



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO HUMANO E
TECNOLOGIAS

OS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO NA POLARIZAÇÃO DE
MACRÓFAGOS NO TECIDO ADIPOSEO MARROM DE CAMUNDONGOS SWISS
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

THIAGO LUCAS DE CASTRO

Rio Claro – SP
2021

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO HUMANO E
TECNOLOGIAS**

**OS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO NA POLARIZAÇÃO DE
MACRÓFAGOS NO TECIDO ADIPOSEO MARROM DE CAMUNDONGOS SWISS
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

THIAGO LUCAS DE CASTRO

Orientador: Prof. Doutor Alexandre Gabarra de Oliveira

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento Humano e Tecnologias.

**Rio Claro – SP
2021**

C355e Castro, Thiago Lucas de
Os efeitos do exercício físico agudo na polarização de macrófagos no tecido adiposo marrom de camundongos swiss alimentados com dieta hiperlipídica / Thiago Lucas de Castro. -- Rio Claro, 2021
75 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Alexandre Gabarra de Oliveira

1. Tecido adiposo marrom. 2. Obesidade. 3. Inflamação. 4. Macrófagos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro




CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: OS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO NA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS NO TECIDO ADIPOSEO MARROM DE CAMUNDONGOS SWISS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

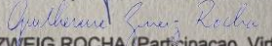
AUTOR: THIAGO LUCAS DE CASTRO

ORIENTADOR: ALEXANDRE GABARRA DE OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em DESENVOLVIMENTO HUMANO E TECNOLOGIAS, área: Tecnologias nas Dinâmicas Corporais pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ALEXANDRE GABARRA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Educação Física / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP


Prof. Dr. GUILHERME GIANNINI ARTIOLI (Participação Virtual)
Escola de Educação Física e Esportes / USP - Universidade de São Paulo -SP


Prof. Dr. GUILHERME ZWEIG ROCHA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas - SP

Rio Claro, 17 de março de 2021

Dedico este trabalho aos meus pais, Miriam Cristina Miguel de Castro e Edwalds Kelb Ribeiro de Castro. Sem vocês em minha vida, eu não teria alcançado nada. Com toda a certeza, a parte mais difícil desse trabalho foi vocês que realizaram. Eu percorri um percurso onde pedras foram tiradas e proteção me foi dada. Sendo assim, foi fácil, pois percorri o caminho com mais amor e flores que pude encontrar. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

O amor de um pai por seu filho é incondicional. Dessa forma, agradeço aos meus pais por tanto amor. Acho justo dizer o quanto vocês são importantes na minha vida e para a execução deste trabalho. Como meus companheiros, torceram para que cada experimento desse certo, me encorajaram cada vez que o resultado deu errado e me incentivaram cada vez que o caminho ficou estreito e pensei em desistir. Vocês me propuseram o mais valioso bem que poderia ter, pois, se hoje eu sou alguém, é devido ao sucesso de vocês. De forma justa, sou grato a Deus por ter me dado a família que eu tenho.

Sou grato também às minhas tias Diva e Cristina Zavaglia. Como mestra e doutora, foram exemplos para mim e que, por experiência, me aconselharam e ajudaram a percorrer esse caminho. O apoio de vocês foi essencial e de grande importância nos momentos de dificuldades na execução dessa dissertação.

Agradeço ao meu orientador Alexandre Gabarra de Oliveira pela oportunidade de ser seu aluno, pelo ensinamento e suporte que tive ao longo dessa dissertação. Agradeço por sempre estar disponível e acessível nos momentos que precisei.

Aos membros do LABIMEF, meu obrigado pelo apoio nos experimentos e companhia. Assim, também agradeço a todos que pertencem ao LICRI, pois foi lá que aprendi e realizei os experimentos aqui expostos. Meu agradecimento em especial à Heloisa Balan Assalin, que, sem nenhuma restrição, compartilhou anos de pesquisa comigo, permitindo que essa dissertação fosse realizada.

Por fim, agradeço meu amigo de graduação e mestrado, Hiago Moreno Camilo. Nos conhecemos desde o terceiro colegial, mas foi necessária uma graduação para nos tornarmos amigos. Assim, estendo às minhas grandes amigas, Amanda Cassab Basso e Kelly Cristiane, o meu muito obrigado, pois vocês três compartilharam cada momento, sentimento e emoção dessa dissertação, sem sombra de dúvidas me escutaram todas as vezes que precisei, além de me aconselharem e me animarem todas as vezes que recorri a vocês.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Introdução: No decurso da obesidade o tecido adiposo branco funciona como promotor de inflamação, condição relacionada com a resistência à insulina (RI), enquanto o tecido adiposo marrom (TAM) pode contribuir com o equilíbrio energético através da termogênese. Paralelamente, em ambos os tecidos encontramos macrófagos infiltrados que, em condições fisiológicas, estão majoritariamente polarizados no sentido M2, ou seja, possuem um perfil anti-inflamatório. Contudo, na obesidade há um predomínio da polarização M1, contribuindo para inflamação sistêmica e RI. Nesse contexto, a literatura aponta que a falta de macrófagos M2 pode comprometer a termogênese do TAM, colaborando assim com o agravamento da obesidade e RI. **Objetivo:** Investigar os efeitos do exercício agudo de natação na infiltração e no balanço da polarização de macrófagos no TAM. **Métodos:** Camundongos *Swiss* foram divididos em três grupos experimentais: alimentados com dieta padrão (CTL), alimentados com dieta hiperlipídica (DH) ou alimentados com dieta hiperlipídica e submetido a um protocolo de exercício agudo de natação (EXE). Foram realizados testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT) com a finalidade de averiguar a resistência à insulina; e análises de imunofluorescência para verificar a infiltração e polarização de macrófagos. **Resultados:** Os grupos DH e EXE apresentaram peso corporal final maior que o CTL, sem qualquer diferença entre os primeiros. O exercício agudo foi capaz de reduzir a glicemia de jejum e a intolerância à glicose. Contudo, o exercício agudo promoveu melhora na tolerância a glicose. Quanto aos macrófagos, a natação não foi capaz de atenuar a infiltração, mas promoveu substancial incremento na polarização M2 e na quantidade de IL-10. **Conclusão:** O exercício físico possui a capacidade de promover a polarização de macrófagos M2 no tecido adiposo marrom, contribuindo assim para um aumento da termogênese. Dessa forma, o exercício pode diminuir a inflamação subclínica e crônica por mecanismos que vão além da perda de peso, contribuindo para o controle da resistência à insulina.

Palavras chaves: tecido adiposo marrom, obesidade, inflamação, macrófagos

ABSTRACT

Introduction: During obesity, white adipose tissue works as a promoter of inflammation, a condition related to insulin resistance (IR), while brown adipose tissue (TAM) can contribute to energy balance through thermogenesis. At the same time, in both tissues we found infiltrated macrophages that, under physiological conditions, are mostly polarized in the M2 direction, that is, they have an anti-inflammatory profile. However, in obesity there is a predominance of M1 polarization, contributing to systemic inflammation and IR. In this context, the literature points out that the lack of M2 macrophages can compromise the thermogenesis of TAM, thus contributing to the worsening of obesity and IR. **Objective:** To investigate the effects of acute swimming exercise on the infiltration and balance of macrophage polarization in TAM. **Methods:** Swiss mice were divided into three experimental groups: fed a standard diet (CTL), fed a high-fat diet (DH) or fed a high-fat diet and submitted to an acute swimming exercise protocol (EXE). Glucose (GTT) and insulin (ITT) tolerance tests were performed in order to ascertain insulin resistance; and immunofluorescence analyzes to verify macrophage infiltration and polarization. **Results:** The DH and EXE groups presented final body weight higher than the CTL, without any difference between the former. Acute exercise was able to reduce fasting glucose and glucose intolerance. However, these did not promote improvement in glucose tolerance. As for macrophages, swimming was not able to attenuate the infiltration, but it promoted a substantial increase in M2 polarization and in the amount of IL-10. **Conclusion:** Physical exercise has the ability to promote the polarization of M2 macrophages in brown adipose tissue, thus contributing to an increase in thermogenesis. Thus, exercise can reduce subclinical and chronic inflammation through mechanisms that go beyond weight loss, contributing to the control of insulin resistance.

Key words: brown adipose tissue, obesity, inflammation, macrophages.

Lista de figuras

Figura 1 - Prevalência de déficit de peso, excesso de peso e obesidade na população de 20 anos ou mais de idade, por sexo Brasil – períodos 2002-2003, 2008-2009, 2013 e 2019	14
Figura 2 - Funcionamento da via da insulina.....	19
Figura 3 - Morfologia do TAB	20
Figura 4 - Glóbulos brancos	23
Figura 5 - Polarização de macrófagos em magros e obesos	27
Figura 6 - Localização do TAM.....	28
Figura 7 - Morfologia do TAM.....	29
Figura 8 - Diferença entre três tecidos adiposos: TAB, TAM e bege.....	34
Figura 9 - Desenho experimental dos animais	44
Figura 10 - Esquema experimental do jejum dos animais	46
Figura 11 - Evolução do peso corporal e peso final dos animais	50
Figura 12 - Resultados da medição de glicose sérica nos grupos	51
Figura 13 - Teste de tolerância à glicose GTT	52
Figura 14 - Caracterização da tolerância à insulina (kitt).	52
Figura 15 - Caracterização da infiltração de macrófagos (TNF- α)	53
Figura 16 - Caracterização da polarização de macrófagos M2 (IL-10).....	55

Lista de tabelas

Tabela 1 - Índices de massa corporal e respectivas faixas indicativas.....	17
Tabela 2 - Anticorpos e diluições	43
Tabela 3 - Composição da dieta hiperlipídica.....	44
Tabela 4 - Composição da dieta padrão.....	45
Tabela 5 - Quantidade de fotos resultantes da imunofluorescência	49

Lista de abreviaturas e siglas

AGLs	Ácidos graxos livres
Akt	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
CTL	Controle
DH	Dieta hiperlipídica
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
GLUT4	Transportador de glicose 4
GTT	Teste de tolerância à glicose
IB	Imunoblot
IKK β	inibidor do fator nuclear kappa β
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
INF γ	Interferon γ
IR	Receptor da insulina
IRS	Substrato para o receptor da insulina
IRS1	Substrato para o receptor da insulina 1
IRS2	Substrato para o receptor da insulina 2
ITT	Teste de tolerância à insulina
JNK	c-Jun-N-terminal quinase
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Ativação clássica de macrófago
M2	Ativação alternativa de macrófago
MCP-1	Proteína quimioatraente para monócitos-1
NF κ B	Fator nuclear kappa B
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PI3k	Fosfatidilinositol 3-quinase
PPAR γ	Receptor para peroxissomo proliferador-ativado
PRRS	Receptores de reconhecimento padrão
RI	Resistência à insulina
SNS	Sistema nervoso simpático

TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
TLR4	Receptor tipo toll 4
TLRS	Receptores do tipo toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UCP1	Proteína desacopladora 1

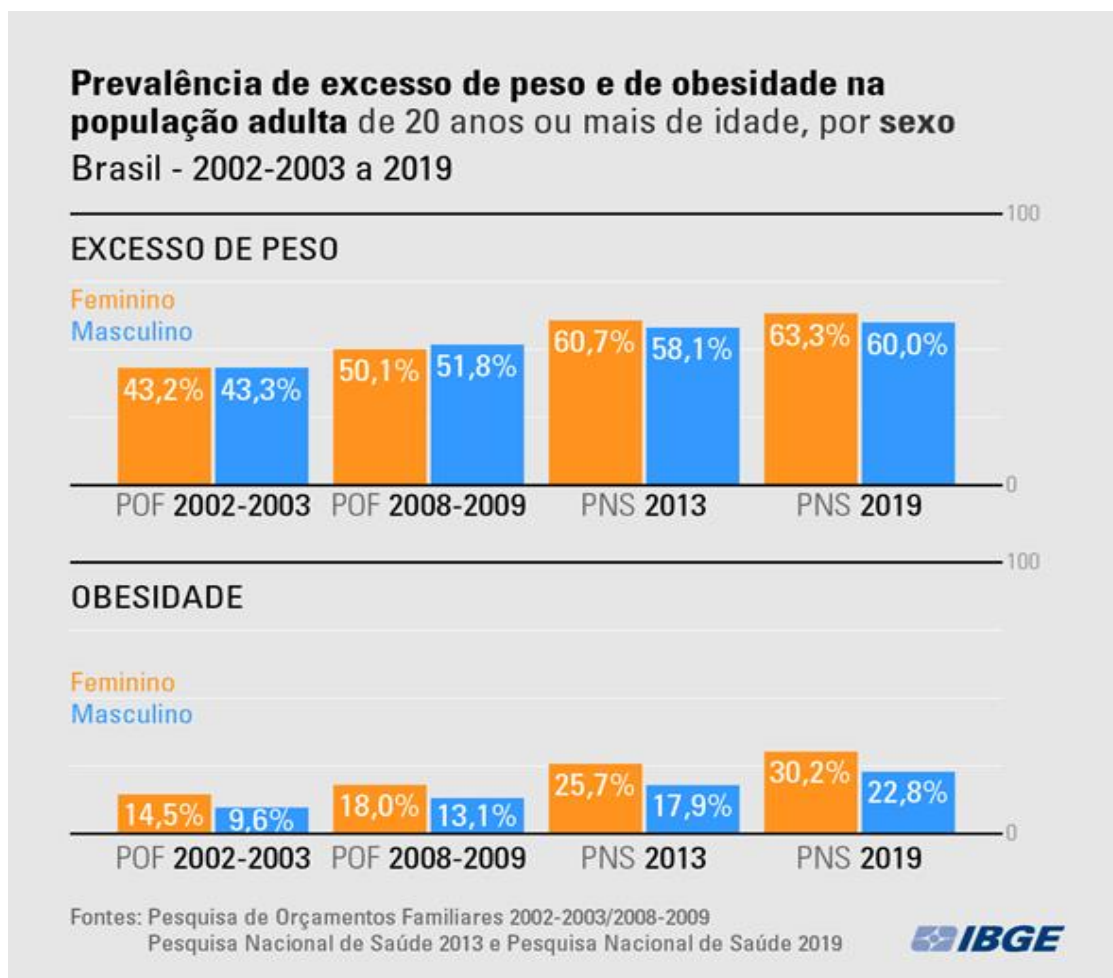
Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Vias de sinalização da insulina e resistência	17
1.2 Tecido adiposo branco: um órgão endócrino	20
1.3 Sistema imune	22
1.4 A inflamação	24
1.5 Células do sistema imune: macrófagos	25
1.6 O tecido adiposo marrom	27
1.7 O TAM e macrófagos M2	32
1.8 <i>Browning</i> : uma extensão do TAM	33
1.9 O exercício físico	35
1.10 O exercício físico e o tecido adiposo marrom	38
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVO.....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
5 RESULTADOS	50
5.1 Caracterização temporal do peso corporal	50
5.2 Parâmetros metabólicos e via de sinalização da insulina	50
5.2.1 Glicemia de jejum	51
5.2.2 Teste de tolerância à glicose (GTT)	51
5.2.3 Teste de tolerância à insulina (ITT) – Constante de decaimento (kitt)	52
5.3 A infiltração e polarização dos macrófagos	53
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	63
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
9 ANEXOS.....	75
Anexo I – Folha de aprovação da comissão de Ética do Uso de Animal CEUA.....	75

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde a nível mundial, a cada dia o número de obesos aumenta cada vez mais, ou seja, ela cresce em níveis alarmantes. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016 13% da população mundial com 18 anos ou mais estava obesa e 39% dos adultos estava com sobrepeso, ou seja, em futuro próximo as chances desses indivíduos se tornarem obesos são grandes, aumentando ainda mais esse número (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). No Brasil, o quadro não é diferente, pois a Pesquisa Nacional da Saúde (PNS) de 2019, apontou uma evolução no aumento de pessoas obesas e com sobrepeso também no Brasil. Segundo esses dados, já em 2008 mais da metade da população brasileira estava com excesso de peso, enquanto que a obesidade em 2019 acometia 22,8,5% da população masculina e cerca de 30,2% da população feminina, como pode ser observado na Figura 1, que apresenta as informações do período de 2002 até 2019.

Figura 1 - Prevalência de déficit de peso, excesso de peso e obesidade na população de 20 anos ou mais de idade, por sexo Brasil – períodos 2002-2003, 2008-2009, 2013 e 2019



Fonte: Página do IBGE no *facebook*¹.

O Vigitel (Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) em uma de suas missões, visa conhecer o estado de saúde da população brasileira e apontar, dessa forma, possíveis medidas e intervenções que possam ser tomadas a fim de diminuir e tratar doenças crônicas não transmissíveis, como a obesidade. A pesquisa é realizada pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, através de ligação telefônica para qualquer indivíduo que tenha 18 anos ou mais, possua telefone fixo, e resida em uma das 26 capitais brasileiras e ou no Distrito Federal poderá participar através de sorteio cego. Dados mais atuais, apresentados pelo VIGITEL de

¹ Disponível em < <https://www.facebook.com/ibgeoficial/posts/o-percentual-de-pessoas-obesas-em-idade-adulta-no-brasil-mais-do-que-dobrou-em-1/4044276365599182/> >
.Acessado em 12/03/2021.

2019, apontam que a frequência de excesso de peso foi de 55,4%, enquanto a frequência de adultos obesos foi de 20,3% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A preocupação com o crescente número de doenças crônicas não transmissíveis como a obesidade se dá por elas serem um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, ocasionando um alto índice de morte. Dados da OMS (Organização mundial da saúde) apontam que 71% das mortes são causadas por doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias e diabetes, que são provenientes de condições pré-existentes, e estão em muitos casos correlacionadas com a obesidade, como fumo, inatividade física, consumo de álcool e dietas não saudáveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Tanto o sobrepeso quanto a obesidade podem ser entendidos como um desequilíbrio entre ingestão alimentar e gasto energético, ou seja, aparecem em indivíduos que consomem mais calorias do que o considerado necessário para a homeostase, associado a níveis muito baixos de atividade física ou ainda inatividade física (KOPELMAN PETER G., 2000; LANGIN, 2010).

Fatores genéticos podem contribuir para o ganho de peso excessivo, sendo assim, a preocupação torna-se ainda maior quando já existem casos de obesidade severa na família. Por outro lado, o estilo de vida parece ser fator chave para o desencadeamento desta doença, a pressão do mercado de trabalho que exige horas de trabalho e dedicação, aliado com a oferta de refeições prontas, baratas e com alto conteúdo energético, contudo pobres em vitaminas, minerais e fibras contribuem em grande parte para o estabelecimento de quadros de obesidade. Pode-se compreender que a obesidade pode ter vários agentes causadores, ou seja, é uma doença multifatorial (KOPELMAN PETER G., 2000; LANGIN, 2010).

Ao mesmo tempo em que a obesidade possui diversas causas, ela também pode desencadear diversas comorbidades, como resistência à insulina (RI), diabetes mellitus tipo II (DM2), dislipidemia, doenças cardiovasculares, e até mesmo alguns tipos de câncer (KOPELMAN PETER G., 2000; LANGIN, 2010). Tal capacidade é possível pela obesidade ser considerada uma doença crônica e de baixo grau inflamatório, situação que colabora para o

desenvolvimento e/ou agravamento dessas comorbidades (YE, 2013; LEE E LEE, 2014; MORRIS *et al.*, 2015).

O índice de massa corporal (IMC), é um indicador que de maneira simples, verifica se um indivíduo encontra-se no peso ideal, calculado a partir da divisão da massa em kg pela altura do indivíduo elevada ao quadrado. O índice é amplamente utilizado pela OMS e pode ser conferido na tabela abaixo, que apresenta os valores e as respectivas faixas indicativas de classificação de peso e risco à saúde.

Tabela 1 - Índices de massa corporal e respectivas faixas indicativas

IMC (KG/M ²)	CLASSIFICAÇÃO	OBESIDADE/GRAU CLASSE	RISCO DE DOENÇA
< 18,5	Abaixo do peso	0	Normal ou elevado
18,5 – 24,9	Normal	0	Normal
25 – 29,9	Pré-obeso	0	Pouco elevado
30 – 34,9	Obesidade Grau	I	Elevado
30 – 39,9	Obesidade Grau	II	Muito elevado
≥40,0	Obesidade Grau	III	Muitíssimo elevado

Fonte: Elaborado a partir das informações disponíveis na página da World Health Organization².

Dessa forma, estuda-se maneiras para amenizar ou conter a obesidade. Nos capítulos abaixo será discutido com mais profundidade como o desenvolvimento da obesidade pode resultar em outras comorbidades a exemplo da resistência à insulina. Também será apresentado e discutido o tecido adiposo marrom, apontado pela literatura como órgão termogênico e que contribui para a depuração de glicose e gorduras. Por fim, evidenciamos o papel do exercício físico no controle e combate da obesidade e resistência à insulina, e o seu possível papel na ativação do tecido adiposo marrom, e melhora do quadro inflamatório, possibilitando um melhor funcionamento do mesmo.

1.1 Vias de sinalização da insulina e resistência

Como discutido anteriormente, a RI pode surgir diante da obesidade. Para entender o como esse fenômeno ocorre, é necessário compreender o

² Disponível em: <<https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>>. Acessado em: 12/05/2020

papel e função da insulina no controle glicêmico de indivíduos saudáveis, para então, compreender as mudanças decorrentes da obesidade.

Manter os níveis de açúcar ideais no sangue é uma tarefa complexa. De forma resumida, pode-se dizer que dois hormônios ajudam nesse controle, o glucagon e a insulina. De forma didática, é possível considerar que esses dois hormônios possuem papel antagônicos, já que o glucagon é secretado pelas células α das ilhotas de Langerhans em quadros que a glicose sanguínea diminui, sua principal função é garantir um aumento da glicose (Guyton AC, HALL JE, 2017).

Já a insulina é produzida pelas células β pancreáticas, e induz a absorção de glicose nos tecidos que possuem sensibilidade aos seus efeitos, tais como o músculo esquelético e tecido adiposo, já no fígado a insulina tem como principal função inibir a neoglicogênese, produção de glicose (KAHN, 2000; SALTIEL, ALAN R, 2001; YE, 2013). A liberação de insulina ocorre em resposta ao aumento de glicose plasmática ou de aminoácidos, como salientam Fu, Gilbert e Liu (2013) e Saltiel, Alan R, (2001), em especial pela leucina, que faz parte de um grupo de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada, conhecidos amplamente como BCAAs (NAIR E SHORT, 2005; XIAO *et al.*, 2011).

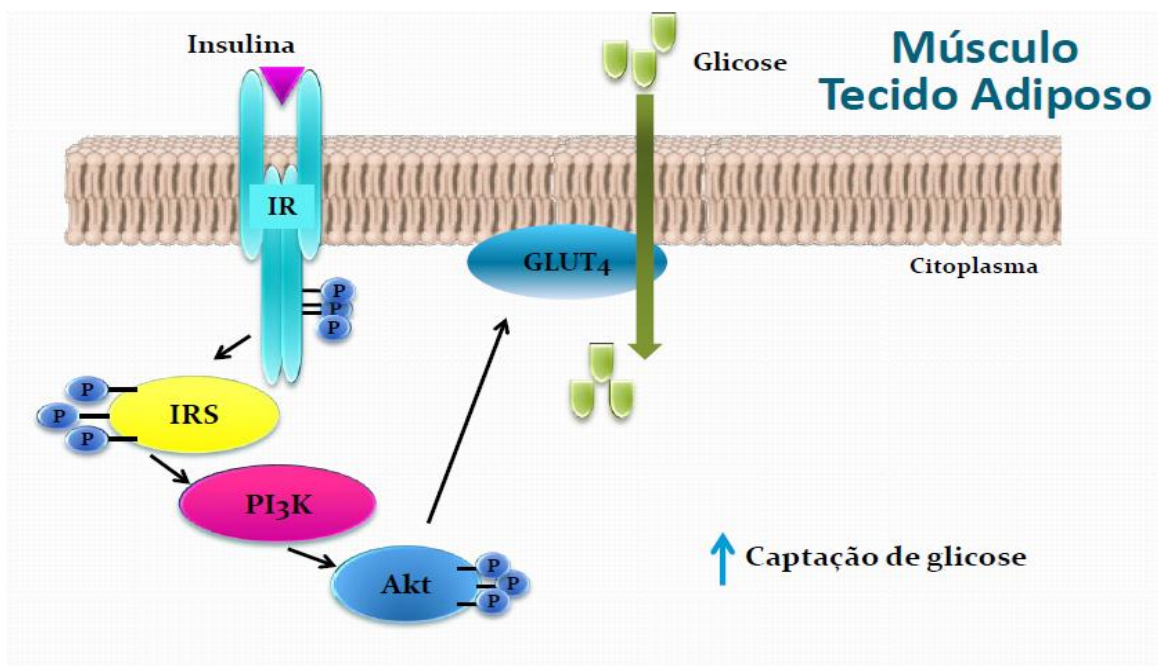
A insulina e o músculo esquelético, possuem uma interessante relação. GROOP *et al.* (1989) explicam que, em jejum os níveis de insulina se encontram baixos, que faz com que haja pouca captação de glicose pelo músculo esquelético e, ao mesmo tempo, ocorra a lipólise pelos adipócitos e, conseqüentemente, há aumento de ácidos graxos na corrente sanguínea. Além disso, neste quadro de jejum, o músculo esquelético utiliza os ácidos graxos como fonte energética, enquanto o cérebro utiliza exclusivamente a glicose.

Além do seu papel no controle glicêmico, a insulina, dada a sua capacidade anabólica pode induzir a proliferação celular, promover um aumento da função mitocondrial e estimular a síntese de glicogênio e ácido graxo (SALTIEL, ALAN R, 2001; YE, 2007).

A figura 2 abaixo apresenta a sinalização da insulina, iniciada pelo receptor de insulina (IR) específico na membrana e que é uma proteína heterotetramérica com duas subunidades alfa (α) e duas betas (β) (KAHN,

2000). As subunidades α são externas à membrana celular, já as subunidades β são proteínas transmembranas. Quando a insulina é ligada à porção α do receptor, ocorre uma mudança conformacional que leva à autofosforilação das subunidades β . Uma vez que o IR é ativado, ele adquire atividade quinase, capaz de promover a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) (KAHN, 2000). Uma vez fosforiladas as proteínas IRSs criam sítios de ligação para diversas proteínas, como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que resulta na sua ativação (Kahn, 2000). Essa ativação da PI3K permite a maior fosforilação da proteína serina/treonina quinase b (Akt) (CEFALU, 2001), enquanto a Akt, por sua vez, aumenta a captação de glicose periférica do tecido muscular e adiposo por promover a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4) do citoplasma para a membrana plasmática e resulta em captação celular de glicose por difusão facilitada após ingestão alimentar (ABEL, E. D *et al*, 2001).

Figura 2 - Funcionamento da via da insulina



Fonte: Tobar³ (17 de fevereiro de 2020, comunicação pessoas)

A RI pode ser definida como uma dificuldade de resposta dos tecidos sensíveis à ação da insulina como músculo esquelético, fígado e tecido adiposo

³ Fluxograma apresentado por Natália Tobar, em reunião do grupo de pesquisa.

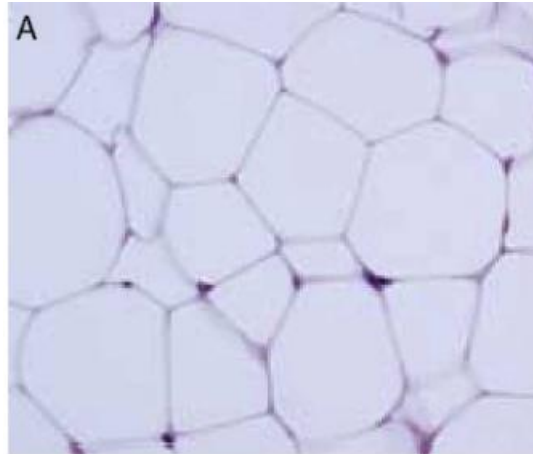
(KAHN, 2000; YE, 2013; LEE E LEE, 2014). Durante o desenvolvimento da RI surge um quadro de hiperinsulinemia compensatória, que é o aumento na produção de insulina pelas células β do pâncreas com objetivos de manter os níveis glicêmicos dentro dos limites normais (YE, 2013). Em um próximo estágio, a RI se desenvolve até que ocorra disfunções nas células β pancreáticas, situação que agrava a dificuldade de ação da insulina, pois essas células já não conseguem produzir altos níveis de insulina, ou seja, a sua produção torna-se menor que o necessário para manutenção dos níveis glicêmicos adequados e leva a um quadro de hiperglicemia, caracterizado pela instalação da DM 2 (CEFALU, 2001).

Além disso, o fígado também possui um importante papel em relação à RI, pois em situações de jejum prolongando, ocorre a produção e liberação de glicose para manter os níveis de açúcar no sangue adequados para a homeostase (YE, 2013; LEE E LEE, 2014). Por isso, durante a alimentação de um indivíduo saudável, o aumento na concentração da insulina inibe a produção hepática de glicose, mas em um quadro de RI, o fígado continua a produzir glicose mesmo em períodos pós prandial (YE, 2013).

1.2 Tecido adiposo branco: um órgão endócrino

Outro elemento responsável por contribuir com a RI na obesidade é o TAB (tecido adiposo branco). Este tecido é caracterizado pelo armazenamento de gordura em períodos de balanço energético positivo, já em situações de pouca ingestão, a energia contida no TAB, pode ser mobilizada para ser metabolizada (LANGIN, 2010). A sua estrutura é definida pela presença de adipócitos, células especializadas no armazenamento de grandes gotículas de gorduras, como pode ser visto na figura 3 abaixo, o que confere a este tecido grande capacidade de hipertrofia e em alguns casos hiperplasia, sendo que o primeiro fenômeno é a expansão no tamanho da célula, e o segundo se refere à multiplicação da quantidade de células (GOSS, 1966).

Figura 3 - Morfologia do TAB



Fonte: Ràfols, 2013, p.7.

O TAB também não possui restrições quanto ao seu crescimento. Um único adipócito branco é capaz de armazenar uma grande gota lipídica que abrange de 85-90% de seu citoplasma e esse tecido é composto basicamente por adipócitos, macrófagos, tecido conjuntivo, nervoso e vascular (ESTEVE RÀFOLS, 2014). Além disso, ele possui pequenas quantidades de mitocôndrias que exercem sua função somente para subsidiar a função lipogênica, ou seja, tem pouca capacidade oxidativa (MANTOVANI *et al.*, 2004).

Antigamente, acreditava-se que o TAB era somente capaz de armazenar gordura para ser usada em períodos de baixa ingestão alimentar, porém foi descoberto que é um tecido com funções endócrinas capaz de se comunicar com diversos outros tecidos através da secreção de hormônios e citocinas, conhecidas em seu conjunto como adipocinas (CINTI, 2002; LANGIN, 2010). Os adipócitos do TAB também são capazes de produzir uma citocina pró-inflamatória em especial chamada de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

Há consenso na literatura atual que o TNF- α é capaz de promover RI, pois estudos, como o de Hotamisligil *et al.* (1994), demonstraram que a administração de TNF- α faz com que a ação da insulina fosse prejudicada, uma vez que fora possível observar a diminuição da captação da glicose e até mesmo a expressão do GLUT4. Outro estudo mais recente de Lauterbach e Wunderlich (2017) mostrou que o TNF- α é capaz de comprometer a fosforilação em tirosina do IR e do IRS, uma vez que a via de captação da glicose é interrompida.

Na obesidade o consumo de calorias é descontrolado, e isso acarreta a rápida e intensa expansão do TAB. Para evitar que o TAB se expanda de forma ectópica, ou seja, em áreas que não são comuns ter gordura, inicialmente ocorre uma inflamação para permitir a expansão saudável desse tecido, permitindo a preservação e integralidade diante das adaptações metabólicas que o tecido enfrenta diante a supernutrição (VILLARROYA *et al.*, 2018). Contudo, como na obesidade a expansão do TAB é constante, essa inflamação pode ter repercussões que contribui para o aumento de conteúdo inflamatório e agravamentos das comorbidades resultantes da obesidade.

A concepção do TAB como órgão endócrino é importante, pois como não possui limites para seu crescimento também não terá restrições a quantidade de adipocinas secretadas, ou seja, desequilíbrios como aumento da inflamação nesse tecido podem gerar repercussões sistêmicas.

1.3 Sistema imune

Durante o período de expansão do TAB algumas células do sistema imune podem migrar até este tecido para promover as mudanças necessárias para a sua expansão. Um exemplo são os macrófagos que invadem o TAB e dão suporte a sua expansão, tendo como produto a inflamação.(VILLARROYA *et al.*, 2018). Dessa forma, é necessário compreender o funcionamento do sistema imune, e as cascatas de eventos que resultam da infiltração e polarização de macrófagos na obesidade.

Em um mundo repleto de doenças se vê a necessidade de um sistema que seja eficiente ao combate a vírus, protozoários, bactérias, entre outros causadores de malefícios. O sistema imune é essencial para a manutenção da espécie contribuindo com adaptações necessárias à medida que o meio ambiente se modifica e apresenta novas ameaças.

Após a primeira infância, as células do sistema imune são produzidas na medula óssea e são classificadas pelos hematologistas em glóbulos brancos de 5 populações diferentes, conforme pode ser visto na figura 4 abaixo que reproduz a classificação de Nicholson (2016), de acordo com a proteína que a célula expressa em sua membrana celular: neutrófilo, linfócitos, monócitos e basófilos/eosinófilos. Ainda sobre essas células, entre essas

proteínas se encontram os receptores que interagem com o meio ambiente, que podem se ligar a receptores de outras células ou a moléculas solúveis como as citocinas (CHAPLIN, 2010; NICHOLSON, 2016).

Figura 4 - Glóbulos brancos

Glóbulos brancos	Funções
Neutrófilos	Resposta precoce, fagocitose, e morte local
Linfócitos	Imunidade adaptativa, sub dividida entre células T e B.
Monócitos	Resposta precoce, fagocitose, e apresentação de antígeno. Quando maduro se torna macrófago no tecido.
Basófilos e Eosinófilos	Defesa contra parasitas e alergias.

Fonte: Adaptado de Nicholson, 2016, p. 276.

As células de forma geral apresentam diversos tipos de receptores em suas superfícies, que podem desempenhar papel fundamental como transporte de glicose para dentro da célula. A respeito dos receptores do sistema imune, estes estão à procura de qualquer sinal de infecção, perigo, ou grande morte celular. Os receptores também se fazem presentes dentro das células, pois alguns vírus ficam alojados no citoplasma da célula o que dificulta o seu reconhecimento pelo lado de fora, esses receptores internos podem se ligar a estruturas como ácidos nucleicos virais. Isso permite à célula reconhecer a infecção e induzir a produção de citocinas que atuam como um “alarme” para o início da autofagia, processo conhecido como imunidade adaptativa e é responsável por reconhecer esse tipo de vírus (CHAPLIN, 2010; NICHOLSON, 2016).

De forma geral, o sistema imunológico divide-se em dois. O primeiro é denominado sistema imune inato e é a primeira linha de defesa do organismo, capaz de combater diversas infecções através dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que detectam os padrões moleculares

associados a patógenos (PAMPs), como bactérias e fungos e induzem respostas inflamatórias. São várias as classes dos PRRs como os *Toll-like receptors* (TLRs) (JANEWAY, 1989; ESTEVE RÀFOLS, 2014; IWASAKI, MEDZHITOV E HAVEN, 2015). Esses receptores, identificam padrões comuns nas paredes celulares de bactérias gram negativas e fungos, tais como o lipopolissacarídeo (IWASAKI, MEDZHITOV E HAVEN, 2015). Já o segundo é o sistema imune adaptativo, que tem a sua resposta dada pela codificação de elementos genéticos, que se reorganizam e criam moléculas para se ligar ao antígeno, ou patógeno em si, a fim de inativá-lo e se desenvolve ao longo da vida, uma vez que o organismo precisa ser apresentado ao antígeno (CHAPLIN, 2010).

1.4 A inflamação

Em condições fisiológicas, a inflamação é uma resposta celular e molecular de defesa do organismo a qualquer patógeno ou infecção e é necessária para a recuperação de órgãos e tecidos (YE, 2013; LEE E LEE, 2014). Uma vez que uma bactéria infecta e gera a inflamação no organismo, as células de patrulha, conhecidas como neutrófilos, são sinalizadas e vão até o local da infecção onde liberam as chamadas quimiocinas, que são citocinas específicas sensíveis a estímulos de inflamação. O aumento da expressão dessas quimiocinas atrai as demais células de defesa para o sítio de inflamação, sendo que os macrófagos são as primeiras células a serem recrutadas (LEE E LEE, 2014).

Outro fenômeno que parece contribuir para a inflamação na obesidade é a hipóxia ocasionada pela hipertrofia do TAB no qual ocorre um estreitamento dos vasos sanguíneos diminuindo a circulação sanguínea no local (TRAYHURN, 2013). Essa situação envolve a lise celular, que promove a liberação de grandes quantidades de ácidos graxos, e migração de macrófagos para o local que apresenta efeitos em promoção de inflamação, principalmente pela via ativação do *Toll-like receptor 4* (TLR4). Devido a migração de macrófagos também ocorre a expressão de TNF- α e IL-6, entre outras citocinas inflamatórias (EGUCHI E MANABE, 2014). Esse efeito é conhecido como

lipotoxicidade, que tem como consequência atrapalhar a sinalização fisiológica de insulina, ou seja, promover RI (EGUCHI E MANABE, 2014).

1.5 Células do sistema imune: macrófagos

Paralelo ao TAB, que por si só é capaz de produzir citocinas inflamatórias, na obesidade ocorre o aumento da infiltração de macrófagos, que fazem parte do sistema imune inato e patrulham todos os órgãos contribuindo para a homeostase, imunidade, combate a patógenos e recuperação tecidual (LAUTERBACH E WUNDERLICH, 2017). Uma característica importante dessas células é sua plasticidade, ou seja, capacidade de se ajustar a diferentes tecidos e condições, tornando-se macrófagos residentes de determinado tecido, ou órgão (BASHIR *et al.*, 2016). Dessa forma, essas células adquirem as características necessárias para a defesa daquele local e adquirem funções e adaptações específicas ao microambiente ao qual estão expostos (HUME *et al.*, 2002; BASHIR *et al.*, 2016).

Nesse contexto, os macrófagos residentes do TAB expressam múltiplos PRRs, que os permite ter uma enorme gama de respostas imunológicas a diversos sinais de perigos (LAUTERBACH E WUNDERLICH, 2017). Uma vez que o patógeno é reconhecido, os macrófagos permeiam um estado inflamatório que resultará no recrutamento de outras células do sistema imune para os sítios de infecções (IWASAKI, MEDZHITOV E HAVEN, 2015).

Além da quantidade de macrófagos, outro aspecto de grande importância é o tipo de ativação em que essas células se encontram. Para determinar qual ativação será realizada, alguns estímulos são necessários, como: produtos vindos de micróbios, células danificadas, linfócitos ativados ou perante outras patologias (WANG, LIANG E ZEN, 2014). Assim, para desempenhar suas funções, os macrófagos podem apresentar diversos tipos de ativações, que, por razões didáticas, classificam-se em duas categorias extremas: pró inflamatória e anti-inflamatória, denominadas respectivamente tipo M1 e M2 (LAUTERBACH E WUNDERLICH, 2017).

Os macrófagos M1 ou de ativação clássica são cruciais para combater infecções e oferecem imunidade contra tumores, contudo, sua

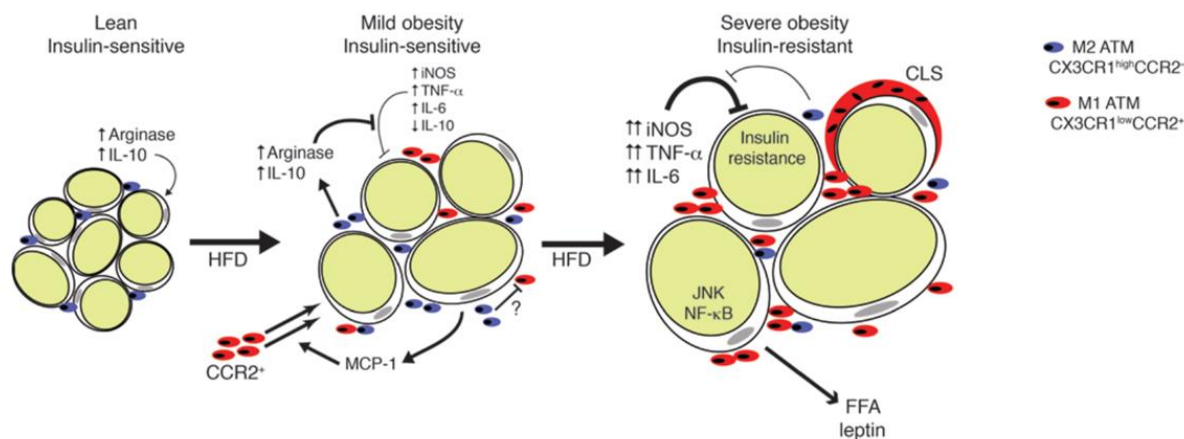
ativação excessiva pode resultar em lesão ao tecido e autoimunidade, entre outros problemas (LAUTERBACH E WUNDERLICH, 2017). Além disso, mediadores inflamatórios como lipopolissacarídeos (LPS) e interferon- γ parecem ter um papel crucial na polarização de macrófagos no sentido M1 (MARTINEZ *et al.*, 2008; MORRIS *et al.*, 2015; BASHIR *et al.*, 2016). Uma vez polarizado, os macrófagos M1 exercem uma capacidade enorme em produzir citocinas inflamatórias tais como: TNF- α , IL-6 e IL1- β (MANTOVANI *et al.*, 2004; MARTINEZ *et al.*, 2008; MORRIS *et al.*, 2015; BASHIR *et al.*, 2016). Essa classificação de polarização gera espécies reativas a oxigênio, como óxido nítrico, por meio da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (LUMENG *et al.*, 2007; BASHIR *et al.*, 2016).

Por sua vez, os macrófagos de ativação alternativa ou M2 possuem baixa expressão pró-inflamatória, como aponta Lumeng *et al.*, (2007), e são estimulados pelas citocinas Th2 IL-4 e IL-13 (SCHRODER *et al.*, 2004; MARTINEZ *et al.*, 2008; MORRIS *et al.*, 2015; BASHIR *et al.*, 2016). Além disso, eles produzem altos níveis da IL-10, que é altamente anti-inflamatória como constata, Lumeng *et al.*, (2007), e também a arginase, uma enzima que bloqueia a atividade iNOS e converte a arginina em ornitina, utilizada na reparação tecidual (BRONTE E ZANOVELLO, 2005; LAUTERBACH, E WUNDERLICH, 2017). Em indivíduos magros, a relação de macrófagos M1 e M2 é regulada, ou seja, há uma proporção maior de M2 em relação a M1 (BASHIR *et al.*, 2016), o que não acontece em indivíduos obesos, como demonstra LUMENG *et al.*(2007), segundo os autores, animais alimentados com dieta hiperlipídica tiveram grande aumento na polarização de macrófagos M1, dessa forma, citocinas inflamatórias como TNF- α são secretadas em grandes quantidades contribuindo para a RI na obesidade.

Já os macrófagos do tipo M2 permitem reparação tecidual e angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) no tecido adiposo. Com isso, há uma alta produção de IL-10, que tem a capacidade de atenuar os efeitos inflamatórios do TNF- α , aumentando a sensibilidade da insulina em adipócitos, melhorando a RI e conseqüentemente aumentando a captação de glicose e produção de catecolaminas, que ajudam do processo de lipólise nos adipócitos (LUMENG *et al.*, 2007). Em quadros de excessiva lipólise, os

macrófagos M2 auxiliam no controle de AG circulante, ou seja, atenuando a lipotoxicidade (KOSTELI *et al.*, 2010). Na figura 5 abaixo, que ilustra esse processo, é possível observar a diferença do funcionamento dos macrófagos em indivíduos magros e obesos.

Figura 5 - Polarização de macrófagos em magros e obesos



Fonte: Lumeng *et al.*, 2007 p.182.

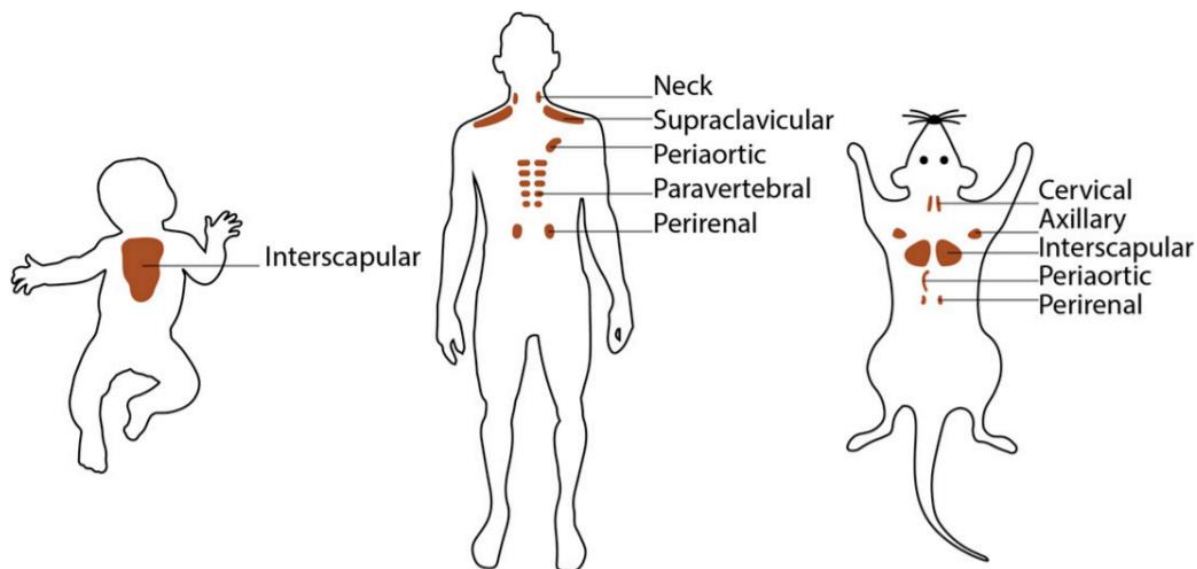
1.6 O tecido adiposo marrom

Além do TAB, existe também um outro tipo de tecido adiposo, denominado tecido adiposo marrom (TAM), conhecido por sua alta atividade termogênica que ajuda no controle e regulação da temperatura corporal (WARWICK E BUSBY, 1990). Perante a sua grande capacidade no controle da temperatura corpórea, acreditava-se que o TAM estava presente apenas em recém nascidos, contudo, estudos demonstraram que esse tecido, apesar de estar em menor quantidade, também se faz presente em adultos (SAITO *et al.*, 2009). Essa descoberta em humanos só foi possível graças a exames de tomografia computadorizada por emissão de pósitrons, onde os sujeitos recebem uma injeção intravenosa de glicose marcada (¹⁸F-fluorodeoxy-glucose), composto radioativo, que é atraído até o tecido ativado, o TAM, e permite ver, através da combinação de imagens, as áreas em que o tecido se localiza, bem como o seu tamanho (BERG, VAN DEN *et al.*, 2017).

Também se descobriu que a distribuição em humanos se dá nas regiões do supraclavicular, pescoço, próximo ao coração, ao longo de toda coluna vertebral e perto dos rins (SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 2015; BERG,

VAN DEN *et al*, 2017). Em roedores a maior parte do TAM é encontrado na região Inter escapular (figura 6) (BERG, VAN DEN *et al*, 2017).

Figura 6 - Localização do TAM



Fonte: Berg, van den et al., 2017, p 48.

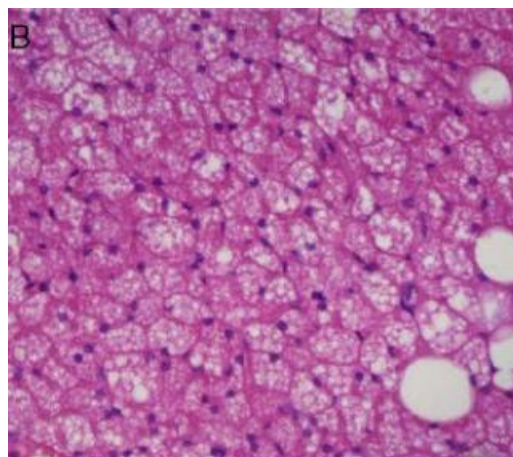
Enquanto o TAB armazena gordura, o TAM oxida os lipídios para gerar calor através de uma via “non-shivering”, que significa sem tremor muscular (WARWICK E BUSBY, 1990). Contudo, estudos indicam que há uma certa correlação entre sexo e IMC para a ativação do TAM, em geral homens, precisam de temperaturas menos frias, quando comparados a mulheres para a ativação do TAM (SAITO *et al.*, 2009; BEUKEL, VAN DEN *et al.*, 2015; BERG, VAN DEN *et al.*, 2017; HERZ E KIEFER, 2019). No caso de obesos, o requerimento de temperaturas mais frias ocorre em parte pela gordura ser um excelente isolador térmico, diminuindo assim o papel do TAM para a termogênese. Em relação à diferença de ativação do TAM pelo sexo, os estudos ainda não têm uma explicação clara sobre o porquê mulheres parecem ter uma ativação maior (PFANNENBERG *et al.*, 2010; MAUVAIS-JARVIS, CLEGG E HEVENER, 2013; CHONDRONIKOLA *et al.*, 2014). Uma das hipóteses é a elevação do hormônio estradiol em mulheres, pois evidências demonstram que esse aumento é acompanhado pela taxa metabólica basal, (BEUKEL, VAN DEN *et al.*, 2015).

Alguns estudos indicam que um humano pode ter cerca de 50g de TAM (VIRTANEN *et al.*, 2009; MARKEN LICHTENBELT, VAN E SCHRAUWEN, 2011), sendo que ele pode assumir 20% do gasto energético e 5% da taxa

metabólica basal (HILL, 2009). Além disso, sua ativação crônica pode ocasionar um consumo de 75 a 100 kcal/dia e na perda de 4 a 4,5kg de gordura ao longo de um ano (HILL, 2009; SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 2015). Levando isso em consideração, esse tecido pode colaborar de sobremaneira para a manutenção do peso corporal e assim conseqüentemente, prevenir o desenvolvimento de RI.

Ao contrário do TAB, o TAM possui várias pequenas gotículas de gordura, como pode ser visto na figura 7 abaixo, que permitem um fornecimento mais rápido de energia e uma grande inervação simpática e vascularização, permitindo um eficiente consumo de oxigênio e dissipação calor (BERG, VAN DEN *et al.*, 2017). O seu nome deve-se à grande quantidade de vasos sanguíneos e mitocôndrias que o TAM possui, responsáveis pelo aspecto mais escuro.

Figura 7 - Morfologia do TAM



Fonte: Ràfols, 2013, p. 7.

Outra característica importante sobre o TAM, é o grande número de mitocôndrias que esse tecido possui (BERG, VAN DEN *et al.*, 2017). É através dessas organelas que a oxidação e geração de calor ocorre no TAM. Quando o organismo é exposto ao frio, ocorre um estímulo ao sistema nervoso simpático (SNS), que resulta na liberação de noradrenalina, capaz de se unir aos receptores β adrenérgicos no TAM (NAKAMURA E MORRISON, 2008; MORRIS *et al.*, 2015). A ativação dos receptores β -adrenérgicos a curto prazo, isto é, efeito agudo, resulta em lipólise, degradação de ácidos graxos, uma maior captação de glicose e ativação da proteína desacopladora 1 (UCP1);

enquanto os efeitos crônicos são o aumento dos genes de transcrição da UCP1 e biogênese mitocondrial (LOWELL E SPIEGELMAN, 2000).

O TAM expressa altas quantidades de UCP1, uma proteína transmembrana que atua desacoplando a síntese de fosforilação do ATP, isso é, dissipando energia em forma de calor (CANNON E NEDERGAARD, 2004). Estudos demonstram que o TAM, quando estimulado pelo frio, pode ser uma alternativa para prevenção de doenças cardiovasculares, tendo em vista o potencial em ajudar no controle da glicose e do colesterol (MARLATT E RAVUSSIN, 2017). Em animais expostos ao frio (4°C), o TAM também mostrou eficiência na depuração dos triglicerídeos disponíveis no plasma em comparação ao grupo controle (20°) e uma retenção maior nos níveis do colesterol tipo HDL (*high density lipoprotein*) (BARTELT *et al.*, 2011).

Uma exposição prolongada ao frio permite a estimulação β -adrenérgica, a qual é capaz de promover características do TAM no TAB, um processo conhecido como *Browning* (CANNON E NEDERGAARD, 2004). Esse tecido castanho apresenta uma maior quantidade de mitocôndrias e UCP-1, o que lhe permite determinada capacidade termogênica e, por consequência, um gasto calórico maior (CAO, L, 2011).

Estudos com animais confirmaram que o principal meio de ativar o TAM é através da diminuição da temperatura entre 18-22° C, que já são capazes de causar um estresse térmico, ocorrendo um aumento do metabolismo e uma ativação do TAM para manter a temperatura do animal (BERG, VAN DEN *et al.*, 2017). Saito *et al.* (2009) submetem indivíduos à temperatura termoneutra e ao frio. O grupo exposto ao frio, instruído a utilizar roupas leves e finas, participou de sessões de 1 hora a uma temperatura de 19° C e, durante esse período, intermitentemente foi colocado sob as pernas dos indivíduos um bloco de gelo a cada 5 minutos por um período de 1 minuto. Já o grupo controle era mantido na mesma sala a uma temperatura de 26 a 28° C com roupas normais e sem o gelo sob as pernas. Após 1 hora, ambos os grupos recebiam uma injeção intravenosa de Fluordesoxiglicose (FDG) e depois de 2 horas era feito um exame de PET-CT. O estudo que foi conduzido por 7 meses demonstrou resultados interessantes, pois o grupo exposto ao frio teve uma maior quantidade de glicose captada pelo TAM, além dos indivíduos desse grupo

possuírem ao fim um peso e IMC menor que o grupo controle (SAITO *et al*, 2009).

Outra forma de ativar o TAM é por termogênese induzida pela dieta (TID), que resumidamente pode ser definido como a taxa de energia que o organismo necessita para digerir e processar os alimentos ingeridos (WESTERTEP, 2004). Estudos com animais demonstram que após uma refeição a UCP1 parecer ter maior atividade, assim como o aumento no consumo de oxigênio, ambos mediado pelo SNS e pela produção de noradrenalina (HIBI *et al.*, 2016).

O TAM também pode ser uma forma alternativa de se combater a RI. Um estudo conduzido com a intenção de comprovar a eficácia do TAM na melhora da homeostase glicêmica e RI em humanos expôs indivíduos a períodos de 5 a 8 horas ao frio (19°) vestindo um colete de refrigeração líquida, ativado conforme a necessidade de cada sujeito (CHONDRONIKOLA *et al*, 2014). Para isso, o colete era acionado e resfriado a cada um grau até que fosse iniciado o processo de tremor muscular, ao atingir esse limite subia-se um grau na temperatura deste acessório. Foi possível constatar pelo estudo que o TAM aumentou seu gasto energético consumindo 30% de glicose e 70% de AG, melhorando o nível de glicose plasmática e RI.

Estudos como esse também demonstram o papel do TAM no consumo de glicose e na melhora da RI e obesidade, por isso, promover o aumento desse tecido parece ser uma boa forma de combate a essas patologias. Outro meio de aumentar esse tecido é o exercício físico, que estimula o SNS a produzir catecolaminas dos tipos noradrenalina e adrenalina (HIBI *et al*, 2016). Nesse caso, a noradrenalina se liga a receptores β -adrenérgicos que desencadeiam na lipólise, fazendo com que a UCP-1 se torne mais ativa, degradando o AG circulante. A longo prazo o exercício promove mudanças na transcrição do gene da UCP-1, biogênese mitocondrial, além da hiperplasia do TAM (SANCHEZ-DELGADO *et al*, 2015).

Contudo, a inflamação também pode ocorrer neste tecido. Estudos mostraram que o TAM de animais alimentados com dieta hiperlipídica tendem a ter menor grau de infiltração de macrófagos quando comparado com o TAM dos mesmos animais, o que indica que o TAM é capaz de ter certa resistência

a inflamação (SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 2015). Caso esse tipo de dieta persista, o TAM desses animais começa a apresentar aumento nos níveis de marcadores inflamatórios como TNF- α e do marcador de macrófagos F4/80 (TOLER, E O'NEILL, E CYPESS, 2015; SAKAMOTO *et al.*, 2016).

Uma das consequências da inflamação no TAM é o aparecimento da RI nesse tecido, visto que as citocinas inflamatórias têm a capacidade de dificultar a atividade da insulina e, considerando que a glicose é essencial para sustentar a sua atividade termogênica, esse tecido pode ter sua atividade reduzida (CANNON E NEDERGAARD, 2004). Estudos com animais geneticamente obesos *ob/ob* demonstram que a expressão da proteína UCP1 é menor, enquanto os marcadores de citocinas inflamatórias como o TNF- α estão em grandes quantidades, o que em conjunto leva à hipótese de que, além da RI a capacidade termogênica desse tecido fica debilitada (MARTINS *et al.*, 2017).

O TAM também expressa os receptores TLRs, principalmente o TLR4 e TLR2. Em condições como a obesidade, a ativação desses receptores resulta em uma resposta pró-inflamatória através da ativação do NF- κ B e da MAPK. Dessa forma, ocorre a diminuição da expressão de UCP1 e a supressão da respiração mitocondrial nos adipócitos marrons, sendo assim, a ativação dos receptores TLRs no TAM acarreta a diminuição da termogênese nesse tecido (OKLA *et al.*, 2015).

1.7 O TAM e macrófagos M2

A literatura aponta que, para o bom desempenho termogênico do TAM, é necessário que ocorra uma polarização de macrófagos M2, uma vez que eles são capazes de produzir catecolaminas e assim induzir a expressão gênica da termogênese no TAM e o estímulo à lipólise no TAB (NGUYEN *et al.*, 2011). Ao que indica a expressão de IL 4 e IL 13 e arginase, produzidas pelos macrófagos M2, parecem ser substanciais para que o TAM seja ativado (QIU *et al.*, 2014; HERZ E KIEFER, 2019).

Os macrófagos M2 desempenham papel fundamental na atividade termogênica do TAM e dos adipócitos castanhos. Estudos indicam que, após exposição ao frio ou qualquer outra estimulação termogênica, ocorre a

infiltração de macrófagos M2 em ambos os tecidos TAM e TAB, permitindo assim que esses tecidos liberem noradrenalina, que age nas células marrons e castanhas, algo muito parecido com a estimulação via SNS (NGUYEN *et al.*, 2011; QIU *et al.*, 2014). Também é proposto pelos mesmos estudos que os macrófagos M2 possuem a maquinaria necessária para sintetizar a noradrenalina, incluindo a tirosina hidroxilase, IL-4 e IL-13. Dessa forma, entende-se que, além do próprio tecido, os macrófagos infiltrados, também ajudam na ativação metabólica.

Os macrófagos M2 também são responsáveis por promover o acastanhamento do TAM, isso pois promovem um suporte anti-inflamatório para a remodelação do TAM, produzindo o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR), que atua no TAB, músculo e fígado, acentuando a captação de glicose mediada pela insulina e controla o estoque e catabolismo de AGs (HEEREN *et al.*, 2016). Isso leva ao aumento do *clearance* de AG pelo TAB e, conseqüentemente, a uma diminuição na concentração plasmática e transporte de AG para os músculo, contribuindo para a sensibilidade à insulina. O PPAR também é capaz de suprimir os níveis circulantes e ou ações dos fatores que o TAB produz que acarretam na RI como o TNF- α . Outros estudos demonstram que os macrófagos M2 desencadeiam o acastanhamento do TAM não somente sob estímulo do frio, como outros múltiplos sinais (SUÁREZ-ZAMORANO *et al.*, 2015, FABBIANO *et al.*, 2016).

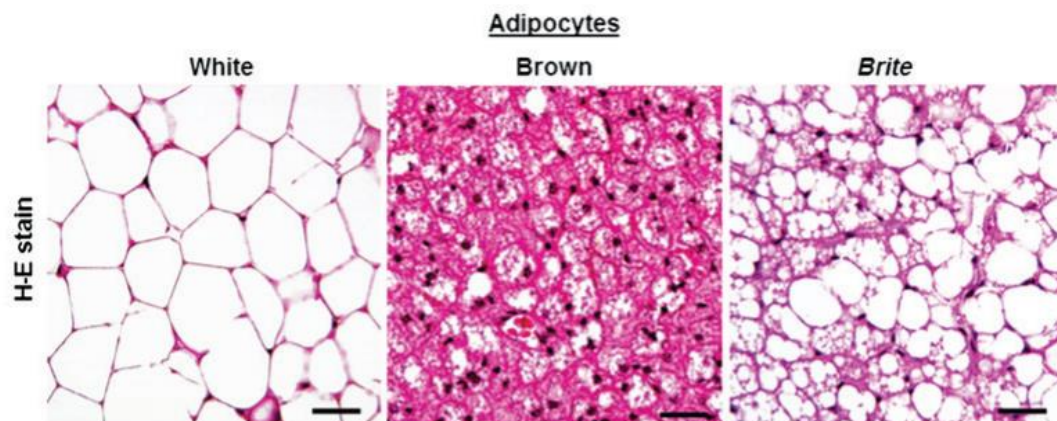
Alguns outros fatores também podem contribuir, tanto para a ativação do TAM, quanto para a polarização de macrófagos, como o fator derivado do músculo conhecido como *meteorin-like*, induzido mediante o exercício físico (RAO *et al.*, 2015; HERZ E KIEFER, 2019).

1.8 Browning: uma extensão do TAM

Em determinadas circunstâncias pode também ocorrer um fenômeno denominado *browning*, traduzindo para o português a ideia é de escurecimento do TAB, ou seja, esse tecido passa a ter algumas características do TAM, começa a apresentar certa atividade termogênica por meio da expressão de UCP1, formando um terceiro tecido adiposo castanho (CANNON E NEDERGAARD, 2004; HERZ E KIEFER, 2019). A figura 8 abaixo mostra a

diferença entre os três tipos de tecidos adiposos. Circunstâncias como fatores ambientais, genéticos ou farmacológicos podem resultar no *browning*, intensificado pelas baixas temperaturas, que podem incentivar a ativação de receptores β -adrenérgicos (CANNON E NEDERGAARD, 2004).

Figura 8 - Diferença entre três tecidos adiposos: TAB, TAM e bege



Fonte: Bargut *et al.*, 2017, p.2.

LEE *et al.*, (2012) apontam que esses adipócitos castanhos podem surgir, pois já existem células desse tipo e, uma vez que o organismo é exposto ao frio ou à estimulação β -adrenérgica, esses adipócitos se desenvolvem, enquanto outros autores acreditam que os adipócitos do TAB podem se transdiferenciar adquirindo assim características do TAM (BARBATELLI *et al.*, 2010; HERZ E KIEFER, 2019).

Uma das alterações necessárias para que ocorra o *browning* é a mudança na polarização de macrófagos. A exposição ao frio parece ser capaz de induzir a produção de IL-4 e IL-13, que promovem a polarização de macrófagos M1 para M2, e estes liberam catecolaminas, que promovem o aparecimento de células bege no TAB. Essa hipótese foi confirmada em um estudo conduzido com camundongos, no qual o grupo exposto agudamente ao frio (4-5° por 48 horas) apresentou um ambiente fisiológico propício ao “*browning*” do TAB (RAO *et al.*, 2014). Essa mudança de um quadro inflamatório para anti-inflamatório parece ser um processo essencial para que ocorra a hiperplasia do tecido castanho. Assim, buscar estratégias que promovam a polarização de M1 para M2 pode ser também considerado algo adjuvante no combate à obesidade.

1.9 O exercício físico

A prescrição de exercício físico como solução a obesidade existe de longa data. É recomendado por médicos, e organizações como a OMS, o capítulo a seguir discute os benefícios que indivíduos obesos podem desfrutar ao realizar sessões de exercício físico.

São vários os benefícios que o exercício físico pode ocasionar em relação à saúde. Em doenças cardiovasculares, um aumento no gasto energético pode ser associado a uma diminuição das placas de gordura, pois, ao se conquistar um déficit calórico de 1.000 Kcal na semana em decorrência do exercício físico, é possível aumentar a vitalidade em cerca de 20% e a atividade física é tão benéfica que até mesmo o exercício agudo é associado a diminuição de eventos cardíacos e até mesmo morte (WARBURTON E BREDIN, 2017).

Diante da RI, o exercício agudo também diminui os níveis de glicose plasmática e, dependendo da intensidade, o controle na homeostase da glicose pode permanecer de 24 até 72 horas após a sessão (RANKINEN *et al.*, 2005; SHERI, R, 2010). Além disso, o exercício agudo pode ajudar no controle de glicose plasmática, pois com a contração muscular ocorre a depleção de glicogênio e conseqüentemente o aumento no consumo de glicose, junto do consumo de ácidos graxos advindo do TAB (PROCTOR *et al.*, 1998). Durante o exercício agudo, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é estimulada devido ao consumo de ATP e ao aumento de AMP. Diante disso, a AMPK parece estar correlacionada com o aumento da oxidação de ácidos graxos e transporte de glicose no músculo (SRIWIJITKAMOL *et al.*, 2007).

Os músculos esqueléticos também podem contribuir para o controle glicêmico em duas situações. A primeira é em repouso e no estado pós-prandial, quando sua absorção pelo músculo depende de insulina e serve para abastecer o armazenamento de glicogênio muscular, enquanto a segunda situação é o exercício físico em alta demanda energética e baixa nos estoques de glicogênio, em que se se faz necessário utilizar a glicose disponível no sangue para suplementar a glicogenólise (WINDER E HARDIE, 1996). Indivíduos que praticam exercício físico e que têm a DM2, atingem a

homeostase da glicose sanguínea, mesmo tendo RI ou falta na produção de insulina (WINDER E HARDIE, 1996). O que indica que o exercício promove captação de glicose por meios independentes da insulina.

A duração e intensidade dos exercícios aliados ao nível de aptidão física dos indivíduos parecem influenciar na quantidade de glicose a ser depurada, contudo, qualquer sessão de exercício físico é capaz de aumentar consumo de glicose visto que os músculos utilizam todo o glicogênio muscular que precisa ser repostado após a atividade física (JENTJENS E JEUKENDRUP, 2003). Outros estudos indicam que frente à DM2, exercícios aeróbicos ou de força muscular parecem diminuir as chances de ocorrência dessa doença (WARBURTON, *et al*, 2001). Além disso, homens sedentários e que possuem DM2 correm o risco 1,7 vezes a mais de morte prematura, o que indica que o exercício possui sua importância mesmo quando a doença já está instalada (KATZMARZYK, 2005). Também, o treinamento físico pode diminuir gordura abdominal e ajudar no controle do peso corporal, ajudando também a controlar o perfil lipídico por diminuir o colesterol LDL (*low density lipoprotein*) e aumentar o HDL como apontam Warburton *et al.* (2001), além de promover o controle da glicose por aumentar a sensibilidade à insulina (PROCTOR *et al.*, 1998).

Alguns estudos indicam que o exercício físico é capaz de controlar a glicemia e os seus efeitos podem ser comparados aos de alguns remédios orais indicados para diabéticos, e ao que tudo indica parece não haver diferença no tipo de exercício escolhido, como o aeróbico e ou de resistência (BOULÉ *et al.*, 2001; PETER ADAMS, 2013). Van Dijk *et al.* (2012) realizou um estudo para verificar a eficiência do exercício físico aeróbico e de resistência muscular como forma do controle de quadros hiperglicêmicos, neste caso os sujeitos foram divididos em três grupos: pré-diabéticos, uso de medicação oral para DM2 e insulínicos dependentes que posteriormente foram categorizados em grupo controle, exercício aeróbico e exercício de resistência muscular. A sessão de exercício aeróbico consistiu em 45 minutos de ciclismo, enquanto a sessão de resistência muscular foi em aparelhos de musculação, sendo metade da sessão em membros superiores e a outra metade em a inferiores. Mesmo com uma única sessão de exercício físico, todos os grupos apresentaram melhora do

quadro hiperglicêmico após 24 horas e também não encontrou diferenças estatísticas entre os dois tipos de exercício.

Perseghin *et al.* (2013) realizaram um estudo que indicou que atividades de intensidade moderada aumentam a captação de glicose em 40%. Os autores expuseram os indivíduos ao exercício agudo em sessões de 5 minutos de aquecimento, seguidas de três sessões de 15 minutos a uma performance de 65% da capacidade aeróbica máxima de cada indivíduo em um aparelho que simula uma escada automática. Outro grupo foi exposto ao exercício crônico com o mesmo protocolo, mas durante 6 semanas. O estudo ainda apontou que o exercício foi capaz de aumentar a sensibilidade à insulina em 43%, enquanto a metformina, um dos principais fármacos utilizados no controle da DM2, melhora apenas de 16 a 25%.

Já outro estudo conduzido por Holten *et al.* (2004) indica que o exercício regular promoveu o aumento na quantidade e função do GLUT4 no músculo. Neste estudo, voluntários foram submetidos a sessões de treino de força para membros inferiores e, após 6 semanas de treinamento, o GLUT4 aumentou sua expressão em cerca de 40%. Além desses fatores, o exercício crônico melhora a capilarização muscular e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo como constatam Cohen *et al.*, (2008), além de diminuir as medicações de pacientes com DM2 (CAUZA *et al.*, 2005; PERSEGHIN *et al.*, 2013).

Nos músculos, o exercício agudo é capaz de aumentar demasiadamente os níveis de IL-6, uma citocina que possui efeitos pró inflamatórios, embora, durante o exercício, sua expressão aumenta cerca de 100 vezes e nessa condição começa a apresentar efeitos anti-inflamatórios, como incentivar o aumento de IL-10 e o receptor antagonista do IL-1, que conseqüentemente inibe a ações do Tnf- α (PEDERSEN, STEENBERG E SCHJERLING, 2001).

Em relação ao tecido adiposo estudos em animais indicam que o exercício físico é capaz de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como Tnf- α , IL-1 β e IL-12, e aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, principalmente no tecido adiposo visceral (PETERSEN E PEDERSEN, 2005).

Além de atuar diretamente na produção ou diminuição de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, o exercício é capaz de modular e promover a polarização de macrófagos M1 para M2, além de inibir a infiltração dos macrófagos no tecido adiposo. Em estudo com animais conduzido por Oliveira *et al.* (2013), um protocolo agudo de natação foi aplicado, com 2 sessões de 3 horas de nado separados por 45 minutos de descanso. Neste ensaio foram comparados 3 grupos de animais: controle, com uma dieta padrão para roedores e sem exercício com alimentação hiperlipídica e sedentário; e com alimentação hiperlipídica combinada com o exercício agudo. De forma geral, foi possível observar que uma única sessão de exercício em animais obesos, foi capaz de promover o aumento de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, o estudo verificou a maior expressão de IL-4 e IL-10 e subentendeu que ocorreu a polarização de macrófagos M1 para M2. Nesse sentido, segundo os autores, a inflamação pareceu um fator crucial.

Estudos como esses comprovam a eficácia do exercício físico na melhora, ou atenuação dos sintomas dessas patologias. Mesmo em animais obesos, a atividade física se mostra uma excelente alternativa. Diante disso, torna-se tentador especular se o exercício agudo também seria capaz de promover a polarização M2 no TAM de animais alimentados com dieta hiperlipídica, o que colaboraria com a maior atividade de UCP1, e consequentemente com o controle glicêmico.

1.10 O exercício físico e o tecido adiposo marrom

O principal meio de ativação do TAM é a exposição ao frio, dada a sua função de contribuir para a temperatura corporal em ambientes frios (BERG, VAN DEN *et al.*, 2017). Torna-se inviável ou no mínimo desconfortável prescrever sessões de frio para a ativação desse tecido e desfrutar de seus benefícios. Outras formas de ativação desse tecido são estudadas, uma delas é o exercício físico. O capítulo a seguir discute o papel do exercício físico na ativação do TAM.

A noradrenalina, quando ligada aos receptores β -adrenérgicos conectados às proteínas G, são capazes de ativar uma via a qual incentiva a produção de enzimas lipolíticas, resultando no aumento de ácidos graxos livres

que contribuem para excitação da UCP-1 (LANGIN, 2006). Além disso, a noradrenalina estimula o TAM a captar glicose, motivo pelo qual permite que o TAM seja visto no PET/CT (ZOUHAL *et al.*, 2008). O exercício físico estimula tanto o SNS quanto a produção das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, a extensão desse estímulo parece depender da duração e intensidade do exercício físico (ZOUHAL *et al.*, 2008).

Estudos indicam que esse estímulo oferecido pelo exercício para os receptores β -adrenérgicos pode levar, em primeiro momento de resposta aguda, à ativação da UCP-1 e à lipólise no TAM, enquanto a resposta crônica aumenta a transcrição genética da UCP-1, aumentando a quantidade de mitocôndrias, e promove a hiperplasia do TAM, assim como recruta células castanhas, ou seja promove o *browning* (SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 2015).

Entretanto, alguns estudos o exercício físico parece ter a capacidade de ativar o TAM independente da estimulação do SNS, como através do aumento de peptídeos natriuréticos que são produzidos pelo coração (BORDICCHIA E MARICA, 2012). Esses peptídeos podem induzir a lipólise e também a expressão de UCP-1 em adipócitos humanos, além de aumentar a quantidade de mitocôndrias permitindo assim um aumento da respiração celular e conseqüentemente no gasto energético (BORDICCHIA, MARICA, 2012; SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 2015). O exercício agudo aumenta a quantidade de peptídeos natriuréticos, tanto por secreção atrial e ventricular, o estímulo necessário para que ocorra tal liberação é o aumento do batimento cardíaco assim como o estresse nos átrios e ventrículos (BORDICCHIA, MARICA, 2012).

Além disso, os músculos possuem certa capacidade endócrina, pois produzem as miocinas que se comunicam com outros órgãos por meio da circulação durante a atividade física (LIN, HANDSCHIN E SPIEGELMAN, 2005; SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 2015). Uma delas é o coativador-1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α), que atua na regulação da glicose sanguínea, lipídios circulantes e no balanço energético (HANDSCHIN E SPIEGELMAN, 2008; SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 2015).

Uma vez que ocorre um aumento da quantidade de PGC-1 α , como consequência, verifica-se um aumento de uma proteína chamada proteína

transmembrana fibronectina tipo III contendo 5 (FNDC5), que, quando clivada, é liberada na corrente sanguínea como irisina (BOSTROM, 2012; SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 2015). A irisina liga-se nas superfícies dos adipócitos brancos e induz a expressão de UCP-1, processo vital para que o TAB comece a expressar atividade termogênica e ocorra o browning. Além do surgimento do tecido adiposo bege, ocorre também um aumento no gasto energético, uma modesta perda de peso e uma melhora na intolerância à glicose (BOSTROM, 2012; SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

Desde a descoberta de métodos que permitiram a localização do TAM em adultos, a literatura aponta que esse tecido é promissor quanto ao controle da glicemia e de lipídios circulantes. Logo, compreender os mecanismos que podem ativar ou promover o crescimento desse tecido são essenciais tanto para a profilaxia quanto para o tratamento da obesidade. Conforme discutido no capítulo 1, o exercício possui a capacidade de ativar o TAM por mecanismos que vão além da estimulação β -adrenérgica. Dessa forma, espera-se que associação do exercício com a ativação do TAM potencialize os benefícios à saúde.

Em contrapartida, durante o desenvolvimento da obesidade tanto o TAB quanto o TAM apresentam um aumento da atividade pró-inflamatória, que terá repercussões sistêmicas que colaboram com a instalação da inflamação subclínica e crônica, comumente observada em indivíduos obesos, o que em contrapartida colabora para o acometimento de diversas doenças comuns a esses indivíduos. Mais especificamente, estudos demonstraram que no TAB a polarização M1 de macrófagos têm um papel determinante e que o exercício físico é capaz de reduzir esse tipo de macrófago. Assim, através de um efeito anti-inflamatório, ele pode promover a saúde desse tecido e também do organismo como um todo. Por outro lado, pouco se sabe se o exercício físico também seria capaz de promover a polarização de macrófagos no sentido M2 no TAM, o que promoveria a maior ativação desse tecido e consequentemente colaboraria com a perda de peso e um estado metabólico mais eficiente. Como a prática de exercícios crônicos leva à perda de peso corporal, que por si só pode ser responsável pela redução de macrófagos M1 e aumento de M2, faz-se necessário a aplicação de um protocolo de exercício agudo sem qualquer perda de peso e, dessa forma, qualquer resultado observado será efetivamente um efeito do exercício físico.

3 OBJETIVO

Geral:

Investigar os efeitos do exercício agudo de natação na infiltração e no balanço da polarização de macrófagos, e a resistência à insulina no tecido adiposo marrom em camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica.

Específico:

Investigar o efeito da dieta hiperlipídica e do exercício agudo de natação no tecido na marcação de F4/80 para a infiltração de macrófagos.

- Investigar o efeito da dieta hiperlipídica e do exercício agudo de natação na comarcação F4/80 e IL-10, através de imunofluorescência, para polarização M2.
- Avaliar a sensibilidade à insulina através dos testes de tolerância à glicose e à insulina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Anticorpos e Reagentes. Todos os anticorpos foram provenientes da Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA) ou Abcam (Cambridge). Os reagentes de rotina do laboratório foram comprados da Sigma Chemical (St. Louis, MO). No experimento de imunofluorescência foram utilizados anticorpos apresentados abaixo na tabela abaixo:

Tabela 2 - Anticorpos e diluições

Proteína	Anticorpo	Referência e fabricante	Diluição
Detecção de macrófagos F4/80	F4/80 (A-19) – Anti Goat	sc- 26642 – Santa cruz Biotechnology, Inc	1:500
Detecção de conteúdo anti-inflamatório (IL-10)	IL-10R α (K-20)- Anti Rabbit	sc- 987– Santa cruz Biotechnology, Inc	1:500
Detecção do anticorpo primário F4/80 (verde)	Donkey anti-goat IgG H&L (Alexa flúor 488®)	ab 150129 - Abcam	1:1000
Detecção do anticorpo primário IL-10 (vermelho)	Donkey anti-rabbit IgG H&L (Alexa flúor 594®)	ab 150076 - Abcam	1:1000

Fonte: elaboração própria

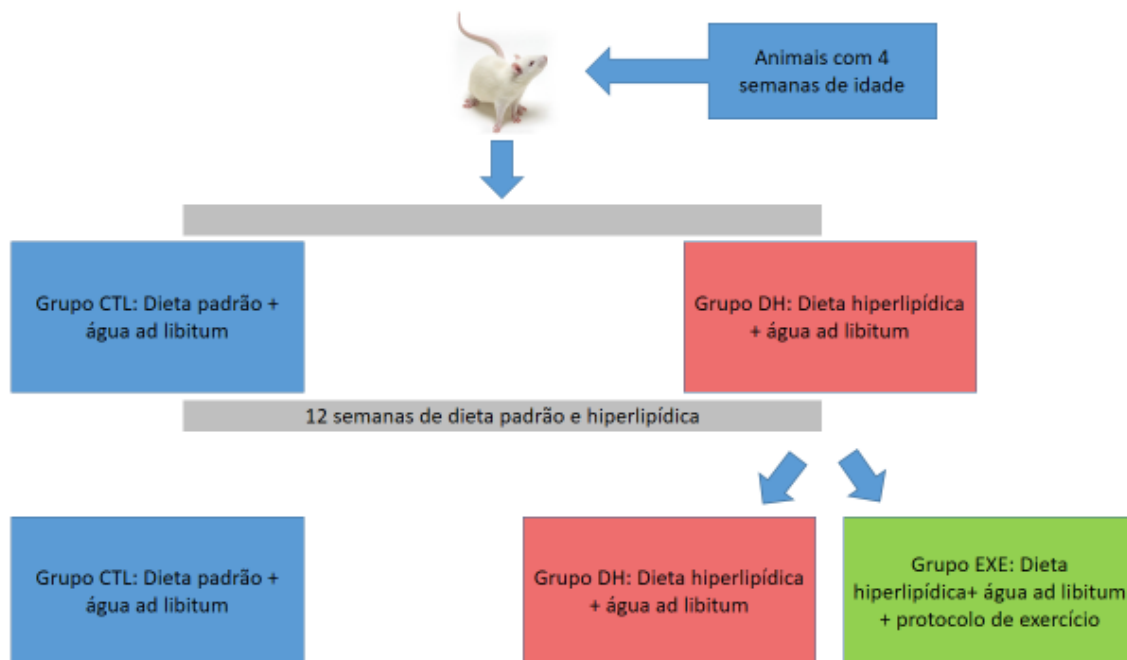
Animais e dieta. Para os experimentos do presente trabalho foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss* provenientes Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA) da UNESP Campus de Botucatu. A pesquisa também está em conformidade com os princípios éticos na experimentação animal, sob CEUA nº 04/2018, registrado em 23.01.2018 (anexo I). Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno de 30x20x13 cm, forradas com maravalha, com tampa de arame cromado e permaneceram em ambiente com temperatura de 23°C, e luminosidade de ciclo claro e escuro de 12 horas controladas.

Quando atingiram 4 semanas de idade, os animais foram divididos inicialmente em dois grandes grupos: controle, alimentados com dieta padrão para roedores e água ad libitum (CTL); e alimentados com dieta hiperlipídica e água ad libitum (DH). Após 12 semanas de dieta padrão e hiperlipídica o grupo DH foi dividido novamente em sedentários e submetidos ao exercício agudo (EXE), totalizando assim os três grupos: CTL, DH, EXE.

O experimento teve duas levas de animais: inicialmente 5 animais de cada grupos, e depois 5 animais nos grupos CTL e DH e 4 no grupo EXE. Como resultado final, o N experimental foi de 10 para o grupo CTL, 10 para DH e 9

para o EXE. A figura abaixo representa um diagrama com o desenho experimental dos animais.

Figura 9 - Desenho experimental dos animais



Fonte: elaboração própria

A dieta hiperlipídica que foi utilizada neste projeto consiste de 55% das calorias provenientes de gordura, 29% de carboidrato e 16% de proteína, por 12 semanas. A diferença entre as dietas que foram utilizadas é a quantidade de gordura, a relação de proteínas, minerais e vitaminas são as mesmas. As tabelas 3 e 4 abaixo, apresentam a composição de cada dieta, assim como a sua caloria.

Tabela 3 - Composição da dieta hiperlipídica

DIETA HIPERLIPÍDICA		
Ingredientes	Quantidade	Calorias Kcal/kg
Banha de porco	312g	2808
Caseína	200g	800
Amido Dextrinado	132g	528
Amido de Milho	115,5g	462
Sacarose	100g	400
Celulose Microcristalina	50g	-
Óleo de Soja	40ml	360
Mix de Minerais (Mistura)	35g	-
Mix de Vitaminas	10g	-
L-Cistina	3g	-

Bitartarato de Colina	2,5g	-
TOTAL	1 Kg	5358

Fonte: elaboração própria

Tabela 4 - Composição da dieta padrão

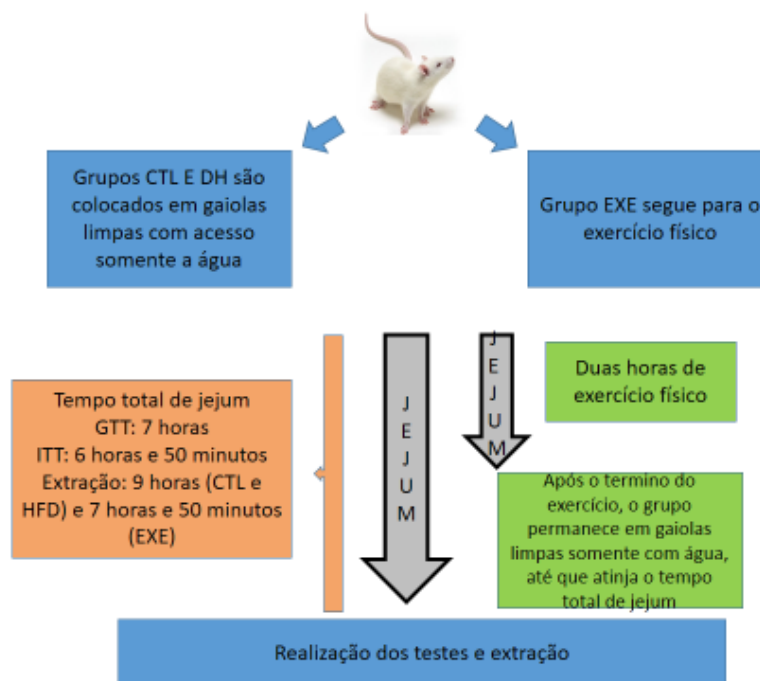
DIETA PADRÃO		
Ingredientes	Quantidade	Calorias Kcal/kg
Banha de porco	-	-
Caseína	200g	800
Amido Dextrinado	132g	528
Amido de Milho	397,5g	1590
Sacarose	100g	400
Celulose Microcristalina	50g	-
Óleo de Soja	70ml	630
Mix de Minerais (Mistura)	35g	-
Mix de Vitaminas	10g	-
L-Cistina	3g	-
Bitartarato de Colina	2,5g	-
TOTAL	1 Kg	3948

Fonte: elaboração própria

Protocolo de exercício físico agudo. Para adaptação ao exercício de natação, no primeiro dia os camundongos foram inseridos ao meio líquido durante 10 minutos no tanque com água rasa, sem que houvesse a necessidade de nadarem. No segundo dia, foram submetidos a 10 minutos com água na altura da cabeça para que pudessem nadar. Os animais EXE, em grupo de 5 animais, nadaram em tanques de 35 cm de largura, 51 cm de comprimento, 32 cm de profundidade com água à 25 cm da capacidade total, com temperatura da água mantida entre 27°C a 30°C. Todos os grupos de animais iniciaram o jejum junto do exercício. Dessa forma, os grupos que não nadaram foram colocados em gaiolas limpas, sem comida, somente com água disponível, enquanto o grupo EXE seguiu para o protocolo de natação, e após finalizado foi colocado em caixas limpas até completar o tempo de jejum. No total, os camundongos nadam 2 horas, sendo divididos em 4 partes de 30 minutos com 5 de intervalo, como realizado anteriormente em Souza *et al.*, (2010) e apresentado originalmente em Ryder *et al.*, (1999), que propôs uma adaptação do exercício físico agudo de ratos para camundongos. Foi

respeitado ao menos uma semana de intervalo entre as sessões de natação para que fossem realizados os testes ITT, GTT, glicemia de jejum e para a extração dos tecidos. A figura 10 abaixo ilustra o jejum dos respectivos grupos.

Figura 10 - Esquema experimental do jejum dos animais



Fonte: elaboração própria

Teste de tolerância intraperitoneal à insulina. O teste foi realizado após a execução dos respectivos protocolos de exercício físico. O jejum de todos os grupos se iniciou junto com o protocolo de exercício físico, ou seja no período de início da natação até o início do ITT foram 6 horas e 50 minutos de jejum. Com um jejum de pelo menos 6 horas, a primeira coleta de sangue equivale ao tempo 0 do teste. Após isso, a insulina (1,5U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sérica. A velocidade constante de decaimento da glicose (kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. Calculou-se o $t_{1/2}$ da glicose a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear.

Verificação do nível de glicose sanguínea e teste de tolerância à glicose. Depois de finalizados os protocolos, amostras sanguíneas foram

coletadas da cauda. O nível de glicose sanguínea foi medido utilizando-se um monitor de glicose (Aparelho de glicose FreeStyle Optium Abbott). O teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) foi realizado em jejum de 7 horas. Após coletar sangue de uma amostra não desafiada (tempo 0), uma solução de 20% de glicose (2.0g/kg peso corporal) foi administrada dentro da cavidade peritoneal. Para determinar a concentração da glicose do soro, amostras de sangue foram coletadas da cauda em 30, 60, 90 e 120 minutos e medida utilizando-se um glicosímetro.

Extração de Tecidos. Os animais foram anestesiados com xilazina (300 µl) + cetamina (300 µl), diluído em solução salina (350 µl). O grupo controle recebeu ± 200 µl de solução pronta, DH e EXE receberam ± 300 µl. A solução foi administrada intraperitonealmente e, após abolição do reflexo corneano e a retirada da pata à dor, o tecido adiposo marrom foi coletado.

Processamento do tecido. Após coleta, os tecidos imediatamente foram submergidos em solução de paraformaldeído, por aproximadamente 12 horas. Após a fixação, o tecido foi lavado em água para a retirada do paraformaldeído, com trocas a cada 30 minutos, durante 2 horas. Em seguida, o tecido permaneceu imerso em álcool 70% até que se iniciasse o protocolo de desidratação, em que o tecido foi imerso em soluções de concentração crescente de álcool etílico (80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III) por uma hora em cada solução. Em seguida, o tecido foi submerso em solução de álcool etílico: xilol (1:1) por 30 minutos, depois, seguiu para a diafanização permanecendo em xilol I por 10 minutos, e xilol II por 20 minutos. Posteriormente, o tecido foi imerso em parafina I, parafina II e parafina III durante 1 hora cada e finalmente emblocado em paraplast.

Corte e colagem do tecido. Os blocos contendo o tecido, foram submetidos ao congelador durante 30 minutos a 1 hora antes do início dos cortes, com a finalidade de facilitar o corte no micrótomo. O micrótomo utilizado foi *Slee Mainz* modelo *Cut 5062* e foram realizados cortes de 5 µm de

espessura. Ao todo 8 lâminas foram utilizadas: 2 para controle negativo e uma de cada grupo e cada leva dos animais (3 grupos, 2 levadas).

Imunofluorescência. Para detectar os anticorpos de interesse, as lâminas foram colocadas em estufa a 55°C *overnight* para que o excesso de parafina fosse retirado. Para garantir que não tivesse nenhuma parafina as lâminas, foram mergulhadas em xilol I e xilol II por 5 minutos cada. Como as soluções utilizadas na imunofluorescência são feitas com a base de água, há a necessidade de hidratação do tecido, dessa forma, as lâminas foram mergulhadas também em álcool absoluto, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70% e água destilada durante 5 minutos em cada.

Para evitar qualquer interferência que o formol possa ter ocasionado, foi realizada a recuperação antigênica e as lâminas foram mergulhadas em tampão citrato de sódio 10M pH 6,0, e aquecidas em banho maria durante 10 minutos à temperatura de 95°C. Após a exposição dos epítomos, as lâminas esfriaram no balcão durante 30 minutos e na sequência foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos em PBS 0.1M pH 8.0 e os cortes circulados com caneta hidrofóbica.

Depois as lâminas foram incubadas com Donkey Serum 5% diluído e em PBS durante 1 hora para bloqueio de ligações inespecíficas. Após isso, foram adicionados os anticorpos primários F4/80 (A-19) e IL-10R α (k20), ambos na diluição 1:500 em BSA 1%, e incubadas *overnight*, enquanto as lâminas de controle negativo foram incubadas somente com BSA. No dia seguinte, o excesso de anticorpo primário foi retirado e as lâminas lavadas 3 vezes em PBS durante 5 minutos cada. A solução de anticorpos secundários então foi colocada e incubada durante 2 horas à temperatura ambiente (*Donkey anti-goat IgG H&L alexa flúor 488*®, e *Donkey anti-rabbit IgG H&L alexa flúor 594*®) na diluição 1:100 em BSA. Para finalizar o experimento, as lâminas foram lavadas novamente, e o meio de montagem utilizado foi o com Vectashield® com DAPI. A lamínula foi delicadamente posicionada e colada nas laterais. É importante ressaltar que, a partir da incubação do anticorpo secundário, as lâminas permaneceram em ambiente escuro.

Análise das lâminas de imunofluorescência. Após esperar a secagem do material, analisou-se as lâminas de controle negativo a fim de verificar qualquer interferência do anticorpo secundário. Uma vez realizados os ajustes, as lâminas foram analisadas sob o aumento da objetiva de 40 vezes, a escala de cada foto é de 50 μm . Foram tiradas aproximadamente de 20 a 25 fotos por lâminas e, posteriormente, as imagens foram analisadas e algumas descartadas por motivo de dobra no tecido e hemácias. O número final de fotos pode ser visto na tabela 5:

Tabela 5 - Quantidade de fotos resultantes da imunofluorescência

CTL (F4/80)	DH (F4/80)	EXE (F4/80)
32 fotos	37 fotos	31 fotos
CTL (IL-10)	DH (IL-10)	EXE (IL-10)
31	37	31

Fonte: elaboração própria

A imagens foram analisadas no programa ImageJ, versão 1.53 g. Para a análise as fotografias com as marcações de F4/80, IL-10 e Dapi foram abertas pelo programa, e através da opção “*merge channels*” foi ajustada cada cor do anticorpo secundário para que o programa pudesse analisar cada anticorpo de forma separada. O *software* analisa a intensidade da marcação.

Com os resultados das áreas de ocorrência de marcação, foi feita uma tabela no Excel. Posteriormente, com os números organizados, foram inseridos no programa GraphPad Prims 7.00, e solicitado a análise de anova e pós teste de tukey.

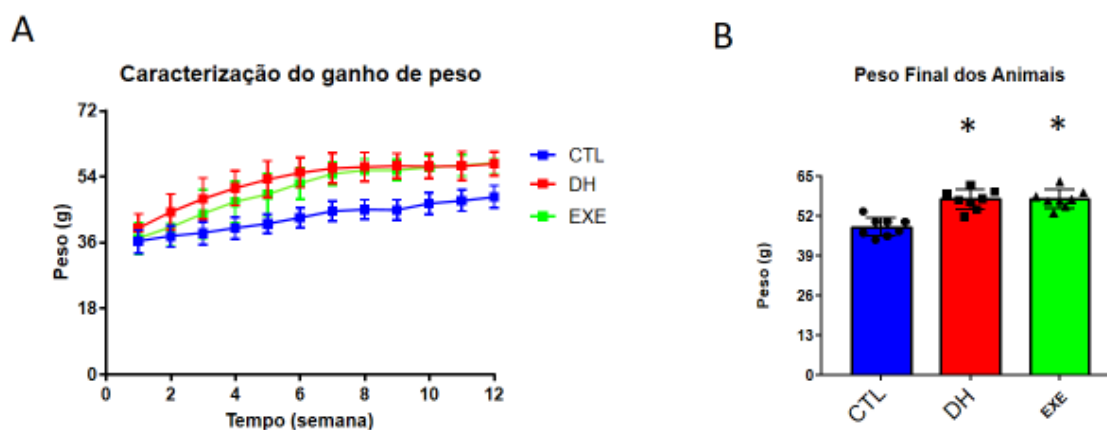
Análise dos resultados. Os dados estão expressos como \pm média e desvio padrão, sendo indicado o número de experimentos independentes. Para análise estatística, os grupos serão comparados utilizando one-way ANOVA com o teste Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização temporal do peso corporal

Como é possível ver na figura 11 os animais DH e EXE apresentaram peso final significativamente maior que os aferidos em seus congêneres alimentados com ração como era esperado. Contudo, não houve qualquer diferença significativa de peso entre os dois grupos alimentados com dieta hiperlipídica, como pode ser visto na figura 11. Esse resultado se mostra particularmente importante por indicar que qualquer alteração observada ocorreu em decorrência justamente do exercício, e não de alguma alteração do peso corporal.

Figura 11 - Evolução do peso corporal e peso final dos animais



Fonte: elaboração própria. (A) Evolução temporal do peso corporal ao longo de 12 semanas em animais CTL, DH e EXE. (B) Peso final dos animais. Os dados estão apresentados em \pm média e desvio padrão. O n experimental é de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs Controle.

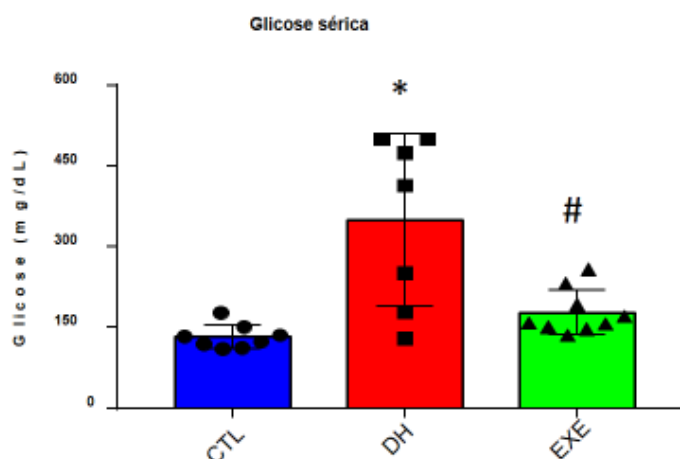
5.2 Parâmetros metabólicos e via de sinalização da insulina

A fim de averiguar o desenvolvimento da resistência sistêmica à insulina, em decorrência da dieta hiperlipídica e aos efeitos do exercício físico agudo, foram realizadas três avaliações para obter-se uma medida indireta: glicemia de jejum, teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina.

5.2.1 Glicemia de jejum

Após verificar o ganho significativo de massa corporal em decorrência da dieta hiperlipídica, avaliamos o efeito deste tipo de dieta na glicemia de jejum. Como esperado, nossos resultados mostraram que as 12 semanas de dieta hiperlipídica foram capazes de aumentar de forma expressiva a glicemia dos animais do grupo DH e que apenas uma sessão isolada de exercício físico de natação foi capaz de reverter esse efeito deletério da dieta hiperlipídica, fazendo com que seus valores ficassem muito próximos daqueles observados nos animais do grupo CTL, como foi possível medir nos índices apresentados pela figura 12. Esse resultado nos mostra o importante papel do exercício físico aeróbio no controle glicêmico.

Figura 12 - Resultados da medição de glicose sérica nos grupos



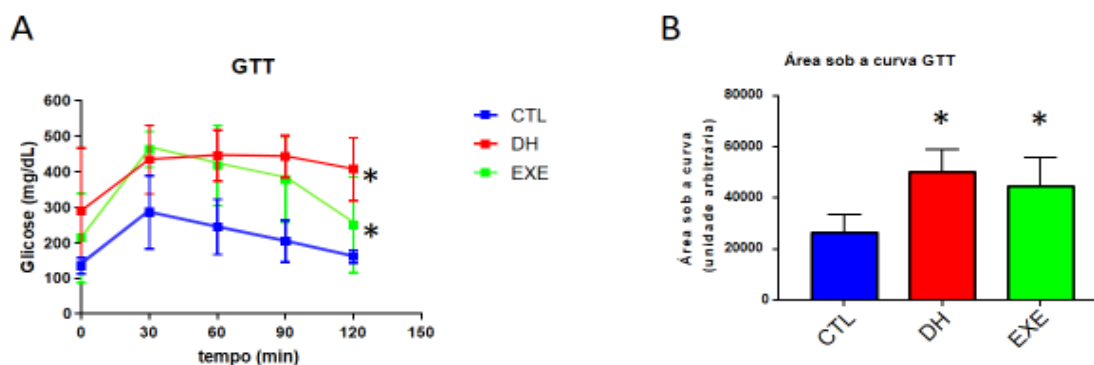
Fonte: elaboração própria. Glicemia de jejum (8 horas) dos animais após 5 horas da sessão de exercício físico agudo em animais CTL, DH e EXE. Os dados estão apresentados em \pm média e desvio padrão. O n experimental é de 7 a 8 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs controle e # $P < 0,05$ dieta.

5.2.2 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Os resultados do teste GTT mostraram que os animais do grupo DH apresentaram maiores níveis de glicose em todos os tempos analisados, resultando assim em maior área sob a curva e evidenciando um significativo aumento da intolerância à glicose. Entretanto, apesar dos animais do grupo EXE apresentarem redução nos valores de glicose nos tempos 60, 90 e 120 minutos, não foi suficiente para resultar em significativa diminuição da área sob

a curva do grupo EXE e relação aos animais do grupo DH (Figura 13 A e B). Esses dados indicam que o exercício físico agudo não foi capaz de reverter a intolerância à glicose promovida pela dieta hiperlipídica. Essa informação pode ser conferida nas figuras 13 A e 13 B abaixo, que apresentam, respectivamente, os resultados dos testes de GTT e área sob a curva GTT.

Figura 13 - Teste de tolerância à glicose GTT

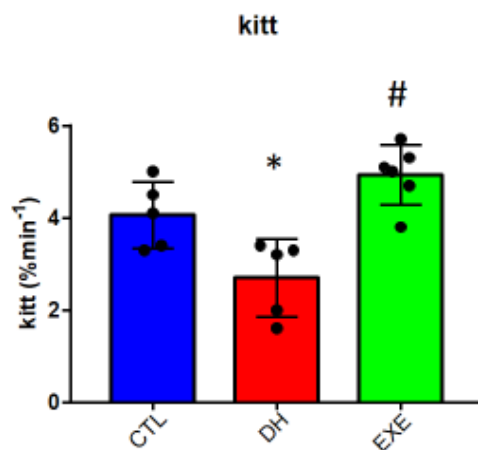


Fonte: elaboração própria. (A) Teste de tolerância à glicose ao final da 14ª semana e após sessão de exercício físico agudo, em animais CTL, DH e EXE. (B) Área sob a curva do GTT. Os dados estão apresentados em \pm média e desvio padrão. O n experimental é de 5 a 7 por grupo. *P < 0,05 vs controle.

5.2.3 Teste de tolerância à insulina (ITT) – Constante de decaimento (kitt)

Como é possível observar na figura abaixo sobre os resultados de glicemia obtidos através do ITT, foi possível calcular a constante de decaimento da glicose (kitt). Os resultados mostram que a dieta hiperlipídica foi capaz de reduzir significativamente o kitt quando comparado aos resultados obtidos nos animais alimentados com dieta padrão para roedores. Em contraste, bastou uma única sessão de exercício físico de natação moderada para promover um incremento robusto do kitt em animais alimentados com a dieta rica em gordura (Figura 14). Vale ainda mencionar que a média obtida nos animais exercitados fora ainda maior que a apresentada pelo grupo CTL, apesar de não haver diferença estatística. Esses resultados indicam que o exercício agudo promoveu uma importante melhora na tolerância à insulina.

Figura 14 - Caracterização da tolerância à insulina (kitt).

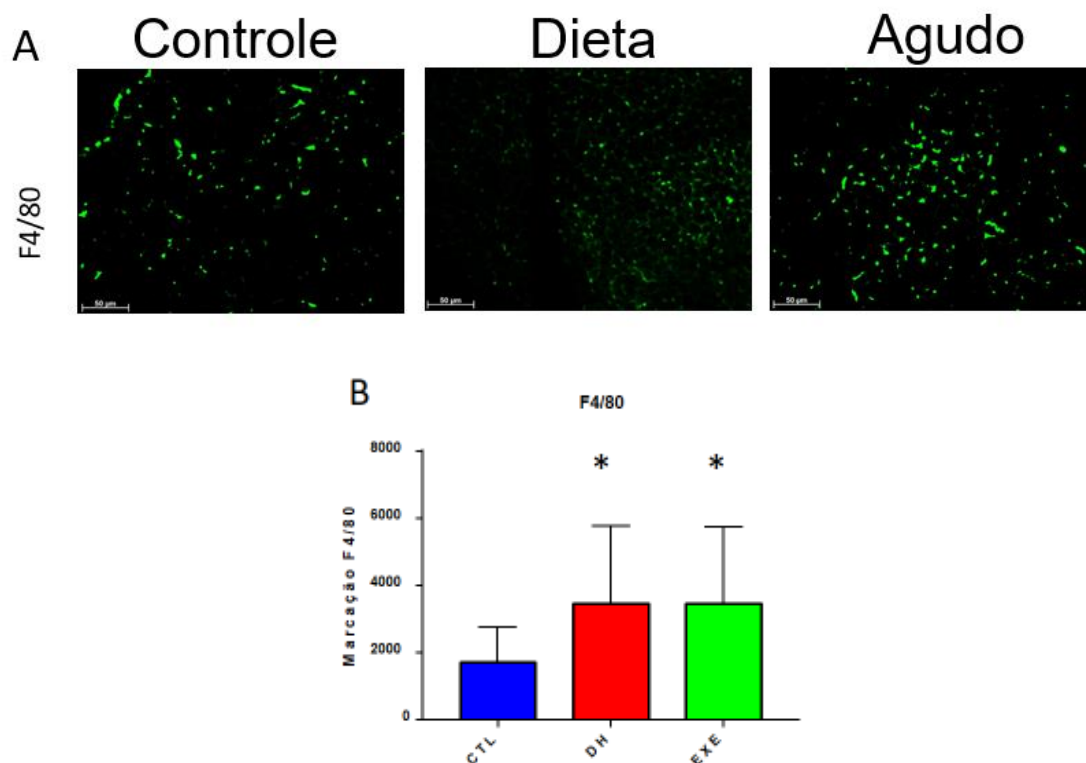


Fonte: elaboração própria. Constante de decaimento da glicose durante o teste de tolerância à insulina em animais, CTL, DH e EXE. Os dados estão apresentados em \pm média e desvio padrão. O n experimental é de 5 a 6 por grupo. * $P < 0,05$ vs CTL # $P < 0,05$ vs dieta

5.3 A infiltração e polarização dos macrófagos

Uma vez demonstrado que a dieta foi capaz de promover ganho de peso e resistência à insulina, enquanto o exercício agudo atenuou o efeito negativo na ação da insulina e, conseqüentemente, validados nossos modelos experimentais, foi possível observar os efeitos da dieta hiperlipídica e, em segundo momento, do exercício agudo sobre o comportamento dos macrófagos no TAM. Para verificar a infiltração de macrófagos no tecido adiposo marrom, foram examinadas imagens obtidas através da técnica de imunofluorescência utilizando o anticorpo F4/80 (marcador de macrófagos). Conforme é possível observar nas figuras 15A e B, após o período em dieta hiperlipídica, os animais do grupo DH apresentaram aumento significativo na quantidade de macrófagos presentes no TAM em relação à apresentada pelos animais controles. Isso indica que apenas uma sessão de exercício de natação não foi capaz de reduzir significativamente a infiltração de macrófagos em animais alimentados com a dieta hiperlipídica.

Figura 15 - Caracterização da infiltração de macrófagos (TNF- α)



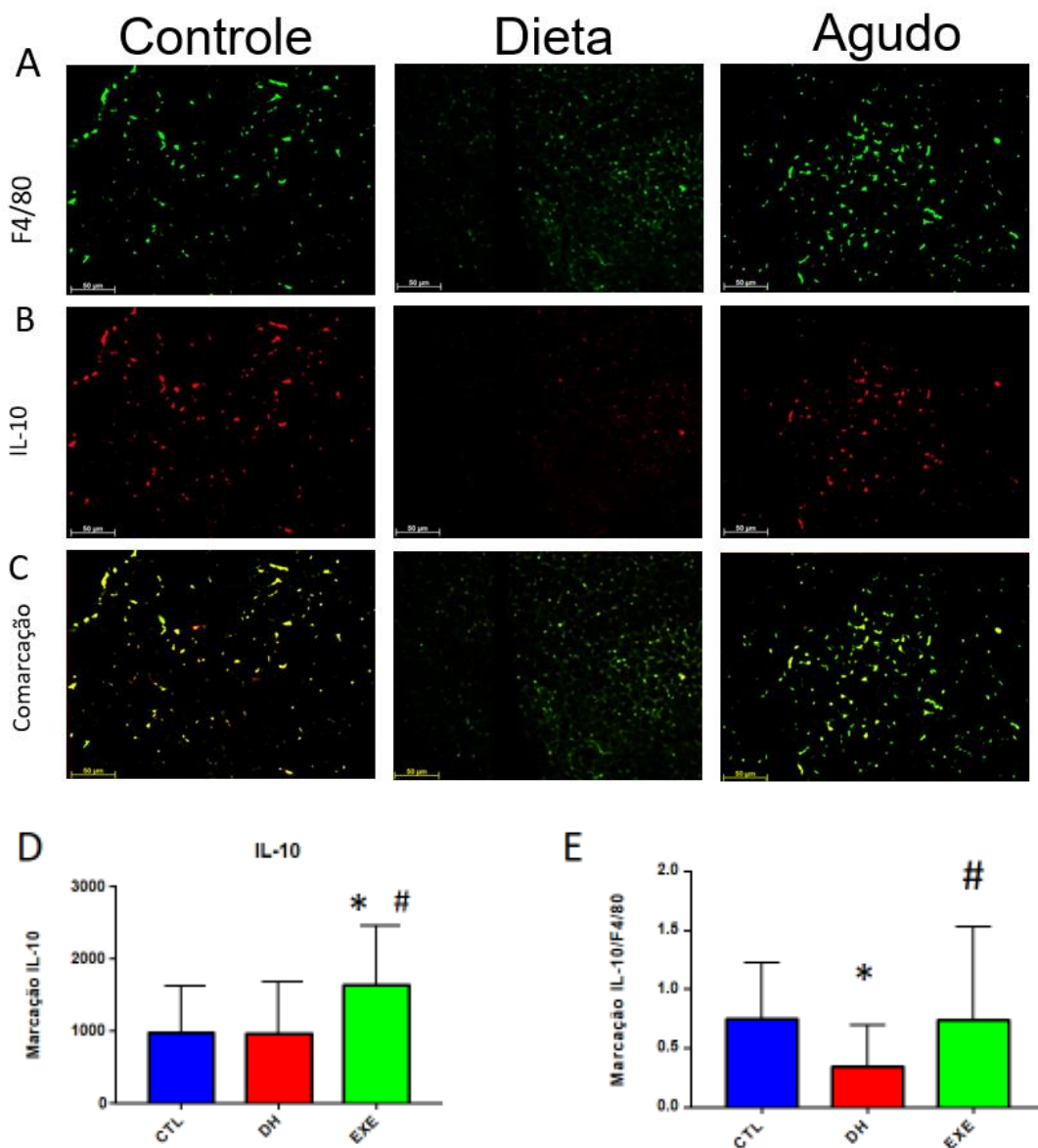
Fonte: elaboração própria. (A) Microfotografia representativas da marcação de F4/80 (verde) acompanhadas de (B) análise da área de marcação, em tecido adiposo marrom dos grupos CTL, DH e EXE, ao final de 14 semanas. Os dados estão apresentados em \pm média e desvio padrão. O n experimental de fotos é 9 a 10 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs CTL.

Como já discutido, a polarização de macrófagos M2 é essencial para o TAM desempenhar seu papel termogênico (Nguyen *et al.*, 2011). Para avaliar isso, foram analisadas imagens de fluorescência marcadas com IL-10 (caracterização de macrófagos M2), além da comarcação com F4/80 para garantir que se tratava de macrófagos e não outro tipo celular.

Como é possível ver na figura 16 abaixo, que apresenta a caracterização da polarização de macrófagos, o grupo DH demonstrou valores parecidos na quantidade de macrófagos M2 quando comparado com o grupo CTL, sendo que o exercício agudo foi capaz de atenuar esse perfil induzido pela dieta hiperlipídica, ou seja, foi capaz de promover aumento significativo na quantidade de IL-10 no TAM (Figura 16 B, C, E). Inclusive quando feita a relação de IL-10 sobre F4/80, verificou-se valores similares entre o grupo EXE e CTL, levando a crer que a maioria dos macrófagos infiltrados nos animais

EXE foram polarizados para M2 (E). Assim, se tomados em conjunto, esses resultados indicam que o exercício agudo é capaz de interferir positivamente na infiltração e polarização de macrófagos no TAM independentemente de não ocorrer perda de peso.

Figura 16 - Caracterização da polarização de macrófagos M2 (IL-10)



Fonte: elaboração própria. (B) Microfotografia representativas da marcação de IL-10 (vermelho) acompanhadas de (D) a análise da área de marcação. Em (C) a comarcação F4/80 (verde) e IL-10 acompanhado da análise de IL-10 sobre F4/80 (amarelo), em tecido adiposo marrom dos grupos CTL, DH e EXE, ao final de 14 semanas (E). Os dados estão apresentados em \pm média e desvio padrão. O n experimental de 9 a 10 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs CTL e # $P < 0,05$ DH.

6 DISCUSSÃO

Como é possível ver a partir dos dados apresentados no capítulo anterior, foi possível observar que, pela primeira vez, a dieta hiperlipídica promoveu aumento na infiltração de macrófagos no TAM e que o exercício físico agudo de natação não foi capaz de modificar esse efeito. Também demonstramos que a dieta hiperlipídica reduziu a quantidade relativa de macrófagos M2 no TAM, enquanto uma única sessão de exercício promoveu a polarização de macrófagos no sentido M2.

Como esperado, nosso protocolo agudo de natação não promoveu redução significativa no peso dos animais em relação aos seus congêneres não submetidos ao exercício. Tal informação é importante, pois estudos que envolvem dietas restritivas resultam em diminuição do peso corporal, em especial do TAB, o que acarreta melhora do quadro de RI e perfil metabólico (TOLEDO *et al.*, 2008; TURNER *et al.*, 2007). A perda de peso ou de gordura também promove melhora no perfil inflamatório (WANG *et al.*, 2011). Algo parecido pode ocorrer em estudos que utilizam o exercício físico crônico, uma vez que essa modalidade promove aumento de massa magra e diminuição expressiva do TAB, situação na qual certamente há uma melhora da saúde como um todo. Logo, o destaque se dá pela ausência da diferença entre os pesos dos grupos de animais, alimentados com dieta hiperlipídica, que nos possibilita inferir que os efeitos bioquímicos, fisiológicos e moleculares nos animais do grupo EXE são decorrentes dos efeitos do exercício físico agudo, e não como uma consequência de perda de peso ou de tecido adiposo.

Sobre o peso, resultados semelhantes podem ser vistos em Souza, Cláudio T De *et al.* (2010), que submeteu animais ao protocolo de exercício físico agudo, mas, como não apresentaram diferença em relação ao grupo dieta, esse estudo serviu como base para escolha do protocolo de nado adotado nesta dissertação. Marinho *et al.*, (2014) comparou diferentes intensidades do exercício físico agudo sobre a sensibilidade à insulina e a atividade da proteína quinase B/AKT no músculo esquelético de camundongos obesos. Na ocasião, parte dos animais nadaram com e sem peso, mas, segundo os autores, o exercício não foi capaz de promover nenhuma alteração na composição corporal dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica.

Já os dados apresentados do kiit verificados pelo presente estudo, quando analisado em conjunto, indicam que o exercício físico agudo foi capaz de promover melhora na sensibilidade à insulina nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. O grupo DH, entendido como sedentário, apresentou significativa redução na constante de decaimento, isto é, foi o grupo que menos respondeu a ação da insulina. O contrário aconteceu com o grupo EXE, que apresentou elevação na constante de decaimento, o que sugere a capacidade do exercício físico agudo de reverter os malefícios no metabolismo de glicose decorrentes da dieta hiperlipídica. O estudo de Souza, *et al.* (2010), apresentou valores de kiit semelhante aos apresentados nesta dissertação, bem como os dados da glicemia de jejum que corroboram o fato do exercício agudo ser capaz de auxiliar na tolerância à insulina. Da mesma forma, utilizando ratos, Ropelle *et al.*, (2009) observaram que 6 horas de natação dividida em duas sessões de 3 horas com 45 minutos de descanso entre elas foi capaz de recuperar o kiit de animais alimentados com dieta hiperlipídica. Os resultados desses estudos, em conjunto com o nosso, indicam a eficiência do exercício agudo em melhorar a sensibilidade à insulina na obesidade.

O estudo de Lima *et al.*, (2009) verificou um importante regulador na sinalização à insulina o TRB3, que se faz presente o protocolo de exercício físico agudo. O exercício escolhido foi a natação, dessa forma os camundongos *Swiss* foram divididos em três grupos: controle, dieta hiperlipídica com e sem exercício físico. Ao verificar os dados do kiit, novamente o exercício agudo se mostrou capaz de alterar os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica, onde o grupo exercitado demonstra uma alta constante de decaimento da glicose, resultado que se assemelha ao do grupo controle.

Já em relação ao GTT, o grupo EXE não apresentou diferença estatística em comparação com outros grupos, ou seja, os dados encontrados indicam que o exercício físico não foi capaz de reverter os efeitos da dieta hiperlipídica na tolerância à glicose. O GTT consiste em administrar uma dose reconhecida de glicose, em um primeiro momento do experimento espera-se que a glicemia do animal suba e depois ao decorrer do GTT espera-se que a glicemia do animal diminua, a exemplo do que aconteceu com o grupo CTL apresentado nessa dissertação, que estão de acordo com o exposto em um

extenso *guideline* para GTT e ITT (BENEDÉ-UBIETO *et al.* 2020). Sendo assim, para que a glicemia retorne a níveis ideais, a glicose deve ser depurada. Isso acontece em decorrência da interação entre a liberação da insulina e sensibilidade dos tecidos alvos a ação desse hormônio.

Como os resultados do ITT demonstram que o exercício agudo foi capaz de promover importante incremento na tolerância à insulina, ou seja, o animal apresenta sensibilidade à sua ação, torna-se tentador especular que a baixa redução na glicemia verificada no GTT ocorreu como consequência de deficiência na produção e/ou secreção de insulina. Ainda, como os animais do grupo EXE apresentaram glicemia de jejum significativamente menor que os do grupo DH, é possível também inferir que eles apresentaram alguma melhora na sensibilidade à insulina e que conseguem responder quando à ação desse hormônio em um período mais longo.

Analisando esses dados em conjunto, parece razoável afirmar que os animais do grupo EXE, apesar da melhora apresentada na resistência à insulina, ainda apresentam dificuldade em depurar rapidamente grandes quantidades de glicose, como evidenciado pela intolerância à glicose observada no GTT. Nesse contexto, torna-se também tentador especular a dieta hiperlipídica possa ter induzido redução na massa de ilhotas, e que o protocolo de exercício agudo adotado, apesar de ter sido eficiente em melhorar a sensibilidade à insulina, não foi capaz de reverter as alterações em nível pancreático. Assim, para elucidar se houve redução ou não na massa de ilhotas, faz necessário que futuros estudos realizem GTT com avaliação dos níveis de insulina durante o teste, além de avaliar a massa de ilhotas, bem como sua secreção de insulina.

Como explanado anteriormente nessa dissertação, a razão M2/M1 é essencial para o funcionamento fisiológico do TAM, pois um aumento na quantidade de macrófagos M1 pode acarretar efeitos prejudiciais à saúde, como distúrbios na sinalização da insulina e metabolismo da glicose (LUMENG *et al.*, 2007). Esses efeitos deletérios estão altamente correlacionados com a R.I e seu desenvolvimento até a DM2 (SHOELSON, LEE E GOLDFINE, 2006). No presente estudo observamos que, através de imunofluorescência, ao fim das 12 semana de dieta hiperlipídica, a marcação de F4/80 estava maior nos

grupos alimentados com dieta hiperlipídica e também que a diferença dos valores do grupo DH e EXE foi mínima, ou seja, houve aumento de macrófagos em decorrência da dieta e o exercício agudo não foi capaz de atenuar esse efeito.

Esses resultados estão de acordo com um estudo *in vitro* anterior que demonstrou que sinais obesogênicos podem levar à infiltração de macrófagos no TAM, (Onishi *et al.*, 2016). Em relação ao exercício físico, até onde temos conhecimento, nenhum outro estudo avaliou o efeito do exercício na infiltração de macrófagos no TAM. Contudo, Oliveira *et al.*, (2013) encontrou resultados similares quando verificou que o exercício físico agudo falhou em inibir a infiltração de macrófagos em TAB de ratos da linhagem *Wistar*. Além deste trabalho, Weisberg *et al.*(2003) demonstraram que quanto maior for o TAB, e conseqüentemente o tamanho de seus adipócitos, maior também é a quantidade de macrófagos infiltrados, ou seja, segundo os autores, parece existir uma correlação importante entre composição corporal dos animais e a infiltração de macrófagos. Assim, torna-se tentador especular se quanto maiores forem os adipócitos marrons, mais macrófagos teríamos infiltrados também no TAM. Corroborando tal hipótese, outro estudo recente realizado por Kotzbeck *et al.* (2018) observou aumento no tamanho dos adipócitos em TAM de animais com obesidade genética.

O estudo de Lumeng *et al.* (2007) indicou que, mais significativo que avaliar a quantidade de macrófagos presente num tecido, seria verificar qual o tipo e qual ativação presentes. De forma mais específica, os autores afirmam que, enquanto em condições fisiológicas há predomínio de macrófagos polarizados no sentido M2, a obesidade leva a um aumento na polarização M1 em detrimento da M2. Nesse contexto, Kawanishi *et al.* (2010) verificaram que o exercício crônico de esteira resultou no aumento da polarização M2 em TAB de animais obesos. Já Oliveira *et al.* (2013) demonstraram que mesmo uma sessão isolada de natação é capaz de promover a polarização M2 no TAB de animais obesos, e que essa alteração colabora com a melhora na sensibilidade à insulina em decorrência do exercício físico. Assim, o presente estudo complementa os anteriores, uma vez que os resultados mostram a redução na polarização M2 em consequência da dieta hiperlipídica e também e que, pela

primeira vez foi verificado que o exercício agudo foi capaz de recuperar os níveis de M2 em TAM de camundongos obesos, como evidenciado pelo aumento da dupla marcação de IL-10 (M2) e F4/80 (macrófagos), com níveis similares aos observados no grupo CTL. Conforme os dados expostos na seção anterior, tal situação indica que nos animais exercitados a maioria dos macrófagos está polarizado no sentido M2 e, conseqüentemente, um ambiente com predomínio de citocinas anti-inflamatórias, principalmente IL-10, e o funcionamento fisiológico da termogênese no TAM.

O estudo de Nguyen *et al.* (2011) mostrou que polarização de macrófagos no sentido M2 para o TAM tem sido indicada como fundamental. Mais precisamente, os autores afirmam que a ausência de macrófagos M2 prejudica a termogênese desse tecido em resposta ao frio. Além disso, outros estudos mostraram que a polarização M2 em TAB é importante na proteção contra o desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e intolerância à glicose como consequência da alimentação rica em gordura saturada, o que indica que esse tipo de ativação de macrófago possa ser um importante alvo terapêutico no tratamento desses distúrbios metabólicos (ODEGAARD *et al.*, 2007).

Nesse contexto, Bartlett *et al.* (2012) demonstraram que uma sessão de HIIT ou aeróbio contínuo realizados de forma aguda são capazes de induzir aumento significativo da fosforilação de AMPK e também de PGC-1 α . O estudo ainda verificou que a ativação de AMPK, juntamente com PGC-1 α , pode resultar em ativação de PPAR- γ , que atua na formação do adipócito, além de controlar no adipócito genes ligados a homeostase da glicose e até mesmo na diferenciação das células do TAB em TAM (AHMADIAN *et al.*, 2013). A polarização de macrófagos M2 é correlacionada com a ativação via PPAR- γ , ao que consta essa molécula parece ser essencial para esse processo (ODEGAARD *et al.*, 2007; VATS *et al.*, 2006). Nessa mesma linha Thomas *et al.* (2011) também analisa o papel do exercício físico agudo em genes reguladores do PPAR- γ como CD36, LXR α e ABCA1 e após 3 horas de uma única sessão de ciclismo, durante 45 minutos a 70% do consumo máximo de oxigênio, ocorreu uma regulação positiva desses genes reguladores e esse efeito persiste por 24 horas. Em contrapartida, os autores também verificaram

o papel do exercício crônico que, além de apresentar um aumento dos genes, apresenta também um aumento da proteína CD36, cujo efeito parece persistir por mais tempo (até 48 horas) da última sessão de treino. Dessa forma, os autores afirmam que a geração de genes reguladores do PPAR- γ associados ao exercício físico resultam em uma regulação positiva dos macrófagos.

Contudo, estudos que envolvam o exercício físico agudo e a infiltração e polarização de macrófagos são ainda escassos, e quando nos referimos ao TAM esse cenário se torna ainda pior. Dessa forma, abre-se espaço para alguns estudos que envolvam o exercício físico crônico. Nesse contexto, a dissertação de Leite (2014) verificou os efeitos profiláticos do treinamento físico sobre a resistência à insulina em ratos *Wistar* alimentados com dieta hiperlipídica e as modulações de fatores inflamatórios sobre o TAB e TAM. No estudo realizado, os animais foram divididos em três grupos: CTL, DH, e EXE (crônico) e foram submetidos a 1 hora de natação por dia, 5 vezes na semana, ao longo de 8 semanas. Após a primeira semana de natação, os animais nadaram com carga de 2,5%, sendo que era ajustada toda semana de acordo com o peso de cada animal, cuja diferença estatística ocorreu somente na 7ª semana, e essa diferença foi considerada mínima. Entretanto, ao analisarem o crescimento do TAB epididimal, verificaram que o grupo DH foi o que apresentou maior valor e, considerando que os animais não apresentaram diferença em relação a ingestão de calorias, os autores sugerem que o exercício protegeu os animais dos efeitos da dieta hiperlipídica. Essa proteção foi além do acúmulo de TAB, ao que consta o exercício físico foi capaz de atenuar o desenvolvimento e melhorar a tolerância à glicose e RI no grupo EXE. Além disso, a autora também verificou que diversos fatores inflamatórios como TNF- α , JNK, IKK, de forma geral, estavam reduzidos no grupo EXE que mostra níveis mais baixos, e em contrapartida, ao analisar o conteúdo anti-inflamatório como a IL-10, observou um aumento no grupo EXE. De forma geral, esse estudo sugere esses efeitos positivos supramencionados se deram em consequência da menor infiltração e polarização de macrófagos M1 observada em decorrência do treinamento.

No contexto do presente estudo, podemos aventar que a polarização de macrófagos M2 em TAM observada possa também ter resultado em melhora

na inflamação no TAM, bem como ter colaborado com a melhora sistêmica da resistência à insulina que ocorre em decorrência do exercício físico. Corrobora essa hipótese também o estudo realizado por Valverde, Benito e Lorenzo (2005), que verificaram a alta taxa de metabolismo da glicose resultante da ação fisiológica da insulina sobre TAM, podendo até mesmo alcançar 10% de todo o *turnover* de glicose em ratos.

Assim, fica clara a necessidade de estudo mais profundo para verificar os desdobramentos da polarização de macrófagos no TAM.

7 CONCLUSÕES

Os dados apresentados nessa dissertação nos possibilitam concluir 6 macros afirmações listadas abaixo:

- O exercício físico agudo se mostra ineficiente na redução do peso corporal.
- O exercício agudo de natação é eficiente para o controle glicêmico, uma vez que resultou em importante redução na glicemia de jejum.
- Uma sessão de natação é suficiente para promover aumento na tolerância à insulina em animais obesos.
- Sobre a tolerância à glicose, o exercício físico agudo falhou em promover a melhora nesse parâmetro em animais obesos.
- Uma sessão isolada de exercício físico se mostrou ineficaz em atenuar a infiltração de macrófagos no tecido adiposo marrom de camundongos obesos.
- O exercício físico agudo demonstra grande capacidade em promover a polarização de macrófagos M2 no tecido adiposo marrom de camundongos obesos.

Assim, ao analisarmos os dados do experimento realizado em conjunto, é substancialmente provável afirmar que uma única sessão de exercício físico já é capaz de promover alterações metabólicas benéficas ao organismo, como a melhora na sensibilidade à insulina. Especificamente sobre o tecido adiposo marrom, o exercício físico agudo parece exercer uma importante capacidade em promover a polarização M2, possibilitando seu melhor funcionamento e contribuindo para um maior gasto energético e controle da glicose sanguínea.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(ABESO), A. B. PARA O E. DA O. E DA S. M. **Diretrizes Brasileira de Obesidade.**

ABDUL-GHANI, M. A.; DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

ABEL, E DALE, *et al.* Adipose- selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. **Nature**, v. 409, n. 729, p. 729–733, 2001.

AHMADIAN, M. *et al.* PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature Medicine**, v. 19, n. 5, p. 557–566, 2013.

BARBATELLI, G. *et al.* The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 6, p. 1244–1253, 2010.

BARTELT, A. *et al.* Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 200–206, 2011.

BARTLETT, J. D. *et al.* Matched work high-intensity interval and continuous running induce similar increases in PGC-1 α mRNA, AMPK, p38, and p53 phosphorylation in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 7, p. 1135–1143, 29 jan. 2012.

BASHIR, S. *et al.* Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. **Inflammation Research**, v. 65, n. 1, p. 1–11, 2016.

BENEDÉ-UBIETO, R. *et al.* Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 13, p. 439–450, 18 fev. 2020.

BERG, S. M. VAN DEN *et al.* Immune modulation of brown(ing) adipose tissue in obesity. **Endocrine Reviews**, v. 38, n. 1, p. 46–68, 2017.

BEUKEL, J. C. VAN DEN *et al.* Women have more potential to induce browning of perirenal adipose tissue than men. **Obesity**, v. 23, n. 8, p. 1671–1679, 2015.

BLAAK, E. E. Metabolic fluxes in skeletal muscle in relation to obesity and insulin resistance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 391–403, 2005.

BORDICCHIA, MARICA, *et al.* Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK

- to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. **the journal of clinical investigation**, v. 122, n. 3, p. 1022–1036, 2012.
- BOSTROM, P. *et al.* A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white and thermogenesis. **Nature**, v. 11, p. 463–8, 2012.
- BOULÉ, N. G. *et al.* Effects of Exercise on Glycemic Control and Body Mass in Type 2 Diabetes Mellitus A Meta-analysis of Controlled Clinical Trials. **JAMA**, v. 286, n. 10, p. 1218–1227, 12 set. 2001.
- BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 641–654, 2005.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.
- CAO, L, *et al.* White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte. **Cell Metabolism**, v. 14, p. 324–338, 2011.
- CAUZA, E. *et al.* The relative benefits of endurance and strength training on the metabolic factors and muscle function of people with type 2 diabetes mellitus. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, 2005.
- CEFALU, W. T. Insulin resistance: Cellular and clinical concepts. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 1, p. 13–26, 2001.
- CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S3–S23, fev. 2010.
- CHONDRONIKOLA, M. *et al.* Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. **Diabetes**, v. 63, n. 12, p. 4089–4099, 2014.
- CINTI, S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: Plasticity of the adipose organ. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 25, n. 10, p. 823–835, 2002.
- COHEN, N. D. *et al.* Improved endothelial function following a 14-month resistance exercise training program in adults with type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2008.
- DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes: Metabolic and molecular

implications for identifying diabetes genes. **Diabetes Reviews**, v. 5 (3), p. 177–269, 1997.

DIJK, J. W. VAN *et al.* Both resistance- and endurance-type exercise reduce the prevalence of hyperglycaemia in individuals with impaired glucose tolerance and in insulin-treated and non-insulin-treated type 2 diabetic patients. **Diabetologia**, v. 55, n. 5, p. 1273–1282, 2012.

EGUCHI, K.; MANABE, I. 21_22533. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 21, p. 629–639, 2014.

ESTEVE RÀFOLS, M. Tejido adiposo: Heterogeneidad celular y diversidad funcional. **Endocrinología y Nutrición**, v. 61, n. 2, p. 100–112, 2014.

FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Current diabetes reviews**, v. 9, n. 1, p. 25–53, 2013.

GOSS, R. J. Hypertrophy versus Hyperplasia. **Science**, v. 153, n. 3744, p. 1615–1620, 1966.

GROOP, L. C. *et al.* Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 84, n. 1, p. 205–213, jul. 1989.

GUYTON, A.C. e Hall J.E.– **Tratado de Fisiología Médica**. Editora Elsevier. 13^a ed., 2017

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. **The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease** *Nature*, 2008.

HEEREN, J. *et al.* Brown adipose tissue and lipid metabolism. **Acta Histochemica**, v. 59, n. 1, p. 78–90, 2016.

HERZ, C. T.; KIEFER, F. W. Adipose tissue browning in mice and humans. **Journal of Endocrinology**, v. 241, n. 3, p. R97–R109, 2019.

HIBI, M. *et al.* Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. **International Journal of Obesity**, v. 40, n. 11, p. 1655–1661, 2016.

HILL, J. O. Special Task Force Report: Can a small-changes approach help address the obesity epidemic ? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. C, p. 477–484, 2009.

HOLTEN, M. K. *et al.* Strength training increases insulin-mediated glucose

uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 2, p. 294–305, 2004.

HOTAMISLIGIL, G. S. *et al.* *Hotamisligil 1994*, Proc Natl Acad Sci. TNFa e IR.pdf. v. 91, n. May, p. 4854–4858, 1994.

HUME, D. A. *et al.* *The mononuclear phagocyte system revisited*. **Journal of leukocyte biology**, v. 72, n. 4, p. 621–7, 2002.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R.; HAVEN, N. *Inmunidad innata*. v. 16, n. 4, p. 343–353, 2015.

JANEWAY, C. A. *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 54, n. 1, p. 1–13, 1989.

JENTJENS, R.; JEUKENDRUP, A. E. *Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery*. **Sports Medicine**, v. 33, n. 2, p. 117–144, 2003.

KAHN, B. B. AND JEFFREY S FLIER. *Obesity and insulin resistance*. **the journal of clinical investigation**, n. 106, p. 473–481, 2000.

KATZMARZYK, P. T. *et al.* *Metabolic Syndrome, Obesity, and Mortality*. **Diabetes Care**, v. 28, n. 2, p. 391–397, 2005.

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

KOPELMAN PETER G. *Obesity as a medical problem*. **Nature**, v. 404, n. April, p. 635–643, 2000.

KOSTELI, A. *et al.* *Kosteli 2010*, JCI. *Baja peso e inflamación*..pdf. v. 120, n. 10, 2010.

KOTZBECK, P. *et al.* *Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation*. **Journal of Lipid Research**, v. 59, n. 5, p. 784–794, 2018.

LANGIN, D. **Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome** *Pharmacological Research*, 2006.

LANGIN, D. **Recruitment of brown fat and conversion of white into brown**

adipocytes: Strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2010.

LAUTERBACH, M. A. R. R.; WUNDERLICH, F. T. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, v. 469, n. 3–4, p. 385–396, 2017.

LAUTERBACH, M. A. R. R.; WUNDERLICH, F. T. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, v. 469, n. 3–4, p. 385–396, 2017.

LEE, B. C.; LEE, J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1842, n. 3, p. 446–462, 2014.

LEE, Y. H. *et al.* **In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding** *Cell Metabolism*, 2012.

LEITE, J. P. **O efeito do treinamento físico sobre a resistência à insulina em animais tratados com dieta hiperlipídica: modulações de fatores inflamatórios sobre o tecido adiposo branco e marrom de ratos Wistar.** [s.l.] UNICAMP, 2014.

LIMA, A. F. *et al.* Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice. *Journal of Cellular Physiology*, v. 221, n. 1, p. 92–97, 2009.

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. **Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators** *Cell Metabolism*, 2005.

LOWELL, B. B.; SPIEGELMAN, B. M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, v. 404, n. 6778, p. 652–660, 2000.

LUMENG, C. N. *et al.* Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization Find the latest version : Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

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

MARINHO, R. *et al.* Efeitos de diferentes intensidades de exercício físico sobre a sensibilidade à insulina e atividade da proteína quinase B/Akt no músculo esquelético de camundongos obesos. **Einstein (São Paulo) [online]**, v. 12, n. 1, p. 82–89, 2014.

MARKEN LICHTENBELT, W. D. VAN; SCHRAUWEN, P. Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 2, 2011.

MARLATT, K. L.; RAVUSSIN, E. Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings. **Current obesity reports**, v. 6, n. 4, p. 389–396, dez. 2017.

MARTINEZ, F. O. *et al.* Istituto Clinico Humanitas, I-20089 Rozzano, Italy, 2 Institute of General Pathology, University of Milan, I-20133 Milan, Italy. **BioScience**, v. 13, n. 4, p. 453–461, 2008.

MARTINS, F. F. *et al.* Thermogenesis, fatty acid synthesis with oxidation, and inflammation in the brown adipose tissue of ob/ob (-/-) mice. **Annals of Anatomy**, v. 210, p. 44–51, 2017.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocrine reviews**, v. 34, n. 3, p. 309–338, jun. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2019**. [s.l.: s.n.].

MINOKOSHI, Y. *et al.* Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature**, v. 415, n. 6869, p. 339–343, 2002.

MORRIS, D. L. *et al.* *HHS Public Access*. v. 14, n. 4, p. 341–346, 2015.

NAIR, K. S.; SHORT, K. R. Hormonal and Signaling Role of Branched-Chain Amino Acids. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 6, p. 1547S-1552S, 2005.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. A thermosensory pathway that controls body temperature. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 62–71, 2008.

NGUYEN, K. D. *et al.* Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. **Nature**, v. 480, n. 7375, p. 104–108, 2011.

NICHOLSON, L. B. The immune system. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 3, p. 275–301, 2016.

- ODEGAARD, J. I. *et al.* Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116–1120, 2007.
- OLIVEIRA, A. G. *et al.* Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats. **Obesity**, v. 21, n. 12, p. 2545–2556, 2013.
- ONISHI, Y. *et al.* GDF1 is a novel mediator of macrophage infiltration in brown adipose tissue of obese mice. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 5, p. 216–223, 2016.
- PEDERSEN, B. K.; STEENBERG, A.; SCHJERLING, P. Exercise and interleukin-6. **Exercise immunology review**, p. 137–141, 2001.
- PERSEGHIN G., PRICE, T. B., PETERSEN, K. F., RODEN, M. E. A. Exercise and Insulin Sensitivity Increased Glucose Transport – Phosphorylation and Muscle Glycogen Synthesis After Exercise Training in Insulin-Resistant. **N Engl J Med**, v. 335, n. 18, p. 1357–1362, 2013.
- PETER ADAMS, O. The impact of brief high-intensity exercise on blood glucose levels. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 6, p. 113–122, 2013.
- PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 4, p. 1154–1162, 2005.
- PFANNENBERG, C. *et al.* Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. **Diabetes**, v. 59, n. 7, p. 1789–1793, 2010.
- PROCTOR, D. N. *et al.* American College of Sports Medicine Position Stand. Exercise and physical activity for older adults. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 30, n. 6, p. 992–1008, 1998.
- QIU, Y. *et al.* Eosinophils and Type 2 Cytokine Signaling in Macrophages Orchestrate Development of Functional Beige Fat. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1292–1308, 2014.
- RANKINEN, T. *et al.* Effects of exercise training on glucose homeostasis. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 108–114, 2005.
- RAO, R. R. *et al.* Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1279–

1291, 5 jun. 2014.

ROPELLE, E. R. *et al.* Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats. **The Journal of physiology**, v. 587, n. Pt 9, p. 2069–2076, maio 2009.

RYDER, J. W. *et al.* Postexercise glucose uptake and glycogen synthesis in skeletal muscle from GLUT4-deficient mice. **FASEB Journal**, v. 13, n. 15, p. 2246–2256, 1999.

SAITO, M. *et al.* High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: Effects of cold exposure and adiposity. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1526–1531, 2009.

SAKAMOTO, T. *et al.* Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 310, n. 8, p. E676–E687, 2016.

SALTIEL, ALAN R, R. K. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 3, p. 799–806, 2001.

SANCHEZ-DELGADO, G. *et al.* Role of exercise in the activation of brown adipose tissue. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 67, n. 1, p. 21–32, 2015.

SCHRODER, K. *et al.* IFN Gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. February, p. 163–189, 2004.

SHERI, R, C. *et al.* Exercise and type 2 diabetes: American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: Joint Position Statement. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 12, p. 2282–2303, 2010.

SOUZA, CLÁUDIO T. DE *et al.* Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4 α pathway in insulin resistant mice. **Journal of Physiology**, v. 588, n. 12, p. 2239–2253, 2010.

SOUZA, CLÁUDIO T DE *et al.* Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. **The Journal of physiology**, v. 588, n. Pt 12, p. 2239–2253, 15 jun. 2010.

SRIWIJITKAMOL, A. *et al.* Effect of acute exercise on AMPK signaling in

skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: A time-course and dose-response study. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 836–848, 2007.

THIEBAUD, D. *et al.* The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man. **Diabetes**, v. 31, n. 11, p. 957–963, nov. 1982.

THOMAS, A. W. *et al.* Exercise-associated generation of PPAR γ ligands activates PPAR γ signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 5, p. 806–815, 15 dez. 2011.

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

TOLER, CARLA ROBERTS, O'NEILL, BRIAN T.O, CYPESS, AARON, M. Diet-Induced Obesity Causes Insulin Resistance in Mouse Brown Adipose Tissue. **Obesity Silver Spring**, v. 23, p. 1765–1770, 2015.

TRAYHURN, P. Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 1–21, 2013.

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

VALVERDE, A. M.; BENITO, M.; LORENZO, M. The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 183, n. 1, p. 59–73, jan. 2005.

VATS, D. *et al.* Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. **Cell metabolism**, v. 4, n. 1, p. 13–24, jul. 2006.

Vigitel: o que é, como funciona, quando utilizar e resultados. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/vigitel>>.

VILLARROYA, F. *et al.* Toward an Understanding of How Immune Cells Control Brown and Beige Adipobiology. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 954–961, 1 maio 2018.

VIRTANEN, K. A.; AL., E. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. **The New England Journal of Medicine**, 2009.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, p. 1–9, 2014.

WANG, Q. *et al.* Differential effect of weight loss with low-fat diet or high-fat diet restriction on inflammation in the liver and adipose tissue of mice with diet-induced obesity. **Atherosclerosis**, v. 219, n. 1, p. 100–108, nov. 2011.

WARBURTON, *et al.* The Effects of Changes in Musculoskeletal Fitness on Health. **Canadian Journal Of Applied Physiology**, v. 26, p. 161–216, 2001.

WARBURTON, D. E. R.; BREDIN, S. S. D. Health benefits of physical activity: A systematic review of current systematic reviews. **Current Opinion in Cardiology**, v. 32, n. 5, p. 541–556, 2017.

WARWICK, P. M.; BUSBY, R. Influence of mild cold on 24 h energy expenditure in 'normally' clothed adults. **British Journal of Nutrition**, v. 63, n. 3, p. 481–488, 1990.

WEISBERG, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, dez. 2003.

WESTERTERP, K. R. Diet induced thermogenesis. **Nutrition and Metabolism**, v. 1, p. 1–5, 2004.

WINDER, W. W.; HARDIE, D. G. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 270, n. 2 33-2, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Management of noncommunicable diseases**. Disponível em: <<https://www.who.int/activities/management-of-noncommunicable-diseases>>. Acesso em: 17 dez. 2019.

WORLD, HEALT ORGATIZATION. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 17 dez. 2019.

WORDL, HEALT ORGANATIZATION. **Body mass index - BMI**. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>>. Acesso em: 17 dez. 2019.

XIAO, F. *et al.* Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via

GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK pathways. **Diabetes**, v. 60, n. 3, p. 746–756, 2011.

YE, J. Role of Insulin in the Pathogenesis of Free Fatty Acid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 7, n. 1, p. 65–74, 2007.


YE, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Frontiers of Medicine in China**, v. 7, n. 1, p. 14–24, 2013.


ZOUHAL, H. *et al.* Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. **Sports Medicine**, v. 38, n. 5, p. 401–423, 2008.

9 ANEXOS

Anexo I – Folha de aprovação da comissão de Ética do Uso de Animal
CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA – IB – UNESP - CRC

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro
Seção Técnica Acadêmica

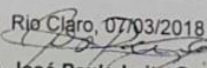
UNESP RIO CLARO

60 ANOS
1954-2014

DECISÃO CEUA Nº 04/2018

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Data de Registro CEUA: 23.01.2018	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado " Efeitos do exercício físico agudo na polarização de macrófagos no tecido adiposo marrom de camundongos obesos ", protocolo nº 0412, sob responsabilidade de Thiago Lucas de Castro (Pesquisador Responsável) e Alexandre Gabarra de Oliveira (Orientador) que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==,==	
Colaboradores: Andrey Santos	
A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Câmpus de Rio Claro, em sua 35ª reunião ordinária , realizada em 07.03.2018	
<input checked="" type="checkbox"/>	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	Não Aprovou.
<input type="checkbox"/>	Retirou , devido à permanência das pendências.

Vigência da autorização: 25/03/2018 a 31/01/2020	
Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica	
Espécie/linhagem/raça: Camundongo heterogêneo Swiss	Número de animais: 96 Peso: 15 g
Idade: desmame Sexo: masculino	
Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): CPPA (Centro de Pesquisa e Produção de Animais) Unesp - Botucatu	

Objetivo Acadêmico:	<input type="checkbox"/> TCC <input checked="" type="checkbox"/> Mestrado <input type="checkbox"/> Doutorado <input type="checkbox"/> Outros – (Iniciação Científica) <input type="checkbox"/> Pós- Graduação
---------------------	---

Rio Claro, 07/03/2018

Prof. Dr. José Paulo Leite Guadanucci
Coordenador

15/03/2018
