, E. A.; PAULI, J. R.; ROMANATTO, T.; CARVALHEIRA, J. B.; OLIVEIRA, A. L.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5045, 2009.

OLCHAWA, B.; KINGWELL, B. A.; HOANG, A.; SCHNEIDER, L.; MIYAZAKI, O.; NESTEL, P.; SVIRIDOV, D. Physical fitness and reverse cholesterol transport. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 6, p. 1087-91, Jun 2004.

OZCAN, L.; ERGIN, A. S.; LU, A.; CHUNG, J.; SARKAR, S.; NIE, D.; MYERS, M. G., JR.; OZCAN, U. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 35-51, Jan 7 2009.

OZCAN, U.; CAO, Q.; YILMAZ, E.; LEE, A. H.; IWAKOSHI, N. N.; OZDELEN, E.; TUNCMAN, G.; GORGUN, C.; GLIMCHER, L. H.; HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 457-61, Oct 15 2004.

PARK, S.; LEE, J.; KANG, D. Y.; RHEE, C. W.; PARK, B. J. Indoor physical activity reduces all-cause and cardiovascular disease mortality among elderly women. **J Prev Med Public Health**, v. 45, n. 1, p. 21-8, Jan 2012.

PAULA, F. M.; LEITE, N. C.; VANZELA, E. C.; KURAUTI, M. A.; FREITAS-DIAS, R.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; ZOPPI, C. C. Exercise increases pancreatic beta-cell viability in a model of type 1 diabetes through IL-6 signaling. **Faseb Journal**, v. 29, n. 5, p. 1805-16, May 2015.

PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; SOUZA, C. T. D.; ROPELLE, E. R. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 399-408, 2009.

PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; CARVALHO-FILHO, M. A.; MORAES, J. C.; DE SOUZA, C. T.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. 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. **J Physiol**, v. 586, n. 2, p. 659-71, Jan 15 2008.

PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; DA SILVA, A. S. R.; MORAES, J. C.; PRADA, P. O.; LEME, J. A. C. D.; LUCIANO, E.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. **Mech Ageing Dev**, v. 131, n. 5, p. 323-329, May 2010.

PICARDI, P. K.; CALEGARI, V. C.; PRADA, P. O.; MORAES, J. C.; ARAUJO, E.; MARCONDES, M. C.; UENO, M.; CARVALHEIRA, J. B.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. **Endocrinology**, v. 149, n. 8, p. 3870-80, Aug 2008.

PIERRE, N.; DELDICQUE, L.; BARBE, C.; NASLAIN, D.; CANI, P. D.; FRANCAUX, M. Toll-like receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e65061, 2013.

RAO, X.; ZHONG, J.; XU, X.; JORDAN, B.; MAURYA, S.; BRAUNSTEIN, Z.; WANG, T. Y.; HUANG, W.; AGGARWAL, S.; PERIASAMY, M.; RAJAGOPALAN, S.; MEHTA, K.; SUN, Q. Exercise Protects against Diet-Induced Insulin Resistance through Downregulation of Protein Kinase C β in Mice. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81364, 2013.

ROMANATTO, T.; ROMAN, E. A.; ARRUDA, A. P.; DENIS, R. G.; SOLON, C.; MILANSKI, M.; MORAES, J. C.; BONFLEUR, M. L.; DEGASPERI, G. R.; PICARDI,

P. K.; HIRABARA, S.; BOSCHERO, A. C.; CURI, R.; VELLOSO, L. A. Deletion of tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. **J Biol Chem**, v. 284, n. 52, p. 36213-22, Dec 25 2009.

ROPELLE, E. R.; FERNANDES, M. F.; FLORES, M. B.; UENO, M.; ROCCO, S.; MARIN, R.; CINTRA, D. E.; VELLOSO, L. A.; FRANCHINI, K. G.; SAAD, M. J.; CARVALHEIRA, J. B. Central exercise action increases the AMPK and mTOR response to leptin. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. e3856, 2008.

ROPELLE, E. R.; FLORES, M. B.; CINTRA, D. E.; ROCHA, G. Z.; PAULI, J. R.; MORARI, J.; DE SOUZA, C. T.; MORAES, J. C.; PRADA, P. O.; GUADAGNINI, D.; MARIN, R. M.; OLIVEIRA, A. G.; AUGUSTO, T. M.; CARVALHO, H. F.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A.; CARVALHEIRA, J. B. C. IL-6 and IL-10 Anti-Inflammatory Activity Links Exercise to Hypothalamic Insulin and Leptin Sensitivity through IKK beta and ER Stress Inhibition. **Plos Biology**, v. 8, n. 8, Aug 2010.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; CARVALHEIRA, J. B. C. Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica. **Revista Motriz**, v. 11, n. 1, p. 6, 2005 2005.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; DA SILVA, A. S.; DE SOUZA, C. T.; GUADAGNINI, D.; CARVALHO, B. M.; CARICILLI, A. M.; KATASHIMA, C. K.; CARVALHO-FILHO, M. A.; HIRABARA, S.; CURI, R.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J.; CARVALHEIRA, J. B. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. **Diabetes**, v. 62, n. 2, p. 466-70, Feb 2013.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; PRADA, P. O.; DE SOUZA, C. T.; PICARDI, P. K.; FARIA, M. C.; CINTRA, D. E.; FERNANDES, M. F.; FLORES, M. B.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J.; CARVALHEIRA, J. B. 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.

SCHAFFLER, A.; SCHOLMERICH, J. Innate immunity and adipose tissue biology. **Trends Immunol**, v. 31, n. 6, p. 228-35, Jun 2010.

SCHENK, S.; HOROWITZ, J. F. Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 117, n. 6, p. 1690-8, Jun 2007.

SCHOTTELIUS, A. J.; MAYO, M. W.; SARTOR, R. B.; BALDWIN, A. S., JR. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. **J Biol Chem**, v. 274, n. 45, p. 31868-74, Nov 5 1999.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D., JR.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-71, Apr 6 2000.

SONDERGAARD, E.; POULSEN, M. K.; JENSEN, M. D.; NIELSEN, S. Acute changes in lipoprotein subclasses during exercise. **Metabolism**, v. 63, n. 1, p. 61-8, Jan 2014.

THALER, J. P.; YI, C. X.; SCHUR, E. A.; GUYENET, S. J.; HWANG, B. H.; DIETRICH, M. O.; ZHAO, X.; SARRUF, D. A.; IZGUR, V.; MARAVILLA, K. R.; NGUYEN, H. T.; FISCHER, J. D.; MATSEN, M. E.; WISSE, B. E.; MORTON, G. J.; HORVATH, T. L.; BASKIN, D. G.; TSCHOP, M. H.; SCHWARTZ, M. W. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest**, v. 122, n. 1, p. 153-62, Jan 2012.

THIVEL, D.; ISACCO, L.; MONTAURIER, C.; BOIRIE, Y.; DUCHE, P.; MORIO, B. The 24-h energy intake of obese adolescents is spontaneously reduced after intensive exercise: a randomized controlled trial in calorimetric chambers. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29840, 2012.

TORSONI, M. A.; CARVALHEIRA, J. B.; PEREIRA-DA-SILVA, M.; DE CARVALHO-FILHO, M. A.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n. 1, p. E216-23, Jul 2003.

TSUKUMO, D. M.; CARVALHO-FILHO, M. A.; CARVALHEIRA, J. B.; PRADA, P. O.; HIRABARA, S. M.; SCHENKA, A. A.; ARAUJO, E. P.; VASSALLO, J.; CURI, R.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1986-98, Aug 2007.

VAN DE SANDE-LEE, S.; PEREIRA, F. R.; CINTRA, D. E.; FERNANDES, P. T.; CARDOSO, A. R.; GARLIPP, C. R.; CHAIM, E. A.; PAREJA, J. C.; GELONEZE, B.; LI, L. M.; CENDES, F.; VELLOSO, L. A. Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. **Diabetes**, v. 60, n. 6, p. 1699-704, Jun 2011.

VELLOSO, L. A. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese: implicações no desenvolvimento da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 165-176, 2006.

VELLOSO, L. A.; ARAUJO, E. P.; DE SOUZA, C. T. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 3, p. 189-93, 2008.

YI, C.-X.; AL-MASSADI, O.; DONELAN, E.; LEHTI, M.; WEBER, J.; RESS, C.; TRIVEDI, C.; MÜLLER, T. D.; WOODS, S. C.; HOFMANN, S. M. Exercise protects against high-fat diet-induced hypothalamic inflammation. **Physiol Behav**, v. 106, n. 4, p. 485-490, 2012.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1 1994.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



CEUA/Unicamp

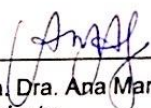
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

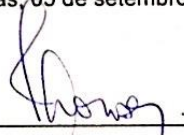
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre o processo inflamatório e apoptótico em neurônios hipotalâmicos de controle da fome em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica" (protocolo nº 2805-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Rodrigo / Rodolfo Marinho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 05 de setembro de 2012.

Campinas, 05 de setembro de 2012.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária ExecutivaCEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – BrasilTelefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>