

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE HUMANA
INTERUNIDADES

TESE DE DOUTORADO

**ENVOLVIMENTO DO NF- κ B E PPAR-GAMA NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E METABÓLICA EM MONÓCITOS DE PESSOAS COM
DIFERENTES NÍVEIS DE CONDICIONAMENTO FÍSICO NA RESPOSTA AO
EXERCÍCIO AGUDO DE DIFERENTES INTENSIDADES**

BARBARA DE MOURA MELLO ANTUNES

Dezembro-2018

Presidente Prudente/SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

BARBARA DE MOURA MELLO ANTUNES

**ENVOLVIMENTO DO NF- κ B E PPAR-GAMA NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E METABÓLICA EM MONÓCITOS DE PESSOAS COM
DIFERENTES NÍVEIS DE CONDICIONAMENTO FÍSICO NA RESPOSTA AO
EXERCÍCIO AGUDO DE DIFERENTES INTENSIDADES**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências e
Tecnologia – FCT/UNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciências da Motricidade Humana.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Santos Lira

Dezembro-2018

Presidente Prudente/SP

A636e

Antunes, Barbara de Moura Mello

ENVOLVIMENTO DO NF-B E PPAR-GAMA NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E METABÓLICA EM MONÓCITOS DE PESSOAS COM
DIFERENTES NÍVEIS DE CONDICIONAMENTO FÍSICO NA RESPOSTA AO
EXERCÍCIO AGUDO DE DIFERENTES INTENSIDADES / Barbara de Moura
Mello Antunes. -- Presidente Prudente, 2018

125 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de
Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente

Orientador: Fábio Santos de Lira

1. Exercício Físico. 2. Aptidão Cardiorrespiratória. 3. Inflamação. 4.
Monócitos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências e
Tecnologia, Presidente Prudente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

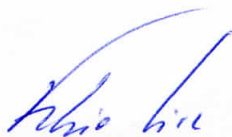
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Envolvimento do NF-kB e PPAR-gamma na resposta inflamatória e metabólica em monócitos de indivíduos sedentários, ativos e treinados

AUTORA: BARBARA DE MOURA MELLO ANTUNES

ORIENTADOR: FABIO SANTOS DE LIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE , especialidade: BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FABIO SANTOS DE LIRA

Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - SP



Prof. Dr. RONALDO VAGNER THOMATIELI DOS SANTOS

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



Profa. Dra. LILA MISSAE OYAMA

Departamento de Fisiologia / Universidade Federal de São Paulo - SP



Prof. Dr. ALESSANDRO MOURA ZAGATTO

Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências de Bauru - SP



Profa. Dra. GIOVANA RAMPAZZO TEIXEIRA

Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - SP

Presidente Prudente, 12 de dezembro de 2018

AGRADECIMENTO AS AGÊNCIAS DE FOMENTO:

O presente projeto de pesquisa teve auxílio financeiro das agências Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) / Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Processos nº: 2014/08003-1 e 2016/12369-7). Agradeço a FAPESP/CAPES pela concessão das bolsas (nacional e de pesquisa no exterior-BEPE) e auxílio financeiro que viabilizaram a realização deste trabalho e todas as produções científicas.

*Dedico a presente tese à minha família, mas
em especial ao meu avô (In Memoriam) que
me motivou a escolher tal trajetória.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me proporcionar saúde para conduzir os meus planos de vida e concretizar cada um deles. E talvez esse tenha sido um dos mais complexos.

Se no céu tenho “alguém” que me guia, aqui na terra tenho anjos personificados em humanos que são meus pilares, porto-seguro e que me sustentam até mesmo na ausência. Mãe, Pai, Dé, Vó, Tia e Vô (onde estiver...) minhas conquistas sempre serão dedicadas a vocês, pois sou o que sou porque tenho cada um de vocês em minha vida e que sorte a minha!

Agradeço a minha família do coração composta por grandes amigos que a faculdade me proporcionou e, sinceramente, agradeço mais ainda por ter o privilégio de conviver e aprender com cada um deles como ser uma profissional e uma pessoa melhor. De maneira muito especial agradeço à Paula Monteiro, Sergio Parmezzani, Neto Gerosa (rs), Dani Inoue, Dú Campos, Ricardo “Cielo”, Camila Buonani, Ana Paula Rocha, Ana Claudia Mazzuco e Fernanda Lima. Vocês são presentes que o mundo me deu!

De maneira muito carinhosa agradeço ao “Chefe” que me guiou nessa jornada. Efetivamente você foi (e é) um exemplo de líder sem se distanciar do lado amigo e humano. Obrigada por me elevar a um nível que nem eu mesma pensava que poderia chegar, por confiar no meu trabalho e por me ensinar acima de tudo que é possível ser “leve” trabalhando quando se gosta do que faz!

Não posso deixar de lembrar e registrar meu profundo carinho e agradecimento ao Prof. Ismael Forte Freitas Júnior, meu primeiro orientador na jornada acadêmica. Foi no CELAPAM que iniciei minha trajetória científica e construí todas as bases científicas que me norteiam até os dias de hoje. Obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Agradeço ao grupo LaFICE e cada membro que compõe esse laboratório. Obrigada pelas análises de madrugada, apoio, conversas, risadas e entrega em cada atividade. Melhor do que sermos um grupo é sermos amigos...

Sou grata pela parceria e espaço dado por diversos laboratórios da UNESP de Presidente Prudente, USP e Universidade de Córdoba (Espanha). Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Emerson Franchini que de maneira inspiradora se fez presente ao longo da minha trajetória como um brilhante coorientador.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e em especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Bolsa Doutorado País Processo nº 2014/08003-1; Bolsa BEPE Doutorado Exterior Processo nº 2016/12369-7) pelo suporte financeiro.

Resumo

O estilo de vida sedentário associa-se com alterações no perfil lipídico, inflamação crônica de baixo grau e aumento do tecido adiposo. Frente a essa questão, levantamos a hipótese de que alterações inflamatórias e metabólicas favorecem a instalação e progressão de diversas alterações metabólicas, e estão diretamente envolvidas com aptidão cardiorrespiratória mensurada pelo consumo de oxigênio pico (baixo ou alto VO_{2pico}). Sendo assim, o presente estudo buscou responder duas questões centrais divididas em duas etapas: **ESTUDO I** – avaliação das respostas metabólicas e inflamatórias periférica durante diferentes intensidades de esforço de acordo com o nível de condicionamento físico dos sujeitos; **ESTUDO II** – avaliação da resposta metabólica e inflamatória celular de acordo com o nível de condicionamento físico. Para o ESTUDO I foram recrutados 28 sujeitos saudáveis do sexo masculino (idade: $28,8 \pm 8,6$ anos; peso: $75,8 \pm 9,9$ kg; VO_{2pico} : $50,5 \pm 8,8$ mL.kg⁻¹.min⁻¹) que realizaram por 60 minutos ou até a exaustão voluntária três protocolos de exercício agudo em baixa (<60% VO_{2pico}), moderada (60-75% VO_{2pico}) e alta intensidade (>90% VO_{2pico}). Em todas as sessões foram coletadas amostras de sangue pré, imediatamente após e 60 minutos após o término da sessão para a determinação das concentrações de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ , PAI-1, adiponectina), hormônios (leptina e insulina) e parâmetros lipídicos (colesterol total, triacilglicerol, HDL-c e ácidos graxos livres). No ESTUDO I, observou-se que a sessão de esforço propiciou significantes modulações sobre TNF- α , IL-6, razão IL-6/IL-10, lactato e ácidos graxos, principalmente em alta intensidade; além de significantes correlações entre a produção de IL-10 durante o exercício com o nível de condicionamento físico, no sangue periférico e estimulado. Interessantemente, o exercício de alta intensidade foi capaz de aumentar as concentrações sistêmicas de PAI-1 imediatamente após a sessão. Para o ESTUDO II foram recrutados 22 sujeitos (idade: $25,8 \pm 5,7$ anos; peso: $76,5 \pm 14,4$ kg; VO_{2pico} : $47,8 \pm 12,3$ mL.kg⁻¹.min⁻¹) para avaliar a produção de citocinas e expressão gênica de marcadores associados com a atividade do PPAR- γ e NF- κ B em monócitos tratados por 24h sobre a presença de lipopolissacarídeo (ativador da via inflamatória TLR-4/NF- κ B), rosiglitazona e GW9662 (agonista e antagonista de PPAR- γ , respectivamente). Observou-se a nível molecular que maiores concentrações de IL-6 são produzidas por monócitos de sujeitos de alto VO_{2pico} enquanto maiores concentrações de IL-10 são produzidas em sujeitos de baixo VO_{2pico} . Quando avaliada a expressão gênica de proteínas das vias de sinalização do PPAR- γ e NF- κ B observou-se maior expressão de AMPK, TLR-4, PGC-1 e PPAR- γ no grupo de alto VO_{2pico} . Sendo assim, conclui-se que o exercício físico em intensidades altas impõe importantes alterações metabólicas que favorecem a instalação do quadro anti-inflamatório, entretanto tais adaptações periféricas são dependentes do nível de condicionamento físico, dado que indivíduos de maior aptidão cardiorrespiratória apresentam maior expressão de proteínas e receptores celulares que modulam positivamente a ativação do PPAR- γ e inibem a via inflamatória do NF- κ B. Desta forma, indivíduos de alto condicionamento físico apresentam adaptações benéficas nos mecanismos celulares e moleculares que refletem nas respostas metabólicas e inflamatórias periféricas frente à prática de exercício físico.

Palavras chaves: Sedentarismo, exercício físico, metabolismo, inflamação, fatores de transcrição.

Abstract

Sedentary lifestyle is associated with changes on lipid profile, low-grade chronic inflammation and increased adipose tissue. In this line, we hypothesized that inflammatory and metabolic alterations favor the installation and progression of several metabolic disorders, and are directly involved with cardiorespiratory fitness (VO_{2peak} uptake). Thus, the present study sought to answer two central questions divided into two steps: EXPERIMENT I - evaluation of the metabolic and inflammatory peripheral responses during different exercise intensities according to cardiorespiratory fitness; EXPERIMENT II - evaluation of cellular metabolic and inflammatory response according to the cardiorespiratory fitness. For EXPERIMENT I, 28 healthy male subjects were recruited (age: 28.8 ± 8.6 years, weight: 75.8 ± 9.9 kg, VO_{2peak} : 50.5 ± 8.8 mL.kg⁻¹.min⁻¹) and performed for 60 minutes or until voluntary exhaustion three acute exercise protocols at low (<60% VO_{2peak}), moderate (60-75% VO_{2peak}) and high (> 90% VO_{2peak}) intensities. In all sessions, blood sample was collected pre, immediately after exercise and 60 minutes after the end of each session to determine cytokine concentrations (TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ , PAI-1, adiponectin), hormones (leptin and insulin) and lipid parameters (total cholesterol, triacylglycerol, HDL-c, and free fatty acids). In EXPERIMENT I, was observed that acute session provided significant modulations on TNF- α , IL-6, IL-6/IL-10 ratio, lactate and fatty free acids, mainly at high intensity; in addition, significant correlations was verified between IL-10 release during exercise and cardiorespiratory fitness in peripheral and stimulated-blood. Interestingly, high-intensity exercise was able to increase systemic concentrations of PAI-1 immediately after the session. For EXPERIMENT II, 22 subjects were recruited (age: 25.8 ± 5.7 years, weight: 76.5 ± 14.4 kg, VO_{2peak} : 47.8 ± 12.3 mL.kg⁻¹.min⁻¹) to evaluate cytokine production and gene expression of markers associated with activation and/or inhibition of PPAR- γ and NF- κ B in monocytes treated for 24h on the presence or absence of lipopolysaccharide (pro-inflammatory pathway activator by TLR-4/NF- κ B), rosiglitazone and GW9662 (PPAR- γ agonist and antagonist, respectively). It was observed that higher concentrations of IL-6 are produced by monocytes of subjects with high VO_{2peak} while higher concentrations of IL-10 are produced in subjects with low VO_{2peak} . When the protein expression of PPAR- γ and NF- κ B signaling pathways was evaluated, higher expression of AMPK, TLR-4, PGC-1 and PPAR- γ was observed in the high VO_{2peak} group. Therefore, it is concluded that physical exercise at higher intensities imposes important metabolic changes that favor the installation of an anti-inflammatory profile, however these peripheral adaptations are fitness-dependent, given that individuals with greater cardiorespiratory fitness have higher expression of proteins and cellular receptors that positively modulate the PPAR- γ activation and inhibit the NF- κ B inflammatory pathway. In this sense, individuals with high physical fitness condition present beneficial adaptations in the cellular and molecular mechanisms that reflect in metabolic and inflammatory peripheral responses mediated by physical exercise practice.

Keywords: Sedentary lifestyle, Physical exercise, Metabolism, Inflammation, Transcription factors.

Lista de Abreviações e Siglas

ABCA1: Transportador de cassetes de ligação a ATP

AKT: Proteína quinase B

AMPK: Proteína quinase ativada por monofostato de adenosina

CD: Cluster de diferenciação

CETP: Proteína de transferência de éster de *colesterol*

COX2: Ciclo-oxigenase 2

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EPOC: Excesso do consumo de oxigênio pós-exercício

FC_{máx}: Frequência cardíaca máxima

FC_{rep}: Frequência cardíaca de repouso

HDL-c: Lipoproteína de alta densidade

IMC: Índice de massa corporal

IκB: Inibidor do fator de transcrição nuclear kappa B

IκK: Complexo IκB quinase

IκKα: Proteína fosforilada Alfa inibidora da quinase IκappaB

IκKβ: Proteína fosforilada Beta inibidora da quinase IκappaB

IκKγ: Proteína fosforilada Gama inibidora da quinase IκappaB

IL-10: Interleucina 10

IL-15: Interleucina 15

IL-18: Interleucina 18

IL-1ra: Receptor antagonista da IL-1

IL-1β: Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-6R: Receptor de Interleucina 6

IL-7: Interleucina 7

IL-8: Interleucina 8

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

IRAK: Quinase do receptor de IL-1

LAK: Células *Killer* Linfócitos ativadas

L-CAT: Lecitina-colesterol aciltransferase

LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade

LIF: Fator de inibição da leucemia

LPS: lipopolissacarideo

M1: Macrófago classicamente ativado (tipo 1)

M2: Macrófago alternativamente ativo (tipo 2)

MyD88: Proteína de diferenciação mieloide

NCoR: Correpessor de receptores nucleares

NEMO: Modulador essencial do NF- κ B

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

NK: Célula *Natural Killer*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAI-1: Inibidor do ativador de plasminogênio 1

PBMC: Células mononucleares do sangue periférico

PBS: Tampão fosfato salino

PCR: Proteína C-reativa

PGC1- α : Coativador 1 alfa do Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

PGC1- β : Coativador 1 beta do Receptor ativado por proliferador de

peroxissoma gama

PI3-K: Fosfatidilinositol-3-quinase

PLan: Potência associada ao limiar anaeróbio

PLLac: Potência associada ao limiar de lactato

PPAR: Receptor ativado por proliferador de peroxissoma

PPAR- α : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa

PPAR- β : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma beta

PPAR- γ : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

PPAR- δ : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma delta

PPRE: Elemento responsivo aos PPARs

PSE: Percepção subjetiva do esforço

PTP-1B: Tirosina fosfatase 1B

RXR: Receptor X Retinóide

SAA: Amilóide A do soro

SRC-1: Co-ativador-1 do receptor esteróide

STAT3: Transdutores de Sinais e Ativadores da Transcrição

TACE: Enzima metaloproteinase conversora do Fator de necrose tumoral Alfa

TAG: Triacilglicerol

Th2: Linfócito T auxiliar tipo 2

TLR: Toll like receptor

TLR4: Toll like receptor 4

TNFR1: Receptor 1 do factor de necrose tumoral

TNFR2: Receptor 2 do factor de necrose tumoral

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TRAFs: Fatores associados ao receptor de TNF

$VO_{2Máx}$: Consumo máximo de oxigênio

$VO_{2Píco}$: Consumo pico de oxigênio

Lista de Figuras

Figura 1: Sinalização clássica (canônica) do NF- κ B na transcrição gênica de citocinas inflamatórias	28
Figura 2: Contração muscular como mediador na produção e liberação de IL-6	32
Figura 3: Sinalização intracelular para ativação do PPAR- γ	35
Figura 4: Esquema ilustrativo do ESTUDO I – Análises fisiológicas e respostas periféricas	42
Figura 5: Esquema Ilustrativo dos ensaios <i>in vitro</i>	51
Figura 6: Diferença percentual dos parâmetros metabólicos e inflamatórios entre os momentos pré e pós exercício das sessões agudas de esforço em baixa, moderada e alta intensidade	60
Figura 7: Diferença percentual dos parâmetros metabólicos e inflamatórios entre os momentos pré e 60 minutos das sessões agudas de esforço em baixa, moderada e alta intensidade	61
Figura 8: Cinética dos parâmetros lipídicos de acordo com as intensidades de esforço	65
Figura 9: Cinética dos parâmetros nutricionais e metabólicos de acordo com as intensidades de esforço	68
Figura 10: Expressão de Monócitos de acordo com o nível de condicionamento físico	72
Figura 11: Concentrações de citocinas no meio de cultura de monócitos incubados por 24 horas.....	74
Figura 12: Expressão gênica em monócitos cultivados por 24h na presença ou ausência de LPS, rosiglitazona e GW9662	77
Figura 13: Expressão gênica em monócitos cultivados por 24h na presença ou ausência de LPS, rosiglitazona e GW9662 (cont).....	78

Lista de tabelas

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na análise do PCR-tempo real.....	52
Tabela 2: Característica dos participantes, expresso em média e desvio padrão, no teste incremental máximo e nas intensidades de esforço.....	55
Tabela 3: Concentração de citocinas inflamatórias, expresso em media e desvio padrão, no sangue periférico e no sangue estimulado com LPS de acordo com a intensidade de esforço	57
Tabela 4: Concentração dos parâmetros metabólicos no sangue periférico, expresso em media e desvio padrão, de acordo com a intensidade de esforço.....	58
Tabela 5: Correlação entre a variação percentual dos parâmetros inflamatórios e metabólicos do sangue periférico, nas diferentes intensidades de exercício físico, e nível de condicionamento físico representada pela potência pico atingida em teste incremental máximo.....	63
Tabela 6: Correlação entre a variação percentual dos parâmetros inflamatórios do sangue estimulado com LPS, nas diferentes intensidades de exercício físico, e nível de condicionamento físico representada pela potência pico atingida em teste incremental máximo	64
Tabela 7: Correlação entre parâmetros de perfil lipídico (absoluto e relativo) do sangue periférico, nas diferentes intensidades de exercício físico, e nível de condicionamento físico representada pela potência pico atingida em teste incremental máximo	66
Tabela 8: Correlação entre hormônios e citocinas do sangue periférico, nas diferentes intensidades de exercício físico, e nível de condicionamento físico representada pelo consumo pico de oxigênio atingido em teste incremental máximo	70
Tabela 9: Característica dos participantes, expresso em média e desvio padrão, no teste incremental máximo.....	71
Tabela 10: Análise da expressão gênica de marcadores inflamatórios. Valores expressos em “número de vezes” (folder) de alteração	76

Sumário

1. Introdução	15
2. Revisão de Literatura.....	17
2.1. Sedentarismo, doenças crônicas e resposta inflamatória.....	17
2.2. Papel dos monócitos na regulação das respostas inflamatórias	21
2.3. NF-κB: Vias de sinalização e resposta inflamatória.....	26
2.4. Efeitos anti-inflamatório do Exercício Físico	28
2.5. Vias de sinalização e papel do PPAR-gama na resposta anti-inflamatória.....	32
3. Justificativa e Problema	36
4. Objetivos.....	37
4.1. Objetivo geral.....	37
4.2. Objetivo específico.....	37
5. Hipóteses do Estudo.....	38
6. Materiais e Métodos.....	39
7. Resultados.....	55
8. Discussão	79
9. Conclusão.....	91
10. Referências.....	92
11. ANEXOS.....	112

1. INTRODUÇÃO

A prática insuficiente de atividade física (<150 minutos/semanais) (Garber et al., 2011) está diretamente associada à instalação e progressão de diversos distúrbios metabólicos, tais como obesidade (Ghigliotti et al., 2014), dislipidemia (Antunes et al., 2015), diabetes *mellitus* tipo 2 e resistência à ação da insulina (Chen et al., 2015), aterosclerose (Husain et al., 2015), alguns tipos de cânceres (Ackerman et al., 2017) entre outras. Estas doenças caracterizam-se mutuamente por um quadro de inflamação crônica de baixo grau dada por uma sutil alteração nas concentrações plasmáticas de fatores pró e anti-inflamatórios (McNelis & Olefsky, 2014, Olefsky & Glass, 2010), sendo a inflamação sistêmica reportada como um mediador regulatório das doenças supracitadas (King, 2008; Ades et al., 2009).

O desequilíbrio nas concentrações dos biomarcadores inflamatórios, principalmente o aumento das citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α (do inglês: tumor necrosis factor alpha), PAI-1 (do inglês: Plasminogen activator inhibitor-1), PCR (do inglês: C-reactive protein), IL-6 (do inglês: interleukin 6), e a redução das citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (do inglês: interleukin 10) e adiponectina, estão intimamente relacionadas com o quadro persistente da inflamação sistêmica de baixo grau (Lira, et al., 2014; Ohashi et al., 2014). O processo inflamatório associado com as doenças crônicas não degenerativas está associado com uma maior atividade de fatores transcricionais, tais como NF- κ B (do inglês: nuclear factor kappa B), que ao ser ativado por endotoxina (LPS) e/ou citocinas inflamatórias (ex.: TNF- α) induz a transcrição gênica de marcadores pró-inflamatórios (Baker et al., 2011).

Por outro lado, a prática regular de exercício físico é capaz de propiciar respostas anti-aterogênica e anti-inflamatória (Nimmo, 2013; Petersen, 2005),

tendo em vista a capacidade que o exercício possui em estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10, IL-1ra e a própria IL-6, que quando advinda da contração muscular e inserida em um *milliê* estável possui caráter anti-inflamatório, bem como aumentar a oxidação de lipídios (Steensberg et al., 2003). É postulado que tais efeitos benéficos do exercício físico estão associados à ativação de outro fator transcricional, o receptor ativado por proliferador de peroxissoma do tipo gama (PPAR- γ), capaz de regular a expressão gênica de proteínas relacionadas com o metabolismo de lipídios/lipoproteína, homeostase glicêmica, proliferação celular e inflamação, sendo no último aspecto vinculado a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina e IL-10 (Tunstall et al., 2002; Auboeuf et al., 1997).

Frente ao exposto, é incipiente o conhecimento do papel da intensidade do exercício físico aeróbio sobre os aspectos metabólicos e inflamatórios, regulado por fatores de transcrição, principalmente o PPAR- γ , de acordo com o condicionamento físico. Neste contexto, investigar a resposta imunometabólica e fatores transcricionais frente diferentes protocolos de exercício físico são fundamentais para a compreensão da modulação do perfil anti-inflamatório e anti-aterogênico.

2. REVISÃO

2.1. Sedentarismo, doenças crônicas e resposta inflamatória

A inatividade física é apontada como fator deletério para a manutenção da saúde humana apresentando íntima relação com as principais doenças crônicas não transmissíveis do século XXI. Desta forma, esta condição é vista como fator de risco isolado extremamente importante para a instalação de distúrbios metabólicos, fenômeno este chamado por alguns autores de “doençoma” da inatividade física (Pedersen, 2009). O doençoma pode ser definido como um agrupamento de doenças que dividem mecanismos patogênicos em comum, como por exemplo, inflamação crônica de baixo grau.

De acordo com Hallal e colaboradores (2012) 31,1% da população adulta mundial é classificada como fisicamente inativa, observando menor prevalência em países da Ásia (17%) e maior prevalência nos países das Américas e Mediterrâneo (43%). Com relação ao Brasil, em estudo recente conduzido por Mielke e colaboradores (2015) observou-se que, em média, 46% da população brasileira (47,2% na região Centro-Oeste, 45,6% na região Sul, 46,5% na região Sudeste, 44,3% na região Nordeste e 48,1% na região Norte) não atingem as recomendações de 150 minutos/semanais de atividade física aeróbia moderada para manutenção da saúde como preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Silva e colaboradores (2016) observaram que esta incidência de inatividade física elevou-se para 63,6% na população adulta, sendo esta alarmante prevalência um determinante para a diminuição da expectativa de vida, bem como para o aumento da incidência de mortes prematuras (Lee et al., 2012).

As principais doenças crônicas não transmissíveis, tais como diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemia e doenças cardiovasculares geralmente apresentam

como característica similar o quadro de inflamação crônica de baixo grau. Neste contexto o quadro inflamatório pode ser definido como aumento de duas a quatro vezes nas concentrações séricas de repouso de marcadores inflamatórios que atuam como preditores de mortalidade (Candore et al., 2010), observando aumento nas concentrações sistêmicas de PCR, TNF- α , PAI-1 e IL-6 concomitantemente com a redução de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e adiponectina (Lira et al., 2010).

É importante ressaltar que a inflamação, ou processo inflamatório, é uma reação fisiológica ou uma sinalização orgânica mediante danos teciduais locais ou infecções apresentando aumento do fluxo sanguíneo, permeabilidade capilar e migração das células dos vasos sanguíneos, prioritariamente de células do sistema imune para a região lesionada. Já a resposta inflamatória são os mecanismos ativados por meio da resposta imune inata de células imunológicas para combate à inflamação e, por isso, não é uma resposta específica, mas ocorre de maneira padronizada independente do estímulo.

No âmbito das doenças crônicas não transmissíveis e inflamação crônica de baixo grau, um dos primeiros relatos da existência do quadro inflamatório associado a elevadas concentrações de TNF- α foi realizado por Hotamisligil e colaboradores, em 1993, ao verificar associação entre a citocina, obesidade e resistência à ação da insulina (Hotamisligil et al., 1993). Anos depois, estudos apresentaram o papel lipolítico do TNF- α devido a sua capacidade de mediar a apoptose de pré-adipócitos e adipócitos maduros, bem como a lipólise de adipócitos e inibição da adipogênese e lipogênese (Warne, 2003, Cawthorn, 2007).

O TNF- α foi descoberto em 1975 e identificado como uma proteína solúvel advinda da ativação de células do sistema imune, tais como monócitos,

macrófagos e linfócitos, e que atuava sobre linhagens de células tumorais em resposta ao seu efeito citotóxico. Esta citocina é sintetizada como uma proteína transmembranar de 26 kDa (233 aminoácidos) que passa por uma clivagem proteolítica, via TACE (do inglês: metaloprotease TNF alpha-converting enzyme), dando origem a citocina que é um polipeptídeo trimérico de 17 kDa (157 aminoácidos) (Wajant, 2003).

De modo geral, a resposta inflamatória ativada por TNF- α é mediada pela interação da citocina com receptores de membrana da superfamília de receptores de TNF, o tipo I (TNFR1 / CD120a) e o tipo II (TNFR2 / CD120b), que estão presentes na superfície de quase todos os tipos de células, com exceção aos eritrócitos, culminando na ativação de diversos fatores intracelulares, tais com o NF-kB (Varfolomeev et al., 2016).

Outra citocina relacionada com a resposta inflamatória frente às condições de doença e sedentarismo é a IL-6 que, no referido contexto, tem sua produção estimulada via TNF- α , tendo em vista que estudos apontam que sua síntese é significativamente aumentada por meio da ativação das vias de sinalização do NF-kB (Mansell et al., 2013).

A IL-6 é uma citocina de 21 kDa que teve seu cDNA clonado em 1986 como um fator de estimulação das células B por Hirano e colaboradores (Hirano et al., 1986). Em 1987, Nijsten e colaboradores caracterizaram a IL-6 como uma proteína glicosilada (184 aminoácidos) envolvida na resposta inflamatória de fase aguda, produzida principalmente por monócitos ativados, que possui associação com outras proteínas de fase aguda, tais como PCR. Segundo os autores, a caracterização da IL-6 como uma proteína de fase aguda está associada ao rápido aumento de até 50 vezes, quando comparado

ao basal, nas concentrações circulantes da citocina frente o quadro de injúria (Nijsten et al., 1987).

Neste contexto, a resposta inflamatória da IL-6 é mediada pela interação da citocina com receptores específicos de membrana, receptor de IL-6 (IL-6R), que encontra-se associado a proteínas transmembranar secundárias, como o gp130, responsáveis por mediar a transdução do sinal da IL-6 após a dimerização (Taga et al., 1989; Kishimoto, 2010). Esta citocina é importante para a diferenciação celular, tais como das células TH₁₇ (Bettelli et al., 2006), orientação das respostas imune inata e adquirida (Scheller et al., 2011), além de ser um potente fator estimulante para a síntese de outras proteínas hepáticas de resposta aguda como PCR, SAA (do inglês serum amyloid A), entre outras (Ramadori et al., 1988).

O quadro inflamatório crônico de baixo grau, além de caracterizar-se por um aumento significativo das concentrações plasmáticas de marcadores pró-inflamatórios, também apresenta redução de citocinas de caráter anti-inflamatório, como IL-10 e adiponectina. Na obesidade é observada associação entre acúmulo de gordura na região abdominal e redução das concentrações de ambos os marcadores (Manigrasso et al., 2005), bem como a redução do peso corporal, principalmente da região andróide, é capaz de diminuir os riscos para doenças cardiovasculares e melhorar o perfil anti-inflamatório de sujeitos obesos por meio da elevação das concentrações de IL-10 e adiponectina (Chou et al., 2013).

Diversas são as propriedades anti-inflamatórias associadas a estas citocinas, como por exemplo, a adiponectina é capaz de reduzir a expressão de marcadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α e IL-6, em resposta à redução na translocação do NF- κ B para o núcleo celular (Wulster-Radcliffe et al., 2004)

e aumenta a secreção de outros mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10 (Wolf et al., 2004). A IL-10 por sua vez é capaz de melhorar o quadro de resistência à ação da insulina na obesidade (Dagdeviren et al., 2016), pode atuar como fator terapêutico nas alterações cardíacas e doenças associadas (Verma et al., 2012) e inibe a produção de marcadores inflamatórios, tais como TNF- α e IL-6 (Moore et al., 1993), também em resposta à redução na atividade do NF- κ B.

2.2. Papel dos monócitos na regulação das respostas inflamatórias

No final da década de 60 foi proposta pela primeira vez, por Van Furth e colaboradores, a existência de um sistema fagocitário mononuclear que ligava monócitos a macrófagos inflamatórios e residentes em tecidos específicos em uma única linhagem de desenvolvimento (Van Furth et al., 1968; Van Furth et al., 1972). Tais células mononucleares são formadas na medula óssea e constantemente são lançadas para a corrente sanguínea compondo 4% e 10% do total das células imunes de animais e humanos, respectivamente (Ginhoux and Jung, 2014).

Os monócitos e os macrófagos são caracterizados como as menores células do sistema imune que, morfologicamente, apresentam apenas um único núcleo celular em estrutura arredondada. A meia vida dos monócitos é considerada curta variando de 20 horas na medula óssea e de no máximo 5 dias em corrente sanguínea (Ginhoux and Jung, 2014). Tais células mononucleares em circulação, principalmente no sangue periférico, são denominadas de monócitos, e quando são recrutadas e infiltradas em tecidos específicos diferenciam-se para macrófagos tissulares. É importante destacar que os monócitos circulantes são células precursoras de outros tipos celulares,

tais como macrófagos, células dendríticas e osteoclastos (Qu et al., 2014; Rivollier et al., 2012).

Em estudo pioneiro para separação celular por tamanho e densidade, por meio de centrifugação de gradiente e em contrafluxo (elutriação), Akiyama e colaboradores (1983), caracterizaram os monócitos em duas subpopulações, sendo uma denominada de “monócitos regulares” e outra de “monócitos intermediários”. Os monócitos regulares foram caracterizados por ter maior tamanho, expressar altas quantidades de antígenos de superfície, exibir alta atividade de peroxidase e produzir elevadas quantidades de IL-1, CSF (do inglês: colony-stimulating factors) e prostaglandina E₂. Ao passo que os monócitos intermediários poderiam ser mais facilmente mobilizados de reservas extravasculares e estar mais envolvidos na produção de IFN-γ (do inglês: interferon gamma). Anos depois, e até os dias de hoje, a diferença fenotípica na expressão dos co-receptor de LPS (CD14) e do receptor de FC (fragmento cristalizável) tipo III (CD16) é mais comumente utilizada para distinguir as diferentes subpopulações de monócitos e suas funcionalidades (Passlick et al., 1989).

Atualmente é bem descrito na literatura classes de monócitos que se diferenciam entre si pela heterogeneidade fenotípica e funcional. Geralmente estão divididos em três subpopulações de monócitos: os clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) que expressam elevadas quantidades de CD14 e não expressam o CD16; compreendendo cerca de 90% dos monócitos do sangue, e os 10% restante são os intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) que também expressam elevadas quantidades de CD14 e expressam baixa quantidade de CD16; e os não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺ ou CD14^{low}CD16⁺) que expressam baixas quantidades do CD14 e altas quantidade de CD16 (Ziegler-

Heitbrock, 2010). Além disso, tais subpopulações de monócitos apresentam receptores de quimiocinas específicos verificando expressão $CCR2^{high}$ e $CX_3CR_1^{low}$ em monócitos clássicos e $CCR2^{low}$ e $CX_3CR_1^{high}$ em monócitos intermediários e não clássicos (Sprangers et al., 2016).

Em linhas gerais, os monócitos clássicos possuem funções associadas à reparação tecidual, propriedades anti-apoptóticas e atuam como a primeira linha de defesa da resposta imune inata contra patógenos. Classicamente são os principais produtores de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ROS) e apresentam atividade fagocítica (Abeles et al., 2012). Além dos CDs 14 e 16, possuem conjunto de receptores do tipo TLR (do inglês: Toll like receptor) e que expressam genes envolvidos na angiogênese, cicatrização de feridas e coagulação (Yang et al., 2014). Os monócitos intermediários são os melhores apresentadores de antígeno comparados às outras subpopulações devido à expressão elevada de moléculas para apresentação de antígeno, tais como CCR5 (do inglês: C-C chemokine receptor type 5) e HLA-DR (do inglês: human leucocyte antigen-DR), porém possuem reduzida capacidade fagocítica. E os monócitos não clássico possuem funções anti-proliferativas, pró-apoptóticas e contribuem na angiogênese e fibrose (Yang et al., 2014), sendo observada maior predominância no sangue periférico de pacientes com doenças inflamatórias. São denominado pró-inflamatório devido reduzida expressão de CD14 e alta expressão de CD16, além de liberar algumas citocinas inflamatória, tais como IL-1 β e TNF- α (Cros et al., 2010).

Frente situações de injúria e inflamação, os monócitos clássicos são rapidamente mobilizados para o tecido lesionado para sinalização e gerar respostas inflamatórias, tais como reconhecimento e remoção de corpos estranhos e células apoptóticas (Wong et al., 2012). Os monócitos

intermediários já são recrutados em uma resposta inflamatória mais tardia, e por muitas vezes nos estágios finais da inflamação, por estar associado com a apresentação do antígeno, secreção de quimiocinas e reconhecimento de parasitas (Turner et al., 2014). Já os monócitos não clássicos são denominados por muitos autores como “monócitos de patrulhamento” por estar no endotélio e ser constantemente mobilizado como parte da resposta inata local diferenciando-se em macrófagos residentes (Thomas et al., 2015).

É digno de nota que todo processo estressor ao organismo culmina em uma resposta imunológica como mecanismo de defesa, seja essa uma injúria provocada por invasão de patógenos (infecção) ou por lesão tecidual (inflamação). Durante a resposta imune também ocorrem mudanças significantes no metabolismo celular e, mediante quadros de doenças metabólicas, o excesso de lipídios e glicose circulantes atua como ativadores da resposta imunológica. A partir destas relações deu-se o termo *Imunometabolismo*, que pode ser definido como uma interação direta e constante, ou seja um *crosstalk*, entre o sistema imunológico e a atuação do metabolismo celular (Antunes et al., 2017)

Frente ao exercício físico, está bem descrito na literatura que a quantidade total de células do sistema imune, incluindo os monócitos, altera-se positivamente, sendo tais modulações reguladas por hormônios (ex.: adrenalina e cortisol) e diretamente relacionadas com a intensidade e duração da sessão de treinamento aeróbio (Gabriel et al., 1992). A monocitose (aumento da quantidade circulante de monócitos) observada frente uma sessão aguda de exercício físico ocorre de forma transitória (por aproximadamente 2 horas) e outros efeitos funcionais podem ser identificados, tais como alteração fenotípica (por uma necessidade de mobilização de monócitos CD14⁺/CD16⁺

nos tecidos), redução da expressão dos receptores de membrana (TLR 1,2 e 4) e, conseqüentemente, a produção de citocinas inflamatórias com redução das concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-1 α (Walsh et al., 2011). Cronicamente, o exercício físico parece reduzir a porcentagem de monócitos CD14⁺/CD16⁺.

Estudo conduzido por Scharhad e colaboradores (2005) para investigar os efeitos do exercício aeróbio prolongado em ciclistas (70% do limiar anaeróbio por 4 horas) observou-se que a sessão de exercício induziu por curto prazo o aumento das concentrações de IL-6 e proteína C-reativa paralelamente ao aumento do número absoluto de células do sistema imune, tais como células *Natural Killer* (NK), monócitos e neutrófilos. Entretanto, sem alterações das capacidades fagocítica e oxidativa das células. Por outro lado, Dimitrov e colaboradores (2017) observaram que o exercício de intensidade moderada (60-75% VO_{2pico}) em curto tempo de execução (20 minutos) reduz a porcentagem de monócitos produtores de TNF- α , e conseqüentemente, as concentrações da citocina em sangue estimulado ou não com LPS, concluindo que a regulação negativa da produção de TNF- α por monócitos durante o exercício agudo é mediada por concentrações elevadas de adrenalina.

Metabolicamente, estudo pioneiro conduzido por Wang e colaboradores (2006) em homens sedentários saudáveis demonstrou que a intensidade do exercício físico é fator determinante no processo redox, mediado pelo LDL oxidado (LDL-ox), em monócitos. Além de aumentar significativamente a quantidade de monócitos, observou-se que o exercício intenso (80% VO_{2max}) aumenta a supressão da atividade da m-SOD (do inglês: mitochondrial superoxide dismutase) e do conteúdo de r-GSH (do inglês: reduced form γ -glutamylcysteinyl glycine) pelo LDL-ox, enquanto exercícios de intensidades leve (40% VO_{2max}) e moderada (60% VO_{2max}) reduzem os efeitos do LDL-ox

sobre os mesmos parâmetros. Além disso, embora o exercício intenso aumente a produção de espécies reativas de oxigênio, tanto o exercício moderado quanto o leve não influenciaram a produção das espécies reativas de oxigênio pelos monócitos.

2.3. NF-κB: Vias de sinalização e resposta inflamatória

O fator de transcrição NF-κB foi descoberto em 1986, por Ranjan Sen (Sen et al., 1986) e caracteriza-se por ser um complexo heterodímero, que possui um domínio N-terminal de 300 aminoácidos, capaz de contribuir em diversos eventos metabólicos tais como na imunidade inata e adaptativa, adesão celular, diferenciação, proliferação, autofagia, senescência e apoptose (Xiao, 2004). Este fator transcricional foi intitulado como “fator nuclear *kappa* B” por ser reconhecido como um fator de atuação nuclear (NF) que se liga seletivamente a 10 pares de bases na região promotora do gene, codificando na cadeia leve kappa (κ), e que foi descoberto em extratos de tumores de células B (Ghosh et al., 1998).

As principais subunidades componentes do fator de transcrição que estão descritas na literatura são p65 (RelA), p50 (NF-κB1), RelB, c-Rel, p105 e p52/100 (NF-κB2), sendo a p65 e p50 as principais subunidades que compõe o heterodímero estudado no contexto da inflamação (Xiao, 2004). Em linhas gerais, o NF-κB permanece inativo no meio citoplasmático por estar acoplado a um complexo inibitório, de aproximadamente 700 a 900 kDa, reconhecido como IKK (do inglês: inhibitor kinase complex) que impede a translocação do fator transcricional para o núcleo celular (Baeuerle et al., 1988)

A exposição celular a substratos energéticos, tais como ácidos graxos livres, bem como a estímulos metabólicos estressores, tais como citocinas, endotoxina e estresse oxidativo, advindos da lipólise e dieta hiperlipídica são

fatores gatilho para o início da sinalização pró-inflamatória do NF- κ B via receptores TLR4 (Escoubet-Lozach et al., 2011; Yeop et al., 2010).

A interação entre o estímulo estressor e os receptores TLR culminam na fosforilação e ativação de diversas moléculas amplificadoras e adaptadoras, tais como proteína de diferenciação mielóide (MyD88), quinase do receptor de IL-1 (IRAK) e quinase associada ao receptor do TNF (TRAFs), entre outras, que são responsáveis pela transdução do sinal e ativação do complexo IKK (Hayden et al., 2011). O complexo inibitório IKK pode ser subdividido em porção catalítica (inibitória) e não catalítica (regulatória), sendo a unidade catalítica caracterizada pelas proteínas IKK α e IKK β (ou IKK1 e IKK2, respectivamente) e a unidade não catalítica pela proteína IKK γ (ou NEMO, do inglês: NF- κ B essential modulator), podendo estas proteínas originar um homo ou heterodímero associado ou não ao NEMO (Mercurio et al., 1999).

A ativação do complexo IKK resulta na fosforilação de proteínas da família I κ B (do inglês: inhibitor of κ B), principalmente da subunidade α/β , e degradação da mesma pelo sistema ubiquitina-proteassoma 26S favorecendo a dissociação entre os complexos para que haja translocação do NF- κ B para a região promotora do gene alvo para amplificar a transcrição de genes associados com a resposta inflamatória (TNF- α , IL-6, iNOS, COX2, PTP-1B) (Serrano-Marco et al., 2012; Pahl, 1999) (**Figura 1**).

A instalação e a progressão do quadro inflamatório em diversas doenças crônicas não transmissíveis estão associadas com o aumento da atividade e expressão do NF- κ B. Em doenças cardiovasculares, como aterosclerose, dislipidemia e alterações endoteliais, este fator de transcrição é apontado como um mediador da resposta inflamatória por elevar a síntese de TNF- α , IL-6, quimiocinas e moléculas de adesão (Li et al., 2014; Antunes et al., 2016); o

mesmo *milliê* inflamatório pode ser observado na diabetes *mellitus* tipo 2 (Grossmann et al., 2015), resistência à insulina (Hotamisligil et al., 1993) e obesidade (Schmidt et al., 2015). Por outro lado, mudanças no estilo de vida podem alterar significativamente a atividade e expressão do NF- κ B viabilizando uma possível resolução do quadro inflamatório crônico de baixo grau.

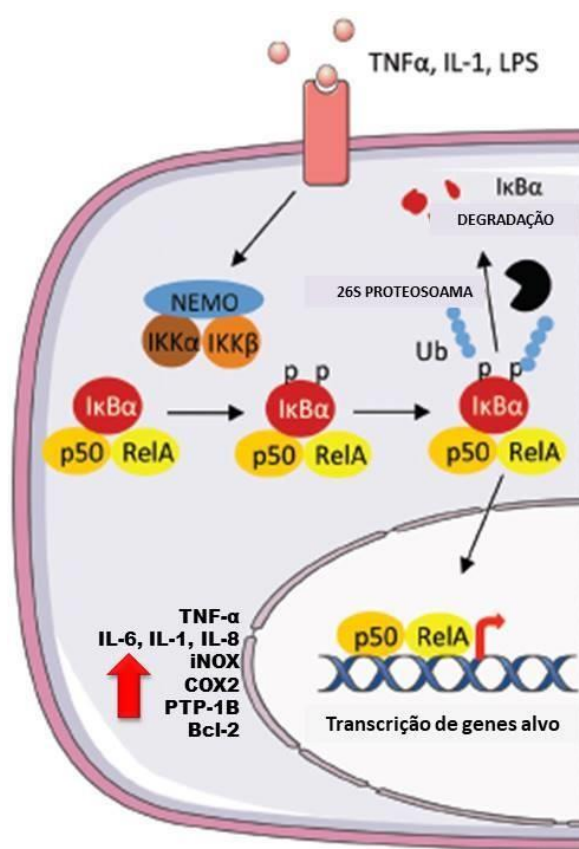


Figura 1. Sinalização clássica (canônica) do NF κ B na transcrição gênica de citocinas inflamatórias. Adaptado de Viennois e colaboradores (2013)

2.4. Efeitos anti-inflamatórios do Exercício físico

Como elucidado nos tópicos anteriores, a inatividade física associada a inadequados hábitos alimentares e cotidianos são fatores gatilho para a instalação e progressão de diversos distúrbios metabólicos, principalmente para o desenvolvimento de doenças que apresentam um quadro inflamatório associado a elas. Se por um lado o baixo nível de atividade física está

relacionado com significantes alterações metabólicas, a contração muscular advinda do exercício físico é capaz de propiciar a liberação fatores imunomoduladores (IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15), de atuação local e sistêmica, e ativar células do sistema imune (monócitos/macrófagos, neutrófilos) com a finalidade de auxiliar no processo de remodelamento muscular e reparação tecidual (Tidball & Villalta, 2010), bem como reestabelecer um possível quadro inflamatório devido sua ação anti-inflamatória (Pedersen & Febbraio, 2012).

Um dos estudos pioneiros que ilustrou a mobilização e interação entre células do sistema imune e o metabolismo energético durante o exercício físico foi conduzido por Bjorn Ahlborg e Gunvor Ahlborg (1970) que verificaram a presença de leucocitose, principalmente aumento de neutrófilos e linfócitos, durante a sessão de exercício físico em resposta aos mecanismos/atividade beta-adrenérgicos resultando na síntese e liberação de catecolaminas, capazes de estimular e disponibilizar substratos energéticos (glicose e ácidos graxos) para a musculatura esquelética e também uma modulação imune local e sistêmica.

A partir da década de 90, o exercício físico passou a ser caracterizado como uma prática de efeitos anti-inflamatório, com aumento da atividade de células imunes (Camus et al., 1998; Camus et al., 1998), e ao verificar que o músculo esquelético era um órgão endócrino capaz de sintetizar e liberar miocinas (Pedersen, 2011; Pedersen, 2012) que são caracterizadas como citocinas provenientes dos miócitos frente à contração muscular com atuação autócrina, parácrina e endócrina (Iizuka et al., 2014).

Uma das principais miocina investigada é a IL-6 que possui atuação pleiotrópica, sendo que sua atuação dependerá do tecido de origem e o ambiente que está estimulando esta produção e secreção. Ou seja, a IL-6 atua

de forma pró-inflamatória quando sua produção e secreção são provenientes de células imunológicas, como os macrófagos, em quadros de septicemia ou inflamação, e também pode desempenhar papel anti-inflamatório quando é produzida e secretada pelas fibras musculares em contração em resposta ao exercício físico, e ao estimular a produção de outras citocinas anti-inflamatórias como a IL-8, IL-10, IL-18 e IL-1ra (Steensberg et al., 2003).

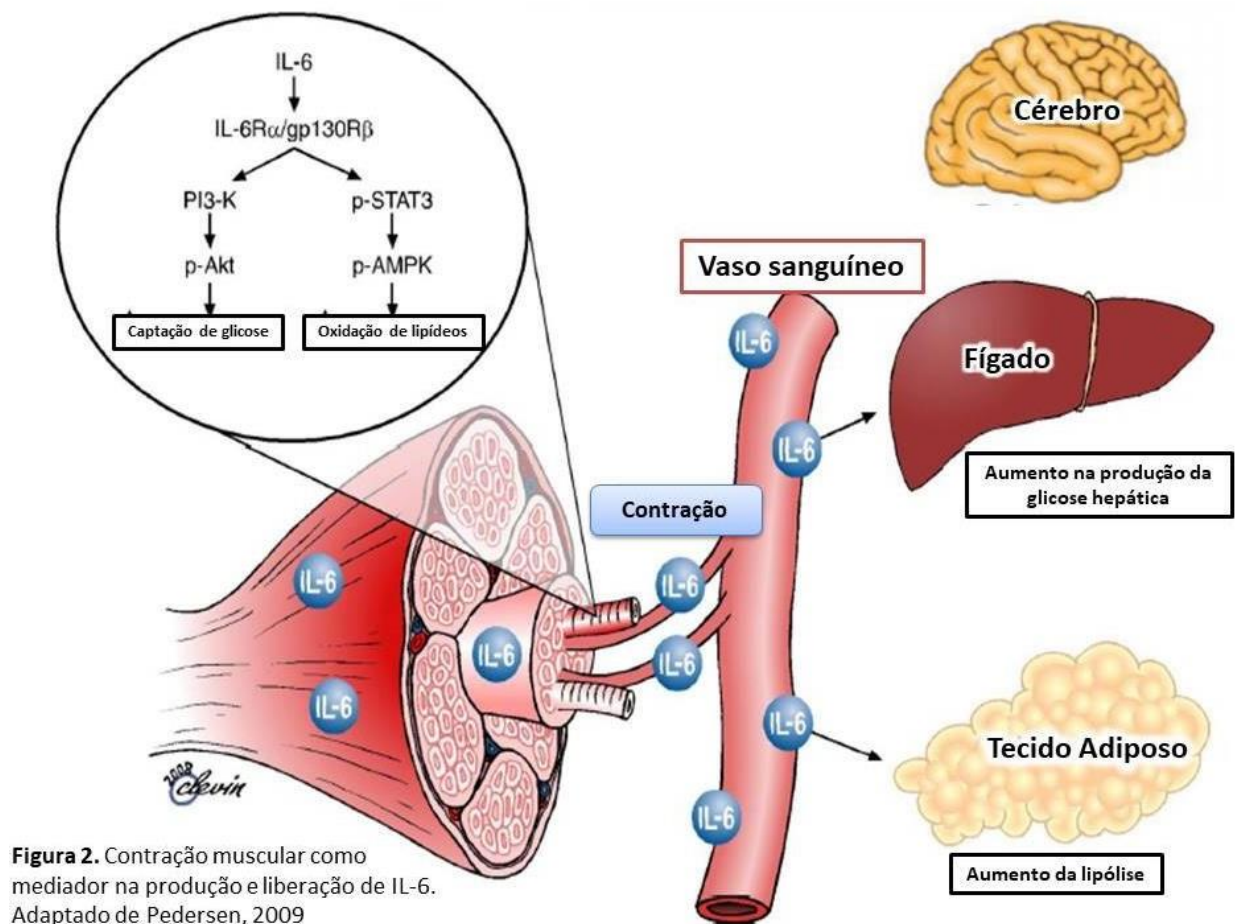
A IL-6, proveniente da contração das fibras musculares, atua de forma distinta nos tecidos e órgãos, observando que no próprio músculo esquelético ela efetua efeitos aditivos na captação de glicose (via ativação de PI3-K e AKT), no fígado controla enzimas responsáveis pela gliconeogênese hepática, no tecido adiposo estimula a oxidação lipídica (via STAT3 e AMPK) e que no sistema nervoso central controla neuropeptídeos relacionados ao controle da ingestão alimentar (Pedersen & Febbraio, 2008; Pedersen et al., 2001) (**Figura 2**).

Entretanto para que o exercício físico possa possibilitar uma resposta anti-inflamatória é de suma importância considerar a manipulação e os ajustes das variáveis do treinamento proposto, principalmente as variáveis de volume, duração e intensidade, pois de acordo com Nieman (1994) o exercício físico quando realizado de forma intensa contribui para o aumento da incidência de infecção do trato respiratório superior, enquanto que o exercício de intensidade moderada teria um efeito protetor às infecções.

Em outro estudo agudo conduzido por Tvede e colaboradores (1989) em cicloergômetro com diferentes intensidades (25%, 50% e 75% do VO_{2max}) durante 1 hora, observaram que algumas subpopulações de células imunes, tais como as *Natural Killer* (NK) e células *Killer* de Linfócitos ativadas (LAK), foram elevadas nas intensidades mais baixas e suprimidas durante o esforço

com intensidade à 75% do VO_{2max} . Com relação a estímulos crônicos, Yakeu e colaboradores (2010) em estudo conduzido por oito semanas de exercício aeróbio leve (caminhada=10.000 passos/dia, três vezes semanais) em sedentários verificou-se que o exercício de baixa intensidade apresenta associação positiva com macrófagos do tipo M2, Th2, PGC-1 α e PGC-1 β e associação negativa com macrófagos M1, demonstrando que exercícios de intensidades mais baixas, porém realizado regularmente e sistematicamente, pode atuar na polarização dos macrófagos e induzir respostas anti-inflamatórias.

Por outro lado, estudos mais recentes têm apresentado os efeitos benéficos do exercício físico de alta intensidade sobre a resposta inflamatória, verificando que após a realização de um exercício aeróbio de alta intensidade (12 estímulos de 5 minutos/cada, 10% declive, 15 km/h) há aumento na quantidade e atividade de monócitos e neutrófilos sugerindo que a presença destas células imunes, principalmente de monócitos, foram responsáveis pelo aumento das concentrações de IL-6, via sinalização de STAT3 (van de Vyver et al., 2015). No entanto, são incipientes os conhecimentos sobre a regulação anti-inflamatória do exercício físico de acordo com o condicionamento físico e a intensidade do esforço, entretanto os possíveis mecanismos regulatórios e a resposta anti-inflamatória estariam diretamente associados com a ativação de outros fatores de transcrição gênica, principalmente com os membros da superfamília do PPAR.



2.5. Vias de Sinalização e papel do PPAR-gama na resposta anti-inflamatória

Em 1960 foi descoberto e feito à primeira menção sobre a proliferação de peroxissomo em estudo conduzido com animais (De Duve, 1960) e, posteriormente a esta investigação, diversos outros estudos foram conduzidos a fim de elucidar as proteínas envolvidas no sistema. Anos depois, em 1990, após clonagem de receptores presentes no fígado de ratos, descobriu-se o fator de transcrição PPAR que se apresenta em três diferentes isoformas: PPAR- α (468 aminoácidos), PPAR- γ (479 aminoácidos) e PPAR- β/δ (441 aminoácidos) (Issemann et al., 1990).

O PPAR é um regulador da expressão gênica de diversas proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico e glicêmico, homeostase, adipogênese, sensibilidade à ação da insulina, resposta imune, desenvolvimento e diferenciação celular, e inflamação (Plutzky, 2003; Feige et al., 2006). Com relação as células imunes, principalmente os monócitos, é bem documentado na literatura que o PPAR- γ regula a resposta inflamatória e exerce papel primordial no quadro da aterosclerose por meio deste tipo celular (Nunn et al., 2007), além disso, a ativação das isoformas PPAR- α e PPAR- γ favorece o transporte reverso do colesterol pela modulação na expressão gênica da ABCA1 em macrófagos (Chinetti et al., 2001).

O PPAR- γ pode ser caracterizado como um receptor nuclear altamente expresso em diferentes tecidos, como tecido adiposo e fígado, em células imunes, como os monócitos, e estimula a transcrição de genes específicos relacionados ao metabolismo lipídico (Fonseca-Alaniz et al., 2006), sendo assim o PPAR- γ têm função regulatória no metabolismo energético e inflamatório.

Na ausência de ativadores, o complexo PPAR-RXR permanece inativo e/ou reprimido no citoplasma por proteínas co-repressoras, tais como correpressor de receptores nucleares (NCoR), que por meio da desacetilação das histonas mantém a cromatina enovelada e impede a ativação da via transcricional (Rizzo et al., 2006; Yu et al., 2007; Yu et al., 2005). A atividade transcricional de PPAR-RXR é ativada quando há o desacoplamento do repressor, por meio de proteínas agonistas, e recrutamento de proteínas co-ativadoras, tais como PGC-1 α (do inglês: peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1) e SRC-1 (do inglês: steroid receptor coactivator-1), viabilizando a acetilação das histonas e, conseqüentemente, a translocação para o núcleo

celular para que haja a ligação do complexo a sequências específicas de reconhecimento (PPREs), na região regulatória dos genes-alvo, e transcrição de genes para a síntese de diversos biomarcadores, tais como a adiponectina no caso do PPAR- γ (Straus et al., 2007) (**Figura 3**).

A transcrição gênica mediada pelo PPAR pode resultar em diferentes respostas e efeitos biológicos de acordo com a mobilização e ativação de isoformas específicas. Frente a isso, uma recente revisão de literatura conduzida por Monsalve e colaboradores (2013) verificou que o PPAR- α possui múltiplos efeitos no fígado, vasos sanguíneos e coração, o PPAR- δ no músculo esquelético, fígado, adipócitos e macrófagos, e o PPAR- γ no tecido adiposo e no músculo esquelético propiciando diminuição dos ácidos graxos livre, resistina e citocinas inflamatórias, possivelmente pela regulação do fator de transcrição NF- κ B.

Estudos verificaram que elevadas concentrações de ácidos graxos e glicose ativam a via inflamatória orquestrada pelo NF- κ B em monócitos, elevando a produção de citocinas pró-inflamatórias (Dickinson et al., 2008); por outro lado, a ativação do PPAR- α e PPAR- γ contra regula a atividade do NF- κ B, reduzindo a produção de citocinas por monócitos e aumentando a apoptose desse tipo celular, sugerindo que os processos inflamatórios mediados pelo NF- κ B estão intimamente relacionados com fatores de transcrição que controlam genes alvos do metabolismo de lipídios (Chinetti et al., 1998).

Diversos autores (Butcher et al., 2008; Yakeu et al., 2010; Thomas et al., 2012) sugerem que a ativação do PPAR- γ durante o exercício constitui potencial fator anti-inflamatório e anti-aterogênico. De acordo com alguns autores, em resposta ao exercício físico, o PPAR pode ser acionado pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que é um complexo proteico

responsável por elevar a oxidação de lipídios, estimulando a expressão gênica de proteínas lipolíticas e redução da expressão de genes lipogênicos, via PPAR (Philp et al., 2013; Hardie, 2003). No entanto, são incipientes os estudos que elucidem a relação imuno-metabólica e a participação do PPAR- γ , principalmente, nos mecanismos moleculares e fisiológicos modulados pelo estilo de vida sedentário ou envolvimento com diferentes programas de exercícios físicos.

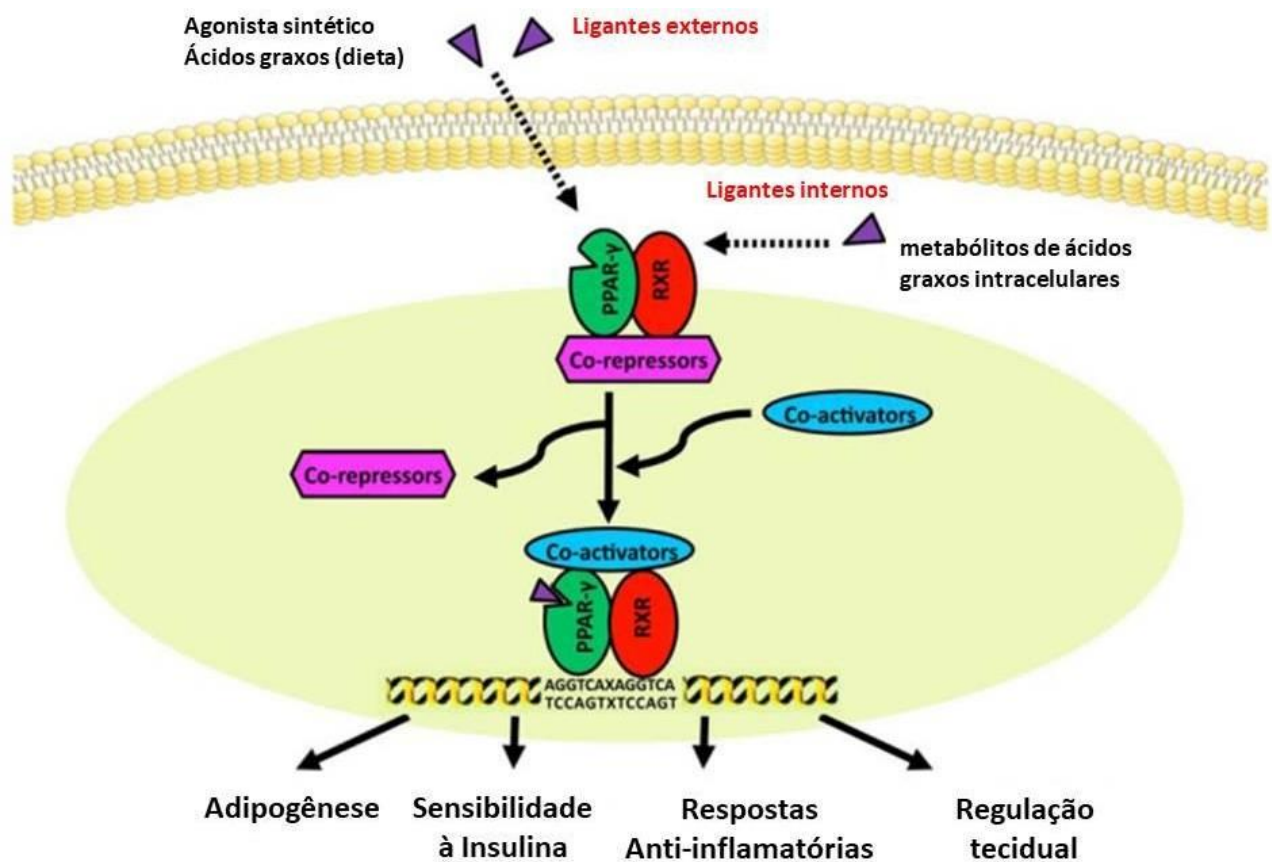


Figura 3. Sinalização intracelular para ativação do PPAR- γ . Adaptado de Wei e colaboradores 2012

3. JUSTIFICATIVA E PROBLEMA

Atualmente, o sedentarismo apresenta-se de forma alarmante com elevadas prevalências mundiais. A inatividade física está diretamente relacionada com a instalação do quadro inflamatório crônico de baixo grau, que por sua vez aumenta o risco de instalação de outras co-morbidades como dislipidemia, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares, entre outras, prejudicando a qualidade e a expectativa de vida. Além disso, o gasto público com as co-morbidades vem sendo cada vez maior, pelas frequentes internações e absenteísmo da população.

A prevalência de doenças crônicas não transmissíveis associada ao quadro inflamatório de baixo grau, provocado pelo sedentarismo, apresentam como denominador comum, na maioria dos casos, o aumento significativo de tecido adiposo, principalmente do tecido adiposo visceral, que pode acarretar diversas lesões secundárias. Os mediadores inflamatórios que se alteram nas referidas doenças podem ser produzidos em diferentes órgãos e tecidos, principalmente por células do sistema imune, como os monócitos. Os monócitos são células imunes capazes de responder a diferentes estímulos estressores, por meio da produção e liberação de mediadores inflamatórios para a circulação e que são poucos estudados. Por outro lado, indivíduos envolvidos com programas de exercícios físicos, exibem perfil anti-inflamatório e anti-aterogênico, favorecendo menores riscos de desenvolvimento de diversas doenças. Entretanto, recentemente foi evidenciado que o perfil anti-inflamatório e anti-aterogênico são finamente regulados pelas respostas imuno-metabólicas. Além disso, fatores de transcrição gênica podem coordenar tais respostas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Investigar a participação dos fatores de transcrição gênica NF- κ B e PPAR- γ sobre a regulação imunometabólica de acordo com o nível de condicionamento físico e diferentes intensidade de esforço físico.

4.2. Objetivos Específicos

- I. Avaliar em sangue periférico o perfil lipídico, glicídico e inflamatório pré e pós-sessões agudas de exercício físico realizados em diferentes intensidades de esforço físico. Para responder a este objetivo foram realizadas dosagens de triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (NEFA), colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), lipoproteína de alta densidade (HDL-c), glicose, endotoxina, lactato, interleucina 10 (IL-10), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α);
- II. Determinar *in vitro* a resposta inflamatória pré, pós e 60 minutos após sessões agudas de exercício físico realizados em diferentes intensidades de esforço físico. Para responder a este objetivo amostras de sangue periférico foram incubados com LPS ou PBS (solução salina-controle) por 1 hora à 37°C e analisaram-se as concentrações de IL-10, IL-6, TNF- α e as razões TNF- α /IL-10 e IL-6/IL-10.
- III. Investigar a capacidade de produção de citocinas inflamatórias por células mononucleares, com ênfase nos monócitos, de acordo com o nível de condicionamento físico. Para responder a este objetivo foram analisadas por ELISA as concentrações de IL-10, IL-6, TNF- α e IFN- γ do sobrenadante da cultura de monócitos após 24 horas de cultivo na presença e ausência de LPS, e em combinação com agonista (Rosiglitazona) ou antagonista (GW9662) de PPAR- γ .

- IV. Analisar a participação de proteínas envolvidas na via de sinalização do NF- κ B em monócitos isolados de acordo com o nível de condicionamento físico. Para responder a este objetivo foi avaliada a expressão gênica do NF- κ B e componentes *upstream* (TLR-4 e HIF-1 α) e *downstream* (IKK1) de sua cascata de sinalização por PCR tempo real.
- V. Analisar a participação de proteínas envolvidas na via de sinalização do PPAR- γ em monócitos de acordo com o nível de condicionamento físico. Para responder a este objetivo foi avaliada a expressão gênica do PPAR- γ e componentes *downstream* de sua cascata de sinalização, tais como PGC-1 α , nos monócitos isolados por PCR tempo real.
- VI. Analisar a participação de proteínas envolvidas na regulação do metabolismo energético de monócitos isolados, de acordo com o nível de condicionamento físico, com intuito de elucidar os efeitos sobre proteínas envolvidas no transporte reverso do colesterol. Para responder a este objetivo foi avaliada a expressão gênica de AMPK, CETP, L-CAT e CD36 por PCR tempo real.

5. HIPÓTESES DO ESTUDO

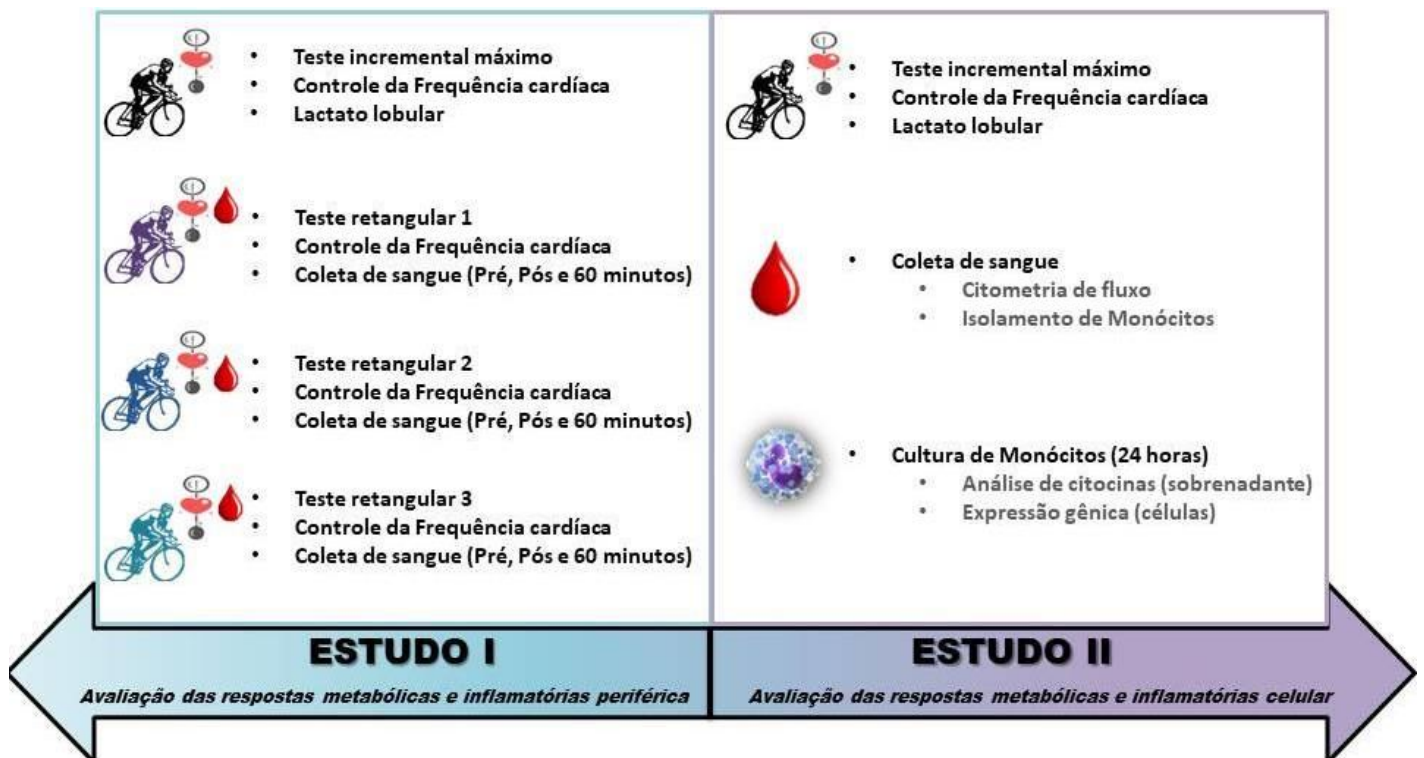
Com base nos objetivos e na literatura revisada foi formulada uma hipótese que poderá ser aceita ou rejeitada:

Hipótese alternativa: A atividade dos fatores de transcrição, NF- κ B e PPAR- γ , bem como a resposta imunometabólica são dependentes da intensidade do exercício físico e condicionamento físico individual.

Hipótese nula: A atividade dos fatores de transcrição, NF- κ B e PPAR- γ , bem como a resposta imunometabólica não são dependentes da intensidade do exercício físico e condicionamento físico.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Em virtude de diversos fatores organizacionais e operacionais a presente tese foi dividida em duas etapas (ESTUDO I e II) a fim de avaliar, inicialmente, as respostas metabólicas e inflamatórias periféricas e sistêmicas durante diferentes domínios de intensidade e de acordo com o nível de condicionamento físico. E, posteriormente, avaliar a resposta metabólica e inflamatória celular (*in vitro*) de acordo com o nível de condicionamento físico. A organização geral dos experimentos da presente tese que compõe os ESTUDOS I e II são apresentados a seguir:



ESTUDO I: Análises fisiológicas e respostas periféricas

Cálculo amostral

Com base em estudo conduzido por Abbasi e colaboradores (2013) realizou-se o cálculo amostral utilizando as concentrações de IL-10 como referência. Dados anteriores indicam que a diferença na resposta de pares combinados é normalmente distribuída com desvio padrão de aproximadamente 36,96 pg/ml. Se a verdadeira diferença na resposta média dos pares correspondentes for 132,89 pg/mL, precisaríamos de 3 indivíduos por grupo para rejeitar a hipótese nula de que essa diferença de resposta é zero com probabilidade (potência) 80%. A probabilidade de erro Tipo I associada a este teste desta hipótese nula é de $p=0,05$. Mediante o cálculo amostral foi estabelecido que 15 sujeitos (5 por grupo) seriam incluídos no estudo a fim de manter o poder amostral.

Participantes

Para o presente estudo foram incluídos: I) homens saudáveis aptos à prática de atividade física, II) com ausência de problemas de saúde física que inviabilizasse a prática de exercício físico em baixas e altas intensidades, III) não fumantes, IV) não alcoólatras e V) não consumidores de drogas ilícitas. Sendo assim, participaram do ESTUDO I do estudo 28 indivíduos adultos saudáveis, do sexo masculino, eutróficos, com idade entre 20 e 35 anos, e com condicionamento físico classificado de acordo com o consumo pico de oxigênio (VO_{2pico}) e potência máxima (PM), em watts, atingida no teste incremental em cicloergômetro.

Após o teste incremental máximo, os voluntários foram alocados nos respectivos grupos: Sedentário (S), indivíduos que não praticavam nenhum tipo de atividade física regular há pelo menos 6 meses ($\dot{V}O_{2pico} = <45 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; $PM = <200 \text{ watts}$); moderadamente ativos (MA), indivíduos que praticavam exercício aeróbio regularmente ($\dot{V}O_{2pico} = \text{entre } 45 \text{ e } 52 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; $PM = \text{entre } 201\text{-}249 \text{ watts}$) e Ativos (A) composto por ciclistas recreacionais e/ou ciclistas amadores ($\dot{V}O_{2pico} = >52,1 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; $PM = >250 \text{ watts}$). Todos concordaram em participar voluntariamente do presente estudo após leitura e assinatura do termo de consentimento informado, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (CAAE: 31168714.6.0000.5402).

Delineamento do Estudo

Após serem selecionados para o estudo e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido os voluntários foram submetidos a quatro sessões de exercício físico (um teste incremental máximo e três sessões retangulares de carga constante) no Laboratório de Fisiologia Celular e Exercício (LaFICE), entre 8:00 e 12:00 horas, sob acompanhamento de equipe especializada e em condições climáticas controladas (temperatura média = 22.1°C ; umidade relativa média = 55%; pressão barométrica média: 731.3 mmHg; altitude: 472 metros acima do nível do mar). No mesmo dia do teste incremental máximo foram realizadas medidas antropométricas em momentos antecedentes ao teste. Primeiramente foi realizado um teste incremental máximo em cicloergômetro para determinar o consumo pico de oxigênio ($\dot{V}O_{2pico}$), a potência máxima atingida no $\dot{V}O_{2pico}$, e as cargas correspondentes aos limiares ventilatórios (LV1 e LV2). Após a determinação de tais variáveis, os sujeitos foram submetidos randomicamente a três protocolos de esforço

agudos aeróbios realizados em dias aleatórios, com intervalo mínimo de 48 horas, em três intensidades de esforço físico (baixa, moderada e alta intensidade) até a exaustão ou até completarem 1 hora de exercício. Foi avaliado o perfil metabólico e inflamatório nas condições basais (pré), imediatamente após a sessão de esforço (pós) e após 60 minutos do término da sessão de esforço. Todos os participantes foram orientados a não se exercitar exaustivamente nos dias antecedentes aos testes físicos, não ingerir nenhum tipo de bebida alcoólica, não consumir nenhum tipo de alimento com cafeína e/ou estimulantes de qualquer natureza. Nos dias das sessões agudas com carga constante, um café da manhã padrão, composto por 25% da energia/caloria diária estimada ($\approx$ 50% de carboidrato, 35% de gordura e 15% de proteína) (Mifflin et al, 1990), foi ofertado aos participantes duas horas antes dos testes com a finalidade de equalizar e controlar a ingestão calórica prévia aos protocolos de exercício físico. O esquema ilustrativo do delineamento experimental está apresentado na **figura 4**.

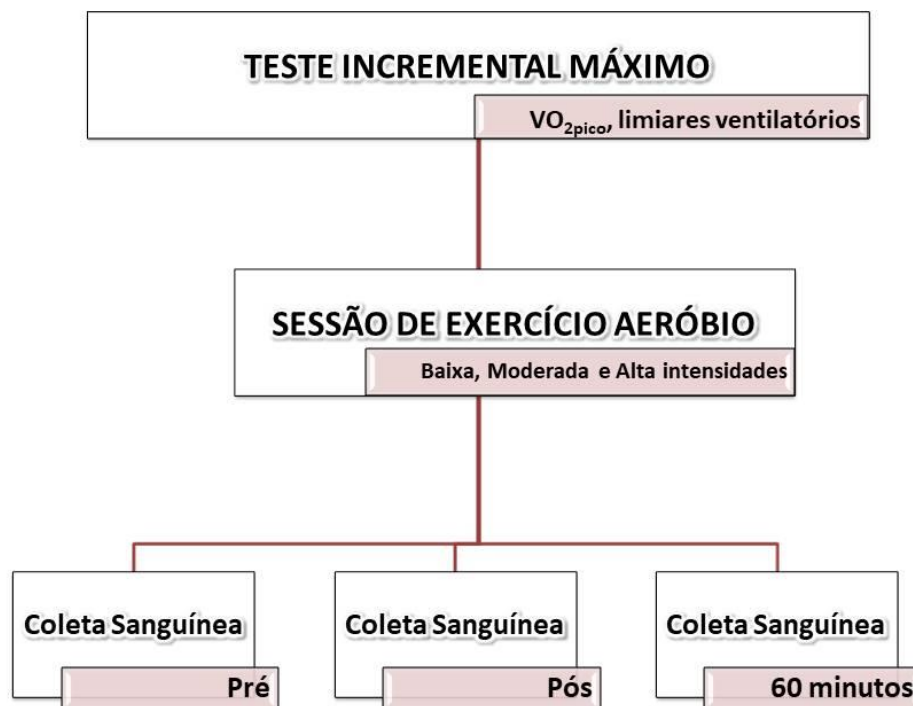


Figura 4. Esquema ilustrativo do ESTUDO I- Análises fisiológicas e respostas periféricas

Avaliação da composição corporal

A determinação da massa corporal foi realizada em balança eletrônica com precisão de 0,05 kg (Filizzola PL 150, Filizzola® Ltda). A estatura foi medida utilizando um estadiômetro com escala métrica com precisão de 0,1 cm com base fixada no solo. Para o cálculo da estimativa da densidade corporal foi utilizada a equação da somatória de sete dobras desenvolvida por Jackson e Pollock (1978); e para o cálculo do percentual de gordura foi utilizada a equação de Siri (1961). As dobras cutâneas foram medidas utilizando o adipômetro da marca Sanny, seguindo as padronizações propostas por Lohman et al. (1988).

Avaliação do Consumo Alimentar

Para a estimativa do consumo calórico foi utilizado o Registro Alimentar de 3 dias referente a ingestão alimentar de dois dias da semana e um dia do final de semana. Os participantes foram devidamente orientados quanto ao preenchimento do documento recebendo informações verbais e visuais sobre medidas caseiras. O registro alimentar foi dividido de acordo com o número de refeições diárias e a quantidade de alimentos registrados em medidas caseiras. Para análise e interpretação dos dados foi utilizado o Programa de Apoio a Nutrição - Nutwin, da Universidade Federal de São Paulo, que apresenta como resultado o total de energia e nutrientes (macro e micro). Todas as análises foram realizadas por nutricionistas experientes.

Teste incremental

Os participantes foram submetidos a um teste progressivo em cicloergômetro (Inbrasport CG-04, Embramed, Porto Alegre, Brasil) até a

exaustão voluntária, conduzida mediante a presença equipe médica, tendo cada estágio duração de três minutos. A carga inicial do teste foi de 35 watts para o grupo sedentário, 70 watts para o grupo moderadamente ativo e 105 watts para o grupo ativo, baseado em estudos realizados por Caritá e colaboradores (2013), com manutenção de rotação entre 70-90 RPM e incremento de 25 watts por estágio; em todos os estágios, nos últimos 20 segundos, foram coletados amostras de sangue do lóbulo da orelha para a determinação das concentrações de lactato sanguíneo. O consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) foi mensurado a cada respiração por meio de analisador de gases (Quark PFTergo, Cosmed, Itália) durante o teste e a maior média do $\dot{V}O_2$ registrado foi definida como $\dot{V}O_{2pico}$ e a carga máxima, em watts, correspondente ao $\dot{V}O_{2pico}$ (W_{max}). Concomitantemente, a frequência cardíaca foi monitorada, usando um frequencímetro (Polar S810, Polar Electro Oy, Kempele, Finland), para o registro da frequência cardíaca de repouso (FC_{rep}), durante o teste e frequência cardíaca máxima ($FC_{máx}$). Ao final de cada estágio os participantes informaram a percepção subjetiva de esforço (PSE) utilizando a escala de Borg 6-20 (BORG, 2000). Os critérios de exaustão adotados para o teste incremental máximo foram: Coeficiente respiratório (QR) >1.1 ; $FC_{máx} > 90\%$ do máximo de acordo com a idade e percepção subjetiva do esforço > 18 . Os limiares ventilatórios foram determinados por três profissionais experientes, sendo o primeiro limiar ventilatório (LV1) caracterizado como o primeiro ponto de inflexão entre ventilação (V_e) e carga de trabalho, e/ou primeiro aumento equivalente do oxigênio pela carga de trabalho ($VE \cdot VO_2^{-1}$) (Binder et al., 2008). O segundo limiar ventilatório (LV2) foi determinado pela segunda inflexão da ventilação pela carga de trabalho, e/ou aumento não linear equivalente ao dióxido de carbono pela carga de trabalho ($VE \cdot VCO_2^{-1}$)

(Binder et al., 2008; Papoti et al., 2017). As variáveis obtidas no teste incremental máximo foram utilizadas para a determinação de diferentes intensidades de esforço físico (testes retangulares de carga constante).

Exercício nos diferentes domínios de intensidade – testes retangulares

As sessões de exercício aeróbio tiveram um aquecimento de 5 minutos a 30% da $\dot{V}O_{2\text{pico}}$. Posteriormente os indivíduos foram submetidos randomicamente a um protocolo de exercício de carga constante até exaustão ou até completarem 1 hora de esforço, no mesmo cicloergômetro e sobre as mesmas condições de rotação propostas no teste incremental máximo. Os testes foram realizados em domínio de intensidade baixa (<60% do $\dot{V}O_{2\text{pico}}$ – 90% do LV1), moderada (60-75% do $\dot{V}O_{2\text{pico}}$ – 50% acima do LV1) ou alta (>90% do $\dot{V}O_{2\text{pico}}$ – 50% acima do LV2).

Análise de Lactato

Em todos os testes (incremental máximo e retangular em diferentes domínios de intensidade) foram coletados 25 μL de sangue do lóbulo da orelha, sendo armazenados em tubos do tipo *ependorf* contendo 50 μL de fluoreto de sódio a 1% e analisados posteriormente no lactímetro Yellow Springs 1500 Sport.

Coleta de sangue periférico

Aproximadamente 20 mL de sangue foram coletados em tubos contendo ácido etilenodiamino tetracético K3 (EDTA K3, BD Vacutainer®), para obtenção do plasma sanguíneo, gel e ativador de coágulo (BD SST® II Advance®), para obtenção do soro sanguíneo, e outro contendo fluoreto de potássio destinado

exclusivamente para as análises de glicose (Becton Dickinson, BD, Juiz de Fora, MG, Brasil). Profissionais especializados realizaram as coletas sanguíneas por meio de punção periférica da veia do antebraço, em repouso (pré), imediatamente após a sessão de esforço (pós) e 60 minutos da recuperação (60 minutos) após cada protocolo de exercício. Os tubos para a obtenção do soro e/ou plasma foram centrifugados a 3000 RPM, e alíquotas foram feitas em tubos *eppendorfs* para estocagem a -80°C até o momento das análises.

Determinação da concentração de hematócrito e volume plasmático

Para cada coleta de sangue, uma alíquota foi mantida em tubos com anticoagulante (EDTA K3, BD Vacutainer®) para determinação de hematócrito em cada momento. Dois tubos capilares por momento de coleta foram selados com resina em uma das extremidades e alocados para secar antes da utilização. Posteriormente, 50 µl de sangue foram adicionados em cada capilar e centrifugados em uma centrífuga de capilares para hematócrito (MH 11,5 i INBRAS, Brasil) por 5 minutos a 11.500 RPM. Este procedimento separa os hematócritos do conteúdo líquido do sangue (plasma), que é determinado a partir de uma tabela de referência para hematócritos. As medidas do hematócrito foram determinadas pela equação de Van Beaumont (1972) onde a porcentagem de volume plasmático é alterada pelo tempo de evolução e em função a prática de exercício físico.

Estimulação do sangue total com LPS ou PBS

Para a estimulação do sangue total utilizou-se de protocolo similar ao proposto por Abbasi e colaboradores (2013), sendo coletado 6 ml de sangue

venoso, por meio de punção periférica da veia do antebraço, distribuído em 2 tubos contendo K3-EDTA. Um tubo de sangue foi destinado para a estimulação com lipopolissacarídeo (LPS) (*Escherichia coli*, tipo: 0111: B4; Sigma, St Louis, MO, USA) com concentração final de 10 ng/mL e em outro tubo (controle) foi adicionado 3µl de tampão fosfato-salino (PBS). Ambos os tubos foram incubados por 1 hora à 37°C em um agitador (marca Kasvi) de rotação constante com baixa velocidade, e imediatamente após a incubação, ambos os tubos foram centrifugados a 3000 RPM, durante 15 minutos, para obtenção do plasma. Alíquotas foram feitas em tubos *ependorfs* e estocadas a -80°C até o momento das análises.

Análises Séricas e Plasmáticas – Sangue Periférico

As análises de glicose, triacilglicerol (TAG), colesterol total (CT), HDL-c e ácidos graxos livres (NEFA) foram analisados por método colorimétrico, obtidos por meio de kits de reagentes da marca Labtest®, Brazil e Wako Diagnostics, sendo este último utilizado apenas para as análises de ácidos graxos livres. A estimativa das concentrações de LDL-c foram calculadas por meio da equação de Friedewald ($LDL = \text{Colesterol total} - HDL-c - TAG/5$) (1972). Para dosagem dos parâmetros inflamatórios e hormonais (PAI-1, leptina, adiponectina, TNF- α , IL-10 e IL-6; R&D System, Inc., Minneapolis, USA/ insulina; Accubind kits, Monobind Inc. Lake Forest, USA), foi utilizado a técnica de ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) com a utilização de uma leitora de microplacas da marca SpectraMax plus 384 Absorbance Microplate Reader (San Diego, California, USA) com um filtro de 450 nm, para leitura das absorbâncias, sendo todas as análises realizadas em monocelata. Para todas as variáveis inflamatórias foram utilizados kits de alta sensibilidade de detecção com variação de captura entre 0,3125-20 ng/mL para

PAI-1, 31,25-2000 pg/mL para leptina, 62,5-4000 pg/mL para adiponectina, 15,6-1000 pg/mL para TNF- α , 3,13-300 pg/mL para IL-6 e 7,8-500 pg/mL para IL-10, 0-300 uUI/mL para insulina; e variação intra e inter-ensaio (%) de 1,6–4,2 e 3,3–6,4 (IL-6), 4,2-5,2 e 4,6-7,4 (TNF- α), 1,7-5,0 e 5,9-7,5 (IL-10), 5,1-8,3 e 7,2-11,3 (insulina), 4,4-7,8 e 6,1-9,5 (PAI-1), 3,0-3,3 e 3,5-5,4 (leptina), 2,5-4,7 e 5,8-6,9 (adiponectina), respectivamente.

A concentração de endotoxina foi analisada pré e pós-sessões agudas de esforço por um teste de lisado de amebócitos *limulus* cromogênico (LAL), que é um teste quantitativo para endotoxina de bactérias gram-negativa (LAL Kit; QCL-1000; Lonza; Lonza Walkersville Inc), utilizando endotoxina liofilizada (origem de *E. coli*) para gerar uma curva padrão. A análise foi realizada a 405-410 nm em espectrofotômetro após o término da reação, e a correlação entre a absorbância e a concentração de endotoxina é linear na faixa de 0,1-1,0 EU/ml.

ESTUDO II – Análises Moleculares e respostas *in vitro*

Delineamento do Estudo

Para o ESTUDO II foram recrutados 22 participantes do sexo masculino, com as mesmas características dos voluntários do ESTUDO I, para a realização de um teste incremental máximo de caracterização e definição da amostra. De acordo com o desempenho no teste incremental máximo, os sujeitos foram divididos em dois grupos de acordo com o nível de condicionamento físico, sendo os mesmos classificados de acordo com o consumo máximo de oxigênio (Baixo $VO_{2pico} = < 40 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ou Alto $VO_{2pico} = 55 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Posteriormente, foi realizada uma coleta de sangue venoso periférico, em repouso e após jejum noturno de 12 horas, para o isolamento de monócitos e ensaios *in vitro* para estimulação das vias inflamatórias mediadas pelos fatores de transcrição NF- κ B e PPAR- γ .

Isolamento dos monócitos

Para separação dos monócitos das outras células do sangue total, foi adotado o seguinte procedimento: ao sangue coletado foi acrescentado Histopaque[®]-1077 (Sigma-Aldrich Co. LLC) (proporção de 1:1) e após 30 minutos de centrifugação de gradiente, com velocidade de 400 X g em uma centrífuga sem freio, ocorreu a sedimentação dos eritrócitos e separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Após esse procedimento foi feita a contagem em microscópio das PBMCs por meio de marcação com azul de Tripan (20ul de composto celular + 380ul de solução de azul de Tripan) e, posteriormente, as células monocucleares foram colocadas na concentração de $1 \times 10^6/\text{mL}$ em placas de poliestireno com 12 poços, específicas para cultivo

de células (Kasvi - PR/Brasil). As células permaneceram incubadas por duas horas a 37 °C e 5% de CO₂ em solução de meio de cultura de células (RPMI-1640 - Sigma-Aldrich Co. LLC) enriquecido com glutamina ([2mM]), bicarbonato de sódio ([24mM]), HEPES ([20mM]), 10% soro fetal bovino e antibióticos ([10000U/mL] de penicilina e [10000U/mL] de estreptomicina). Esse procedimento permite a separação dos monócitos dos linfócitos. Os monócitos aderem ao fundo da placa enquanto os linfócitos permanecem suspensos no meio de cultura e foram posteriormente retirados.

Tratamento dos monócitos

Após isolamento dos monócitos cada participante teve seis poços com volume final de 1 mL somados o meio de cultura e a substância usada para o tratamento, como exemplificado na **Figura 5**. Os monócitos foram tratados com LPS ([100ng/mL]), Rosiglitazona ([1µM]) (Sigma-Aldrich Co. LLC) e GW9662 ([10µM]) (Sigma-Aldrich Co. LLC). Após 24h de incubação o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C para posterior determinação das concentrações de TNF-α, IL-6, IL-10 e IFN-γ por meio de ensaio imunoenzimático com kits comerciais de ELISA de alta sensibilidade (R&D System®) (similar ao ESTUDO I). Todos os poços após incubação de 24 horas foram destinados ao tratamento com Brazol para a análise de expressão gênica por meio do PCR tempo real. Considerando a preparação e a diluição do GW9662, que é realizada com sulfóxido de dimetilo (DMSO - Sigma-Aldrich Co. LLC), a mesma quantidade do reagente (10µL) foi acrescida aos poços para equalização dos meios de cultura.

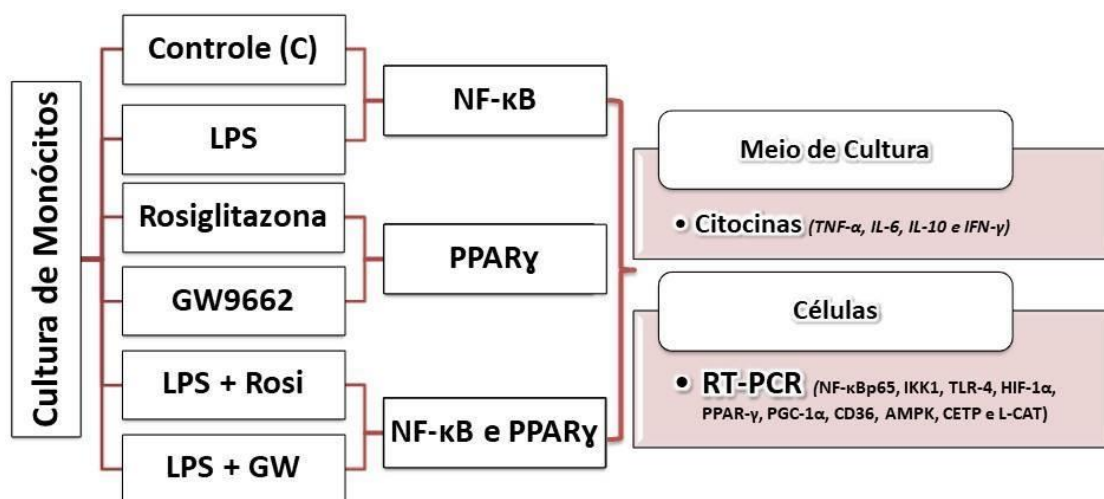


Figura 5. Esquema ilustrativo dos ensaios *in vitro*

Análise da expressão gênica por RT-PCR (real time – polimerase chain reaction) do NF-κB, IKK1, TLR-4, HIF-1α, PPAR-γ, PGC-1α, CD36, AMPK, CETP e L-CAT.

O RNA total foi isolado das amostras (após 24 horas na presença e/ou ausência de LPS, Rosiglitazona e GW9662) usando reagente Brazol (LGC Biotecnologia Ltda. Cotia/SP), seguindo recomendações do fabricante. Concentrações do RNA foram determinadas mensurando a absorbância de 260nm/280nm em espectrofotômetro. Posteriormente foi utilizado 1µg do RNA total na reação contendo Oligo dt (500 µg/mL), 10 mM de cada dNTP, 5x First-Strand Buffer, DTT e 200 U de transcriptase reversa (SuperScript II-Invitrogen) para gerar cDNA. A desnaturação do RNA total foi efetuada em termociclador a 65°C por 10 minutos e, após adicionar transcriptase reversa para gerar o cDNA, continua-se o processo com um ciclo à 25°C por 10 minutos, dois ciclos à 37°C por 60 minutos (cada ciclo) e um ciclo de 85°C por 5 minutos. O cDNA gerado foi armazenado a -80°C para posterior análise por RT-PCR com *Syber Green*.

A reação de RT-PCR contendo cDNA e *primers* ocorreram em condições

de ciclagem pré-determinadas, sendo duas etapas de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, a amplificação ocorre em 40 ciclos: a desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 60° por 60 segundos, com extensão a 72°C por 2 minutos. Na **tabela 1** são apresentadas as sequências dos *primers*.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na análise do PCR-tempo real

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
GAPDH	ACAAC TTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC
PPAR-γ	CAGCCTTTAACGAAATGACCA	TGTGGAGTAGAAATGCTGGA
NF-KB	GAAGCACGAATGACAGAGGC	GCTTGGCGGATTAGCTCTTTT
TLR-4	TTTATCCAGGTGTGAAATCCAG	AGATGCTAGATTTGTCTCCACAG
PGC-1α	GCAGACCTAGATTCAAACCTCAG	GTATTCGCCATCCCTCTGTC
IKK1	GACCTTCAGATCACTCCTACAG	CAAATGACCAAACAGCTCCT
CD36	TTTGGCTTAATGAGACTGGGAC	AAAGCAACAAACATCACCACAC
L-CAT	AAGCTGGACAAACCAGATGTG	TAGACAACCCTGGTGTTATCG
CETP	AAATCTTCCAAGAGGTTGTCGG	CCATCACTGAAGAATTGACCAC
HIF-1α	AGTTCACCTGAGCCTAATAGTCC	TCCAAGTCTAAATCTGTGTCCTG
AMPK	GGCACGCATACCCTTGAT	TCTTCCTTCGTACACGCAAATAA

Citometria de fluxo

A técnica da citometria de fluxo foi utilizada para caracterização dos monócitos dos participantes em clássicos, intermediários e não clássicos. Para a fenotipagem, as PBMCs (1×10^6) foram marcadas com anticorpos e fluorocromos específicos para as proteínas de membrana CD14 e CD16 (APC Mouse Anti-Human CD14 e PE Mouse Anti-Human CD16 – BD) e analisadas em um citômetro de quatro canais, modelo BD FACScalibur (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canadá).

Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e os resultados descritivos foram expressos em média e desvio padrão (DP). No ESTUDO I, a comparação dos parâmetros inflamatórios e metabólicos após as diferentes intensidades de exercício físico foi realizada por meio da ANOVA *two-way* (intensidade X tempo), com o post-hoc de *Bonferroni*, quando necessário. O tamanho do efeito foi calculado pela ETA ao quadrado (η^2) e analisado conforme proposto por Cohen (Cohen, 1992) (pequeno: <0.2 ; moderado: $0.2 - 0.8$ e grande: >0.8). Para analisar a variação relativa e absoluta das variáveis sanguíneas, o delta absoluto (Δ) e percentual ($\Delta\%$) nas diferentes intensidades de exercício físico (baixa, moderada e alta intensidades) foram calculados e analisados por ANOVA *one-way*. A correlação de Pearson foi utilizada para verificar a relação entre adaptações metabólicas, desempenho e condicionamento físico de acordo com as intensidades de esforço físico. No ESTUDO II, para a comparação entre os grupos de condicionamento físico (baixo e alto $VO_{2\text{pico}}$) utilizou-se o Teste *t* de Student para amostras independentes. Para a análise das concentrações de citocinas do sobrenadante da cultura de monócitos, bem como da expressão gênica, entre os grupos de condicionamento físico exposto a diferentes estímulos (LPS, Rosiglitazona, GW9662, LPS+Rosiglitazona e LPS+GW9662) realizou-se ANOVA *two-way* (estímulo X grupo), com o post-hoc de *Bonferroni*, quando necessário. A significância estatística foi estabelecida em 5%, e todas as análises foram realizadas usando SPSS, release 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

7. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em tópicos, de acordo com as etapas do estudo, para facilitar a organização e compreensão dos resultados.

ESTUDO I: Análises fisiológicas e respostas periféricas

Na **tabela 2** são apresentadas as características fisiológicas de todos os voluntários avaliados (28 indivíduos) no ESTUDO I frente os testes incrementais e retangulares de carga constante.

Tabela 2. Característica dos participantes, expresso em média e desvio padrão, no teste incremental máximo e nas intensidades de esforço.

	<i>Incremental</i>	<i>Baixa intensidade</i>	<i>Intensidade Moderada</i>	<i>Alta Intensidade</i>
Idade (anos)	28,8±5,6	-	-	-
Massa corporal (kg)	75,8±9,9	-	-	-
Potência _{pico} (watts)	214,6±55,3	96,1±36,3	129,9±44,0 [£]	182,6±49,2 ^{£,#}
VO _{2pico} (mL,kg ⁻¹ ,min ⁻¹)	50,5±8,8	30,8±6,1	37,5±8,4 [£]	47,4±9,3 ^{£,#}
FC _{max} (bpm)	188±10	139±15	160±17 [£]	180±11 ^{£,#}
[La] (mmol,L)	9,3±2,5	2,7±1,8	4,3±2,8 [£]	11,2±3,6 ^{£,#}
T _{lim} (minutos)	-	58±7	46±17 [£]	13±13 ^{£,#}

VO_{2pico}= consumo pico de oxigênio; FC_{max}= Frequência cardíaca máxima; [La]= concentração de lactato; T_{lim}= tempo limite; £= estatisticamente diferente do baixa intensidade; #= estatisticamente diferente do intensidade moderada ,

O perfil inflamatório, representado em valores de concentração absoluta, em sangue periférico e estimulado com LPS é apresentado na **tabela 3**. No sangue periférico, o TNF- α apresentou efeito para intensidade ($F= 4,276$, $p= 0,025$; η^2 : 0,248) e tempo ($F= 9,922$, $p= 0,001$; η^2 : 0,433), porém a análise post-hoc mostrou apenas tendência entre o alta intensidade com relação as outras intensidades ($p=0,08$). Para o fator tempo, maiores concentrações foram observadas imediatamente após o exercício em relação ao pré e 60 minutos pós-exercício. IL-10 apresentou interação entre intensidade e tempo ($F= 2,745$, $p= 0,038$; η^2 : 0,174), porém o post-hoc não detectou as diferenças. Para o sangue estimulado com LPS, houve interação entre intensidade e tempo para o TNF- α ($F= 3,610$, $p= 0,011$; η^2 : 0,205), porém o post-hoc não detectou as diferenças. Houve apenas um efeito no tempo ($F= 23,305$, $p <0,001$; η^2 : 0,625) para liberação de IL-6 no sangue estimulado com LPS, com valores maiores imediatamente após o exercício.

Tabela 3. Concentração de citocinas inflamatórias, expresso em média e desvio padrão, no sangue periférico e no sangue estimulado com LPS, de acordo com a intensidade de esforço.

		Sangue Periférico			Sangue Estimulado(LPS)		
		Pré	Pós	60 minutos	Pré	Pós	60 minutos
TNF- $\alpha^{a,b,f}$ (pg.mL)	<60%VO _{2pico}	2,2±0,9	2,3±1,1	2,2±1,1	386±196	477±285	402±266
	60-75%VO _{2pico}	2,3±1,2	3,1±1,3	2,2±1,7	435±296	360,8±194	369±199
	>90% VO _{2pico}	2,6±1,5	3,5±1,8	2,7±1,2	337±171	347,6±197	399±216
IL-6 ^e (pg.mL)	<60%VO _{2pico}	1,8±2,0	2,5±1,4	2,5±1,9	9,4±11,0	15,4±15,1	9,7±7,9
	60-75%VO _{2pico}	1,6±1,2	3,5±2,9	2,2±1,5	10,9±11,7	23,6±20,5	12,3±10,1
	>90% VO _{2pico}	1,6±1,3	2,2±1,6	2,3±1,6	8,3±5,4	21,8±11,9	9,4±5,4
IL-10 ^c (pg.mL)	<60%VO _{2pico}	3,7±1,5	3,7±1,6	3,3±0,8	7,0±7,7	11,2±14,9	7,6±8,5
	60-75%VO _{2pico}	3,4±1,3	3,9±1,6	3,6±1,4	6,5±6,4	18,4±25,5	9,8±11,5
	>90% VO _{2pico}	3,1±1,5	3,5±1,4	3,9±2,0	7,3±7,6	4,6±3,0	7,1±5,5
IL-6/IL-10	<60%VO _{2pico}	0,6±0,7	0,7±0,5	0,8±0,6	2,9±4,2	2,2±1,3	10,0±29,4
	60-75%VO _{2pico}	0,6±0,5	0,9±0,6	0,6±0,3	3,3±3,2	2,5±2,5	3,7±6,1
	>90% VO _{2pico}	0,5±0,4	0,7±0,6	0,7±0,5	6,7±15,3	9,8±11,2	2,6±2,6
TNF- α /IL-10	<60%VO _{2pico}	0,6±0,3	0,7±0,4	0,7±0,3	107,8±163,5	77,9±59,0	136,4±199,8
	60-75%VO _{2pico}	0,7±0,3	0,9±0,7	0,7±0,6	144,7±148,6	50,7±52,9	99,8±103,0
	>90% VO _{2pico}	0,9±0,7	1,2±0,7	0,9±0,6	99,9±109,7	103,1±93,0	110,2±131,4

^aEfeito da intensidade no sangue periférico; ^bEfeito do tempo no sangue periférico; ^c Interação intensidade X tempo no sangue periférico; ^dEfeito da intensidade no sangue estimulado; ^eEfeito do tempo no sangue estimulado; ^f Interação intensidade X tempo no sangue estimulado.

A análise dos parâmetros metabólicos, representado em valores de concentração absoluta, é apresentada na **Tabela 4**. Glicose apresentou uma interação entre intensidade e tempo ($F= 3,991$; $p= 0,026$; $\eta^2: 0,222$) com maiores concentrações no exercício de alta intensidade após 60 minutos do término da sessão quando comparado com o mesmo momento das outras intensidades. Houve um efeito da intensidade nas concentrações de lactato ($F= 53,769$, $p<0,001$; $\eta^2: 0,818$), com maiores valores no exercício de alta

intensidade quando comparado com as outras intensidades, e também um efeito do tempo ($F= 36,621$, $p< 0,001$; η^2 : 0,753) com maiores valores imediatamente após o exercício. Além disso, o lactato também apresentou uma interação entre intensidade e tempo ($F= 54,168$, $p<0,001$; η^2 : 0,819), com concentrações superiores no exercício de alta intensidade imediatamente após o término da sessão quando comparado as outras intensidades. Observou-se também efeito do tempo para endotoxina ($F= 7,959$, $p= 0,014$; η^2 : 0,362), com maiores concentrações pós-exercício, e interação entre intensidade e tempo ($F= 3,369$, $p= 0,049$; η^2 : 0,194) com concentrações mais altas de endotoxina após o exercício de alta intensidade quando comparado com o exercício de baixa intensidade.

Tabela 4. Concentração dos parâmetros metabólicos no sangue periférico, expresso em media e desvio padrão, de acordo com a intensidade de esforço.

		<i>Pré</i>	<i>Pós</i>	<i>60 minutos</i>
Glicose (mg.dL) ^c	<60%VO _{2pico}	81,8±9,4	80,9±9,3	84,7±11,2
	60-75%VO _{2pico}	83,4±10,6	85,7±9,4	80,6±22,1
	>90% VO _{2pico}	84,2±9,9	80,4±11,3	96,4±9,5
NEFA (mEq.L)	<60%VO _{2pico}	0,89±0,04	0,91±0,07	0,95±0,06
	60-75%VO _{2pico}	0,92±0,06	0,91±0,08	0,89±0,24
	>90% VO _{2pico}	0,90±0,03	0,85±0,03	0,96±0,07
Lactato (mmol.L) ^{a,b,c}	<60%VO _{2pico}	1,71±0,64	2,67±2,00	-
	60-75%VO _{2pico}	1,56±0,49	4,46±3,09	-
	>90% VO _{2pico}	1,51±0,79	10,07±2,92	-
Endotoxina (EU.mL) ^{b,c}	<60%VO _{2pico}	1,02±0,30	0,99±0,27	-
	60-75%VO _{2pico}	0,94±0,26	0,99±0,23	-
	>90% VO _{2pico}	1,18±0,43	1,24±0,29	-

^aEfeito da intensidade no sangue periférico; ^bEfeito do tempo no sangue periférico; ^c Interação intensidade X tempo no sangue periférico.

Para melhor compreender as variações nas respostas inflamatórias e metabólicas de acordo com as intensidades de exercício físico, a diferença percentual ($\Delta\%$) entre os momentos Pré X Pós e Pré X 60 minutos foram analisados no sangue periférico e no sangue estimulado com LPS. Não houve diferenças no sangue periférico quando analisado variação entre os momentos Pré X Pós. No entanto, resultados significativos foram encontrados no sangue estimulado com LPS verificando que o exercício de alta intensidade aumentou significativamente as concentrações de lactato ($F= 44,890$; $p<0,001$), IL-6 ($F= 4,908$; $p= 0,011$) e relação IL-6/IL-10 ($F= 6,185$; $p= 0,004$) concomitantemente com a diminuição das concentrações de ácidos graxos livres (NEFA) ($F= 6,063$; $p= 0,004$) imediatamente após a sessão de esforço (**Figura 6**).

Quando analisado a variação entre os momentos Pré X 60 minutos, não foram observadas diferenças no sangue estimulado com LPS, apenas no sangue periférico para a variável glicose após 60 minutos do término da sessão de alta intensidade ($F=3,487$; $p=0,038$). É importante destacar que uma tendência de resposta similar foi observada para IL-10 no exercício de alta intensidade ($F=2,832$; $p=0,068$) no sangue periférico (**Figura 7**).

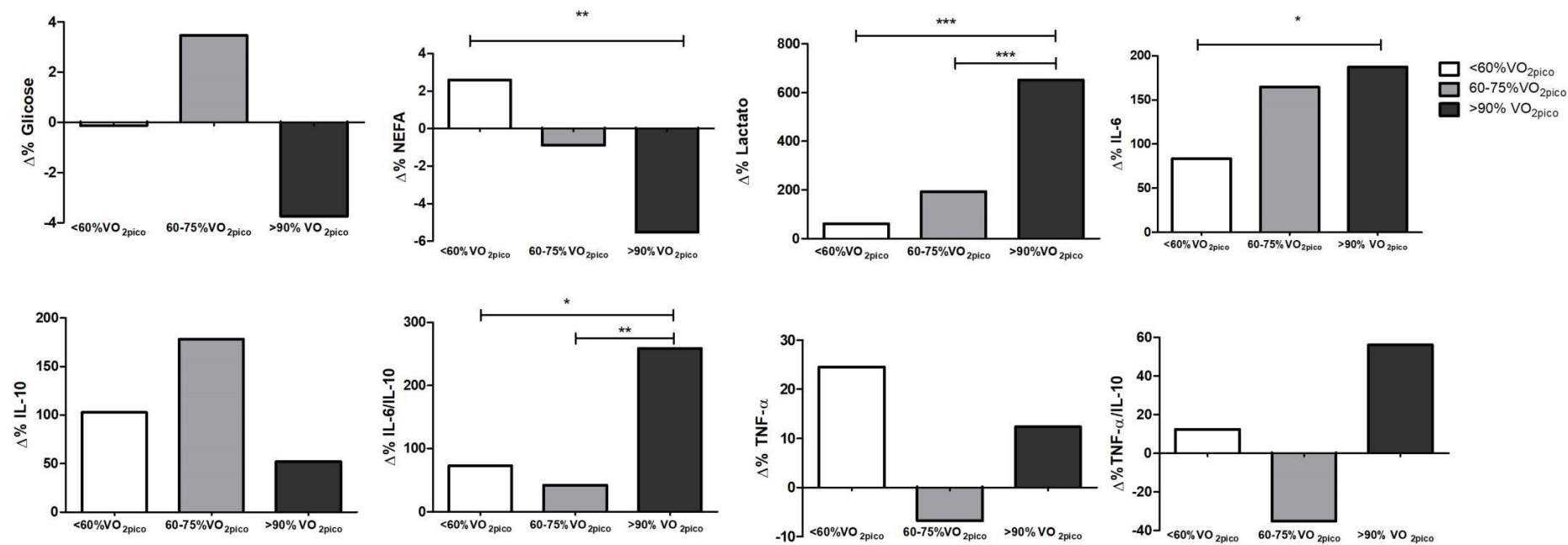


Figure 6: Diferença percentual, expresso em $\Delta\%$, dos parâmetros metabólicos e inflamatórios entre os momentos pré e pós exercício das sessões agudas de esforço em baixa, moderada e alta intensidade. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$

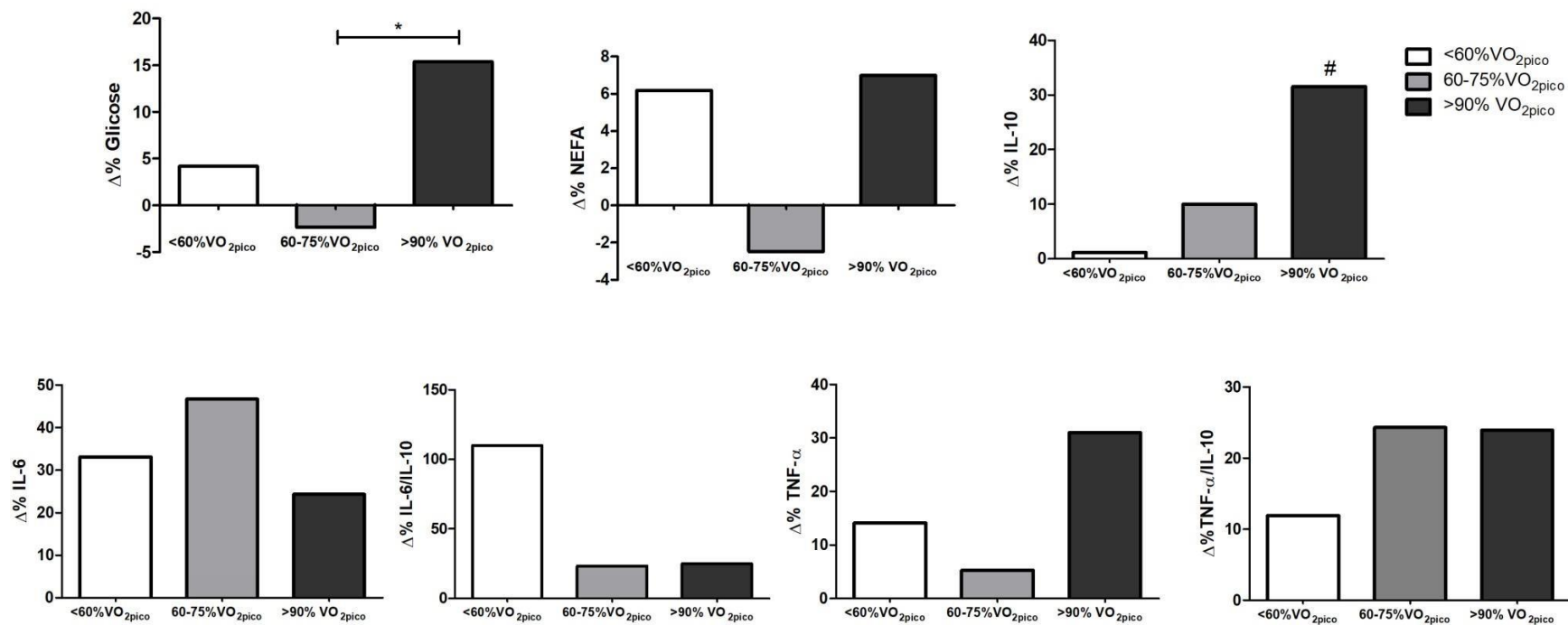


Figure 7: Diferença percentual, expressa em $\Delta\%$, dos parâmetros metabólicos e inflamatórios entre os momentos pré e após 60 minutos das sessões agudas de esforço em baixa, moderada e alta intensidade. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ and # tendência a diferença.

A fim de analisar a relação entre as respostas metabólicas e inflamatórias, de acordo com as intensidades de exercício físico, com o nível de condicionamento físico realizou-se análises de correlação com os parâmetros de desempenho físico (VO_{2pico} e potência pico), encontrado relações significativas com a potência aeróbia pico (W_{pico}). Na **tabela 5** são apresentadas as correlações do sangue periférico, de acordo com a intensidade do exercício físico, observando relações significativas após exercício entre W_{pico} e endotoxina, IL-10, lactato e glicose, principalmente nos exercícios executados em intensidades $>60\% VO_{2pico}$.

Na **tabela 6** são apresentadas as correlações do sangue estimulado com LPS, de acordo com a intensidade do exercício físico, observando uma relação positiva entre W_{pico} e IL-10 após o exercício, porém no exercício de baixa intensidade.

Tabela 5. Correlação entre a variação percentual dos parâmetros inflamatórios e metabólicos do sangue periférico, nas diferentes intensidades de exercício físico, e nível de condicionamento físico representada pela potência pico atingida em teste incremental máximo.

		$\Delta\%1$		$\Delta\%2$	
		<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Baixa intensidade (<60%VO _{2pico})	TNF- α (pg,mL)	0,241	0,321	-0,274	0,271
	IL-6 (pg, mL)	0,091	0,711	0,080	0,743
	IL-10 (pg,mL)	-0,118	0,629	0,050	0,840
	IL-6/IL-10	0,173	0,478	-0,147	0,548
	TNF- α /IL-10	0,296	0,219	-0,126	0,619
	Glicose (mg,dL)	0,399	0,091	0,436	0,062
	NEFA (mEq,L)	0,299	0,214	0,398	0,092
	Endotoxina (EU,mL)	-0,309	0,198	-	-
Intensidade Moderada (60-75%VO _{2pico})	Lactato (mmol,L)	-0,591	0,010*	-	-
	TNF- α (pg,mL)	-0,081	0,766	0,428	0,098
	IL-6 (pg, mL)	0,057	0,834	0,094	0,728
	IL-10 (pg,mL)	0,513	0,042*	0,156	0,563
	IL-6/IL-10	-0,054	0,843	-0,020	0,094
	TNF- α /IL-10	-0,233	0,385	0,292	0,273
	Glicose (mg,dL)	0,357	0,175	-0,352	0,182
	NEFA (mEq,L)	0,266	0,320	-0,391	0,134
Alta intensidade (>90%VO _{2pico})	Endotoxina (EU,mL)	-0,531	0,034*	-	-
	Lactato (mmol,L)	-0,538	0,031*	-	-
	TNF- α (pg,mL)	-0,205	0,416	-0,195	0,438
	IL-6 (pg, mL)	-0,041	0,871	0,032	0,901
	IL-10 (pg,mL)	-0,120	0,634	-0,056	0,825
	IL-6/IL-10	-0,182	0,470	-0,002	0,993
	TNF- α /IL-10	-0,030	0,907	-0,197	0,434
	Glicose (mg,dL)	0,567	0,014*	0,287	0,248
	NEFA (mEq,L)	0,148	0,559	0,234	0,351
	Endotoxina (EU,mL)	-0,527	0,025*	-	-
	Lactato (mmol,L)	0,457	0,065		

$\Delta\%1$ =diferença percentual entre os momentos Pré e Pós sessão aguda de exercício físico; $\Delta\%2$ =diferença percentual entre os momentos Pré e 60 minutos após sessão aguda de exercício físico; *r*= correlação de Pearson, *p*<0,05

Tabela 6. Correlação entre a variação percentual dos parâmetros inflamatórios do sangue estimulado com LPS, nas diferentes intensidades de exercício físico, e nível de condicionamento físico representada pela potência pico atingida em teste incremental máximo.

		$\Delta\%1$		$\Delta\%2$	
		<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Baixa intensidade (<60%VO _{2pico})	TNF- α (pg,mL)	0,223	0,358	0,440	0,059
	IL-6 (pg,mL)	0,216	0,375	0,150	0,541
	IL-10 (pg,mL)	0,485	0,041*	0,235	0,348
	IL-6/IL-10	-0,373	0,127	-0,316	0,201
	TNF- α /IL-10	-0,210	0,404	-0,225	0,369
Intensidade Moderada (60-75%VO _{2pico})	TNF- α (pg,mL)	-0,263	0,324	-0,310	0,242
	IL-6 (pg,mL)	-0,137	0,613	-0,114	0,675
	IL-10 (pg,mL)	0,333	0,290	0,200	0,49
	IL-6/IL-10	-0,375	0,186	-0,295	0,306
	TNF- α /IL-10	-0,375	0,186	-0,354	0,214
Alta intensidade (>90%VO _{2pico})	TNF- α (pg,mL)	-0,262	0,293	0,087	0,731
	IL-6 (pg,mL)	-0,330	0,182	-0,224	0,372
	IL-10 (pg,mL)	0,040	0,875	0,186	0,460
	IL-6/IL-10	0,254	0,310	0,095	0,708
	TNF- α /IL-10	0,278	0,263	0,209	0,404

$\Delta\%1$ =diferença percentual entre os momentos Pré e Pós sessão aguda de exercício físico; $\Delta\%2$ =diferença percentual entre os momentos Pré e 60 minutos após sessão aguda de exercício físico; *r*= correlação de Pearson, *p*<0,05

A análise dos parâmetros que compõe o perfil lipídico, representado em valores de concentração absoluta, é apresentada na **Figura 8**. Não houve efeito das intensidades e do tempo sobre as variáveis de triacilglicerol (intensidade: $F= 0,326$; $p= 0,706$; η^2 : 0,019/ tempo: $F= 3,472$; $p= 0,065$; η^2 : 0,170), colesterol total (intensidade: $F= 0,261$; $p= 0,771$; η^2 : 0,015/ tempo: $F= 0,912$; $p= 0,395$; η^2 : 0,051), LDL-c (intensidade: $F= 0,445$; $p= 0,600$; η^2 : 0,025/ tempo: $F= 0,782$; $p= 0,446$; η^2 : 0,044) e HDL-c (intensidade: $F= 0,468$; $p= 0,613$; η^2 : 0,027/ tempo: $F= 1,786$; $p= 0,189$; η^2 : 0,095).

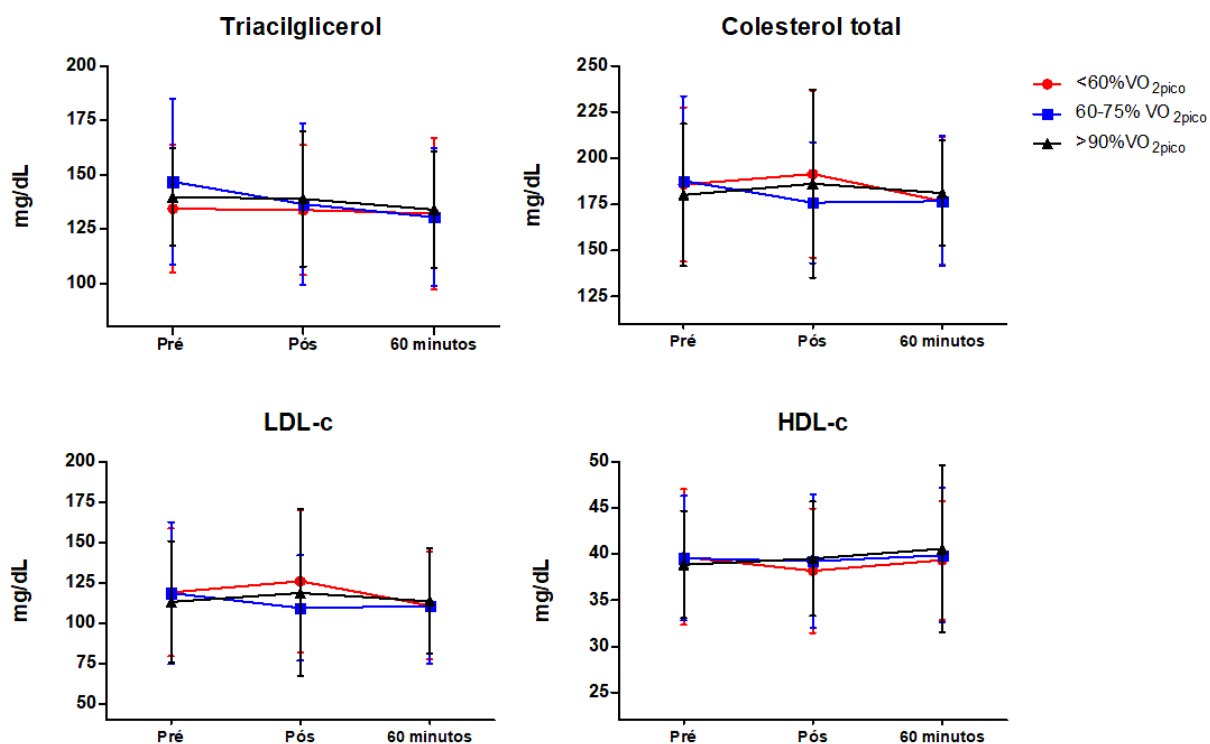


Figura 8. Cinética dos parâmetros lipídicos, expresso em média e desvio padrão, de acordo com as intensidades de esforço. LDL-c= lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=lipoproteína de alta densidade.

A fim de analisar a relação entre os parâmetros do perfil lipídico, de acordo com as intensidades de exercício físico, com o nível de condicionamento físico realizou-se análises de correlação com os parâmetros de desempenho físico (VO_{2pico} e potência pico), encontrando relações significativas com a potência aeróbia pico (W_{pico}). Na **tabela 7** são apresentadas as correlações do sangue periférico, de acordo com a intensidade do exercício físico, observando uma relação inversa entre W_{pico} e HDL-c do momento pré no exercício de intensidade moderada (60-75% VO_{2pico}). É digno de nota que, para a mesma intensidade de esforço, algumas tendências de relação foram observadas no momento 60 minutos após o término do exercício e nas variações (delta) entre os momentos Pré X 60 minutos das variáveis de colesterol total, LDL-c e não HDL-c.

Tabela 7. Correlação entre parâmetros de perfil lipídico (absoluto e relativo) do sangue periférico, nas diferentes intensidades de exercício físico, e nível de condicionamento físico representada pela potência pico atingida em teste incremental máximo.

		Pré		Pós		60 minutos		Δ1		Δ2	
		r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value
Baixa intensidade (<60%VO _{2pico})	CT (mg,dL)	0,010	0,962	0,176	0,411	0,124	0,563	0,157	0,464	0,152	0,478
	TAG (mg,dL)	0,245	0,249	0,152	0,477	0,003	0,988	-0,137	0,523	-0,297	0,159
	LDL-c (mg,dL)	0,023	0,915	0,203	0,341	0,196	0,358	0,172	0,422	0,229	0,281
	HDL-c (mg,dL)	-0,263	0,215	-0,280	0,185	-0,299	0,155	0,056	0,795	-0,085	0,692
	nHDL (mg,dL)	0,064	0,767	0,219	0,304	0,191	0,371	0,157	0,465	0,180	0,401
Intensidade Moderada (60-75%VO _{2pico})	CT (mg,dL)	-0,197	0,419	0,194	0,426	0,365	0,124	0,329	0,169	0,450	0,053
	TAG (mg,dL)	0,119	0,628	0,034	0,889	-0,043	0,860	-0,181	0,459	-0,211	0,387
	LDL-c (mg,dL)	-0,147	0,549	0,282	0,242	0,444	0,057	0,330	0,168	0,442	0,058
	HDL-c (mg,dL)	-0,477	0,039*	-0,423	0,071	-0,396	0,093	0,157	0,508	0,186	0,431
	nHDL (mg,dL)	-0,119	0,627	0,285	0,237	0,430	0,066	0,328	0,170	0,438	0,061
Alta intensidade (>90%VO _{2pico})	CT (mg,dL)	0,105	0,634	0,077	0,726	0,162	0,461	-0,008	0,971	0,025	0,909
	TAG (mg,dL)	0,029	0,897	-0,130	0,554	-0,114	0,605	-0,345	0,107	-0,256	0,236
	LDL-c (mg,dL)	0,139	0,528	0,143	0,516	0,172	0,432	0,047	0,831	0,014	0,951
	HDL-c (mg,dL)	-0,188	0,391	-0,364	0,088	0,000	0,999	-0,236	0,277	0,170	0,439
	nHDL (mg,dL)	0,139	0,527	0,124	0,572	0,149	0,498	0,019	0,932	-0,016	0,942

CT= colesterol total; TAG= Triacilglicerol; LDL-c= lipoproteína de baixa densidade; HDL-c= lipoproteína de alta densidade; nHDL= colesterol não HDL; Δ1=diferença absoluta entre os momentos Pré e Pós sessão aguda de exercício físico; Δ2=diferença absoluta entre os momentos Pré e 60 minutos após sessão aguda de exercício físico; r= coxrelação de Pearson, p<0,05

A análise das concentrações de leptina, adiponectina, insulina e PAI-1, representado em valores de concentração absoluta, são apresentados na **Figura 9**. Não houve efeito das intensidades e do tempo sobre as variáveis de adiponectina (intensidade: $F= 0,810$; $p= 0,451$; $\eta^2: 0,04$ / tempo: $F= 1,341$; $p= 0,272$; $\eta^2: 0,055$) e insulina (intensidade: $F= 0,763$; $p= 0,507$; $\eta^2: 0,203$ / tempo: $F= 0,948$; $p= 0,439$; $\eta^2: 0,240$). Para leptina houve efeito do tempo ($F= 4,837$; $p= 0,025$; $\eta^2: 0,203$) com menores concentrações imediatamente após o exercício quando comparado com o momento pré exercício. PAI-1 apresentou efeito do tempo ($F= 10,637$; $p< 0,001$; $\eta^2: 0,326$) com maiores concentrações imediatamente após o exercício quando comparado com o momento 60 minutos após o termino da sessão. Além disso, houve uma interação entre intensidade e tempo ($F= 5,062$; $p= 0,001$; $\eta^2: 0,187$) com concentrações superiores no exercício de alta intensidade imediatamente após o término da sessão quando comparado com o exercício de baixa intensidade. Vale ressaltar que, quando analisado isoladamente as intensidades de esforço, o exercício de alta intensidade apresentou maiores concentrações imediatamente após a sessão quando comparado com os momentos pré e após 60 minutos; enquanto as outras intensidades (baixa e moderada) apresentaram maiores concentrações imediatamente após a sessão quando comparado apenas com o momento 60 minutos após o exercício.

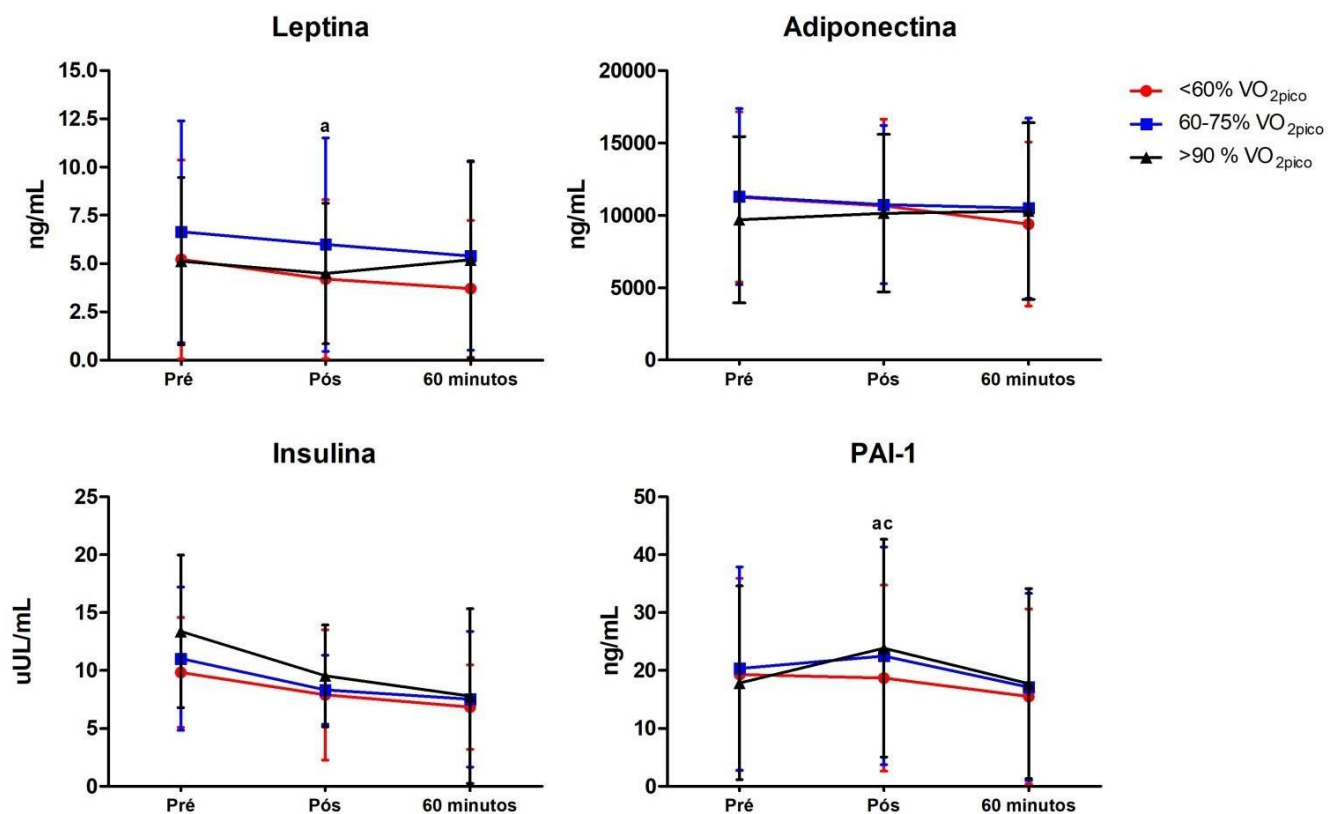


Figura 9. Cinética dos parâmetros nutricionais e metabólicos, expresso em média e desvio padrão, de acordo com as intensidades de esforço. PAI-1= Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1. ^aEfeito do tempo; ^bEfeito da intensidade; ^cInteração intensidade X tempo.

Análises de correlação foram conduzidas para verificar a relação entre as concentrações de leptina, adiponectina, insulina e PAI-1, de acordo com as intensidades de exercício físico, com o nível de condicionamento físico. Diferentemente das citocinas e variáveis do perfil lipídico, foram observadas relações significativas com o VO_{2pico}. Na **tabela 8** são apresentadas as correlações do sangue periférico, de acordo com a intensidade do exercício físico, observando relação inversa entre VO_{2pico}, insulina e leptina nos momentos pré e imediatamente após, respectivamente, na intensidade moderada. Adiponectina apresentou relação inversa imediatamente e após 60 minutos do exercício de alta intensidade. Sobre as variações percentuais

observou-se relação positiva entre $VO_{2\text{pico}}$ e insulina nas intensidades moderada e alta imediatamente após as sessões de exercício físico.

Tabela 8. Correlação entre hormônios e citocinas do sangue periférico, nas diferentes intensidades de exercício físico, e nível de condicionamento físico representada pelo consumo pico de oxigênio atingido em teste incremental máximo.

		Pré		Pós		60 minutos		Δ1%		Δ2%	
		r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value
Baixa intensidade (<60%VO _{2pico})	Leptina (ng/mL)	-0,315	0,153	-0,267	0,217	-0,069	0,754	-0,048	0,833	0,027	0,906
	Adiponectina (ng/mL)	0,042	0,844	0,091	0,674	-0,142	0,508	-0,047	0,827	-0,210	0,324
	PAI-1 (ng/mL)	-0,013	0,953	-0,097	0,651	0,033	0,877	-0,409	0,052	-0,020	0,927
	Insulina (μUL/mL)	-0,303	0,222	-0,061	0,811	0,403	0,136	0,145	0,565	0,499	0,058
Intensidade Moderada (60-75%VO _{2pico})	Leptina (ng/mL)	-0,259	0,233	-0,464	0,030*	-0,384	0,070	-0,182	0,417	-0,198	0,378
	Adiponectina (ng/mL)	-0,241	0,257	-0,192	0,369	-0,163	0,446	0,153	0,476	-0,014	0,949
	PAI-1 (ng/mL)	-0,083	0,701	-0,147	0,494	0,002	0,994	-0,146	0,496	0,163	0,456
	Insulina (μUL/mL)	-0,482	0,050	0,190	0,465	-0,085	0,792	0,607	0,010*	-0,377	0,228
Alta intensidade (>90%VO _{2pico})	Leptina (ng/mL)	-0,206	0,359	-0,107	0,617	-0,114	0,596	0,051	0,820	0,075	0,739
	Adiponectina (ng/mL)	-0,237	0,264	-0,417	0,043*	-0,456	0,025*	0,151	0,481	-0,322	0,125
	PAI-1 (ng/mL)	-0,236	0,268	-0,403	0,051	-0,164	0,443	-0,022	0,917	0,355	0,089
	Insulina (μUL/mL)	-0,318	0,171	0,419	0,066	-0,073	0,761	0,632	0,003*	0,131	0,593

PAI-1= inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1; Δ1%=diferença percentual entre os momentos Pré e Pós sessão aguda de exercício físico; Δ2%=diferença percentual entre os momentos Pré e 60 minutos após sessão aguda de exercício físico; r= correlação de Pearson, p<0,05

ESTUDO II – Análises Moleculares e respostas *in vitro*

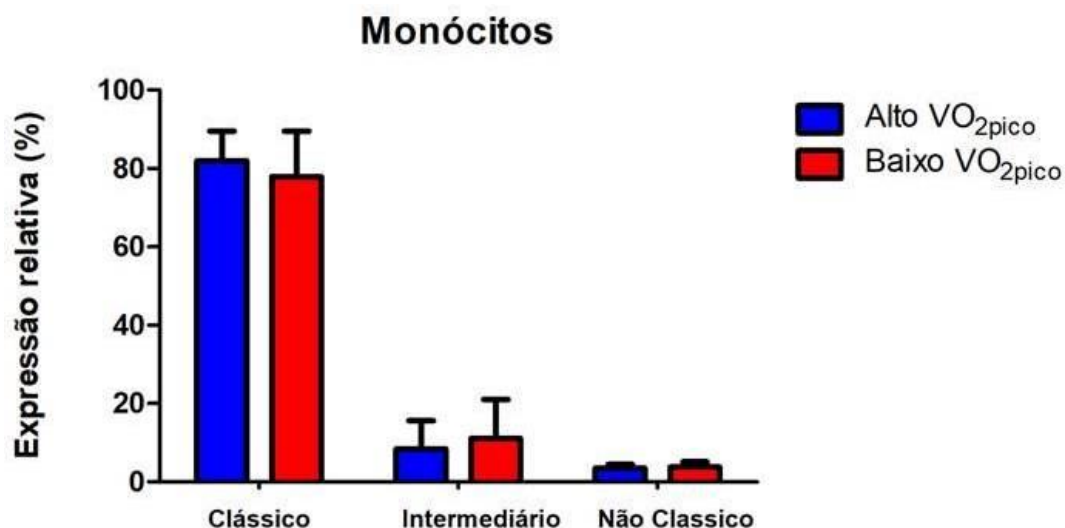
Na **tabela 9** são apresentadas as características fisiológicas de todos os voluntários avaliados (22 indivíduos) no ESTUDO II frente os testes incrementais máximos.

Tabela 9. Característica dos participantes, expresso em média e desvio padrão, no teste incremental máximo.

	Baixo VO _{2pico}	Alto VO _{2pico}	p-value
Idade (anos)	28,2±4,3	25,6±6,4	0,312
Massa corporal (kg)	75,8±17,2	75,4±11,0	0,954
Potência _{pico} (watts)	146,5±45,2	246,1±58,5	<0,001*
VO _{2pico} (mL,kg ⁻¹ ,min ⁻¹)	37,3±6,7	58,4±6,4	<0,001*
FC _{rep} (bpm)	81,1±6,8	69,0±7,9	0,001*
FC _{max} (bpm)	184,4±16,6	182,4±7,9	0,735
[La] (mmol,L)	9,4±1,8	11,1±1,9	0,039*

VO_{2pico}= consumo pico de oxigênio; FC_{rep}= Frequência cardíaca de repouso; FC_{max}= Frequência cardíaca máxima; [La]= concentração de lactato

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada com objetivo de determinar a expressão fenotípica dos monócitos visando à caracterização dos monócitos entre clássico, intermediário e não clássico por meio da marcação com anticorpos CD14 e CD16. A caracterização é apresentada na **Figura 10** e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de condicionamento físico



		N	%	DP	P-value
Clássico CD14⁺⁺CD16⁻	Alto VO ₂ pico	9	81,95	7,56	0,418
	Baixo VO ₂ pico	7	77,95	11,61	
Intermediário CD14⁺⁺CD16⁺	Alto VO ₂ pico	9	8,49	7,12	0,541
	Baixo VO ₂ pico	7	11,15	9,92	
Não Classico CD14⁺ CD16⁺	Alto VO ₂ pico	9	3,52	0,93	0,674
	Baixo VO ₂ pico	7	3,77	1,32	

Figura 10. Expressão de Monócitos de acordo com o nível de condicionamento físico

A análise das concentrações de citocinas produzidas na cultura de monócitos, após 24 horas de incubação, sob estimulação de LPS (ativador de NFkB) isolado ou combinado com agonista (Rosiglitazona) e antagonista (GW9662) de PPAR- γ são apresentados na **Figura 11**. Não houve efeito dos estímulos e do nível de condicionamento físico sobre as concentrações de TNF- α . IL-6 apresentou efeito do grupo ($F= 4,940$; $p= 0,046$; $\eta^2: 0,292$) com maiores concentrações no grupo de alto VO₂pico e interação estímulo e grupo

($F= 6,493$; $p= 0,006$; $\eta^2: 0,351$) com maiores concentrações observadas no grupo alto $VO_{2\text{pico}}$, quando comparado com o baixo $VO_{2\text{pico}}$, sob estimulação de LPS + Rosiglitazona e LPS + GW9662. Vale ressaltar que, sob as mesmas estimulações, o grupo baixo $VO_{2\text{pico}}$ apresentou um decréscimo da citocina. IL-10 apresentou interação estímulo e grupo ($F= 8,223$; $p= 0,001$; $\eta^2: 0,302$), entretanto o pos-hoc apresentou uma tendência de diferença ($p= 0.08$) entre os grupos sob estimulação com LPS. IFN- γ apresentou efeito da estimulação ($F= 4,892$; $p= 0,023$; $\eta^2: 0,197$) com menores concentrações sob estimulação de LPS+GW9662 quando comparado com o LPS isolado.

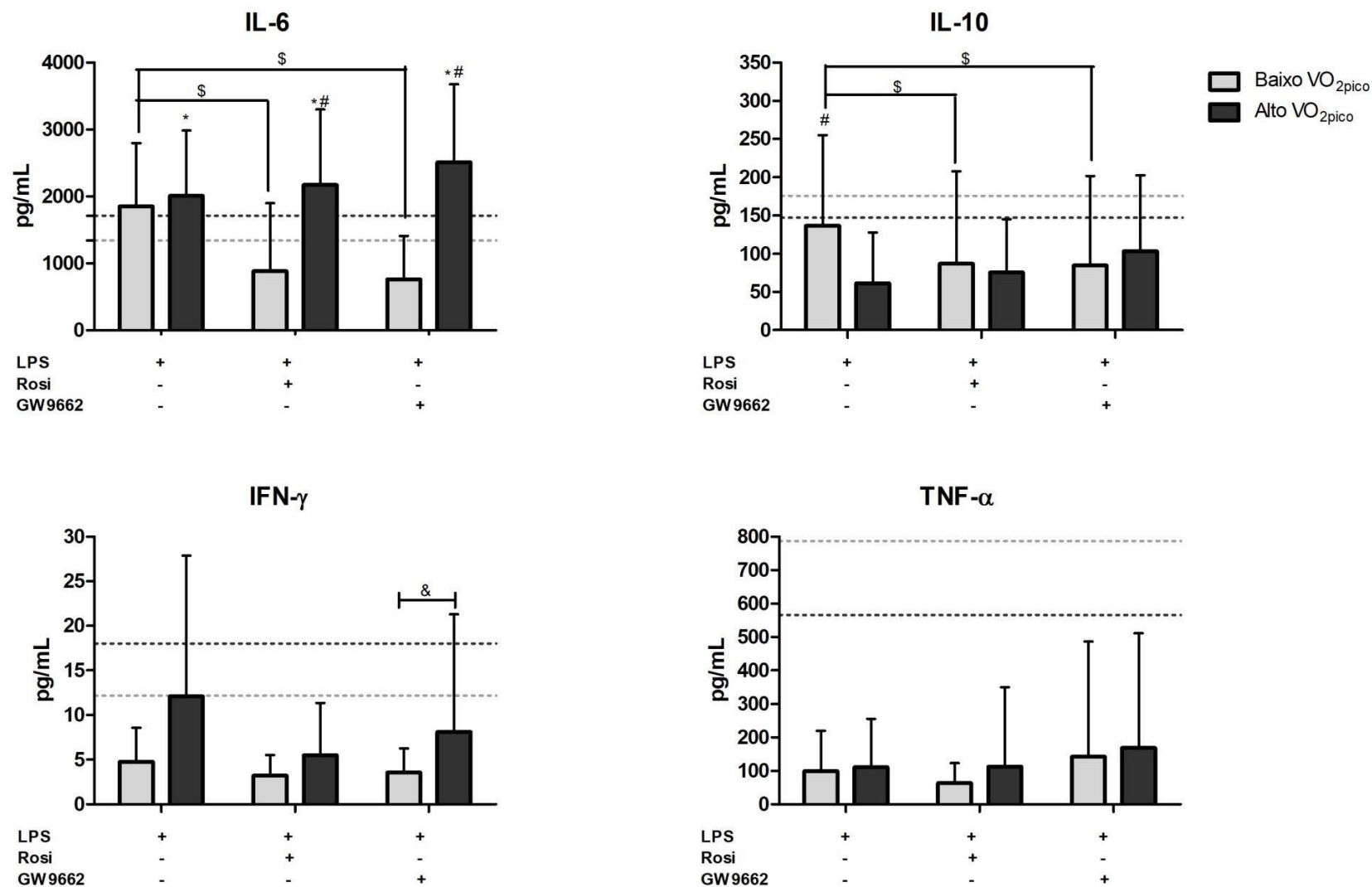


Figura 11. Concentrações de citocinas, expresso em média e desvio padrão, no meio de cultura de monócitos incubados por 24 horas.

*Diferença do grupo, &Diferença do estímulo quando comparado com o LPS (independente do grupo), #Interação estímulo X grupo, \$Diferença dentro do grupo entre os estímulos. Linha tracejada refere-se ao controle de acordo com o grupo

Para o ESTUDO II foram incluídos 22 voluntários (proporcionalmente divididos entre os grupos Baixo e Alto VO_{2pico}) que participaram de todos os testes e análises, entretanto para as análises de expressão gênica analisou-se as amostras dos 12 voluntários que melhor caracterizavam os grupos (Baixo $VO_{2pico} = 35,3 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e Alto $VO_{2pico} = 63,1 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). A análise de expressão gênica foi conduzida com a finalidade de investigar as alterações impostas pelos estímulos ofertados (LPS, Rosiglitazona, GW9662, LPS+Rosiglitazona e LPS+GW9662) após 24 de incubação. Os resultados (**Tabela 10, Figura 12 e 13**) são apresentados de acordo com as alterações dos genes alvo relativizados pelo gene GAPDH usado como constitutiva. Resultados significativos foram observados nos genes PPAR- γ , PGC-1 α , TLR-4, CD36, AMPK e L-CAT. É importante ressaltar que para a variável L-CAT foi observado um efeito do estímulo, entretanto o pos-hoc não detectou as diferenças.

Tabela 10. Análise de expressão gênica de marcadores inflamatórios, Valores expressos em “número de vezes” (folder) de alteração.

Variável	Grupo	Controle	LPS	Rosí	GW	LR	LG	Efeitos	F	p-valor	η^2
PPAR- γ	Baixo VO2	6,44	0,54	26,93	10,99	15,77	7,18	Estímulo	14,511	<0,001*	0,592
	Alto VO2	1,19	1,78	43,81	29,04	24,55	27,48	Grupo	8,867	0,014*	0,470
								Interação	2,456	0,123	0,198
PGC1 α	Baixo VO2	1,25	0,98	44,38	22,31	56,12	57,61	Estímulo	31,567	<0,001*	0,798
	Alto VO2	1,18	1,26	71,38	35,20	126,88	72,70	Grupo	15,739	0,004*	0,663
								Interação	4,080	0,027*	0,338
IKK1	Baixo VO2	0,95	0,89	36,91	21,86	148,34	41,31	Estímulo	3,955	0,074	0,331
	Alto VO2	1,09	2,89	85,97	24,09	205,23	115,81	Grupo	0,813	0,394	0,092
								Interação	0,246	0,665	0,030
TLR-4	Baixo VO2	1,00	1,35	25,06	15,36	51,72	60,96	Estímulo	19,976	0,001*	0,714
	Alto VO2	0,99	4,73	72,43	49,49	196,66	293,56	Grupo	34,475	<0,001*	0,812
								Interação	8,445	0,013*	0,514
HIF-1 α	Baixo VO2	1,23	1,13	14,13	8,93	8,26	14,22	Estímulo	3,813	0,062	0,353
	Alto VO2	1,39	2,67	24,82	10,48	19,97	3,45	Grupo	1,580	0,249	0,184
								Interação	0,559	0,549	0,074
NF-kB	Baixo VO2	1,26	1,54	71,15	27,04	69,44	10,23	Estímulo	1,724	0,221	0,161
	Alto VO2	1,01	1,75	21,78	14,86	12,46	30,57	Grupo	0,761	0,406	0,078
								Interação	1,104	0,328	0,109
CD36	Baixo VO2	0,67	0,57	55,72	37,44	17,34	20,29	Estímulo	8,889	0,004*	0,559
	Alto VO2	2,78	1,29	81,84	34,16	24,79	30,03	Grupo	0,968	0,358	0,121
								Interação	0,380	0,672	0,052
AMPK	Baixo VO2	1,17	1,13	545,44	297,66	259,78	184,58	Estímulo	26,487	<0,001*	0,746
	Alto VO2	1,18	1,81	347,72	272,71	211,84	217,30	Grupo	6,112	0,035*	0,404
								Interação	1,507	0,246	0,143
CETP	Baixo VO2	1,43	0,83	81,93	76,51	41,99	47,23	Estímulo	2,840	0,077	0,289
	Alto VO2	1,13	4,08	180,19	26,39	157,02	87,36	Grupo	0,775	0,408	0,100
								Interação	1,049	0,385	0,130
L-CAT	Baixo VO2	1,35	1,21	20,31	11,07	196,84	214,07	Estímulo	7,556	0,034*	0,602
	Alto VO2	1,17	1,33	27,82	14,02	257,45	436,66	Grupo	0,661	0,453	0,117
								Interação	0,736	0,442	0,128

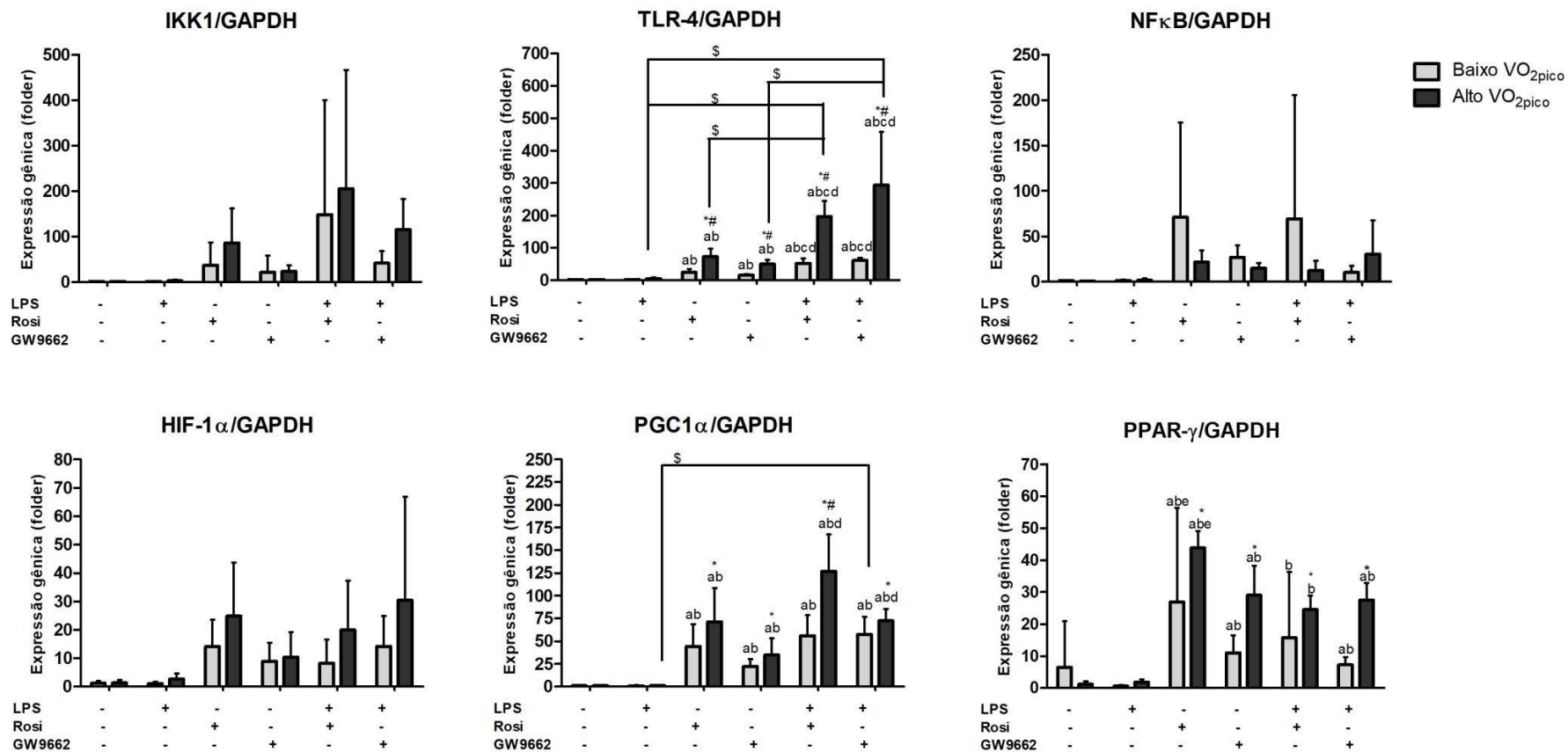


Figura 12. Expressão gênica em monócitos cultivados por 24h na presença ou ausência de LPS, rosiglitazona e GW9662. Valores expressos em média e desvio padrão das alterações em "número de vezes" comparadas ao gene GAPDH (constitutiva). ^aDiferente do controle, ^bDiferente do LPS, ^cDiferente do rosiglitazona, ^dDiferente do GW9662, ^eDiferente do LPS+Rosiglitazona, ^fDiferente do LPS+GW9662, ^{*}Diferença entre os grupos (Baixo e Alto VO_{2pico}), [#]Interação estímulo X grupo, ^{\$}Diferença dentro do grupo entre os estímulos. p<0.05

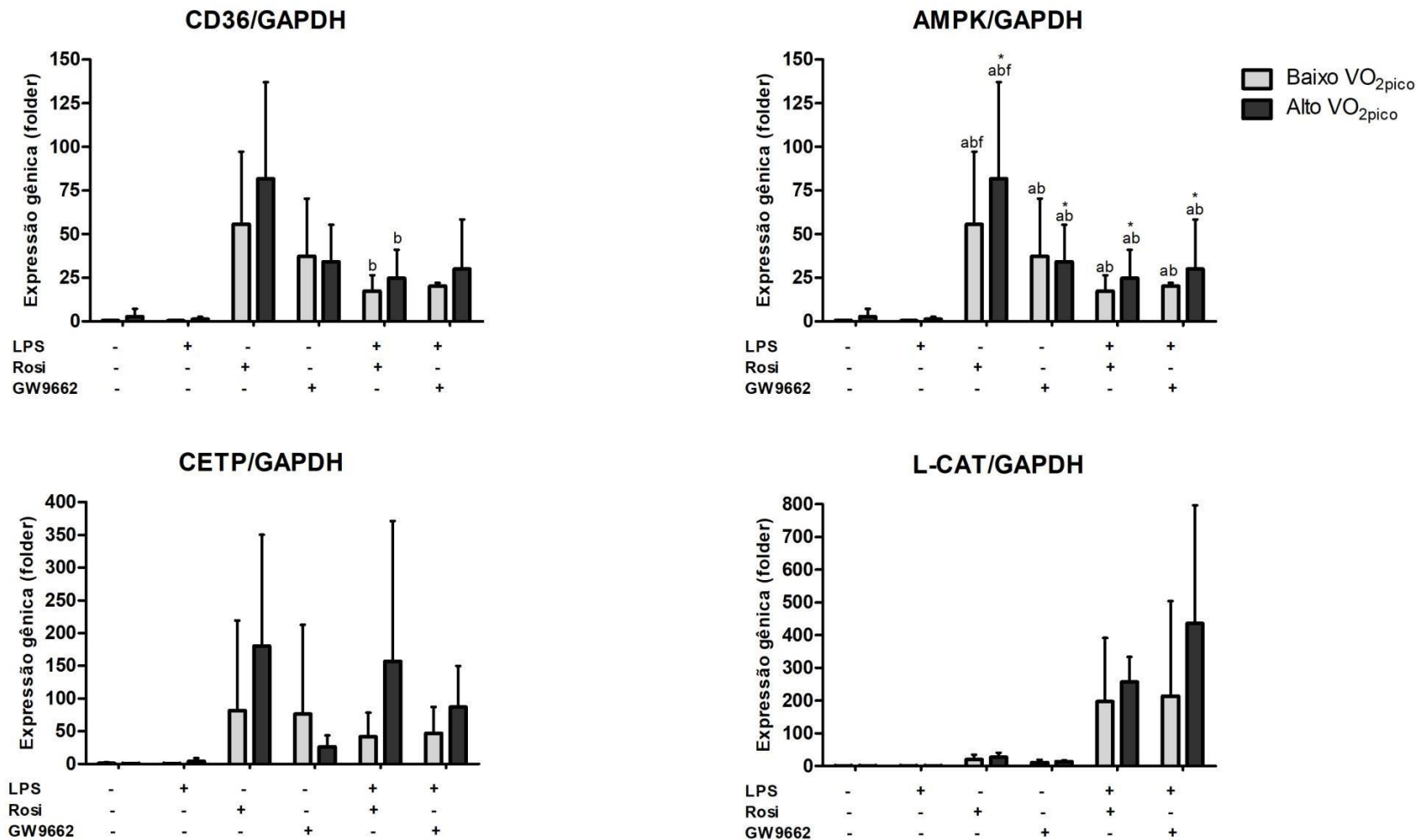


Figura 13. Expressão gênica em monócitos cultivados por 24h na presença ou ausência de LPS, rosiglitazona e GW9662. Valores expressos em média e desvio padrão das alterações em "número de vezes" comparadas ao gene GAPDH (constitutiva). ^aDiferente do controle, ^bDiferente do LPS, ^cDiferente do rosiglitazona, ^dDiferente do GW9662, ^eDiferente do LPS+Rosiglitazona, ^fDiferente do LPS+GW9662, *Diferença entre os grupos (Baixo e Alto VO_{2pico}), [#]Interação estímulo X grupo, ^{\$}Diferença dentro do grupo entre os estímulos. p<0.05

8. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo nos possibilita melhor compreender as modulações fisiológicas, metabólicas e inflamatórias periféricas impostas pelo exercício físico realizado em diferentes intensidades de esforço e de acordo com o nível de condicionamento físico individual. Além disso, identificar como a aptidão cardiorrespiratória propicia adaptações celulares e moleculares que impactam diretamente nas modulações mediadas pelo exercício físico agudo.

Tais conhecimentos viabilizam o conhecimento de protocolos de treinamento direcionados aos públicos alvo com maior precisão para a obtenção de melhorias sobre aspectos relacionados com desempenho físico e saúde. Sendo assim, é importante entender as respostas fisiológicas e periféricas impostas pelo exercício físico e como o “maquinário biológico individual” pode orquestrar as modulações periféricas e moleculares.

Quando investigado as respostas fisiológicas periféricas, observamos que o exercício de alta intensidade ($>90\% \text{VO}_{2\text{pico}}$) parece ser o principal modelo a aumentar significativamente as concentrações de lactato, glicose, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, razão IL-6/IL-10, paralelamente a diminuição das concentrações de ácidos graxos, imediatamente após a sessão de esforço. Além disso, após 60 minutos do término da sessão (recuperação) há uma tendência de aumento das concentrações de IL-10 que apresentou associação com parâmetros de desempenho/condicionamento físico no sangue total periférico e estimulado com LPS.

As modulações positivas mediadas pelo treinamento de alta intensidade, principalmente sobre os seus efeitos anti-inflamatório e anti-aterogênico, estão sendo amplamente investigados. Em um contexto similar, Peake e

colaboradores (2005) investigaram em homens bem treinados os efeitos inflamatórios impostos por três modelos de exercício físico (a) corrida em intensidade moderada (60% VO_{2max}) por 60 minutos; b) corrida em alta intensidade (85% VO_{2max}) por 60 minutos e; c) corrida *downhill* (-10%) à 60% VO_{2max} por 45 minutos) observando que as concentrações de IL-1ra e IL-10 aumentaram significativamente após o exercício de alta intensidade quando comparado com os outros dois modelos à 60% VO_{2max} . Estes resultados sugerem que após o exercício de 1 hora de duração, a intensidade do exercício parece ter um efeito significativo sobre a produção de citocinas anti-inflamatórias por influência de fatores sistêmicos, como os hormônios (cortisol e norepinefrina) e a produção de IL-6 durante a sessão de esforço (Peake et al, 2004; Peake et al, 2005, Sondergaard et al., 2000).

Além da intensidade, outros parâmetros fisiológicos podem influenciar na produção e liberação de IL-10. Jankord & Jemiole (2004) sugerem que alto volume de atividade física regular está associado com maiores concentrações de IL-10 evidenciando que o treinamento físico desempenha um papel significativo sobre os parâmetros inflamatórios. Abbasi e colaboradores (2013) em estudo conduzido com sangue estimulado com LPS em atletas após exercício exaustivo observaram que há aumento nas concentrações de IL-10, IL-1ra, IL-6, MCP-1 e IL-8 no sangue não estimulando enquanto que no sangue estimulado observou-se aumento de IL-8, IL-1ra, e TGF- β 1 com supressão do TNF- α e IL-6, entretanto o pico de IL-6 imediatamente após o exercício também foi observado.

Tais estudos corroboram com nossos resultados e com a nossa hipótese inicial de que o exercício em alta intensidade propicia respostas positivas e benéficas ao organismo, entretanto as modulações parecem ser dependentes do

nível de condicionamento físico. Além disso, temos que destacar que o exercício físico *per se* possui efeitos anti-inflamatórios, vinculado com a produção de IL-6 advinda da contração muscular, que atua como gatilho para a produção e liberação de outras citocinas de caráter anti-inflamatórias, tais como IL-1ra e IL-10 (Pedersen, 2011; Pedersen et al., 2001). Por outro lado, Van der Poll e colaboradores (1996) verificaram que pacientes induzidos a endotoxemia apresentaram aumento das concentrações de IL-10 com pico após 2 horas de injeção, entretanto indivíduos que receberam infusão de hidrocortisona diretamente antes da administração de LPS, as concentrações de IL-10 foram ainda maiores sugerindo uma possível modulação independente de outras citocinas precursoras. Embora não significante, no presente estudo foi possível observar um aumento no sangue periférico das concentrações de IL-6 em todas as intensidades, principalmente nos protocolos de alta intensidade, o que pode explicar o comportamento da IL-10.

A produção e a liberação de IL-6, mediada pelo exercício físico, pode aumentar até 100 vezes após o esforço quando comparado com concentrações em repouso ou pré-exercício (Starkie et al., 2001), entretanto as suas variações dependem de diversas variáveis do treinamento, tais como volume, protocolo/modelo e intensidade, e as suas alterações estão diretamente relacionadas com a regulação energética e inflamatória considerando a sua atuação como “sensor energético” (Pedersen & Febbraio, 2008; Reihmane & Dela, 2014). A contribuição energética mediada por IL-6 pode ser observada ao identificar as alterações nas concentrações de glicose, lactato e ácidos graxos livres, dado que tais variáveis estão associadas com a depleção dos estoques de glicogênio e são mobilizados para a manutenção da atividade contrátil.

Além dos parâmetros inflamatórios, quando analisado a concentração de

outras citocinas (adiponectina, PAI-1) e hormônios (leptina e insulina) que regulam o metabolismo glicídico e lipídico, observou-se que o exercício diminuiu as concentrações de leptina, como esperado, e interessante, o exercício de alta intensidade aumentou significativamente as concentrações de PAI-1 imediatamente após a sessão de exercício retornando aos valores similares ao repouso após 60 minutos. Vale ressaltar que o PAI-1 é considerado um marcador aterogênico de importante contribuição no equilíbrio dos processos fibrinolíticos inibindo a ação do ativador do plasminogênio tecidual (Cesari et al., 2010)

Em estudo prévio conduzido por nosso grupo foi observado resultados similares com aumento significativo das concentrações de PAI-1 imediatamente após a sessão de esforço, porém em exercício contínuo de intensidade moderada (70% da velocidade associada com o VO_{2pico}) (Santos et al., 2016) corroborando com outro estudo que também observou alterações significantes em exercícios de intensidades mais baixas em jovens (Buchan et al., 2011). Por outro lado, Kahraman e colaboradores (2011) observaram em homens saudáveis que uma sessão aguda de exercício submáximo (60 minutos a 90% do limiar anaeróbio individual) é capaz de aumentar, mesmo que não significativamente, as concentrações de PAI-1 sugerindo um estado transitório de coagulação associado ao exercício físico.

Além disso, devemos mencionar que as concentrações basais de PAI-1 estão diretamente associadas com o nível de condicionamento físico individual observando-se menores valores em indivíduos altamente treinados que realizam elevado volume de treinamento quando comparado com sedentários (Lira et al., 2010). Neste contexto, o nível de condicionamento individual parece ser um fator determinante para as modulações impostas pelo exercício físico associado à

intensidade do esforço e tais pressupostos são fortalecidos ao verificar as correlações inversas entre citocinas, hormônios e parâmetros de desempenho físico, principalmente em intensidades moderada e alta.

Mesmo não apresentando alterações significantes em suas concentrações frente às sessões de esforço, vale mencionar a relação inversa entre as concentrações de adiponectina após o exercício físico (imediatamente e 60 minutos após o término da sessão) com o VO_{2pico} . A adiponectina é caracterizada como uma citocina anti-inflamatória, anti-angiogénica, anti-aterosclerótica, anti-proliferativa e pró-apoptóticas em diversos tipos celulares e no músculo esquelético estimula a captação e utilização da glicose, via aumento da translocação do GLUT-4 (Ceddia et al., 2005), e o transporte de ácidos graxos (Qiao et al., 2012). Além disso, adiponectina aumenta as vias de glicólise e β -oxidação, por meio da ativação da AMPK (Yamauchi et al., 2002), viabilizando a biodisponibilidade de substratos energéticos. Nesta perspectiva, a relação inversa observada entre as concentrações de adiponectina e VO_{2pico} frente o exercício físico pode ser explicado por uma menor necessidade de mobilização e captação de energia dada a utilização e depleção dos estoques de glicogénio muscular que, sabidamente, são elevados em indivíduos treinados e representam uma adaptação benéfica ao metabolismo tornando-o mais econômico e funcional mediante situações de elevado gasto energético.

Em linhas gerais, pudemos identificar nas respostas periféricas que o nível de condicionamento físico paralelamente a intensidade de esforço são variáveis chaves para as modulações impostas pelo exercício físico, entretanto outros aspectos celulares, moleculares e/ou intracelulares também podem orquestrar e gerenciar tais respostas.

Desta forma, ao investigar aspectos celulares pudemos identificar que não

há diferença fenotípica entre os monócitos de sujeitos classificados como baixo e alto $VO_{2\text{pico}}$ que pode ser explicado pelas características gerais dos voluntários recrutados para o presente estudo, tendo em vista que todos eram saudáveis e eutróficos. Tal hipótese é fortalecida ao comparar os nossos resultados com de outro estudo do nosso grupo que envolve homens obesos o qual identificamos maiores valores percentuais de monócitos clássicos em obesos quando comparado com os eutróficos (dados não publicados). Entretanto, por meio da cultura de células, identificamos que a resposta dos monócitos frente diferentes estímulos inflamatórios se diferencia entre os grupos de condicionamento físico.

É importante destacar que os tratamentos utilizados para a cultura dos monócitos nos permitiu ativar e/ou bloquear vias inflamatórias e anti-inflamatórias, tendo em vista que os compostos são amplamente utilizados em estudos com ênfase nas vias de ativação do NF-kB e PPAR- γ .

O LPS é uma endotoxina presente na membrana de bactérias gram-negativas, sendo sua maior produção e liberação associada com o estresse na microbiota intestinal, principalmente por meio de compostos nutricionais advindos de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas (Harte et al., 2012; Herieka et al., 2014), favorecendo a instalação de um perfil inflamatório dada a sua capacidade de interação com receptores da família *Toll like receptor* e ativação de fatores de transcrição nuclear, como o NF-kB (Silveira et al., 2016). Rosiglitazona é um agonista de PPAR- γ , membro da classe de medicamentos antidiabético TZD (do inglês: thiazolidinediones) e são considerados ligantes sintéticos do PPAR- γ atuando, principalmente na redução da resistência à insulina e concentrações de glicose aumentando a sensibilidade tecidual (como por exemplo, no músculo esquelético, tecido adiposo e fígado) à insulina

endógena e exógena (Bailey, 2005; Wellington, 2005). Já o GW9662 (2-cloro-5-nitrobenzanilida) atua como um potente antagonista de PPAR- γ que modifica covalentemente um resíduo de cisteína (Cys 285) no sítio de ligação do ligante de PPAR- γ inibindo a sua ativação; além disso, parece que o GW9662 também modifica covalentemente tanto o PPAR- δ (delta) como o PPAR- α (alfa) em concentrações significativamente superiores às necessárias para a inibição do PPAR- γ (Leesnitzer et al., 2002).

Quando analisado a produção de citocinas inflamatórias no sobrenadante da cultura de monócitos, exposto ao tratamento com LPS, Rosiglitazona e GW9662, foi observado significantes diferenças de acordo com os grupos de condicionamento físico, principalmente sobre as concentrações de IL-6 e IL-10. É sabido que o LPS é um agente ativador de vias de sinalização pró-inflamatório, por meio da atividade transcricional do NF- κ B, entretanto ao ser conjugado com rosiglitazona (agonista de PPAR- γ) ou GW9662 (antagonista de PPAR- γ) se estabelece uma “competição” de vias entre os fatores de transcrição. Nesta perspectiva, independentemente de estímulos pró ou anti-inflamatórios, o grupo de alto condicionamento físico produz maiores concentrações de IL-6 evidenciando uma melhor responsividade a agentes estressores do referido grupo.

Em recente estudo conduzido por Eaton e colaboradores (2018) observou-se que homens fisicamente ativos ($VO_{2pico} = 47 \pm 8 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), antes e após 20 dias de treinamento intervalado de alta intensidade (5×4 minutos a $\sim 80\%$ da potência pico), possuem maior expressão de mRNA de IL-6 no músculo esquelético após uma sessão de treinamento. Além de indivíduos fisicamente ativos, atletas também apresentam maior expressão gênica de IL-6 frente protocolos de treinamento de alta intensidade (Kochanowicz et al., 2017).

Esses estudos evidenciam as positivas adaptações metabólicas, e possivelmente anti-inflamatória, imposta pelo exercício físico e nível de condicionamento físico capaz de propiciar significantes impactos à saúde.

Por outro lado, a produção de IL-10 por monócitos cultivados sob diferentes estímulos foi maior no grupo de baixo condicionamento físico, principalmente sob estimulação com LPS isolado, o que nos leva a hipotetizar sobre a necessidade de uma resposta anti-inflamatória acentuada para regular e/ou neutralizar um estresse inflamatório. Sabe-se que a inatividade física é capaz de impor um quadro inflamatório de baixo grau similar ao observado em doenças crônico-degenerativa, tais como a obesidade. De acordo com Carvalho e colaboradores (2010) a alta expressão e liberação de IL-10 em sujeitos com excesso de peso pode representar uma tentativa de inibir um quadro inflamatório representado pela alta expressão e liberação de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6.

Por outro lado, Ortega (2016) sugere que há efeitos bioregulatórios advindos da prática de exercício físico dependentes do perfil metabólico individual, ou seja, em indivíduos saudáveis a prática de exercício físico deve estimular uma resposta inflamatória enquanto que em pessoas com quadro inflamatório instalado o exercício físico deve mediar uma resposta anti-inflamatória, principalmente por meio da redução de mediadores inflamatórios que estão elevados. No presente contexto, entende-se que a resposta anti-inflamatória é necessária para pessoas que apresentam um quadro inflamatório enquanto que para pessoas saudáveis faz-se necessário uma “sobrecarga” inflamatória para manter a responsividade e a funcionalidade efetiva do sistema imune contra agentes estressores. Tal estudo pode explicar, pelo menos em partes, as diferenças observadas na produção de IL-6 e IL-10 nos monócitos

frente os diferentes estímulos na cultura de células, possivelmente sendo influenciado pelo condicionamento físico individual e perfil metabólico.

Interessantemente, a expressão gênica de importantes proteínas *upstream*, *downstream* e receptores reguladores das vias de sinalização do NF- κ B e PPAR- γ se diferenciam entre os grupos de condicionamento físico elucidando os mecanismos moleculares que associa-se positivamente com a prática regular de exercício físico. Krämer e colaboradores (2006) investigaram as diferenças na expressão gênica da família PPAR (α -alfa e δ -delta) e PGC-1 (α -alfa e β -beta) no músculo esquelético de homens atletas (ciclistas), fisicamente ativos e inativos por lesão medular verificando que a expressão de mRNA de PPAR- α , PPAR- δ , PGC-1 α e -1 β é maior em atletas, quando comparados com indivíduos fisicamente ativos e que tais proteínas estão correlacionadas com o tipo de fibras musculares, principalmente com as fibras oxidativa.

Como supracitado, o PGC-1 α é um co-ativador de todas as isoformas PPAR e, portanto, a expressão coordenada entre PGC-1 α e isoformas de PPAR podem refletir efeitos funcionais para modular o metabolismo, tais como melhoras na capacidade oxidativa. Em animais é sugerido que PGC-1 α contribui na regulação mitocondrial mediada pela AMPK e expressão de proteína de transporte de membrana de glicose (GLUT4) no músculo esquelético (Leick et al., 2010). Essa informação é interessante tendo em vista que em nossos resultados identificamos maiores expressões de AMPK nos sujeitos de alto condicionamento físico evidenciando que há uma melhora do sistema oxidativo e energético frente o treinamento físico regular. Além disso, devemos destacar o comportamento observado frente o tratamento conjugado entre LPS e Rosiglitazona dado que, em condições práticas e clínicas, indivíduos obesos diabéticos (que possuem um quadro inflamatório) ao serem

tratados com Rosiglitazona aumentaram a expressão de PGC-1 α , paralelamente a melhora da sensibilidade insulínica e atividade da succinato desidrogenase (Mensink et al., 2007)

Além das contribuições sobre o metabolismo energético é evidenciado os impactos que o PGC-1 α possui sobre a resposta inflamatória, principalmente na modulação das vias pró-inflamatória. Nesta perspectiva, Eisele e colaboradores (2013) sugere que o PGC-1 α , bem como o PGC-1 β , reprime a produção de citocinas inflamatórias reduzindo a fosforilação do NF- κ B e, consequentemente, diminuindo a ativação transcricional do fator nuclear evidenciando o papel regulatório que o PGC-1 α possui sobre os eventos inflamatórios. Nossos resultados corroboram com os estudos prévios ao observarmos que o grupo de alto condicionamento físico tem maior expressão de PGC-1 α independente da estimulação imposta nos levando a hipotetizar que o nível de aptidão física conduz a adaptações metabólicas protetivas, principalmente ao impor um ambiente inflamatório via LPS ou bloqueio da atividade do PPAR- γ (GW9662). Por outro lado, quando estimulado com LPS e rosiglitazona (agonista de PPAR- γ), mimetizando uma “competição de vias”, podemos identificar que há uma maior expressão dependente de PPAR- γ que por sua vez também é maior expressado no grupo de alto VO_{2pico}.

Essas respostas evidenciam um potente mecanismo protetivo e anti-inflamatório que o exercício físico propicia ao organismo e pode explicar o comportamento das citocinas analisadas no sobrenadante da cultura, principalmente da IL-6. Além disso, a modulação positiva sobre a expressão das proteínas do eixo AMPK/PGC-1 α /PPAR- γ a nível celular podem orquestrar as respostas anti-inflamatórias observadas a nível sistêmico frente sessão aguda de exercício físico explicando, principalmente, as concentrações

circulantes de IL-6 e IL-10 após esforço. Tais achados nos permite compreender que a resposta benéfica periférica ao exercício físico é modulada diretamente pelas adaptações moleculares e celulares do “maquinário biológico individual”.

Vale ressaltar que a atividade e expressão de receptores de membrana são cruciais para a ativação de vias de sinalização e no presente trabalho observou-se diferença entre os grupos e estímulos na expressão de TLR-4 verificando maiores valores no grupo de alto condicionamento físico, principalmente sob estimulação com LPS combinado com GW9662 (antagonista/bloqueador de PPAR- γ). Estes resultados podem ser interpretados como um aumento ou uma melhora da resposta imune frente os diferentes estímulos, principalmente sob estimulação com LPS isolado ou conjugado, que pode estar associado às adaptações impostas pelo treinamento. De acordo com estudo conduzido por Nickel e colaboradores (2011) com atletas eutróficos e obesos o treinamento aeróbio por 10 semanas, paralelamente ao nível de atividade física prévia dos sujeitos, induz um aumento na expressão dos receptores da família TLR, principalmente TLR-4 e TLR-7, sugerindo que por meio de exercícios aeróbicos regulares há modulações positivas sobre a imunidade inata e as citocinas pró-inflamatórias na obesidade. Child e colaboradores (2013) observaram que 2 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade (4 minutos à ~ 85% do $VO_{2\text{pico}}$ com intervalo passivo de 2 minutos (10 repetições) com frequência de 3 vezes/semanais) aumentou em 2 vezes a expressão de TLR-4 em monócitos totais CD14, em 2,6 vezes em monócitos CD14⁺⁺/CD16⁻ (clássico) e 1,5 em monócitos totais CD14⁺/CD16⁺⁺ (não clássico) em homens sedentários evidenciando o papel regulatório do exercício físico sobre a expressão de receptores mesmo frente uma curta

exposição.

Neste contexto é importante destacar que, dependendo do ligante e/ou agente estimulante, a atividade do TLR-4 pode induzir respostas diferentes, o que influenciará no tipo, magnitude e duração da resposta inflamatória. A via de sinalização mediada por TLR-4 e MyD88 é caracterizada por ativar a produção e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, entretanto se a transdução do sinal for mediada por TRAM, TRIF e posteriormente se associar ao TRAF3, essa via resultará na produção de IFN- β (que está envolvido na ativação da resposta imune inata) e na produção da citocina anti-inflamatória (Brown et al., 2011). Sendo assim, uma maior expressão de TLR-4 pode estar associada com uma melhor resposta inflamatória frente a diferentes agentes estressores e, conseqüentemente, atuar de forma protetora ao metabolismo.

9. CONCLUSÃO

De acordo com as respostas periféricas podemos concluir que a produção de citocinas, principalmente de citocinas de caráter anti-inflamatório como a IL-10, está diretamente associada com o domínio de intensidade com maiores concentrações em exercícios de alta intensidade evidenciando importante papel anti-inflamatório do exercício físico. No entanto, esta resposta é dependente da aptidão física. Os efeitos anti-inflamatórios vinculados a pratica regular de exercício físico e, conseqüentemente, ao nível de condicionamento físico podem ser explicados pela maior expressão de proteínas e receptores celulares, tais como AMPK, TLR-4 e PGC-1 α , em indivíduos de alto condicionamento físico, exibindo arcabouço celular extremamente eficiente para respostas rápidas e bem sucedidas.

Sendo assim, conclui-se que o exercício físico realizados em alta intensidade impõe importantes alterações metabólicas que favorecem a instalação do quadro anti-inflamatório, entretanto tais adaptações periféricas são dependentes do nível de condicionamento físico, dado que indivíduos de maior aptidão cardiorrespiratória apresentam maior expressão de proteínas e receptores celulares que modulam positivamente a ativação do PPAR- γ e inibem a via inflamatória do NF- κ B. Desta forma, indivíduos de alto condicionamento físico apresentam adaptações benéficas nos mecanismos celulares e moleculares, mediado pela prática crônica e regular de exercício físico, que refletem significativamente nas respostas metabólicas e inflamatórias periféricas frente sessões de exercício físico.

10. REFERÊNCIAS

1. Abbasi A et al., Changes in spontaneous and LPS-induced ex vivo cytokine production and mRNA expression in male and female athletes following prolonged exhaustive exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2013;19:8-28.
2. Abeles RD et al., CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14(hi) /CD16(neg) monocytes: Expansion of CD14(hi) /CD16(pos) and contraction of CD14(lo) /CD16(pos) monocytes in acute liver failure. *Cytometry A.* 2012 Oct;81(10):823-34. doi: 10.1002/cyto.a.22104. Epub 2012 Jul 26.
3. Ackerman SE et al., Insights into the link between Obesity and Cancer. *Curr Obes Rep.* 2017 Jun;6(2):195-203. doi: 10.1007/s13679-017-0263-x.
4. Ades PA et al., High-calorie-expenditure exercise: a new approach to cardiac rehabilitation for overweight coronary patients. *Circulation.* 2009 May 26;119(20):2671-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.834184. Epub 2009 May 11.
5. Ahlborg B, Ahlborg G. Exercise leukocytosis with and without beta-adrenergic blockade. *Acta Med Scand.* 1970 Apr;187(4):241-6.
6. Akiyama Y et al., Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *J Clin Invest.* 1983 Sep;72(3):1093-105
7. Antunes BMM et al., Arterial Thickness and Immunometabolism: The Mediating role of Chronic Exercise. *Curr Cardiol Rev.* 2016;12(1):47-51.
8. Antunes BMM et al., Macronutrient intake is correlated with dyslipidemia and low-grade inflammation in childhood obesity but mostly in male obese. *Nutr Hosp.* 2015 Sep 1;32(3):997-1003. doi: 10.3305/nh.2015.32.3.9289.

9. Auboeuf D et al., Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*. 1997 Aug;46(8):1319-27.
10. Baeuerle PA et al., I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*. 1988 Oct 28;242(4878):540-6.
11. Bailey CJ. Treating insulin resistance in type 2 diabetes with metformin and thiazolidinediones. *Diabetes Obes Metab*. 2005 Nov;7(6):675-91.
12. Baker RG et al. NF-κB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab*. 2011 Jan 5;13(1):11-22. doi: 10.1016/j.cmet.2010.12.008. Review.
13. Bettelli E et al., Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8. Epub 2006 Apr 30.
14. Binder RK et al., Methodological approach to the first and second lactate threshold in incremental cardiopulmonary exercise testing. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2008 Dec;15(6):726-34. doi: 10.1097/HJR.0b013e328304fed4.
15. Borg G. Escalas de Borg para a dor e o esforço percebido. São Paulo, Manole, 2000.
16. Brown J et al., TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res*. 2011 Apr;90(4):417-27. doi: 10.1177/0022034510381264. Epub 2010 Oct 12.
17. Buchan DS et al., The effects of time and intensity of exercise on novel and established markers of CVD in adolescent youth. *Am J Hum Biol*. 2011 Jul-Aug;23(4):517-26. doi: 10.1002/ajhb.21166. Epub 2011 Apr 4.

18. Butcher LR et al., Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPARgamma. *Med Sci Sports Exerc.* 2008 Jul;40(7):1263-70. doi: 10.1249/MSS.0b013e31816c091d.
19. Candore G et al., Inflammation, genetic background and longevity. *Biogerontology.* 2010 Oct;11(5):565-73. doi: 10.1007/s10522-010-9286-3. Epub 2010 Jun 13.
20. Caritá RAC et al. Aerobic fitness and amplitude of the exercise intensity domains during cycling. *Rev Bras Med Esporte*, 19(4) – Jul/Ago, 2013.
21. Camus G et al., Endotoxaemia, production of tumour necrosis factor alpha and polymorphonuclear neutrophil activation following strenuous exercise in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1998 Dec;79(1):62-8.
22. Camus G et al., Possible in vivo tolerance of human polymorphonuclear neutrophil to low-grade exercise-induced endotoxaemia. *Mediators Inflamm.* 1998;7(6):413-5.
23. Carvalho GQ et al., Peripheral expression of inflammatory markers in overweight female adolescents and eutrophic female adolescents with a high percentage of body fat. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2010 Aug;35(4):464-70. doi: 10.1139/H10-033.
24. Cawthorn WP et al., TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9;582(1):117-31. Epub 2007 Nov 26.
25. Ceddia RB et al., Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia.* 2005 Jan;48(1):132-9. Epub 2004 Dec 24.
26. Cesari M et al., Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc*

- Ther. 2010 Oct;28(5):e72-91. doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00171.x. Epub 2010 Jul 7.
27. Chen L et al. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:508409. doi: 10.1155/2015/508409. Epub 2015 Jun 2
 28. Child, Marta; Leggate, Melanie; and Gleeson, Michael (2013) "Effects of Two Weeks of High-intensity Interval Training (HIIT) on Monocyte TLR2 and TLR4 Expression in High BMI Sedentary Men," *International Journal of Exercise Science*: Available at: <https://digitalcommons.wku.edu/ijes/vol6/iss1/10>
 29. Chinetti G et al., Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*. 1998 Oct 2;273(40):25573-80.
 30. Chinetti G et al., PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med*. 2001 Jan;7(1):53-8.
 31. Chou CY et al., Weight loss improves serum mediators and metabolic syndrome features in android obese subjects. *Obes Res Clin Pract*. 2013 Jan-Feb;7(1):e81-8. doi: 10.1016/j.orcp.2011.10.003.
 32. Cohen J. A power primer. *Psychol Bull*. 1992;112(1):155-159.
 33. Cros J et al., Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):375-86. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.012. Epub 2010 Sep 9.
 34. Dagdeviren S et al., Altered Interleukin-10 Signaling in Skeletal Muscle Regulates Obesity-Mediated Inflammation and Insulin Resistance. *Mol Cell Biol*. 2016 Sep 19. pii: MCB.00181-16. [Epub ahead of print]

35. Dickinson S et al., High-glycemic index carbohydrate increases nuclear factor-kappaB activation in mononuclear cells of young, lean healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2008 May;87(5):1188-93.
36. Dimitrov S et al., Inflammation and exercise: Inhibition of monocytic intracellular TNF production by acute exercise via β_2 -adrenergic activation. *Brain Behav Immun.* 2017 Mar;61:60-68. doi: 10.1016/j.bbi.2016.12.017. Epub 2016 Dec 21.
37. Eaton M et al., Impact of a single bout of high-intensity interval exercise and short-term interval training on interleukin-6, FNDC5, and METRN mRNA expression in human skeletal muscle. *J Sport Health Sci.* 2018 Apr;7(2):191-196. doi: 10.1016/j.jshs.2017.01.003. Epub 2017 Jan 9.
38. Eisele PS et al., The peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α/β (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- κ B in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2013 Jan 25;288(4):2246-60. doi: 10.1074/jbc.M112.375253. Epub 2012 Dec 8.
39. Escoubet-Lozach L et al., Mechanisms establishing TLR4-responsive activation states of inflammatory response genes. *PLoS Genet.* 2011 Dec;7(12):e1002401. doi: 10.1371/journal.pgen.1002401. Epub 2011 Dec 8
40. Feige JN et al., From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res.* 2006 Mar;45(2):120-59. Epub 2006 Jan 25.
41. Fonseca-Alaniz MH et al., [The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 Apr;50(2):216-29. Epub 2006 May 23.

42. Friedewald WT et al., Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972 Jun;18(6):499-502.
43. Gabriel H et al., Immunoregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities. Int J Sports Med. 1992 Jul;13(5):359-66.
44. Garber CE et al., American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. Med Sci Sports Exerc. 2011 Jul;43(7):1334-59. doi: 10.1249/MSS.0b013e318213febf
45. Ghigliotti G, et al. Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions. Inflammation. 2014 Aug;37(4):1337-53. doi: 10.1007/s10753-014-9914-1.
46. Ghosh S et al., NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol. 1998;16:225-60.
47. Ginhoux F et al., Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. Nat Rev Immunol. 2014 Jun;14(6):392-404. doi: 10.1038/nri3671.
48. Grossmann V et al., Profile of the Immune and Inflammatory Response in Individuals With Prediabetes and Type 2 Diabetes. Diabetes Care. 2015 Jul;38(7):1356-64. doi: 10.2337/dc14-3008. Epub 2015 Apr 15.
49. Hallal PC et al., Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. Lancet 2012; 380 (9838): 247-57

50. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of energy status. *Endocrinology*. 2003;144:5179-83
51. Harte AL et al., High fat intake leads to acute postprandial exposure to circulating endotoxin in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2012 Feb;35(2):375-82. doi: 10.2337/dc11-1593. Epub 2011 Dec 30.
52. Hayden MS et al., NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2012 Feb 1;26(3):203-34. doi: 10.1101/gad.183434.111. Review.
53. Heck H et al., Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *Int J Sports Med*. 1985 Jun;6(3):117-30.
54. Herieka M, Erridge C. High-fat meal induced postprandial inflammation. *Mol Nutr Food Res*. 2014 Jan;58(1):136-46. doi: 10.1002/mnfr.201300104. Epub 2013 Jul 12.
55. Hirano T et al., Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. 1986 Nov 6-12;324(6092):73-6.
56. Hotamisligil GS et al., Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87-91.
57. Hotamisligil GS et al., Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87-91.
58. Husain K et al., Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem*. 2015 Aug 26;6(3):209-17. doi: 10.4331/wjbc.v6.i3.209.

59. Iizuka K et al., Skeletal muscle is an endocrine organ. *J Pharmacol Sci.* 2014;125(2):125-31. Epub 2014 May 23.
60. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990 Oct 18;347(6294):645-50.
61. Jackson AS, Pollock ML. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutr.* 1978 Nov;40(3):497-504.
62. Jankord R and Jemioło B. Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men. *Med Sci Sports Exerc.* 2004 Jun;36(6):960-4.
63. Kahraman S et al., The effect of the acute submaximal exercise on thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels in young sedentary males. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2011 Aug;17(4):414-20. doi: 10.1177/1076029610385672. Epub 2010 Nov 15.
64. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1527-34. doi: 10.1902/jop.2008.080246. Review.
65. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 2010 May;22(5):347-52. doi: 10.1093/intimm/dxq030. Epub 2010 Apr 21.
66. Kochanowicz A et al., Cellular Stress Response Gene Expression During Upper and Lower Body High Intensity Exercises. *PLoS One.* 2017 Jan 31;12(1):e0171247. doi: 10.1371/journal.pone.0171247. eCollection 2017

67. Krämer DK et al., Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPAR alpha, PPAR delta and PGC-1alpha mRNA. *Acta Physiol (Oxf)*. 2006 Nov-Dec;188(3-4):207-16.
68. Lee IM et al., Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet* 2012; 380 (9838): 219-29
69. Leesnitzer LM et al., Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry*. 2002 May 28;41(21):6640-50.
70. Leick L et al., PGC-1{alpha} is required for AICAR-induced expression of GLUT4 and mitochondrial proteins in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Sep;299(3):E456-65. doi: 10.1152/ajpendo.00648.2009. Epub 2010 Jul 13.
71. Li H et al., Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014 Nov;237(1):208-19. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001. Epub 2014 Sep 9.
72. Lira FS et al., Endotoxin levels correlate positively with a sedentary lifestyle and negatively with highly trained subjects. *Lipids Health Dis*. 2010 Aug 4;9:82. doi: 10.1186/1476-511X-9-82.
73. Lira FS et al., Sedentary subjects have higher PAI-1 and lipoproteins levels than highly trained athletes. *Diabetol Metab Syndr*. 2010 Jan 22;2:7. doi: 10.1186/1758-5996-2-7.
74. Lira FS et al., The relationship between inflammation, dyslipidemia and physical exercise: from the epidemiological to molecular approach. *Curr Diabetes Rev*. 2014;10(6):391-6.

75. Lohman TG et al. Anthropometric Standardization Reference Manual, Human Kinetics, Champaign, Illinois, 1988.
76. Manigrasso MR et al., Association between circulating adiponectin and interleukin-10 levels in android obesity: effects of weight loss. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Oct;90(10):5876-9. Epub 2005 Jul 19.
77. Mansell A et al., Dangerous liaisons between interleukin-6 cytokine and toll-like receptor families: a potent combination in inflammation and cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2013 Jun;24(3):249-56. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.03.007. Epub 2013 May 3.
78. McNelis JC et al., Macrophages, immunity, and metabolic disease. Immunity. 2014 Jul 17;41(1):36-48. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.010.
79. Mensink M et al., Improved skeletal muscle oxidative enzyme activity and restoration of PGC-1 alpha and PPAR beta/delta gene expression upon rosiglitazone treatment in obese patients with type 2 diabetes mellitus. Int J Obes (Lond). 2007 Aug;31(8):1302-10. Epub 2007 Feb 20.
80. Mercurio F et al., IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. Mol Cell Biol. 1999 Feb;19(2):1526-38.
81. Mielke GI et al., Prática de atividade física e hábito de assistir à televisão entre adultos no Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 24(2): 277-286, abr-jun 2015
82. Mifflin MD et al., A new predictive equation for resting energy expenditure in healthy individuals. Am J Clin Nutr. 1990 Feb;51(2):241-7.

83. Monsalve FA et al., Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:549627. doi: 10.1155/2013/549627. Epub 2013 May 27.
84. Moore KW et al., Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:165-90.
85. Nieman DC. The effect of exercise on immune function. *Bull Rheum Dis.* 1994 Dec;43(8):5-8.
86. Nijsten MW et al., Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet.* 1987 Oct 17;2(8564):921.
87. Nickel T et al., Immunomodulatory effects of aerobic training in obesity. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:308965. doi: 10.1155/2011/308965. Epub 2011 Mar 10.
88. Nimmo MA et al. The effect of physical activity on mediators of inflammation. *Diabetes Obes Metab.* 2013 Sep;15 Suppl 3:51-60. doi: 10.1111/dom.12156.
89. Nunn AV et al., The integration of lipid-sensing and anti-inflammatory effects: how the PPARs play a role in metabolic balance. *Nucl Recept.* 2007 May 25;5(1):1
90. Ohashi K et al., Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Jul;25(7):348-55. doi: 10.1016/j.tem.2014.03.009. Epub 2014 Apr 17.
91. Olefsky JM et al., Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:219-46. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135846.
92. Ortega E. The "bioregulatory effect of exercise" on the innate/inflammatory responses. *J Physiol Biochem.* 2016 Jun;72(2):361-9. doi: 10.1007/s13105-016-0478-4. Epub 2016 Mar 15.

93. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999 Nov 22;18(49):6853-66.
94. Papoti M et al., Tethered Swimming for the Evaluation and Prescription of Resistance training in Young Swimmers. *Int J Sports Med*. 2017 Feb;38(2):125-133. doi: 10.1055/s-0042-105017. Epub 2017 Feb 7.
95. Passlick B et al., Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989 Nov 15;74(7):2527-34.
96. Peake J et al., Changes in neutrophil surface receptor expression, degranulation, and respiratory burst activity after moderate-and high-intensity exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2004 Aug;97(2):612-8. Epub 2004 Apr 9.
97. Peake JM et al., Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. *Eur J Appl Physiol*. 2005 Dec;95(5-6):514-21. Epub 2005 Sep 6.
98. Pedersen BK et al., Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Apr 3;8(8):457-65. doi: 10.1038/nrendo.2012.49.
99. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*. 2008 Oct;88(4):1379-406. doi: 10.1152/physrev.90100.2007.
100. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Apr 3;8(8):457-65. doi: 10.1038/nrendo.2012.49.

101. Pedersen BK. Muscles and their myokines. *J Exp Biol.* 2011 Jan 15;214(Pt 2):337-46. doi: 10.1242/jeb.048074.
102. Pedersen BK. The diseasome of physical inactivity--and the role of myokines in muscle--fat cross talk. *J Physiol.* 2009 Dec 1;587(Pt 23):5559-68. doi: 10.1113/jphysiol.2009.179515. Epub 2009 Sep 14.
103. Pedersen BK et al., Exercise and interleukin-6. *Curr Opin Hematol.* 2001 May;8(3):137-41.
104. Pedersen BK et al., Recovery of the immune system after exercise. *Acta Physiol Scand* 1998; 162: 325-332
105. Petersen AM et al., The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2005 Apr;98(4):1154-62.
106. Philp A et al., Glycogen content regulates peroxisome proliferator activated receptor- δ (PPAR- δ) activity in rat skeletal muscle. *PLoS One.* 2013 Oct 17;8(10):e77200. doi: 10.1371/journal.pone.0077200. eCollection 2013.
107. Plutzky J. The potential role of peroxisome proliferator-activated receptors on inflammation in type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2003 Aug 18;92(4A):34J-41J. Review.
108. Qiao L et al., Adiponectin increases skeletal muscle mitochondrial biogenesis by suppressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Diabetes.* 2012 Jun;61(6):1463-70. doi: 10.2337/db11-1475. Epub 2012 Mar 13.
109. Qu C et al., Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *Int J*

- Infect Dis. 2014 Feb;19:1-5. doi: 10.1016/j.ijid.2013.09.023. Epub 2013 Nov 8.
110. Ramadori G et al., Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol.* 1988 Aug;18(8):1259-64.
111. Reihmane D and Dela F. Interleukin-6: possible biological roles during exercise. *Eur J Sport Sci.* 2014;14(3):242-50. doi: 10.1080/17461391.2013.776640. Epub 2013 Mar 11.
112. Rivollier A et al., Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med.* 2012 Jan 16;209(1):139-55. doi: 10.1084/jem.20101387. Epub 2012 Jan 9.
113. Rizzo G, Fiorucci S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2006 Aug;6(4):421-7. Epub 2006 Jun 13.
114. Santos CC et al., Influence to high-intensity intermittent and moderate-intensity continuous exercise on indices of cardio-inflammatory health in men. *J Exerc Rehabil.* 2016 Dec 31;12(6):618-623. doi: 10.12965/jer.1632780.390. eCollection 2016 Dec.
115. Scharhag J et al., Does prolonged cycling of moderate intensity affect immune cell function? *Br J Sports Med.* 2005 Mar;39(3):171-7; discussion 171-7.
116. Scheller J et al., The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011 May;1813(5):878-88. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034. Epub 2011 Feb 4.

117. Schmidt FM et al., Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. *PLoS One*. 2015 Mar 17;10(3):e0121971. doi: 10.1371/journal.pone.0121971. eCollection 2015.
118. Sen R et al., Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986. 46: 705-716. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):7485-96.
119. Serrano-Marco L et al., TNF- α inhibits PPAR β/δ activity and SIRT1 expression through NF- κ B in human adipocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1821(9):1177-85. doi: 10.1016/j.bbalip.2012.05.006. Epub 2012 Jun 7.
120. Silva RC et al., Physical Activity and Lipid Profile in the ELSA- Brasil Study. *Arq Bras Cardiol*. 2016 Jul;107(1):10-9. doi: 10.5935/abc.20160091. Epub 2016 Jun 23.
121. Silveira LS et al., Macrophage Polarization: Implications on Metabolic Diseases and the Role of Exercise. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2016;26(2):115-32. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2016015920.
122. Siri WE. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. 1961. *Nutrition*. 1993 Sep-Oct;9(5):480-91; discussion 480, 492.
123. Søndergaard SR et al., Changes in plasma concentrations of interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonists in response to adrenaline infusion in humans. *Eur J Appl Physiol*. 2000 Sep;83(1):95-8.
124. Sprangers S et al., Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J Immunol Res*. 2016;2016:1475435. doi: 10.1155/2016/1475435. Epub 2016 Jul 11.

125. Starkie RL et al., Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Apr;280(4):C769-74.
126. Steensberg A et al., IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Aug;285(2):E433-7.
127. Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2007 Dec;28(12):551-8. Epub 2007 Nov 5.
128. Taga T et al., Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell.* 1989 Aug 11;58(3):573-81.
129. Thomas AW et al., Exercise-associated generation of PPAR γ ligands activates PPAR γ signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism. *J Appl Physiol* (1985). 2012 Mar;112(5):806-15. doi: 10.1152/jappphysiol.00864.2011. Epub 2011 Dec 15.
130. Thomas G et al., Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Jun;35(6):1306-16. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304650. Epub 2015 Apr 2.
131. Tidball JG et al., Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010 May;298(5):R1173-87. doi: 10.1152/ajpregu.00735.2009. Epub 2010 Mar 10.
132. Tunstall RJ et al., Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Jul;283(1):E66-72.

133. Turner JD et al., Circulating CD14^{bright}CD16⁺ 'intermediate' monocytes exhibit enhanced parasite pattern recognition in human helminth infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Apr 24;8(4):e2817. doi: 10.1371/journal.pntd.0002817. eCollection 2014 Apr.
134. Tvede N et al., Effect of physical exercise on blood mononuclear cell subpopulations and in vitro proliferative responses. *Scand J Immunol*. 1989 Mar;29(3):383-9.
135. Van Beaumont W. Evaluation of hemoconcentration from hematocrit measurements. *J Appl Physiol*. 1972 May;32(5):712-3.
136. van der Poll T et al., Hypercortisolemia increases plasma interleukin-10 concentrations during human endotoxemia--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Oct;81(10):3604-6.
137. van de Vyver M et al., Neutrophil and monocyte responses to downhill running: Intracellular contents of MPO, IL-6, IL-10, pstat3, and SOCS3. *Scand J Med Sci Sports*. 2016 Jun;26(6):638-47. doi: 10.1111/sms.12497. Epub 2015 Jun 9.
138. van Furth R et al., The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*. 1968 Sep 1;128(3):415-35.
139. van Furth R et al., The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*. 1972;46(6):845-52.
140. Varfolomeev E et al., Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*. 2016 Sep 9. pii: S1043-4666(16)30489-6. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.035. [Epub ahead of print]

141. Verma SK et al., Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor- κ B. *Circulation*. 2012 Jul 24;126(4):418-29. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.112185. Epub 2012 Jun 15.
142. Wajant H et al., Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003 Jan;10(1):45-65.
143. Walsh NP et al., Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2011;17:6-63.
144. Wang JS et al., Role of exercise intensities in oxidized low-density lipoprotein-mediated redox status of monocyte in men. *J Appl Physiol* (1985). 2006 Sep;101(3):740-4. Epub 2006 May 25.
145. Warne JP. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol*. 2003 Jun;177(3):351-5.
146. Wellington K. Rosiglitazone/Metformin. *Drugs*. 2005;65(11):1581-92; discussion 1593-4.
147. Wolf AM et al., Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Oct 15;323(2):630-5.
148. Wong KL et al., The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*. 2012 Sep;53(1-3):41-57. doi: 10.1007/s12026-012-8297-3.
149. World Health Organization (WHO). Global recommendations on physical activity for health, 2011.

150. Wulster-Radcliffe MC et al., Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Apr 9;316(3):924-9
151. Xiao W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol.* 2004 Dec;1(6):425-35.
152. Yakeu G et al., Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPAR γ and Th2 cytokines. *Atherosclerosis.* 2010 Oct;212(2):668-73. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.002. Epub 2010 Jul 16.
153. Yamauchi T et al., Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002 Nov;8(11):1288-95. Epub 2002 Oct 7.
154. Yang J et al., Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014 Jan 7;2(1):1. doi: 10.1186/2050-7771-2-1.
155. Yeop Han C et al., Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation. *Diabetes.* 2010 Feb;59(2):386-96. doi: 10.2337/db09-0925. Epub 2009 Nov 23.
156. Yu C et al., The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):13600-5. Epub 2005 Feb 3.

157. Yu S, Reddy JK. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1771(8):936-51. Epub 2007 Jan 20.
158. Ziegler-Heitbrock L et al., Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558. Epub 2010 Jul 13.

11. ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Envolvimento do NF-KB e PPAR-gamma na resposta inflamatória e metabólica em monócitos de indivíduos sedentários, fisicamente ativos e treinados

Pesquisador: FABIO SANTOS LIRA

Área Temática:

Versão:

CAAE: 31168714.6.0000.5402

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 710.650

Data da Relatoria: 06/06/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado que tem por objetivo analisar a participação dos fatores de transcrição gênica PPAR-gamma e NF-KB, como possíveis reguladores chaves na interação imuno-metabólica em indivíduos com diferentes níveis de condicionamento físico: sedentários, fisicamente ativos e treinados. O pesquisador hipotetiza a participação de fatores de transcrição gênica estão diretamente envolvidas com com o estado de treinamento.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar a participação dos fatores de transcrição gênica PPAR-gamma e NF-KB, como possíveis reguladores chaves na interação imunometabólica em indivíduos com diferentes níveis de condicionamento físico: sedentários, fisicamente ativos e treinados.

Objetivo Secundário:

Em cada etapa detalhamos os experimentos necessários para o alcance dos objetivos propostos. I) Avaliar o comportamento de parâmetros metabólicos e inflamatórios em repouso, durante e após protocolo de exercício aeróbico nos três

Endereço: Rua Roberto Simonsen, 305

Bairro: Centro Educacional

CEP: 19.060-900

UF: SP

Município: PRESIDENTE PRUDENTE

Telefone: (18)3229-5315

Fax: (18)3229-5353

E-mail: cep@fct.unesp.br

Continuação do Parecer: 710.650

domínios de intensidade (moderado, pesado e severo). a) Avaliar o perfil metabólico e inflamatório. Para responder a este objetivo serão realizadas as seguintes dosagens: triacilglicerol, ácidos graxos livres, glicerol, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), glicose, insulina, cortisol, catecolaminas, inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), adiponectina, interleucina 10 (IL-10), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-); b) Avaliar a capacidade de produção de citocinas em monócitos dos diferentes grupos mediante os diferentes domínios de intensidade (moderado, pesado e severo). Para responder a este objetivo será necessário cultivar monócitos por 24 horas na presença e ausência de LPS, e em combinação com agonistas ou inibidores do PPAR-. Para avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF-) e anti-inflamatória (IL-10) no meio de incubação por ELISA. c) Avaliar a via de sinalização do NF-B em monócitos. Para responder a este objetivo iremos avaliar a expressão gênica e proteica por PCR tempo real e Western blotting do NF-Bp50 e NF-Bp65, respectivamente, e componentes downstream de sua cascata de sinalização, IKK e Iκ-B nos monócitos isolados. d) Avaliar a via de sinalização do PPAR- em monócitos. Para responder a este objetivo iremos avaliar a expressão gênica e proteica por PCR tempo real e Western blotting do PPAR-, respectivamente, e componentes downstream de sua cascata de sinalização, PGC-1 e RXR, nos monócitos isolados. e) Avaliar a expressão gênica e proteica de ABCA-1, CETP e L-CAT em monócitos com intuito de elucidar os efeitos sobre proteínas envolvidas no transporte reverso do colesterol.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador afirma que os riscos da pesquisa são considerados mínimos e que todos os procedimentos serão realizados por equipe qualificada. Afirma ainda que é possível que exercício proposto cause dores ou desconfortos, porém esses são classificados como de baixa magnitude e curta duração.

Com relação ao benefício, o pesquisador reitera as vantagens de realizar o exercício físico. Cabe destacar nesse item que o pesquisador deveria se atentar quanto ao benefício que esse projeto pode trazer a comunidade científica, destacando isso para o participante.

Endereço: Rua Roberto Simonsen, 305

Bairro: Centro Educacional

CEP: 19.060-900

UF: SP

Município: PRESIDENTE PRUDENTE

Telefone: (18)3229-5315

Fax: (18)3229-5353

E-mail: cep@fct.unesp.br

Continuação do Parecer: 710.650

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta-se bem sustentado e não fere os critérios éticos da Resolução 466/12. O mesmo não apresenta riscos capazes gerar transtornos de qualquer natureza ao participante.

Ainda nesse mesmo sentindo, cabe destacar o cuidado do pesquisador frente ao participante, quando o mesmo utiliza-se do cuidado médico durante as avaliações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Segue a avaliação dos termos de apresentação obrigatória:

TCLE: presente e correto;

Autorização do local: presente e correto;

Termo de compromisso: presente e correto;

Folha de rosto: presente e correto.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando os comentários realizados anteriormente, considerado o projeto como APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado ad referendum do CEP.

PRESIDENTE PRUDENTE, 07 de Julho de 2014

Assinado por:
Edna Maria do Carmo
(Coordenador)

Endereço: Rua Roberto Simonsen, 305

Bairro: Centro Educacional

CEP: 19.060-900

UF: SP

Município: PRESIDENTE PRUDENTE

Telefone: (18)3229-5315

Fax: (18)3229-5353

E-mail: cep@fct.unesp.br

Presidente Prudente, 04 de julho de 2014.

Ilmo.(a) Sr.(a)

Fabio Santos Lira

Ref. Projeto intitulado: "Envolvimento do NF-KB e PPAR-gamma na resposta inflamatória e metabólica em monócitos de indivíduos sedentários, fisicamente ativos e treinados".

CAAE: 31168714.6.0000.5402

Recebemos os documentos referentes ao projeto acima, os quais foram analisados e estão de acordo com as solicitações.

Decorrente do exposto, o projeto foi **APROVADO**, *ad-referendum* do Comitê de Ética em Pesquisa.

Lembramos que os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), assinados, deverão permanecer em poder do pesquisador responsável pelo período mínimo de 5 anos após o encerramento do estudo, para eventual fiscalização da CONEP.

Informamos que eventuais emendas (proposta de modificação no projeto inicial) e extensões (proposta de prorrogação ou continuidade da pesquisa) devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e suas justificativas. Entretanto, se houver modificações importantes de objetivos e métodos deve ser apresentado outro protocolo de pesquisa.

Atenciosamente,


PI Prof. Dra. Edna Maria do Carmo
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “Envolvimento do NF- κ B e PPAR- γ na resposta inflamatória e metabólica em monócitos de indivíduos sedentários, fisicamente ativos e treinados”.

Nome do (a) Pesquisador (a): Fábio Santos Lira

Nome do (a) Orientador (a): Fábio Santos Lira

1. **Natureza da pesquisa:** o sra (sr.) está sendo convidada (o) a participar desta pesquisa que tem como finalidade analisar a participação dos fatores de transcrição gênica PPAR- γ e NF- κ B, como possíveis reguladores chaves na interação imuno-metabólica em indivíduos com diferentes níveis de condicionamento físico: sedentários, fisicamente ativos e treinados.
2. **Participantes da pesquisa:** 30 indivíduos adultos do sexo masculino, que serão distribuídos em grupos de 10 indivíduos, de acordo com o nível de atividade física: sedentários, fisicamente ativos, e treinados.
3. **Envolvimento na pesquisa:** ao participar deste estudo a Sr permitirá que o (a) pesquisador (a) realize inicialmente um teste ergoespirométrico para determinar o consumo pico de oxigênio em cicloergômetro (bicicleta ergométrica) e a Máxima Fase Estável do Lactato, assim como três sessões de exercício aeróbio até a exaustão voluntária ou completar 1 hora em uma intensidade correspondente a 90% da Máxima Fase Estável do Lactato. Haverá coleta de amostras sanguíneas no momento basal (antes da sessão), durante o teste e a recuperação após o esforço (imediatamente após o esforço, após 30 e 60 minutos).
4. **Riscos e desconforto:** a participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas (podendo eventualmente causar dores ou desconfortos causados pelo exercício físico). Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.
5. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o (a) pesquisador (a) e seu (sua) orientador (a) (e/ou equipe de pesquisa) terão conhecimento de sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa: Profa. Dra. Edna Maria do Carmo

Vice-Coordenadora: Profa. Dra. Renata Maria Coimbra Libório

Telefone do Comitê: 3229-5315 ou 3229-5526

E-mail cep@fct.unesp.br

6. **Benefícios:** ao participar desta pesquisa o Sr. não terá nenhum benefício direto. Entretanto, o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos para o participante, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior.
7. **Pagamento:** o Sr não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

O Sr. tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o Sr.. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa por meio do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário por meio do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem: Confiro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Orientador

Pesquisador: Fábio Santos Lira, contato: (18) 3229-5826

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa: Profa. Dra. Edna Maria do Carmo
Vice-Coordenadora: Profa. Dra. Renata Maria Coimbra Libório
Telefone do Comitê: 3229-5315 ou 3229-5526
E-mail cep@fct.unesp.br



QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – VERSÃO CURTA

Nome: _____

Data: ____/____/____ Idade : ____ Sexo: F () M ()

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são MUITO importantes. Por favor, responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação!

Para responder as questões lembre que:

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

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

1b Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo, pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias_____por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas:_____Minutos: _____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias_____por **SEMANA** () Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas:_____Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentado durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?

_____horas_____minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?

_____horas_____minutos

NOME: _____
IDADE: _____

FORMULÁRIO DE REGISTRO ALIMENTAR

Anote: data, hora, descreva detalhadamente o alimento e a quantidade consumida (como no exemplo abaixo).

Anotar logo após o consumo. NÃO ALTERAR SUA ROTINA ALIMENTAR, é muito importante que todos os alimentos sejam anotados e suas quantidades conforme o consumo e a orientação

Exemplo:

HORA	ALIMENTO	QUANTIDADE
7:00	Pão francês	1
	Manteiga	1 colher de chá
	Leite integral	1 copo tipo requeijão
	Achocolatado	2 colheres de sopa
12:30	Arroz	4 colheres de sopa
	Bife (com gordura)	1 unidade média

HORA	QUANTIDADE	ALIMENTO

	QUANTIDADE	ALIMENTO