



JULIANA PAULA LEITE

**O efeito do treinamento físico sobre a resistência à  
insulina em animais tratados com dieta hiperlipídica:  
modulações de fatores inflamatórios sobre o tecido  
adiposo branco e marrom de ratos *Wistar*.**

Campinas

2014







---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

JULIANA PAULA LEITE

O efeito do treinamento físico sobre a resistência à insulina  
em animais tratados com dieta hiperlipídica: modulações de  
fatores inflamatórios sobre o tecido adiposo branco e  
marrom de ratos *Wistar*.

Orientador: Profº. Drº. Mario José Abdalla Saad

Coorientador: Drº. Alexandre Gabarra de Oliveira

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de  
Mestra em Ciências Médicas.

Este exemplar corresponde à versão final da tese  
defendida pela aluna Juliana Paula Leite e orientada pelo  
Profº. Drº. Mario José Abdalla Saad.

Campinas

2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

L536e

Leite, Juliana Paula, 1982-

O efeito do treinamento físico sobre a resistência à insulina em animais tratados com dieta hiperlipídica : modulações de fatores inflamatórios sobre o tecido adiposo branco e marrom de ratos Wistar / Juliana Paula Leite.. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Mario Jose Abdalla Saad.  
Coorientador : Alexandre Gabarra de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tecido adiposo branco. 2. Tecido adiposo marrom. 3. Atividade física. I. Saad, Mario Jose Abdalla, 1956-. II. Oliveira, Alexandre Gabarra de, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** The effect of exercise training on insulin resistance in animals treated with high-fat diet : modulation on inflammatory factors over white and brown adipose tissue of rats Wistar

**Palavras-chave em inglês:**

White adipose tissue

Brown adipose tissue

Physical activity

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Títuloção:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Mario Jose Abdalla Saad [Orientador]

Mara Patricia Traina Chacon Mikahil

Jose Antonio Rocha Gontijo

**Data de defesa:** 16-04-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

JULIANA PAULA LEITE

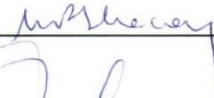
Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIO JOSE ABDALLA SAAD

### MEMBROS:

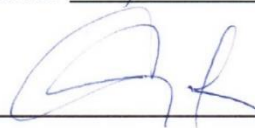
1. PROF(A). DR(A). MARIO JOSE ABDALLA SAAD



2. PROF(A). DR(A). MARA PATRICIA TRAINA CHACON MIKAHIL



3. PROF(A). DR(A). JOSE ANTONIO ROCHA GONTIJO



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 16 de abril de 2014



## **DEDICATÓRIA**

*À minha família, única e essencial.*

*Aos meus queridos pais, sempre presentes, Regina e Roberto.*

*Às minhas irmãs e amigas, Janaína e Patrícia, ao meu sobrinho, Diego, amor  
incondicional.*

*Ao meu melhor amigo, noivo, e companheiro para todas as horas, Vitor.*



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad, pela oportunidade, competência e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Alexandre Gabarra de Oliveira, pela confiança, amizade e companheirismo de muitos anos, pela orientação de cada experimento, pela paciência em ensinar, por não desistir, por escutar minhas dúvidas e meus anseios e mostrar que cada um pode ir em busca de seu sonho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por conceder minha bolsa de mestrado e auxílio do projeto permitindo que tudo isso se realizasse.

Aos colegas do laboratório Marília, Francine, Maria Carol, Luciene, Sandra, Juliana Alves, Angélica, Kelly e Luís, que sempre estiveram dispostos para solucionar dúvidas e ajudar quando necessário.

À Natália que com toda paciência e dedicação fez hora extra no hospital, ficando tarde da noite comigo para realização do teste de composição corporal em meus animais.

À Érica do Cemib, que sempre atendeu meus pedidos com toda simpatia e paciência.

Ao Marino, Antônio e Zé, que durante todo o meu trabalho cuidaram bem dos animais experimentais, sempre me ajudaram a solucionar qualquer problema e todos os dias me receberam com muita simpatia e disponibilidade. Pessoas assim fazem toda a diferença!

Ao Sr. Luís Janeri e Sr. Jósimo Pinheiro, funcionários do Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina (LICRI), sempre prestativos, pelo constante suporte e apoio.

À Regina, secretária da pós-graduação, que sempre foi acessível ajudando em qualquer dúvida necessária.

À minha banca de qualificação, Prof Dr. José Rodrigo Pauli, Dr. Rodrigo Miguel Marim e Dr. Andrey Santos, por suas críticas e sugestões a fim de melhorar meu projeto.

À minha banca de defesa da tese de mestrado, Prof Dr. José Antônio Rocha Gontijo e Profa Mara Patrícia Chacon-Mikahil, pelas contribuições para finalização deste trabalho e publicação do manuscrito.

Aos animais que não morreram em vão e fizeram parte desse projeto.

Aos amigos conquistados no LICRI, em especial à Juliana, Carol, Patrícia, Any, Dioze, Bruno, Tiago e Guilherme, tão queridos, que sempre estiveram dispostos a esclarecer minhas dúvidas e ajudar no meu processo de aprendizagem, que tornaram os dias inacabáveis de experimentos mais fáceis e divertidos e colaboraram para realização desse projeto.

Às minhas queridas amigas, Mayra, Marcela e Ananda, amizade para toda vida, que me acompanham a cada passo conquistado e me apoiam nos períodos difíceis e alegres.

Aos professores que fizeram parte da minha formação, contribuíram para o meu conhecimento e me inspiraram a buscar meus objetivos.

À minha família pelo apoiou para que eu concretizasse mais uma etapa da minha vida, pela paciência nos dias mais difíceis e exaustivos, pelo carinho do dia a dia e por todo cuidado comigo.

Ao meu noivo por me apoiar desde o início, por estar ao meu lado fazendo com que tudo sempre pareça mais fácil, por ser meu porto seguro, por me entender tão bem e por me proporcionar momentos inesquecíveis.



“Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão, perder com classe  
e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a  
quem se atreve e a vida é "muito" para ser  
insignificante.”

*Augusto Branco*



## RESUMO



A obesidade representa o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças como diabetes tipo 2, dislipidemia, esteatose hepática, doenças vasculares e alguns tipos de cânceres. Embora o aumento do tecido adiposo seja a principal característica da obesidade, nem todo depósito de gordura é prejudicial. Isso se deve ao fato do tecido adiposo ser subdividido em dois tipos: branco e marrom, os quais apresentam características bem distintas. O tecido adiposo branco estoca energia na forma de triglicerídeos, produz a secreção de vários tipos de citocinas inflamatórias e o seu aumento está associado a um estado inflamatório subclínico do organismo. Já o tecido adiposo marrom é especializado na dissipação da energia em forma de calor, estudos vêm mostrando a sua associação com a melhora da resistência à insulina e menor índice de massa corporal, por isso, o seu aumento pode ser potencial alvo para o tratamento de síndromes metabólicas. Paralelamente, estudos comprovaram que o exercício físico, quando praticado de forma crônica, pode exercer importante efeito anti-inflamatório nos obesos. Este efeito está associado à redução da massa de tecido adiposo branco e estudos comprovaram que o exercício também é capaz de promover o aumento da massa do tecido adiposo marrom. No entanto, ainda não está claro quais os mecanismos envolvidos para tais benefícios. Diante disso, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito profilático do exercício crônico sobre a massa do tecido adiposo (branco e marrom), marcadores inflamatórios e resistência à insulina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Além de verificar os mecanismos pelos quais o exercício é capaz de aumentar a atividade termogênica do tecido adiposo marrom. Para isso, utilizamos ratos *Wistar*, divididos em 3 grupos: animais alimentados com dieta padrão para roedores (CTL), animais alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) e animais alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento de natação (EXE). O protocolo de treinamento utilizado foi de 8 semanas. Nossos resultados mostraram que o exercício crônico de 8 semanas foi capaz de atenuar o desenvolvimento da massa de gordura e a expressão das proteínas de formação do tecido adiposo branco (TAB); apresentou efeito protetor contra a intolerância à glicose e RI. Fora também observado a redução dos circulantes de LPS, TNF- $\alpha$  e AGLs, além da expressão das serinas quinases JNK E IKK. Além disso, os dados demonstram ainda o efeito positivo do exercício na via de sinalização da insulina; aumento da massa do tecido adiposo marrom (TAM) e da expressão de proteínas envolvidas no

processo de termogênese. Por último, verificamos que o exercício crônico foi capaz de atenuar a infiltração de macrófagos no TAM e promover maior polarização de macrófagos do tipo M2 no TAM. A partir dessas análises, podemos entender em parte que o exercício físico, quando aplicado antes do estabelecimento da obesidade, é capaz de atenuar o quadro de resistência à insulina e os efeitos deletérios da inflamação causada pela dieta hiperlipídica. Além de contribuir para a maior atividade do TAM através de um mecanismo orquestrado pela ativação alternativa de macrófagos.

# **ABSTRACT**





Obesity is a major risk factor for the development of diseases such as type 2 diabetes, dyslipidemia, fatty liver, vascular disease and some cancers. Although the increase in adipose tissue is a hallmark of obesity, not every deposit of fat is harmful. This is because adipose tissue is subdivided into two types: white and brown, which have very different characteristics. White adipose tissue stocks energy in the form of triglycerides, and it is responsible to the secretion of various cytokines and their increase is associated with a proinflammatory state of the organism. As brown adipose tissue is specialized in the dissipation of energy as heat, studies have shown its association with improved insulin resistance and lower body mass index. Therefore, its increase may be a potential target for the treatment of metabolic syndromes. In parallel, studies have shown that chronic exercise may have an important anti-inflammatory effect on obesity due to a reduction mass of white adipose tissue and the capacity to promote the increased mass of brown adipose tissue. However, it remains unclear which mechanisms are involved for such benefits. Therefore, the aim of our study was to evaluate the prophylactic effect of chronic exercise on the mass of adipose tissue (white and brown), inflammatory markers and insulin resistance in high-fat diet rats. Besides, our study verified the mechanisms by which exercise can increase the thermogenic activity of brown adipose tissue. For this, we used 6 weeks male Wistar rats, which were divided into 3 groups as follows: animals fed with standard rodent diet (CTL) animals fed with high fat diet (HFD) and animals fed with high fat diet and submitted to swimming training (EXE). The training protocol used was 8 weeks. Our results showed that 8 weeks of chronic exercise was able to attenuate the development of fat mass and protein expression formation of white adipose tissue (WAT). It was also shown a protective effect against glucose intolerance and insulin and observed a reduction of circulating LPS, TNF- $\alpha$  and FFA, in addition to the expression of serine kinases JNK and IKK. The results also demonstrate the positive effect of exercise on insulin signaling pathway, increasing the mass of brown adipose tissue (BAT) and the expression of proteins involved in the thermogenesis process, which resulted in higher accumulation of fat in the adipocytes of TAM. Finally, we found that chronic exercise was able to attenuate the infiltration of macrophages in the TAM and promote greater polarization of the type M2 macrophages in TAM. From these analyses, we can understand in part that exercise, when applied before the onset of obesity, is able to

attenuate the context of insulin resistance and the deleterious effects of inflammation caused by high-fat diet, contributing to the higher activity of TAM through an alternative orchestrated macrophage activation mechanism.

## LISTA DE TABELAS

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Composição da Dieta Padrão e da Dieta hiperlipídica. | 45 |
|------------------------------------------------------------------------|----|



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> Projeção da prevalência da obesidade ( $IMC \geq 30\text{kg/m}^2$ ) nos Estados Unidos, Austrália, Ilhas Maurício, Austrália e Brasil. Adaptado: Kopelman. 2000. | 27 |
| <b>Figura 2-</b> Estado de polarização dos macrófagos em indivíduos obesos e magros. Adaptado: dados suplementares, Oliveira <i>et al</i> , 2013.                                 | 35 |
| <b>Figura 3-</b> Ativação alternativa de macrófagos no tecido adiposo branco e marrom. Adaptado: Whittle e Vidal-Puig, 2011.                                                      | 38 |
| <b>Figura 4-</b> Caracterização temporal.                                                                                                                                         | 56 |
| <b>Figura 5-</b> Caracterização da adiposidade.                                                                                                                                   | 57 |
| <b>Figura 6-</b> Desenvolvimento do tecido adiposo branco.                                                                                                                        | 59 |
| <b>Figura 7-</b> Caracterização da tolerância à glicose.                                                                                                                          | 60 |
| <b>Figura 8-</b> Caracterização da tolerância à insulina.                                                                                                                         | 61 |
| <b>Figura 9-</b> Níveis séricos de insulina.                                                                                                                                      | 62 |
| <b>Figura 10-</b> Via de sinalização da Insulina no tecido adiposo branco.                                                                                                        | 64 |
| <b>Figura 11-</b> Níveis circulantes de, LPS e TNF- $\alpha$ e Ácidos graxos livres.                                                                                              | 65 |
| <b>Figura 12-</b> Vias inflamatórias das serinas quinases IKK $\beta$ e JNK no tecido adiposo branco.                                                                             | 67 |
| <b>Figura 13-</b> Níveis circulantes de IL-10.                                                                                                                                    | 68 |
| <b>Figura 14-</b> Caracterização do crescimento do tecido adiposo marrom.                                                                                                         | 69 |
| <b>Figura 15-</b> Expressão das proteínas UCP-1 e TH no Tecido Adiposo Marrom.                                                                                                    | 71 |
| <b>Figura 16-</b> Caracterização morfológica do tecido adiposo marrom.                                                                                                            | 73 |
| <b>Figura 17-</b> Caracterização da infiltração de macrófagos.                                                                                                                    | 74 |
| <b>Figura 18-</b> Caracterização da polarização de macrófagos.                                                                                                                    | 76 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

|              |                                          |
|--------------|------------------------------------------|
| AGLs         | Ácidos graxos livres                     |
| Akt          | Proteína quinase B                       |
| ANOVA        | Análise de variância                     |
| C/EBPs       | Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT |
| CTL          | Controle                                 |
| DH           | Dieta hiperlipídica                      |
| DM2          | Diabetes Mellitus tipo 2                 |
| ELISA        | Ensaio imunoenzimático                   |
| EXE          | Exercício                                |
| GLUT4        | Transportador de glicose 4               |
| GTT          | Teste de tolerância à glicose            |
| IB           | Imunoblot                                |
| IKK $\beta$  | inibidor do fator nuclear kappa B        |
| IL-6         | Interleucina-6                           |
| IL-10        | Interleucina-10                          |
| IMC          | Índice de massa corporal                 |
| INF $\gamma$ | Interferon $\gamma$                      |
| IR           | Receptor da insulina                     |
| IRS          | Substrato para o receptor da insulina    |

|               |                                                         |
|---------------|---------------------------------------------------------|
| ITT           | Teste de tolerância à insulina                          |
| JNK           | c-Jun-N-terminal quinase                                |
| LPS           | Lipopolissacarídeo                                      |
| M1            | Ativação clássica de macrófago                          |
| M2            | Ativação alternativa de macrófago                       |
| MCP-1         | Proteína quimioatraente para monócitos-1                |
| NFκB          | Fator nuclear kappa B                                   |
| PI3k          | Fosfatidilinositol 3-quinase                            |
| PPAR $\gamma$ | Receptor para peroxissomo proliferador-ativado          |
| RI            | Resistência à insulina                                  |
| SREBP-1c      | Proteína 1c ligadora do elemento regulador por esteróis |
| TAB           | Tecido adiposo branco                                   |
| TAM           | Tecido adiposo marrom                                   |
| TGF- $\beta$  | Fator de transformação do crescimento $\beta$           |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral $\alpha$                       |



## Sumário

|                                                                               |      |
|-------------------------------------------------------------------------------|------|
| RESUMO .....                                                                  | xiii |
| ABSTRACT .....                                                                | xvii |
| 1- INTRODUÇÃO .....                                                           | 29   |
| 1.1 Obesidade.....                                                            | 31   |
| 1.2 Via de sinalização da insulina e resistência.....                         | 33   |
| 1.3 Tecido Adiposo .....                                                      | 34   |
| 1.3.1 Tecido Adiposo Branco.....                                              | 34   |
| 1.3.2 Tecido Adiposo Marrom.....                                              | 39   |
| 1.4 Exercício .....                                                           | 42   |
| 2- OBJETIVOS.....                                                             | 45   |
| 2.1- Gerais .....                                                             | 47   |
| 2.2- Específicos .....                                                        | 47   |
| 3- MATERIAL E MÉTODOS .....                                                   | 49   |
| 3.1- Animais .....                                                            | 51   |
| 3.2- Modelo de obesidade .....                                                | 51   |
| 3.3- Divisão dos grupos .....                                                 | 52   |
| 3.4- Protocolo de treinamento físico crônico .....                            | 52   |
| 3.5- Determinação da massa corporal .....                                     | 52   |
| 3.6- Controle de Ingestão .....                                               | 52   |
| 3.7- DEXA.....                                                                | 53   |
| 3.8- Dosagem sérica dos níveis de glicose .....                               | 53   |
| 3.9- Teste de tolerância glicose (GTT) .....                                  | 53   |
| 3.10- Teste de tolerância à insulina (ITT) .....                              | 53   |
| 3.11- Sacrifício e Extração dos Tecidos Adiposos Branco e Marrom .....        | 54   |
| 3.12- Parâmetros Fisiológicos .....                                           | 54   |
| 3.12.1 - Dosagem sérica dos níveis de insulina .....                          | 54   |
| 3.12.2- Análise bioquímica dos níveis séricos de AGLs .....                   | 54   |
| 3.12.3- Dosagem sérica dos níveis de citocinas (IL-10 e TNF- $\alpha$ ) ..... | 55   |
| 3.12.4- Dosagem sérica de LPS.....                                            | 55   |
| 3.13- Extração dos tecidos .....                                              | 55   |

|                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.14- Análise da expressão das proteínas.....                                                                                                       | 56  |
| 3.14.1- Eletroforese.....                                                                                                                           | 56  |
| 3.14.2- Immunoblotting ou Westernblotting.....                                                                                                      | 58  |
| 3.15- Microscopia óptica.....                                                                                                                       | 59  |
| 3.16- Imunofluorescência.....                                                                                                                       | 59  |
| 3.17- Análise Estatística.....                                                                                                                      | 59  |
| 4- RESULTADOS.....                                                                                                                                  | 61  |
| 4.1- Caracterização Temporal.....                                                                                                                   | 63  |
| 4.2- Caracterização da Adiposidade.....                                                                                                             | 64  |
| 4.3- Desenvolvimento do Tecido Adiposo Branco.....                                                                                                  | 65  |
| 4.4- Parâmetros Metabólicos e Via de Sinalização da Insulina.....                                                                                   | 67  |
| 4.4.1- Testes de tolerância à glicose (GTT).....                                                                                                    | 67  |
| 4.4.2- Testes de tolerância à insulina (ITT).....                                                                                                   | 68  |
| 4.4.3- Dosagem Sérica dos níveis de insulina.....                                                                                                   | 69  |
| 4.4.4- Expressão das proteínas totais e fosforiladas (IR $\beta$ , IRS-1 e Akt) envolvidas na sinalização da insulina no tecido adiposo branco..... | 70  |
| 4.5- Parâmetros Metabólicos e Vias Inflamatórias.....                                                                                               | 72  |
| 4.5.1- Dosagem sérica dos níveis de LPS, TNF $\alpha$ e Ácidos graxos livres.....                                                                   | 72  |
| 4.5.2- Expressão das proteínas totais e fosforiladas IKK $\beta$ e JNK no tecido adiposo branco.....                                                | 73  |
| 4.6- Parâmetros Metabólicos anti-inflamatórios.....                                                                                                 | 75  |
| 4.6.1- Dosagem sérica dos níveis de IL-10.....                                                                                                      | 75  |
| 4.7- Tecido Adiposo Marrom.....                                                                                                                     | 76  |
| 4.7.1- Caracterização do TAM.....                                                                                                                   | 76  |
| 4.7.2- Expressão das proteínas totais UCP-1 e TH.....                                                                                               | 77  |
| 4.7.3- Morfologia do TAM.....                                                                                                                       | 79  |
| 4.7.4- Infiltração de macrófagos.....                                                                                                               | 80  |
| 4.7.5- Polarização do tipo M2.....                                                                                                                  | 82  |
| 5- DISCUSSÃO.....                                                                                                                                   | 85  |
| 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                                                  | 97  |
| 7- ANEXOS.....                                                                                                                                      | 111 |

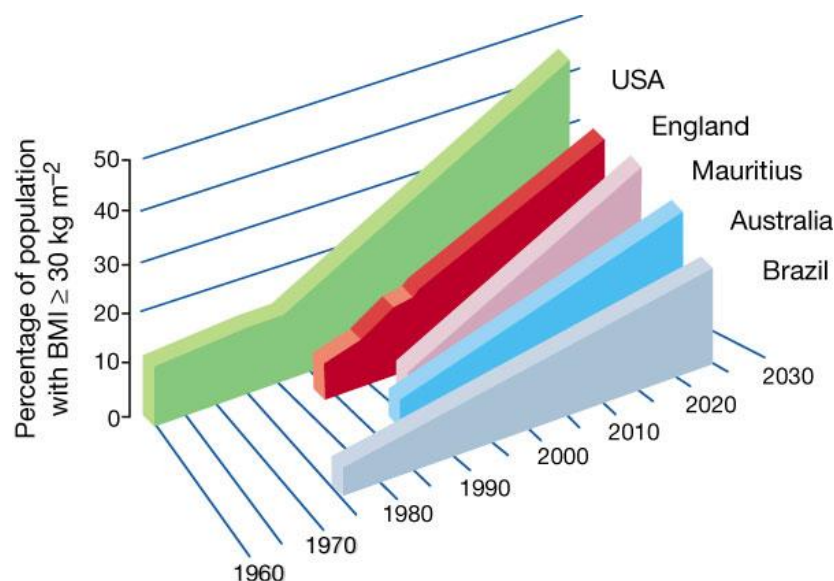
# **1- INTRODUÇÃO**



# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade

Atualmente, a obesidade é considerada uma epidemia mundial, visto que, projeções feitas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam para prevalências maiores que 50% nos Estados Unidos e maiores que 25% no Brasil, no ano de 2025 (Figura 1) (Kopelman, 2000). A obesidade pode ser caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, com potencial prejuízo à saúde, decorrente de vários fatores como os genéticos e ambientais, que envolvem padrões dietéticos e de atividade física ou ainda fatores individuais de susceptibilidade biológica (Kopelman, 2000). Para o seu diagnóstico, o método mais comumente utilizado é o Índice de Massa Corporal (IMC), obtido por meio da fórmula que combina peso e altura ( $IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$ ). Segundo a OMS, o diagnóstico é feito da seguinte forma: sobrepeso,  $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ ; pré-obesidade,  $IMC 25 \text{ à } 29,9 \text{ Kg/m}^2$ ; obesidade grau I,  $IMC 30 \text{ à } 34,9 \text{ Kg/m}^2$ ; obesidade grau II,  $IMC 35 \text{ à } 39,9 \text{ Kg/m}^2$  e obesidade grau III com  $IMC \geq 40 \text{ Kg/m}^2$  (ABESO, 2009).



**Figura 1-** Projeção da prevalência da obesidade ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) nos Estados Unidos, Austrália, Ilhas Maurício, Austrália e Brasil. Adaptado: Kopelman. Nature, v. 40, p. 635-643, 2000.

A obesidade também apresenta-se como fator determinante no desenvolvimento de inúmeras doenças, dentre elas: hiperinsulinemia, resistência à insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemias, doença coronariana, doença da vesícula biliar e alguns tipos de cânceres (Jakicic e Otto, 2005). Evidências apontam a inflamação como principal elo de ligação entre obesidade e RI, sendo esta relação considerada fator crucial para o desenvolvimento da DM2 (Wellen e Hotamisligil, 2005; Cani *et al.*, 2007). Consequentemente, o aumento da incidência de obesidade resulta em crescimento dos casos de RI. Tal resistência é destacada não só por reduzir o transporte e metabolismo da glicose tanto nos adipócitos quanto no músculo esquelético e musculatura lisa vascular, mas também por comprometer a regulação da produção hepática de glicose (Reaven, 1995, Stumvoll *et al.*, 2005). Nesse sentido, a ativação de vias inflamatórias parece modular negativamente a via de sinalização à insulina nos principais tecidos sensíveis à ação desse hormônio (Wellen e Hotamisligil, 2005). Entretanto, os mecanismos para a ativação das vias inflamatórias induzidas pela obesidade, bem como, em que tecido esta inflamação se inicia, ainda não foram totalmente elucidados.

A dieta rica em gordura saturada é um fator determinante no desenvolvimento da obesidade, pois, além de conduzir a um balanço energético positivo, promover aumento do tecido adiposo e consequentemente do peso corporal, pode ainda desencadear um processo inflamatório sobre alguns tecidos, dentre os quais o adiposo apresenta um certo destaque (Calder e Grimble, 2002). O estado de inflamação do tecido adiposo leva a uma alteração na secreção de vários tipos de hormônios (como, leptina e adiponectina), citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, dentre outras) e outras proteínas que podem modular a homeostase energética (Wellen e Hotamisligil, 2005). Algumas dessas substâncias possuem efeitos sistêmicos e podem causar RI em várias células e tecidos responsivos a esse hormônio (Bastard *et al.*, 2006).

## 1.2 Via de sinalização da insulina e resistência

Em condições fisiológicas a sinalização intracelular da insulina inicia-se após a sua ligação ao receptor específico de membrana, denominado receptor de insulina (IR). Trata-se de, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades alfa ( $\alpha$ ) e duas subunidades beta ( $\beta$ ) (Saltiel e Kahn, 2001). As subunidades  $\alpha$  encontram-se extracelularmente, enquanto as subunidades  $\beta$  são proteínas transmembranas. A insulina liga-se a porção  $\alpha$  do seu receptor, estimulando a autofosforilação das subunidades  $\beta$ , que apresentam atividade tirosina quinase intrínseca. A ativação do IR estimula a fosforilação em tirosina de diversos substratos, entre eles, o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e 2 (IRS-2) (Hotamisligil *et al.*, 1996). A fosforilação das proteínas IRSs permite a criação de sítios de ligação para outras proteínas como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), promovendo sua ativação. A ativação da PI3K aumenta a fosforilação em serina da proteína serina/treonina quinase B (Akt). A Akt atua aumentando a captação periférica de glicose principalmente no tecido muscular e adiposo por aumentar a translocação dos transportadores de glicose (GLUTs), do citoplasma para a membrana plasmática, o que resulta em captação celular de glicose por difusão facilitada após a ingestão alimentar (Abel *et al.*, 2001).

A RI é caracterizada pela dificuldade dos tecidos metabólicos - como tecido adiposo, fígado e músculo, em responder as ações anabólicas da insulina, uma particularidade característica das disfunções metabólicas induzidas pela obesidade (Kahn e Flier, 2000). Esta resistência manifesta-se como uma redução na captação de glicose no músculo, o que leva ao aumento da lipólise de triglicerídeos do tecido adiposo, resultando em hiperinsulinemia, hiperglicemia e hiperlipidemia (Shulman, 2000). Sabe-se que a RI é um importante mecanismo fisiopatológico do DM2 (Gregor e Hotamisligil, 2011, Donath e Shoelson, 2011, Harcourt *et al.*, 2013), a qual em muitos casos, está associada a uma complexa rede de vias de sinalização, incluindo redução da fosforilação em tirosina do IR e seus substratos (IRS1/2), bem como redução da fosforilação em serina de Akt, nos tecidos-alvo da insulina (Pessin e Saltiel, 2000, Saltiel e Kahn, 2001, Boura-Halfon e Zick, 2009). O mecanismo responsável por tal alteração é a ativação crônica de algumas serinas quinases, tais como c-Jun N-terminal quinase (JNK) e inibidor da quinase do fator de transcrição NF $\kappa$ B (IKK $\beta$ ),

que podem originar a RI induzida pela obesidade, principalmente por promover fosforilação em serina do IRS-1 (Shoelson *et al.*, 2006, Solinas e Karin, 2010).

O aumento na massa do TAB pode desencadear a RI, através da maior produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) e a proteína quimioatraente para monócitos-1 (MCP-1), que além de ativarem as vias inflamatórias da JNK e IKK $\beta$ , também podem aumentar a infiltração de macrófagos, para este tecido, bem como alterar a polarização dessas células para o estado inflamatório (mudança do fenótipo M2-alternativo para M1-clássico) (Lumeng *et al.*, 2007). Somado a isso, o excesso de nutrientes favorece o acúmulo de ácidos graxos livres (AGLs), e de lipopolissacarídeos (LPS), agravando o quadro de resistência à insulina (Hirosumi *et al.*, 2002, Wellen e Hotamisligil, 2005). Sendo assim, a diminuição desses fatores citados podem contribuir para a melhora da homeostase e sensibilização da insulina.

### **1.3 Tecido Adiposo**

Embora o aumento do tecido adiposo seja a principal característica da obesidade, nem todo depósito de gordura é prejudicial. Isso se deve ao fato do tecido adiposo ser subdividido em dois tipos: branco e marrom, os quais apresentam características bem distintas (Saely *et al.*, 2012).

#### **1.3.1 Tecido Adiposo Branco**

O desenvolvimento do tecido adiposo nos seres humanos inicia-se a partir do segundo trimestre de gestação e torna-se mais proeminente do último trimestre até os primeiros meses após o nascimento como resultado do aumento do tamanho e número de células (Poissonnet *et al.*, 1984). A capacidade de proliferação das células precursoras do tecido adiposo subcutâneo é mais elevada durante o primeiro ano de vida e antes da puberdade (Hauner, 2004). Sendo assim, o período da infância é altamente sensível ao excesso de ingestão de dietas ricas em gordura saturada, pois nele o tecido adiposo pode se expandir dramaticamente. No entanto, o potencial de gerar novas células de gordura persiste mesmo na fase adulta, principalmente por influência de dietas ricas em gordura saturada, que



induzem inicialmente a hipertrofia dos adipócitos e podendo em alguns casos, como a obesidade, levar a hiperplasia dessas células (Ailhaud *et al.*, 2006).

O processo para aumento das células do tecido adiposo é conhecido como adipogênese e envolve a interação de fatores de transcrição e do ciclo celular, proteínas reguladoras de expressão gênica, levando ao desenvolvimento dos adipócitos. (Lefterova e Lazar, 2009; Armani *et al.*, 2010)

Os pré- adipócitos são linhagens celulares, derivadas de células tronco embrionárias de origem mesodérmica, que possuem a capacidade de se proliferar e diferenciar em adipócitos maduros, condrócitos, osteoblastos e miócitos. Esta ação confere ao tecido adiposo constante plasticidade funcional, o que determina a sua capacidade de expansão durante toda a vida (Sethi e Vidal-Puig, 2007). A diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos é um processo altamente controlado. Dessa forma, fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR $\gamma$ ), a proteína 1c ligadora do elemento regulador por esteróis (SREBP-1c) e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBPs) desempenham um papel chave na complexa cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese (Lefterova e Lazar, 2009). Sendo o PPAR $\gamma$  e o C/EBP $\alpha$  consideradas duas moléculas cruciais para o desenvolvimento da cascata transcricional que leva à diferenciação do adipócito.

O PPAR $\gamma$  é o maior regulador da adipogênese, ou seja, necessário e suficiente para a formação de gordura (Famer, 2006). Este fator de transcrição é altamente expresso no tecido adiposo e estimula a transcrição de vários genes específicos do adipócito, assim como os passos iniciais e críticos da adipogênese (Tontonoz *et al.*, 1995). No entanto, PPAR $\gamma$  é uma molécula chave que está envolvida em diversas outras funções no tecido adiposo branco, (TAB) tais como: regulação do metabolismo de lipídeos, melhora da homeostase da glicose, remodelação do tecido e diferenciação das células do TAB em tecido adiposo marrom (TAM) (Ahmadian *et al.*, 2013).

O C/EBP $\alpha$  atua na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos e na conversão de fibroblastos em adipócitos. O C/EBP $\beta$  também induz adipogênese, provavelmente por

estimular a expressão do PPAR $\gamma$ , cujo gene contém sítios C/EBP na região promotora (Tontonoz *et al.*, 1994). Estudos experimentais demonstraram que a deleção de genes C/EBP resultam em severas anormalidades nos adipócitos (Lefterova e Lazar, 2009). Achados comprovaram que a C/EBP $\alpha$  é necessária para formação do tecido adiposo branco (Linhart *et al.*, 2001).

A proteína SREBP é um fator de transcrição com importante papel na adipogênese, na sensibilidade insulínica e na homeostase dos ácidos graxos (White e Stephens, 2010). O SREBP-1c/ADD1 é predominantemente expresso no fígado, glândula adrenal, tecido adiposo e músculo esquelético. Sua expressão isolada não é capaz de induzir a adipogênese, no entanto, eleva a atividade transcricional do PPAR $\gamma$ , fazendo com que aumente a proporção de células submetidas ao processo de diferenciação (Famer, 2006).

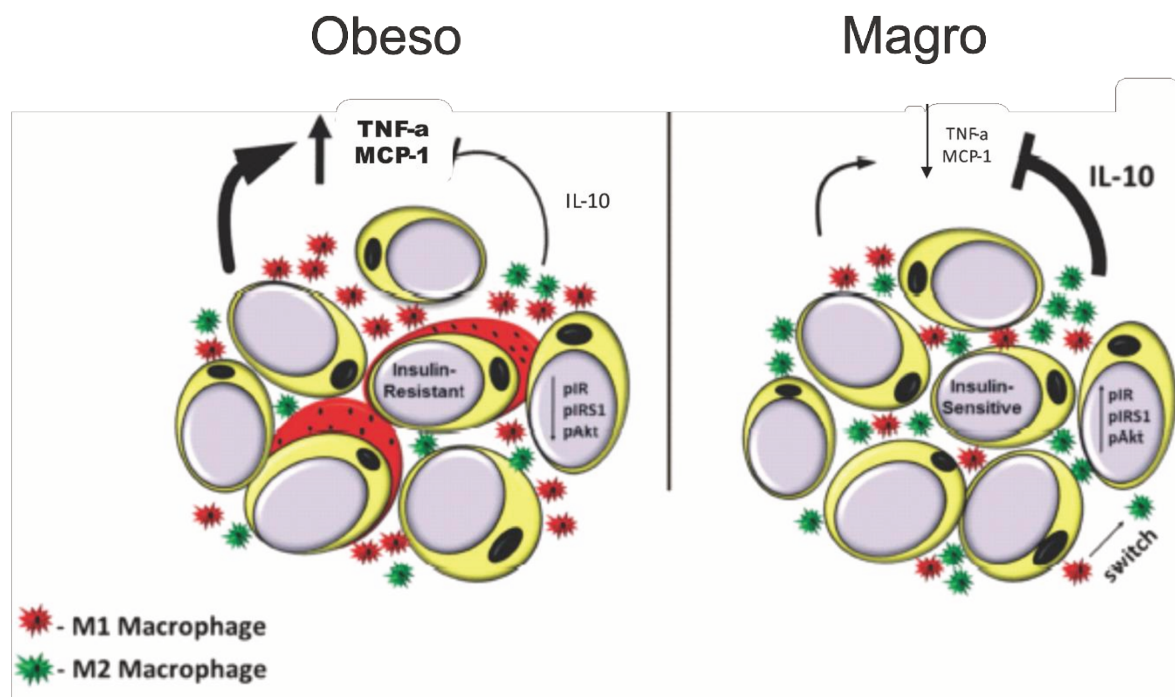
O TAB, que representa a maior parte do tecido adiposo do organismo, é formado por células de vários tipos, sendo os adipócitos as mais abundantes. As outras células presentes estão incluídas na fração do estroma vascular, entre elas estão célula do tecido conectivo e células imune incluindo macrófagos (Fantuzzi, 2005). O número de macrófagos presentes no TAB é diretamente relacionado com a adiposidade e o tamanho dos adipócitos em humanos e roedores (Xu *et al.*, 2003). Os adipócitos brancos maduros são células grandes, muitas vezes maiores que as hemácias, fibroblastos e células imune e podem alterar acentuadamente seu tamanho em volume e diâmetro conforme a quantidade de triglicerídeos acumulada. Sabe-se que o aumento do tamanho do adipócito é correlacionado com as concentrações séricas de insulina, RI, inflamação e aumento do risco de desenvolver o DM2 (Hocking *et al.*, 2013).

O TAB é comumente conhecido como um tipo de gordura em que os triglicerídeos são estocados e posteriormente mobilizados para utilização sistêmica quando outros tecidos requerem energia. Posteriormente, foi caracterizado como um órgão endócrino, devido sua capacidade de produzir e liberar adipocinas na corrente sanguínea, cuja função principal é integrar suas múltiplas funções, tais como o balanço energético, controle da ingestão alimentar e do apetite, imunidade, sensibilidade à insulina, pressão arterial e reprodução (Hauner, 2004; Gesta *et al.*, 2007).

Tais adipocinas podem possuir ações pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. As adipocinas pró-inflamatórias estão relacionadas com danos a algumas vias metabólicas, dentre elas destacam-se: TNF- $\alpha$ , MCP-1, a interleucina 6 (IL-6), entre outras. O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que apresenta-se altamente expressa na obesidade, tanto em modelo animal quanto em humanos, e está relacionado com interferências na sinalização da insulina e homeostase da glicose. Isso ocorre através da ativação da via IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, a qual está diretamente relacionada com a inibição da via de sinalização do receptor de insulina. Estudo realizado *in vitro* mostrou que a adição de TNF- $\alpha$  leva à redução da fosforilação de IRS-1 em tirosina e aumenta a sua fosforilação em serina, causando alteração no processo de sinalização da insulina e consequente RI (Hotamisligil *et al.*, 1994). Por outro lado, as adipocinas anti-inflamatórias se destacam por manter ou melhorar o funcionamento de muitas vias metabólicas, dentre elas destacam-se: a interleucina 10 (IL-10), a adiponectina e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ). A IL-10 é uma adipocina anti-inflamatória, cuja diminuição da produção tem sido associada com o desenvolvimento de DM2 e seus níveis circulantes podem estar correlacionados positivamente com a sensibilidade à insulina (Bluher *et al.*, 2005; Strackowski *et al.*, 2005). Pesquisa realizada por Lumeng e colaboradores (2007) mostrou que o tratamento de culturas de adipócitos 3T3-L1 com IL-10 foi capaz de atenuar os efeitos deletérios do TNF- $\alpha$ , diminuir a secreção de MCP-1 e manter as células em um estado de sensibilidade à insulina. Esse e outros estudos indicam que IL-10 é um importante fator anti-inflamatório produzido pelas células do tecido adiposo a fim de melhorar a sinalização de insulina.

Como abordado previamente, os adipócitos não são as únicas células do tecido adiposo que desencadeiam respostas inflamatórias, macrófagos residentes no tecido adiposo também podem desencadear uma resposta pró-inflamatória e seus níveis estão aumentados na obesidade (Hassan *et al.*, 2012). Os macrófagos mostram grande heterogeneidade na função e fatores ambientais moldam suas propriedades e o seu estado de ativação (Mantovani *et al.*, 2004; Gordon e Taylor, 2005). A ativação de macrófagos tem sido definida por dois tipos de polarização, M1 e M2, que se alternam de acordo com as necessidades do organismo (Mantovani *et al.*, 2004). A ativação do tipo M1 ou clássica, é induzida por mediadores pró-inflamatórios como (LPS) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), e aumenta a produção de citocinas pró-

inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, o que contribui para o estado de RI (Lumeng *et al.*, 2007). Já a ativação do tipo M2 ou alternativa, é caracterizada pela menor expressão de citocinas pró-inflamatórias e promove o aumento nos níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, colaborando para um estado de sensibilidade à insulina (Figura 2) (Lumeng *et al.*, 2007).



**Figura 2-** Estado de polarização dos macrófagos em indivíduos obesos e magros. Adaptado: dados suplementares, Oliveira *et al.*, p. 2545-56, 2013.

Esse contexto de inflamação está diretamente associado com o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina. Sendo a disfunção na secreção de algumas dessas adipocinas, o aumento na infiltração dos macrófagos e a elevação dos AGLs circulantes, potentes colaboradores para o desenvolvimento de um processo inflamatório que se acredita ser a base do estado insulino-resistente da obesidade (Wellen e Hotamisligil, 2005).

### 1.3.2 Tecido Adiposo Marrom

O TAM é especializado na produção de calor (termogênese) e, portanto, participa ativamente na regulação da temperatura corporal. Suas células são caracterizadas pela presença de várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos e apresentam um grande número de mitocôndrias, que por não possuírem o complexo enzimático necessário para a síntese de ATP, utilizam a energia liberada pela oxidação de lipídeos e glicose, para gerar calor (Lidell e Enerbäck, 2010). Os adipócitos marrons são densamente innervados pelo sistema nervoso simpático, o qual promove a liberação de norepinefrina que ativa seus receptores  $\beta$ -adrenérgicos expressos sobre a superfície dos adipócitos e levam à produção de calor (Slocum *et al.*, 2013). Esse processo é mediado pela proteína desacopladora- 1 (UCP-1, termogenina), uma proteína da membrana mitocondrial interna do adipócito marrom, que atua como um canal de próton o qual descarrega a energia gerada pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso das mitocôndrias durante as reações oxidativas do ciclo de Krebs, desviando esses prótons do complexo F1F0 (ATP sintase) e impedindo a síntese de ATP, permitindo então que a energia estocada na mitocôndria se dissipe em calor (Cannon e Nedergaard, 2004). Estudos mostram que esse processo de termogênese é muito importante para o metabolismo energético, pois induz o aumento da energia gasta o que colabora para a redução da adiposidade (Cypess e Kahn, 2010).

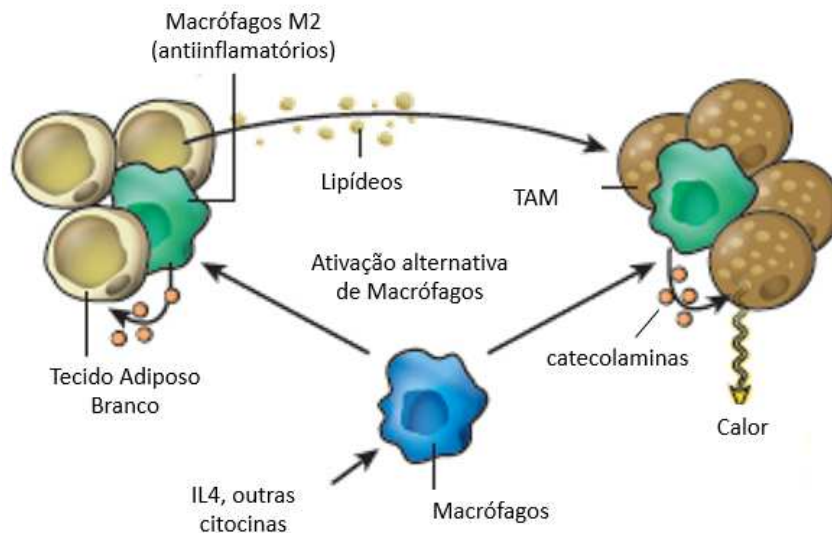
Os depósitos de TAM apresentam-se em maiores proporções em fetos e recém-nascidos quando comparados com indivíduos adultos, por isso, não acreditava-se na funcionalidade desse tecido em idades mais avançadas. No entanto, em 2009, alguns estudos levaram a mudança desse paradigma. Estudos realizados comprovaram a funcionalidade de TAM presente em adultos através de tomografia computadorizada, método não invasivo, e também correlacionaram inversamente a quantidade de TAM com o IMC (Cypess *et al.*, 2009; Virtanen *et al.*, 2009). A partir desses achados, o TAM começou a ganhar destaque nas pesquisas como potencial alvo para tratar obesidade e doenças associadas através da sua capacidade de aumentar a energia gasta do organismo.

Estudos subsequentes mostraram que células parecidas com os adipócitos do TAM, poderiam se diferenciar no tecido adiposo branco, formando as células bege ou células de

gordura marrom recrutáveis (Wu *et al.*, 2012). Dados observados em roedores sugerem a existência de 2 tipos de células de gordura marrom: TAM constitutivo, o qual é de origem embrionária e anatomicamente localizado na região interescapular de camundongos; e o TAM recrutável o qual reside dentro do TAB e músculo esquelético e tem sido chamado de bege (Wu *et al.*, 2012, Schulz *et al.*, 2013). Essas células bege possuem baixa expressão basal de UCP-1, mas respondem a estimulação cAMP com alta expressão de UCP-1 e altas taxas respiratória, mostrando níveis similares às observadas pelo TAM subescapular. Essa diferenciação de células do tecido adiposo branco em bege também é relevante do ponto de vista terapêutico relacionado a redução da obesidade e melhora da homeostase da glicose (Hassan *et al.*, 2012).

Assim como o TAB, o TAM pode afetar o metabolismo de todo o corpo. No entanto, ao contrário do TAB, a ativação do TAM pode promover a perda de peso e o aumento da sensibilidade à insulina (Cypess e Kahn, 2010). Em 2013, trabalho realizado com camundongos submetidos a transplante de TAM verificou que o aumento na massa desse tecido foi capaz de melhorar a homeostase da glicose e a sensibilidade a insulina, acompanhada de diminuição da massa de gordura. Além disso, o transplante também atenuou os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica, e observou-se que essas melhoras eram volume dependente, ou seja, quanto maior a massa de tecido transplantado melhores eram as respostas analisadas (Stanford *et al.*, 2013).

Nguyen e colaboradores (2011), demonstraram que o processo de termogênese é sustentado pela ativação alternativa de macrófagos, a qual em resposta ao frio, é capaz de induzir a produção local de catecolaminas no TAB e no TAM. Esse processo ocorre porque a ativação alternativa de macrófagos aumenta a expressão da tirosina hidroxilase (Th), enzima chave na síntese de catecolaminas. Essas catecolaminas por sua vez induzirão a lipólise do TAB, fornecendo lipídeos que servirão de combustível no processo de termogênese, e o aumento da expressão de genes termogênicos no TAM (Figura 3).



**Figura 3-** Ativação alternativa de macrófagos no tecido adiposo branco e marrom. Adaptado: Whittle e Vidal-Puig. *Nature*, v. 480, p. 46, 2011.

Nos últimos anos, a quantidade e atividade do TAM vem sendo associada à proteção contra a obesidade e alterações metabólicas associadas. Diante disso, algumas maneiras não farmacológicas de ativação desse tecido são: a exposição crônica ao frio e o exercício físico (Xu *et al.*, 2011, Boström *et al.*, 2012, De Matteis *et al.*, 2013, Van der Lans *et al.*, 2013).

## 1.4 Exercício

Sabe-se hoje que existe uma relação direta entre o sedentarismo e o desenvolvimento de múltiplos fatores de risco como obesidade, hipertensão arterial, resistência à insulina, diabetes e dislipidemia (Rennie et al, 2003). Estudos desenvolvidos demonstraram a relação direta entre a prática de exercícios físicos regulares e qualidade de vida (WHO, 2010). Diante disso, o exercício físico vem sendo prescrito com o objetivo de recuperar a saúde, bem estar físico e emocional, garantindo ao indivíduo a melhora da qualidade de vida por meio da redução da adiposidade e controle das alterações metabólicas e hormonais (Jakicic e Otto, 2005; Gleeson *et al.*, 2011). Por isso, entende-se que o exercício físico regular pode ser uma alternativa para a prevenção e o tratamento dessas doenças e seus fatores de risco (Horowitz, 2007).

O treinamento físico crônico é conhecido por aumentar o gasto energético, o que favorece a perda de peso e a redução da adiposidade. No entanto, ainda não está claro se esta redução acontece pelo fato do exercício físico induzir uma inibição da adipogênese. Estudo realizado por Sakurai et al 2010, com ratos *Wistar* divididos em grupos controle e treinados (submetidos a exercício na esteira por 9 semanas), analisou a expressão de genes de diferenciação nos adipócitos e no estroma vascular do tecido adiposo relacionadas com a adipogênese. Na pesquisa, observou-se diminuição no número e tamanho dos adipócitos no TAB dos ratos treinados comparados com os controles. Os resultados obtidos indicam que o treinamento físico crônico diminui a capacidade das células do estroma vascular se diferenciarem em adipócitos, e que um possível mecanismo subjacente ao exercício que induz a inibição da adipogênese pode ser a diminuição da expressão de mRNA PPAR $\gamma$ .

O exercício é considerado fator chave no tratamento e prevenção da RI. Alguns estudos mostram que o aumento da sensibilidade à insulina pelo exercício é muito rápida, ocorrendo dentro de 2 à 3 dias (King *et al.*, 1995, Gan *et al.*, 2003). Da mesma forma, melhoras na tolerância à glicose já podem ser observadas após uma sessão aguda de exercício físico (Azevedo et al., 1995, Oliveira *et al.*, 2011, Oliveira *et al.*, 2013). Dentro deste contexto, muitas pesquisas evidenciaram os benefícios do exercício sobre a homeostase da



insulina e elucidaram alguns possíveis mecanismos moleculares envolvidos nesse processo. Ropelle e colaboradores (2006) em estudo realizado com ratos submetidos a três meses de dieta hiperlipídica, demonstraram que uma única sessão de natação pode prevenir a RI induzida por dieta através da diminuição da atividade de JNK, a qual foi acompanhada pela redução na fosforilação em serina do IRS-1. Na mesma linha, Luciano e colaboradores (2002), mostraram que ratos submetidos ao exercício aeróbio crônico obtiveram melhoras na sensibilidade à insulina, através do aumento da fosforilação do IRS-1/2 em tirosina bem como a associação dessas proteínas com a PI3K, e aumento da fosforilação em serina da AKT quando estimulados com insulina e comparados aos animais controles sedentários.

A expansão exagerada do TAB pode resultar em aumento da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1 (Gregor e Hotamisligil, 2011). O exercício físico, quando praticado de forma crônica, é capaz de reduzir a gordura abdominal e visceral, o que contribui para a diminuição da produção dessas citocinas (Gleeson *et al.*, 2011). Há indícios de que esse efeito antiinflamatório produzido pelo exercício físico esteja relacionado diretamente à perda de peso, entretanto esta evidência não é observada uniformemente (Hammett *et al.*, 2006, Giannopoulou *et al.*, 2005, Nicklas *et al.*, 2004). Por isso, outra linha defende que o exercício físico é capaz de modular a produção de citocinas pró-inflamatórias mesmo na ausência da perda de peso. Pesquisa realizada por Phillips e colaboradores (2012) com mulheres obesas na pós-menopausa submetidas à 12 semanas de treinamento de resistência mostrou que o exercício reduz a circulação de algumas citocinas inflamatórias, dentre elas, TNF- $\alpha$  sem que houvesse alterações no peso corporal. Nesse sentido, a literatura confere ao exercício um papel protetor contra a RI induzida por TNF- $\alpha$ , por sua capacidade de reduzir os níveis dessa e outras citocinas pró-inflamatórias e por aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Oliveira *et al.*, 2013). Estudo realizado por Jankord e Jemiolo (2004), com homens entre 65 e 74 anos, praticantes de exercícios aeróbios regulares, mostrou que os indivíduos treinados apresentaram maiores níveis de IL-10 quando comparados com seus pares destreinados. De acordo com esses resultados, outra pesquisa mostrou que os níveis de IL-10 aumentam juntamente com a sensibilidade à insulina após o exercício (Oberbach *et al.*, 2006). Algumas linhas de pesquisa acreditam que a atenuação do estado inflamatório do tecido adiposo associado com o

exercício crônico possa ocorrer tanto por supressão da infiltração de macrófagos como pela maior alteração fenotípica do estado M1 para o M2 (Kawanishi *et al.*, 2010, Oliveira *et al.*, 2013). E essa maior ativação do tipo M2 também favorece o aumento dos níveis de IL-10.

Recente estudo experimental, comprovou que o exercício também é capaz de promover a formação das células bege a partir do tecido TAB, assim como, aumentar a atividade do TAM, o que atualmente vem ganhando destaque devido aos potenciais efeitos terapêuticos desse tecido sobre a homeostase da glicose e da insulina (De Matteis *et al.*, 2013). Estudo realizado por Slocum e colaboradores (2013) com camundongos C57, submetidos a dieta hiperlipídica e corrida em esteira durante 7 dias, verificou que o exercício foi capaz de promover perda de peso, redução da gordura corporal, aumento da regulação de UCP-1, e a análise histológica do TAM mostrou que os adipócitos marrons apresentaram coloração mais forte e maior quantidade de mitocôndrias, quando comparados com os controles sedentários com dieta hiperlipídica .

Os estudos apresentados até o momento são descritivos, sendo necessário uma análise mais detalhada sobre os possíveis efeitos que o exercício crônico pode causar sobre a adipogênese, fatores inflamatórios e o TAM.

## **2- OBJETIVOS**



## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Gerais**

Avaliar o efeito profilático do exercício sobre o aumento do tecido adiposo (branco e marrom), marcadores inflamatórios e resistência à insulina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Assim como, verificar os mecanismos pelos quais o exercício é capaz de aumentar a atividade termogênica do tecido adiposo marrom.

### **2.2- Específicos**

Avaliar os efeitos do exercício sobre aspectos fisiológicos e metabólicos:

- Peso Corporal, glicemia de jejum e tolerância à insulina;
- Níveis séricos de AGLs, LPS, TNF $\alpha$  e IL-10;
- Crescimento do TAB, pela análise de proteínas específicas: PPAR $\gamma$ , SREBP-1c e C/EBP $\alpha$ ;
- Via de sinalização da insulina no TAB, através da análise das fosforilação das proteínas: IR $\beta$ , IRS-1 e Akt.
- Vias inflamatórias no TAB, pela análise da fosforilação das serinas quinases JNK e IKK;
- Expressão de proteínas relacionadas a atividade termogênica do TAM, UCP-1 e Th;
- Morfologia do TAM;
- Ativação de macrófagos M2 no TAM.



## **3- MATERIAL E MÉTODOS**





### 3- MATERIAL E MÉTODOS

**3.1- Animais:** Nesse estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos obtidos no centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP com 4 semanas de vida, porém o experimento iniciava-se ao completarem 6 semanas de vida. A partir desse momento, os animais eram mantidos sob condições estáveis de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclos claro/escuro de 12 horas controlados, com livre acesso à água e alimentação (dieta hiperlipídica palatável ou dieta padrão de acordo com o grupo de estudo). Todo experimento foi conduzido de acordo com as normas da Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade (CEUA/IB - UNICAMP) – protocolo n° 2562-1.

**3.2- Modelo de obesidade:** A dieta hiperlipídica é composta por carboidrato (38,5%); proteína (15%); lipídeos (46,5%), totalizando: 5,4 kcal/g. Esta foi oferecida durante o protocolo de 8 semanas para os grupos específicos.

Tabela 1: Composição da Dieta Padrão e da Dieta hiperlipídica.

| Ingredientes           | Ração Padrão (g/kg) | Kcal/kg | Ração hiperlipídica (g/kg) | Kcal/kg |
|------------------------|---------------------|---------|----------------------------|---------|
| Amido de milho (q.s.p) | 397,5               | 1590    | 115,5                      | 462     |
| Caseína                | 200                 | 800     | 200                        | 800     |
| Sacarose               | 100                 | 400     | 100                        | 400     |
| Amido dextrinado       | 132                 | 528     | 132                        | 528     |
| Banha de porco         | -                   | -       | 312                        | 2808    |
| Óleo de soja           | 70                  | 630     | 40                         | 360     |
| Celulose               | 50                  | -       | 50                         | -       |
| Mistura de minerais    | 35                  | -       | 35                         | -       |
| Mistura de vitaminas   | 10                  | -       | 10                         | -       |
| L-cistina              | 3                   | -       | 3                          | -       |
| Colina                 | 2,5                 | -       | 2,5                        | -       |
| Total                  | 1000                | 3948    | 1000                       | 5358    |

**3.3- Divisão dos grupos:** Os animais foram divididos em 3 grupos (n = 6/grupo):

- Controle (CTL): animais alimentados com dieta padrão para roedores;
- Dieta Hiperlipídica (DH): animais alimentados com dieta hiperlipídica e sedentários;
- Exercício (EXE): animais alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento de natação.

**3.4- Protocolo de treinamento físico crônico:** Para adaptação ao exercício de natação, os ratos foram primariamente inseridos ao meio líquido durante 10 minutos por 2 dias consecutivos. Após a adaptação iniciou-se o protocolo de natação, no qual, os ratos nadavam 1h por dia, cinco vezes por semana, durante um período contínuo de 8 semanas. Após a primeira semana de treino os animais nadavam suportando uma carga que era ajustada semanalmente, correspondendo a 2,5% do seu peso corporal naquela semana. Este protocolo foi previamente utilizado em nosso laboratório (Luciano *et al.*, 2002). Os ratos nadaram em baldes plásticos de 50 cm de diâmetro por 100 cm de profundidade, quatro animais por balde, com a temperatura da água mantida em aproximadamente 28-30°C.

**3.5- Determinação da massa corporal:** A massa corporal foi determinada pela balança de precisão, sempre no início de cada semana e ao final do experimento após anestesia dos animais.

**3.6- Controle de Ingestão:** Nas semanas 1, 4 e 8 do experimento os animais foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas, com acesso livre à água e alimentação. As gaiolas utilizadas eram da marca Tecniplast, modelo 3701M081, para ratos com peso acima de 300g, superfície de 450 cm<sup>2</sup> com altura de 18 cm, com câmara de alimentação bipartida localizada fora da gaiola. As gavetas de alimentação são removíveis para facilitar o reabastecimento sem incomodar o animal. Nessa gaiola os animais recebiam comida e bebida à vontade. Após a adaptação de 48 horas, iniciou-se o controle de ingestão durante 3 dias consecutivos a cada 24 horas.

**3.7- DEXA:** Para determinação da composição corporal dos animais foi utilizado o equipamento, gentilmente cedido pelo Serviço de Medicina Nuclear do HC/UNICAMP. Equipamento modelo Discovery, do tipo DEXA (dual-energy X-ray absorptimetry), fabricado pela HOLOGIC. A análise trata-se de uma exploração fundamentada na passagem de baixas doses de raio X (2 feixes colimados de 38 e 70 KeV de energia) absorvidos pelos animais que ao interagirem com estruturas ósseas e tecidos moles resultam em absorções e atenuações que foram posteriormente interpretadas pelo software. Após a ilustração e processamento das imagens pelo computador, a densidade mineral óssea, a massa óssea e a massa magra (absoluta, em gramas), além da porcentagem de gordura foram geradas a partir de um único escaneamento de corpo inteiro. Estas informações forneceram, portanto, uma análise global da distribuição da gordura corporal. Antes da realização deste experimento os animais tiveram livre acesso à água e alimentação, porém o grupo exercitado não praticou a natação. Os animais foram previamente sedados com ketamina e xilazina (0,32ml de ketamina/ 0,2ml de Xilazina) para permanecerem imóveis durante o teste, que foi realizado ao final das 8 semanas de treinamento crônico.

**3.8- Dosagem sérica dos níveis de glicose:** A concentração de glicose foi determinada com fitas reativas e glicosímetro (Optium Xceed – Abbot, Berkshire, Inglaterra).

**3.9- Teste de tolerância glicose (GTT):** Após jejum de 6 horas, a primeira coleta de sangue foi realizada no tempo 0. Em seguida, glicose 20% (2g/Kg de peso corporal) foi injetada via intraperitoneal (ip) nos ratos e as amostras de sangue foram coletadas da cauda nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos para determinação da glicose sérica (item 3.8). Tolerância à glicose foi avaliada pela área sob a curva análise (AUC).

**3.10- Teste de tolerância à insulina (ITT):** Após jejum de 6 horas, a primeira coleta de sangue foi realizada no tempo 0. Em seguida, a insulina (1,5 U/Kg de peso corporal) foi injetada ip nos ratos e as amostras de sangue foram coletadas da cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para determinação da glicose sérica (item 3.8). A tolerância à insulina foi avaliada pelo *clearance* de glicose sobre os minutos iniciais do

desafio de insulina. A velocidade constante do decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula  $0,693/t_{1/2}$ . O  $t_{1/2}$  da glicose será calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear.

**3.11- Sacrifício e Extração dos Tecidos Adiposos Branco e Marrom:** Realizada 24 horas após a última sessão de exercício, respeitou-se previamente um intervalo de repouso, após esta sessão, pré determinado no *Time Course* para o exercício crônico. Após jejum (6 horas), os ratos foram anestesiados através da administração intraperitoneal (ip) de tiopental sódico (15mg/kg) e a perda dos reflexos pedal e corneano foram usadas como controle da anestesia. Em seguida, foram realizados os procedimentos experimentais para análise dos parâmetros fisiológicos e a extração dos tecidos adiposos (branco e marrom) para análise de proteínas intracelulares pela técnica de imunoprecipitação e imunoblote descritos a seguir.

### **3.12- Parâmetros Fisiológicos:**

3.12.1 - Dosagem sérica dos níveis de insulina: Foram utilizados kits de ELISA (Crystal Chem. Inc., EUA) comerciais espécie-específicos para as determinações. Para a análise de insulina (cat n° 90080), às cavidades da placa de ELISA foram adicionadas 5 µL das amostras e padrões. Após incubação (2 horas a 4°C) e lavagem (cinco vezes) das cavidades da placa, 100 µL do conjugado (anti-insulina marcada com enzima) foram acrescentados a cada cavidade. Após novo período de incubação (30 minutos a temperatura ambiente) seguido de lavagem (sete vezes), foram adicionados 100 µL da solução do substrato. Após incubação por 10 a 40 minutos, no escuro, as reações foram bloqueadas com 100 µL de solução ácida e as absorbâncias lidas em leitora de ELISA a 450 nm e os resultados dados em ng/mL.

3.12.2- Análise bioquímica dos níveis séricos de AGLs: Após jejum (12 h), uma amostra de sangue foi coletada da veia cava. O soro de cada animal foi separado por centrifugação (2,500g) por 15 min a 4° C e armazenado a -80 ° C para posterior análise. Os níveis séricos de ácidos graxos livres (AGLs) foram analisados utilizando NEFA-kit-U (Wako químicos, Neuss, Alemanha) com ácido oléico como padrão.

3.12.3- Dosagem sérica dos níveis de citocinas (IL-10 e TNF- $\alpha$ ): As concentrações foram dosadas pelo método ELISA de captura, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para cada citocina e as especificações do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA, Estados Unidos). Nas cavidades da placa de ELISA (NUNC – “*Immuno plate Maxisorp*” – 96 wells) foram adicionados 100  $\mu$ L do anticorpo monoclonal de captura anti-citocina de rato (0,5-4  $\mu$ g/mL em tampão fosfato salina-PBS). Após incubação “*overnight*” a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as cavidades lavadas com tampão de lavagem ( Reagente Set A ou B, BD Bioscience, San Diego, CA, Estados Unidos). Reações inespecíficas foram bloqueadas pela adição de 200  $\mu$ L de tampão diluente e incubando-se a temperatura ambiente por 1 h. Após lavagem, 100  $\mu$ L dos padrões (citocina recombinante) e das amostras foram adicionadas às cavidades da placa e, após incubação, a placa foi lavada para adição de 100  $\mu$ L do anticorpo monoclonal de detecção marcado em cada cavidade. Após incubação a temperatura ambiente por 1 h, a placa foi lavada e, a seguir, 100  $\mu$ L de uma solução de avidina-peroxidase (1:250) adicionados às cavidades, incubando-se por 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem, 100  $\mu$ L do substrato (tetrametilbenzidina-TMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram adicionados e a placa incubada a temperatura ambiente por um período de 30 minutos para o desenvolvimento da cor. A reação foi interrompida adicionando-se 20  $\mu$ L de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N em cada cavidade. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm. As concentrações de citocinas presentes nas amostras foram calculadas a partir da curva padrão e os resultados expressos em pg/mL.

3.12.4- Dosagem sérica de LPS: Amostras de soro estéril foram obtidas da veia porta e diluídas à 20% com água livre de endotoxina e então aquecida à 70°C por 10 minutos para inativar as proteínas séricas. Então, o LPS foi quantificado usando kit comercial Limulus Amebocyte Assay (Cambrex, Walkersville, MD, USA) de acordo com o protocolo fabricante.

**3.13- Extração dos tecidos:** Os ratos foram anestesiados como descrito anteriormente, a cavidade abdominal foi aberta, e após localização da veia porta 0,2 ml de salina ou insulina (10<sup>-6</sup> mol/L) foram injetadas. A gordura epididimal do TAB e o TAM interescapular foram retirados após 90 s da infusão de insulina, e as amostras dos tecidos

homogeneizadas em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi centrifugado a 11000 rpm por 40 minutos a 4°C. O material extraído foi novamente centrifugado a 11000 rpm por 40 minutos a 4°C, para remoção do material insolúvel, utilizando-se o sobrenadante para as etapas seguintes: uma parte para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto e outra parte para avaliar o extrato total posteriormente, pela separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantido sempre a 4°C até o momento de submeter à fervura a 100°C durante 5 minutos.

**3.14- Análise da expressão das proteínas:** SREBP-1c, CEBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$  (totais) envolvidas na adipogênese do TAB; IR $\beta$ , IRS-1 e Akt (totais e fosforiladas) envolvidas na sinalização da insulina na gordura epididimal; JNK e IKK (totais e fosforiladas): relacionadas com a RI; TH e UCP-1 (totais) enzimas envolvidas no processo de termogênese TAM.

3.14.1- Eletroforese: Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da Bio-Rad (Richmond, C.A.). Metanohidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditiotreitol (DTT) foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo). Insulina mista regular foi procedente da Biobrás. A membrana de nitrocelulose BA 85, 0,2 $\mu$ m foi proveniente de Schleider e Schuell. Os anticorpos anti-Akt, anti-p-Akt e anti-IRS-1 foram obtidos da Cell. Também foram utilizados anticorpo anti-IR-p-IR, anti-p-IRS-1 Tyr, anti-pJNK, anti-JNK, anti-pIKK $\beta$ , anti-IKK $\beta$ , anti-SREBP-1c, anti-PPAR $\gamma$ , anti-CEBP $\alpha$ , anti-TH, anti-UCP-1 adquirido da Santa Cruz Biotechnology Inc.

As soluções a empregadas nos experimentos estão descritas abaixo.

- Tampão de extração: Continha: trisma base 100 mM, EDTA 10mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2mM (diluído em álcool etílico), triton X 100 1%, aprotimina 10 3% (0,1mg/mL). Esta

solução foi mantida a 4°C. O ortovanadato, PSMF e aprotimina foram acrescentados no momento do uso.

- Tampão de Laemmli (5x): Foi utilizado para estocar o material extraído e para aplicação no gel de poliacrilamida. Continha: Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 20%.
- Solução tampão para eletroforese em gel (SDS-PAGE): Foi utilizada para a realização da eletroforese das proteínas extraídas no gel SDS-PAGE. A solução foi diluída 1:4. Continha: Trisma base 0,2M, glicina 1,52M, EDTA 7,18M e SDS 0,4%.
- Solução tampão para transferência: Foi utilizada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Continha: Trisma base 25mM, glicina 129mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Foi ser estocada a 4°C.
- Solução tampão para SDS-PAGE, gel de resolução ("resolving"): Foi utilizada para o preparo do SDS-PAGE, gel de resolução. Continha: EDTA 4 mM, SDS 25% e trisma base 1,5M. O pH da solução foi ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.
- Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento ("stacking"): Foi utilizada no preparo do SDS-PAGE, gel de empilhamento das proteínas. Continha: EDTA 4 mM, SDS 2% e trisma base 10 mM. O pH foi ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.
- Solução basal: Solução básica foi utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. Continha: cloreto de sódio 0,12 M, trisma base 0,01 M, *Tween* 20 0,05%.
- Solução bloqueadora: Foi utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose logo após a transferência. Continha: 5% de leite em pó desnatado (Molico®) e azida sódica 0,02% dissolvidas em solução basal.

- Solução para anticorpos: Solução onde foram diluídos os anticorpos específicos. Continha: 0,3% de soro albumina bovino (BSA) e azida sódica 0,02% diluídos em solução basal.

3.14.2- Immunoblotting ou Westernblotting: Foram aplicados no SDS-PAGE de 2 mm, 200 µg de proteína por amostra, sendo o gel balizado por marcador de alto peso molecular comercial, para gel de poliacrilamida, da Bio Rad: PageRuler (Bio Rad). A eletroforese foi efetuada em cuba de minigel Mini- PROTEAN® II Cell da Bio Rad, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE foi inicialmente submetido a 20 volts, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (“*stacking*”) e 100 volts até o final do gel de resolução (“*resolving*”). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da Bio Rad. Durante a transferência, a cuba foi mantida a 120 volts por 150 minutos (Towbin *et al.*, 1979). Para evitar aumento excessivo da temperatura, foram efetuadas trocas sucessivas da forma de gelo durante a transferência. As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por duas horas à temperatura ambiente, e depois lavadas em solução basal por três sessões de dez minutos para subsequente incubação com anticorpo específico. Tal incubação foi feita *overnight* a 4°C por 14-16 horas, sob agitação constante e, novamente, as membranas foram lavadas com solução basal por quatro sessões de dez minutos. A seguir, utilizando-se a diluição 1:1 dos reagentes do kit comercial Pierce Western Blot Signal Enhancer (Thermo Scinetific, Illinois, EUA) adicionou-se 2 mL por membrana e incubou-se 1 a 2 minutos. Após a incubação, foi montado o cassete e as membranas foram expostas em filme de RX (Eastman Kodak, Rochester, NY), usando intensificador (Cronex Lightning Plus intensifying screens – DuPont, Wilmington, DE). O filme foi revelado de forma convencional. Uma vez identificadas, as bandas das auto-radiografias, a leitura foi feita por densitometria óptica (Scion Image, Scion Corporation, Frederick, MD), quantificando suas áreas. A partir de então, foi realizada a análise dos dados, comparando o valor obtido no tecido do animal controle com o experimental, de forma que sempre haja controle dentro de um experimento.



**3.15- Microscopia óptica:** Os tecidos serão extraídos e analisados ao microscópio óptico. Após dissecação, serão fixados por imersão de formaldeído 4%, com tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por menos de 24h, sendo, então, desidratados, clareados e, por fim, embebidos em parafina. Cinco seções seriadas de 5µm de espessura serão obtidas e coradas com hematoxilina e eosina, a fim de se analisar a morfologia.

**3.16- Imunofluorescência:** Para detectar os antígenos F4/80 e MGL-1, a fixação nas lâminas foi realizada em forno microondas (Panasonic Junior) à 700W. As lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01mol/L, pH 6,0 por 10 minutos e resfriadas à temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram incubados *overnight* a 4°C com o anticorpo primário para F4/80 e MGL-1 (Dako Cytomation) (diluído 1:150). Em seguida os cortes foram incubados com os anticorpos secundários conjugados com os respectivos fluoróforos (Santa Cruz Biotechnology) por uma hora a temperatura ambiente e marcadas com DAPI. Após a marcação de núcleos as lâminas foram montadas com Entelan® (Merck, Darmstadt, Germany). Os experimentos foram realizados em triplicata para cada animal.

**3.17- Análise Estatística:** Para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que houve diferença significativa, o Teste de Bonferroni foi utilizado para detectar diferenças existentes entre todos os grupos. Os resultados de *blots* foram apresentados como comparações diretas de bandas nas radiografias e quantificadas por densitometria óptica. Os gráficos apresentam as médias e desvios-padrão dos diferentes grupos. O nível de significância foi  $p \leq 0,05$ .



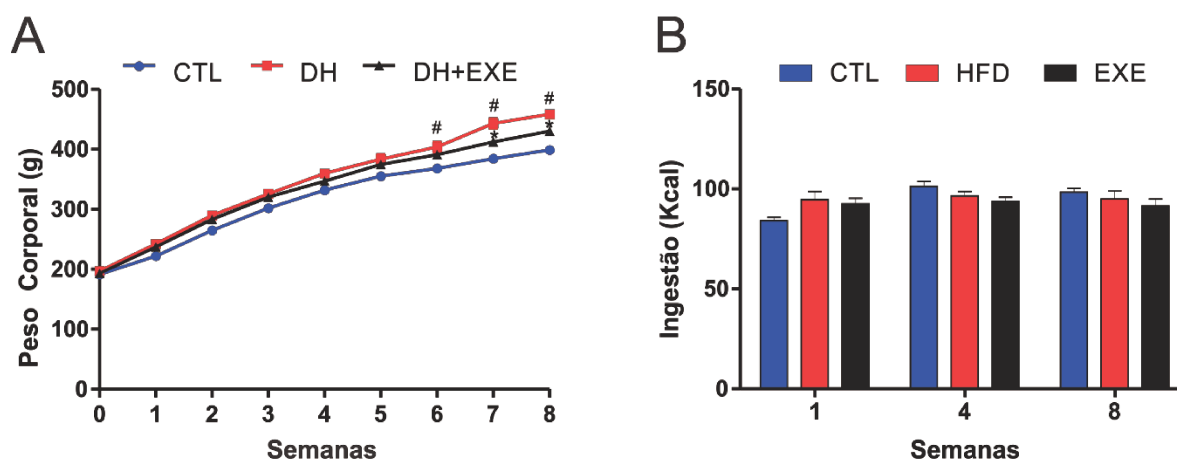
## **4- RESULTADOS**



## 4- RESULTADOS

### 4.1- Caracterização Temporal

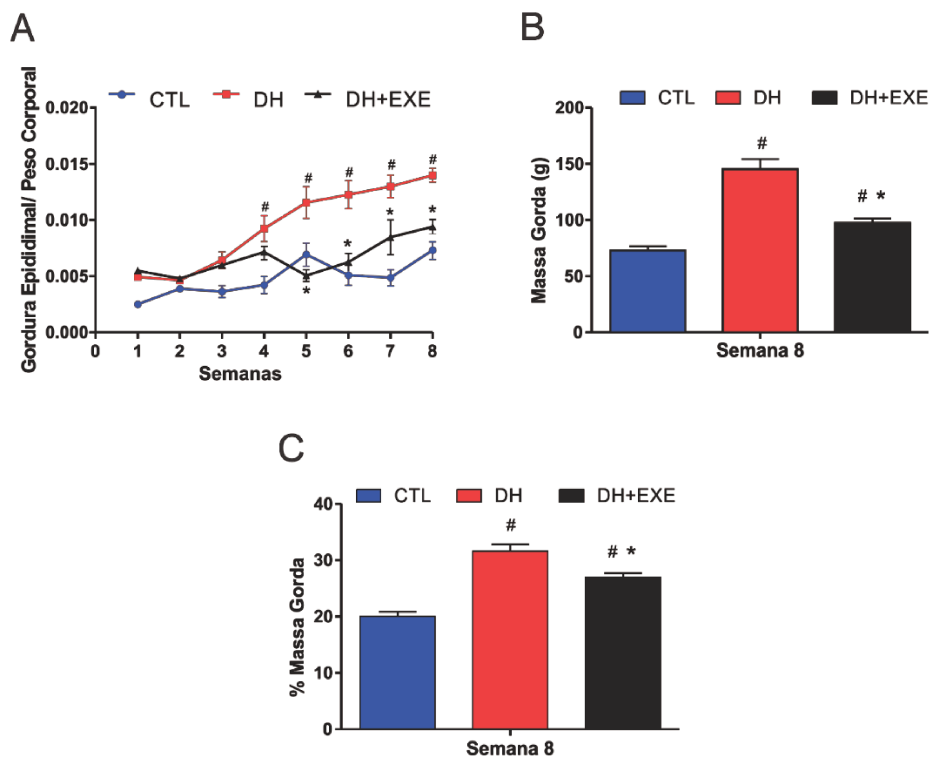
Durante a aplicação do protocolo, composto por 8 semanas de exercício físico crônico, acompanhamos semanalmente o desenvolvimento do peso corporal dos animais estudados. Como podemos observar no gráfico A da figura 4 os animais do grupo DH alcançaram os maiores valores de peso corporal ao final das 8 semanas de tratamento, quando comparados com seus controles e também com os animais do grupo EXE. De forma mais específica, verificamos ainda que a diferença entre os grupos DH e o EXE tornou-se significativa apenas após a semana 7 do estudo (Figura 4A). Faz-se importante destacar que essa diferença de peso é mínima. Para verificar se essa diferença no peso corporal entre os animais do grupo DH e do grupo EXE deu-se em virtude do gasto energético em decorrência do treinamento ou devido a diferenças no padrão alimentar, comparamos a ingestão desses dois grupos ao longo das 8 semanas. Nesse sentido vimos que não houve qualquer diferença significativa entre esses grupos ao longo do estudo (Figura 4B), estando em linha com estudo semelhante realizado previamente por Sakurai e colaboradores (2010).



**Figura 4- Caracterização temporal.** (A): Evolução temporal do peso corporal ao longo das 8 semanas em animais CTL, DH e DH+EXE. (B): Comparativo da ingestão alimentar entre os grupos em dieta hiperlipídica nas semanas 1, 4 e 8. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo. #  $P < 0,05$  vs. CTL e \*  $P < 0,05$  vs. DH. ANOVA; Teste de Bonferroni.

## 4.2- Caracterização da Adiposidade

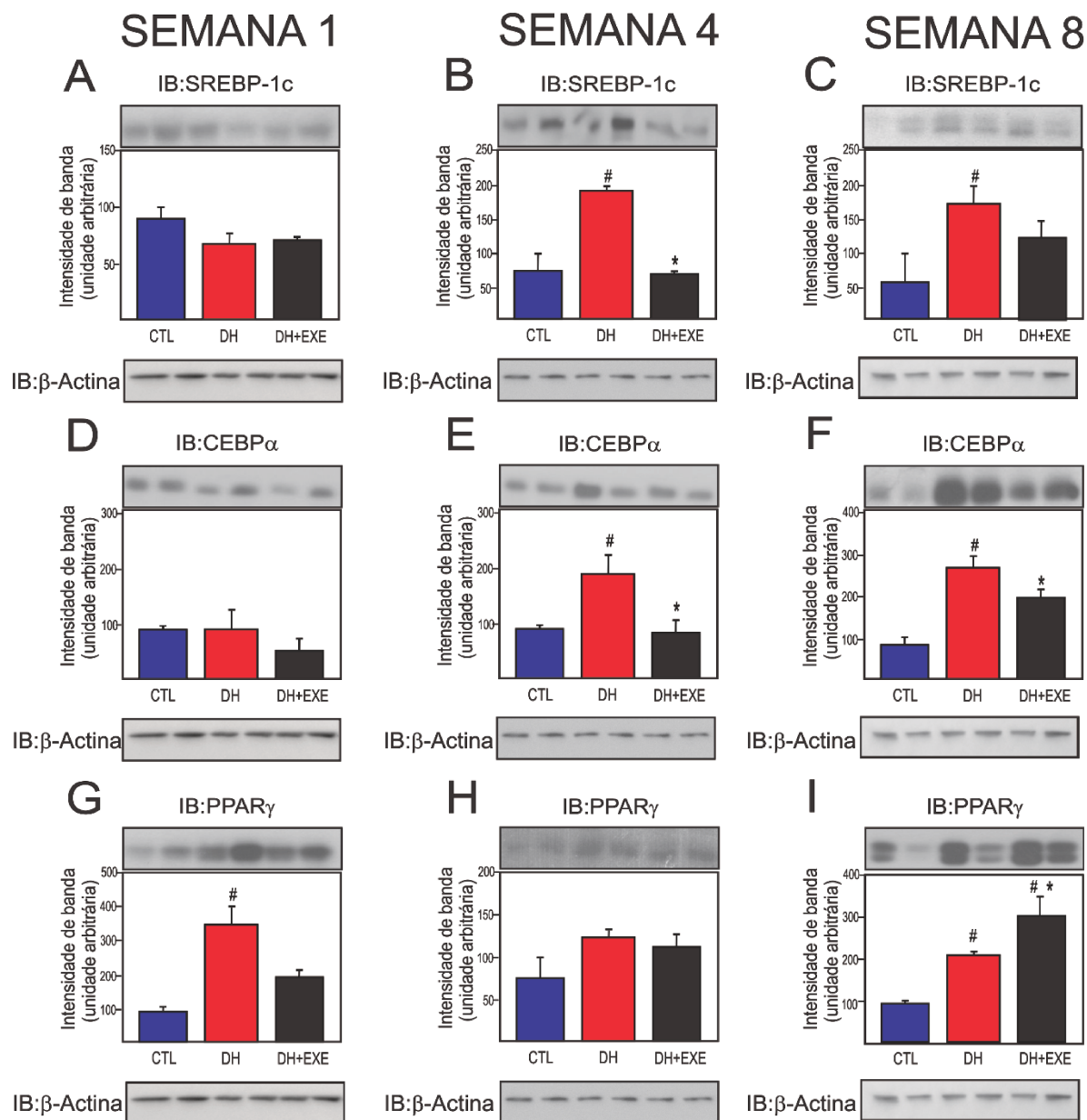
Na mesma linha, acompanhamos também o desenvolvimento do tecido adiposo branco epididimal ao longo das 8 semanas do estudo e verificamos que todos os animais submetidos à dieta hiperlipídica (DH) apresentaram maiores valores dessa gordura, quando comparados aos animais em ração padrão para roedores (Figura 5A). Agora, comparando os grupos DH e EXE, vimos que o exercício foi capaz de atenuar o aumento da gordura epididimal, normalmente associada com a dieta hiperlipídica (Figura 5A). Ao final das 8 semanas de estudo, analisamos ainda a massa gorda total dos animais e observamos os valores bastante elevados nos animais do grupo DH, quando comparados aos animais CTL e EXE, sendo assim, o exercício foi capaz de atenuar esse aumento (Figura 5B e 5C).



**Figura 5-. Caracterização da adiposidade.** (A): Evolução temporal da gordura epididimal relativa do tecido adiposo branco. #  $P < 0,001$  vs. CTL e \*  $P < 0,01$  vs. DH. Ao longo das 8 semanas em animais CTL, DH e EXE. (B): Massa gorda total. #  $P < 0,05$  vs. CTL, \*  $P < 0,05$  vs. DH. (C): Massa gorda relativa. #  $P < 0,001$  vs. CTL, \*  $P < 0,01$  vs. DH. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo. ANOVA; Teste de Bonferroni.

### 4.3- Desenvolvimento do Tecido Adiposo Branco

A partir desses dados fisiológicos, seguimos analisando alguns fatores de transcrição envolvidos na formação do TAB ao longo das 8 semanas, no intuito de esclarecer se o exercício seria capaz de modular essa via. Para isso, verificamos a expressão de três proteínas chaves na promoção da adipogênese SREBP-1c, PPAR $\gamma$  e CEBP $\alpha$ . Notamos que a partir da quarta até o final do experimento, os grupos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram maior expressão de todas essas proteínas quando comparados com os seus controles (Figura 6A – I). Especificamente ao comparar os grupos DH e EXE verificamos que as proteínas SREBP-1c e CEBP $\alpha$  tiveram maior expressão no grupo DH (Figura 6A-F). No entanto, a proteína PPAR $\gamma$  apresentou um comportamento diferente. Na oitava observamos uma maior expressão da PPAR $\gamma$  no grupo EXE (Figura 6G-I). Tal fato pode ser explicado pela diversidade de funções dessa proteína, como melhora da sensibilidade à insulina neste tecido, e diferenciação das células do TAB em TAM.



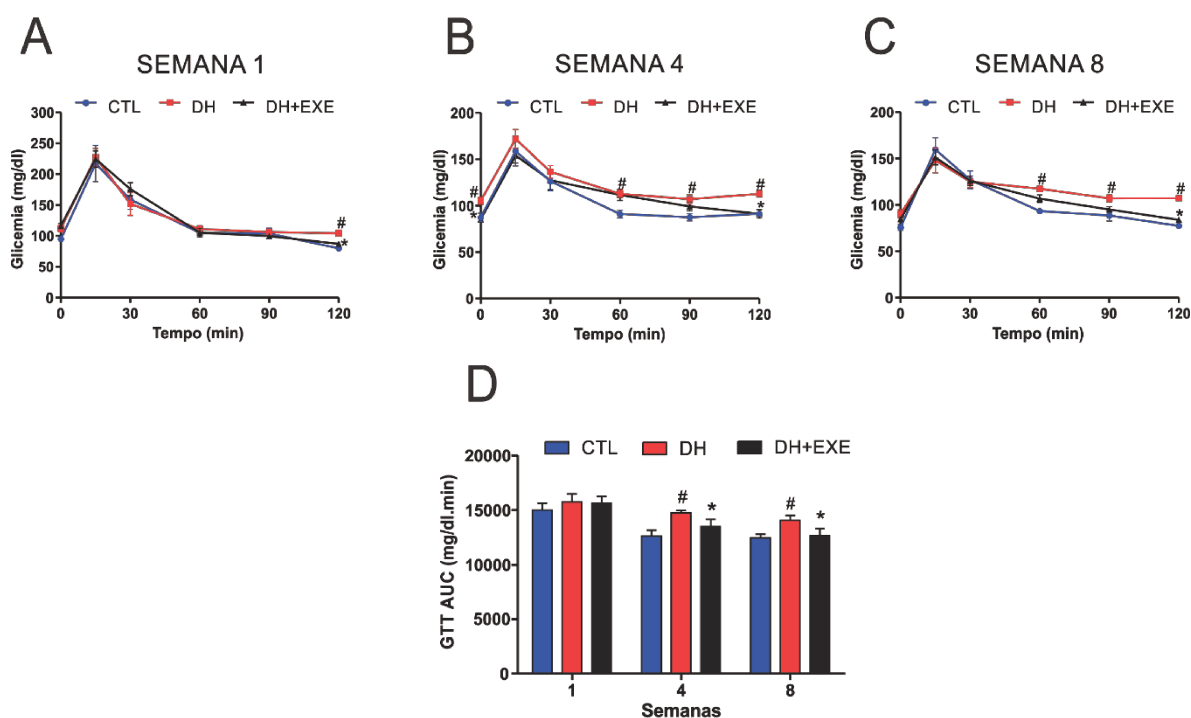
**Figura 6-. Desenvolvimento do Tecido Adiposo Branco.** Blots representativos demonstram no tecido adiposo branco a expressão das proteínas (A-C) SREBP-1c, (D-F) CEBPα e (G-I) PPARγ. Expressão da proteína total. #  $P < 0,05$  vs. CTL e \*  $P < 0,05$  vs. DH. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. ANOVA; Teste de Bonferroni.



## 4.4- Parâmetros Metabólicos e Via de Sinalização da Insulina

### 4.4.1- Testes de tolerância à glicose (GTT)

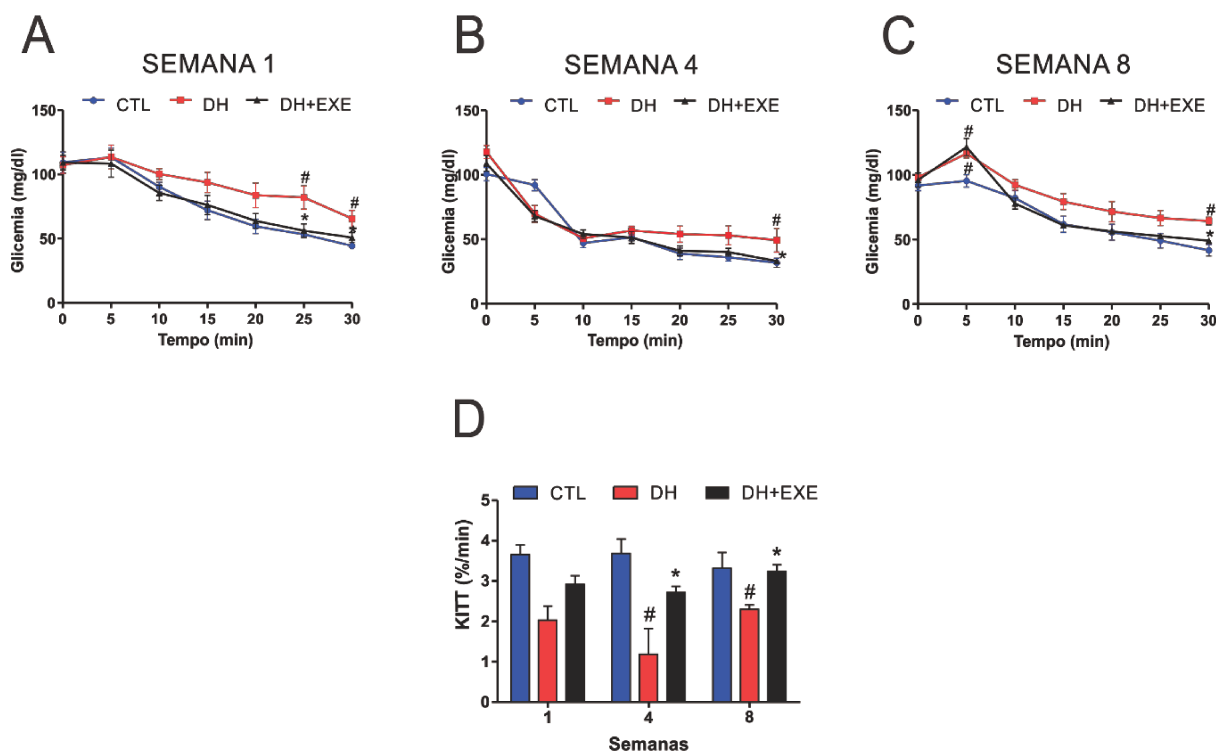
O passo seguinte consistiu em observar o desenvolvimento da intolerância à glicose e da RI ao longo das 8 semanas, bem como do efeito do exercício sobre estes parâmetros, através dos testes de tolerância à glicose e à insulina, respectivamente GTT e ITT. Avaliando os resultados do GTT, constatamos que da quarta semana em diante os animais do grupo DH apresentavam maior área sob a curva, ou seja, intolerância à glicose, quando comparados aos animais controle (Figura 7A-D). Em contrapartida, os animais do grupo EXE ficaram protegidos desse efeito deletério da dieta hiperlipídica (Figura 7A-D). Quanto à glicemia de jejum, como era de se esperar em se tratando de ratos *Wistar*, nenhuma diferença fora observada entre qualquer um dos grupos estudados, ao longo de todo o protocolo.



**Figura 7-. Caracterização da Tolerância à Glicose.** (A): Teste de tolerância à glicose ao final da semana 1. (B): Teste de tolerância à glicose ao final da semana 4. (C): Teste de tolerância à glicose ao final da semana 8. (D): AUC. #  $P < 0.05$  vs CTL e \*  $P < 0.05$  vs DH. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.4.2- Testes de tolerância à insulina (ITT)

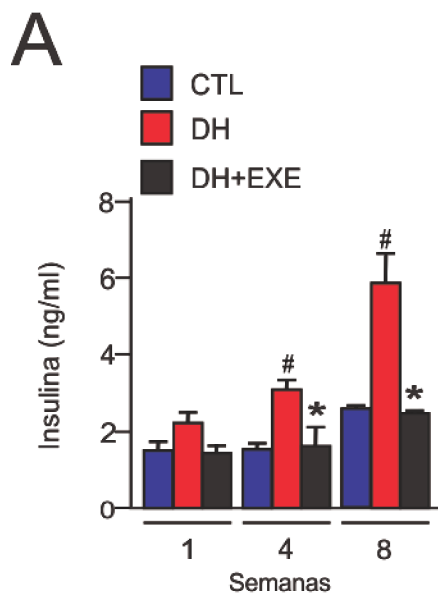
Em relação ao ITT, os resultados mostraram que a RI no grupo DH já pode ser constatada mesmo após uma semana de dieta hiperlipídica, mantendo-se evidente ao longo do estudo (Figura 8A-D). E que assim como ocorrera para a tolerância à glicose, o exercício também foi capaz de impedir o desenvolvimento da RI ao longo das 8 semanas de dieta hiperlipídica (Figura 8A-D).



**Figura 8-. Caracterização da Tolerância à Insulina.** (A): Curva de resposta da glicose durante o teste de tolerância à insulina ao final da semana 1. (B): Curva de resposta da glicose durante o teste de tolerância à insulina ao final da semana 4. (C): Curva de resposta da glicose durante o teste de tolerância à insulina ao final da semana 8. (D): KITT. #  $P < 0.05$  vs CTL e \*  $P < 0.05$  vs DH. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.4.3- Dosagem Sérica dos níveis de insulina

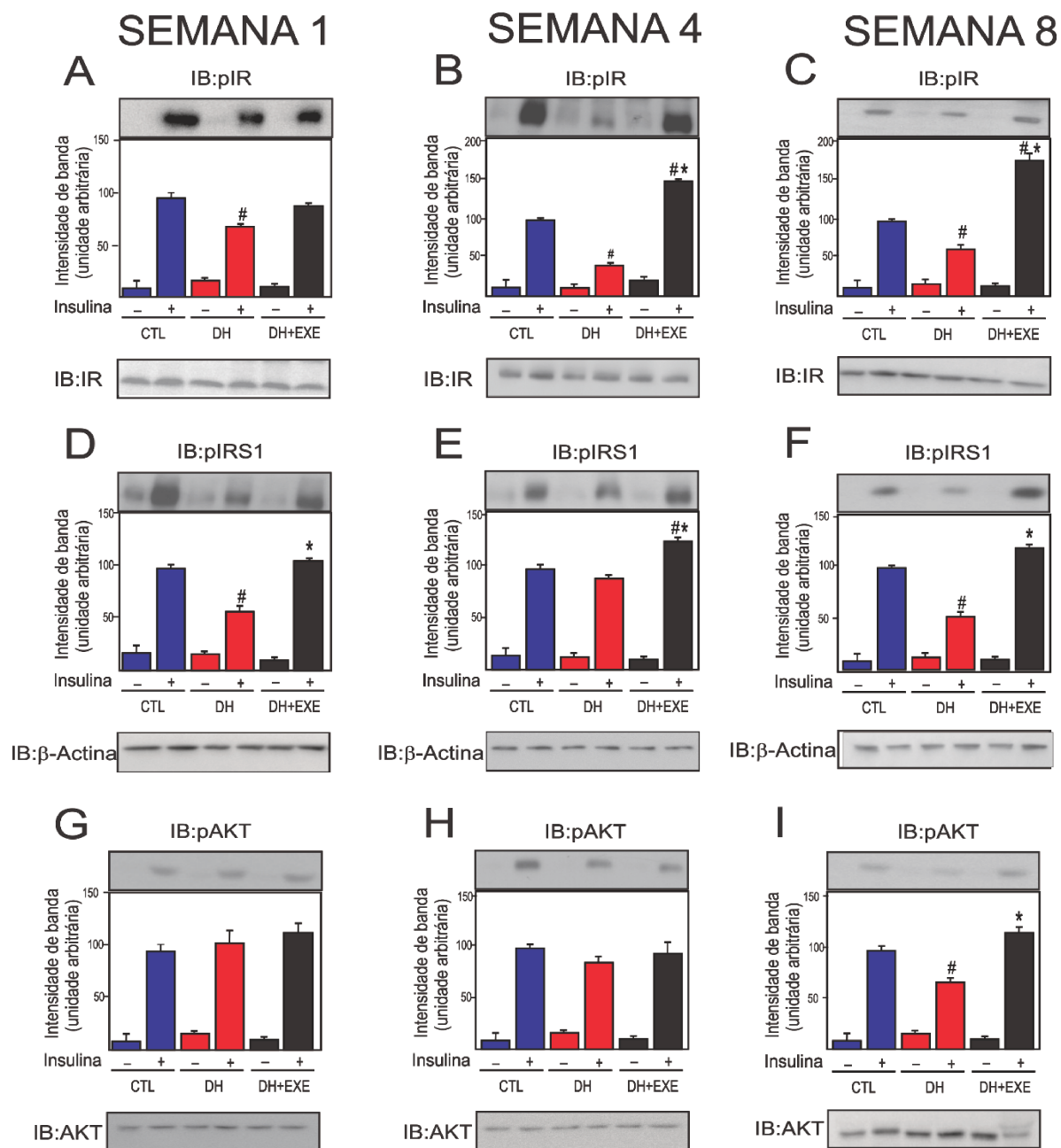
A administração da dieta hiperlipídica levou a um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na circulação de insulina a partir da quarta semana no grupo DH, comparado com os grupos CTL e EXE (Figura 9). Por outro lado, o grupo EXE apresentou valores significativamente mais baixos que o grupo DH e muito próximos do grupo CTL. Esses resultados corroboram com os anteriores destacando a importância do exercício na sensibilidade à insulina.



**Figura 9-. Níveis séricos de Insulina.** (A): Níveis circulantes de insulina ao final das semanas 1, 4 e 8. <sup>#</sup>  $P < 0,05$  vs CTL e <sup>\*</sup>  $P < 0,05$  vs DH. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.4.4- Expressão das proteínas totais e fosforiladas (IR $\beta$ , IRS-1 e Akt) envolvidas na sinalização da insulina no tecido adiposo branco

O passo seguinte foi analisar as células do tecido adiposo branco para determinar se a melhora na sensibilidade à insulina induzida pelo exercício crônico foi acompanhada pela melhora na sinalização de insulina neste tecido. Para isso, o primeiro passo foi avaliar a ativação do receptor de insulina (IR $\beta$ ). Os resultados mostraram que a fosforilação em tirosina do IR $\beta$ , em resposta a um estímulo de insulina, esteve reduzida nos animais do grupo DH em relação aos do grupo CTL e EXE (figura 10A-C). Além disso, o treinamento crônico foi capaz de estimular a expressão desta proteína em níveis maiores do que o grupo CTL após a quarta semana de exercício (Figura 10A-C). O segundo passo, foi analisar a ativação do substrato do receptor de insulina (IRS-1). Notamos que a fosforilação em tirosina do IRS-1 esteve reduzida nos animais do grupo DH em relação aos do grupo CTL e que o treinamento crônico foi capaz de reverter quase totalmente essa redução (Figura 10D-F). Em linha com os resultados do receptor de insulina, o seu substrato também apresentou níveis maiores que o grupo CTL após a quarta semana de treino (Figura 10D-F). Por fim, avaliamos a proteína quinase B (Akt) (Figura 10G-I). Observamos que a fosforilação em serina, mostrou-se menor no grupo DH na oitava semana de dieta comparado com os demais grupos (Figura 10I). E nesse mesmo período verificamos que o exercício foi capaz de aumentar substancialmente a sua expressão. Com esses resultados podemos notar o efeito protetor do exercício físico sobre a sinalização da insulina no TAB.



**Figura 10- Via de sinalização da insulina no Tecido Adiposo Branco.** Blots representativos demonstram no tecido adiposo branco a fosforilação em tirosina de IR $\beta$  (A-C) e IRS-1 (D-F), e a fosforilação em serina 473 de Akt (G-I). Expressão da proteína total. #  $P < 0,05$  vs CTL e \*  $P < 0,05$  vs DH. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. ANOVA; Teste de Bonferroni.

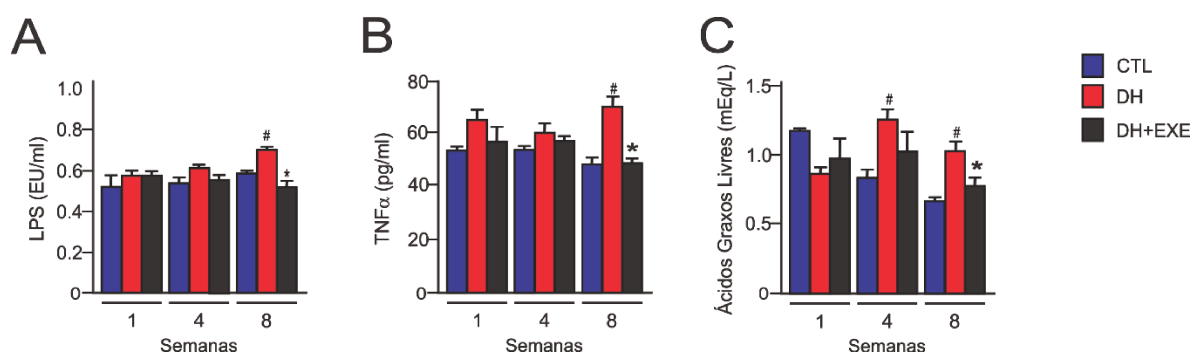
## 4.5- Parâmetros Metabólicos e Vias Inflamatórias

### 4.5.1- Dosagem sérica dos níveis de LPS, TNF $\alpha$ e Ácidos graxos livres

Para verificar o estado de inflamação do organismo analisamos primeiramente os níveis circulantes da endotoxina LPS. O grupo DH apresentou maiores níveis na oitava semana, quando comparado com os demais grupos (Fig 11A). Já o grupo EXE apresentou valores muito próximos do grupo CTL, o que enfatiza o efeito protetor do exercício contra a inflamação em decorrência da dieta hiperlipídica.

Na mesma linha, fomos analisar os níveis circulantes de TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória capaz de gerar vários sinais que ativam vias responsáveis pela inibição da ação da insulina (Uysal *et al.*, 1997). Observamos que na oitava semana o grupo DH apresentou maiores níveis dessa citocina pró-inflamatória, comparado com os ratos CTL, e o protocolo de exercício crônico foi capaz de atenuar o aumento de TNF- $\alpha$  (Fig, 11B).

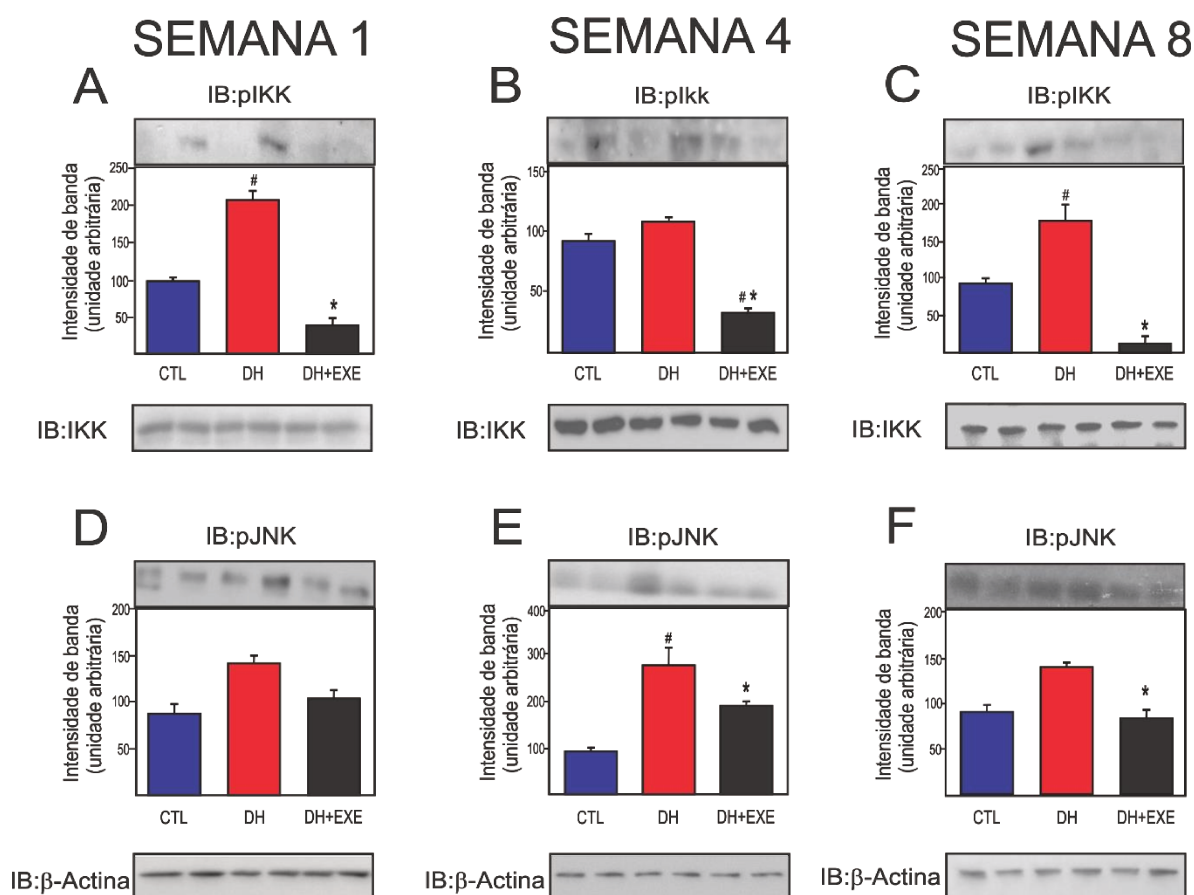
Diante disso quantificamos também os níveis de AGLs durante a aplicação do protocolo. Podemos notar, que a partir da quarta semana o grupo DH apresenta valores maiores de AGLs do que os demais grupos. E na oitava semana o exercício foi eficaz em diminuir estes níveis (Figura 11C).



**Figura 11- Níveis circulantes de, LPS e TNF- $\alpha$  e Ácidos graxos livres.** (A) LPS. (B) TNF $\alpha$  (C) Ácidos graxos livres. #  $P < 0,01$  vs CTL e \*  $P < 0,01$  vs DH. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.5.2- Expressão das proteínas totais e fosforiladas IKK $\beta$ e JNK no tecido adiposo branco

Na sequência, verificamos a influência da dieta hiperlipídica no perfil de ativação das serinas quinases IKK $\beta$  e JNK do TAB. Notamos que desde a primeira semana o grupo DH apresentou maior fosforilação de IKK $\beta$  quando comparado aos demais grupos (Figura 12A-C). Além disso, podemos constatar que o exercício foi capaz de atenuar essa fosforilação a níveis inferiores ao apresentado pelo grupo CTL (Figura 12A-C). Já a fosforilação de JNK foi maior no grupo DH a partir da quarta semana comparado com os demais grupos e o exercício também foi capaz de atenuar essa fosforilação.



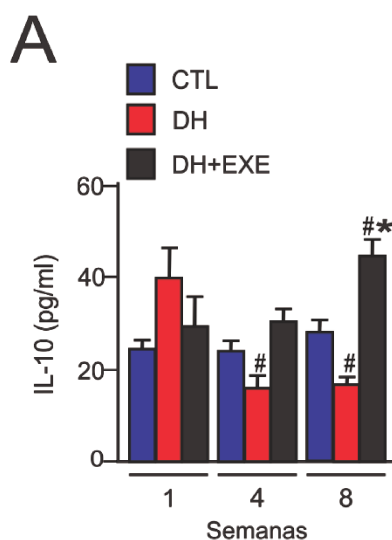
**Figura 12- Vias inflamatórias das serinas quinases IKK $\beta$  e JNK no Tecido Adiposo Branco.** Blots representativos demonstram no tecido adiposo branco a fosforilação de IKK $\beta$  (A-C), e a fosforilação de JNK (D-F). Expressão da proteína total. #  $P < 0,05$  vs CTL e \*  $P < 0,05$  vs DH. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. ANOVA; Teste de Bonferroni.



## 4.6- Parâmetros Metabólicos anti-inflamatórios

### 4.6.1- Dosagem sérica dos níveis de IL-10

Como os níveis plasmáticos de IL-10 são relacionados positivamente com a sensibilidade à insulina em indivíduos saudáveis e são reduzidos em indivíduos obesos (Hong *et al.*, 2009). Diante disso, nós procuramos verificar se o exercício crônico de oito semanas poderia contribuir para manter ou até mesmo aumentar os níveis dessa adipocina anti-inflamatória. Nós então analisamos os níveis circulantes de IL-10, e observamos menores níveis no grupo DH comparado ao grupo CTL (Fig 13A). Por outro lado, o exercício crônico de oito semanas resultou em significativo aumento nos níveis de IL-10 na circulação, até mesmo quando comparados aos observados nos animais do grupo CTL (Fig 13A).

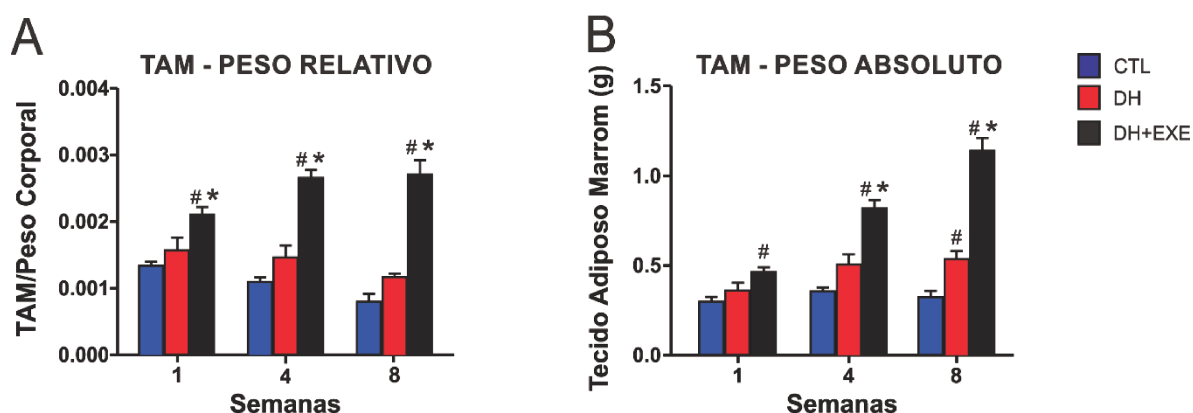


**Figura 13- Níveis circulantes de IL-10.** (A) IL-10. <sup>#</sup>  $P < 0,05$  vs CTL e <sup>\*</sup>  $P < 0,05$  vs DH. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. ANOVA; Teste de Bonferroni.

## 4.7- Tecido Adiposo Marrom

### 4.7.1- Caracterização do TAM

Ao analisarmos o desenvolvimento do tecido adiposo marrom escapular (TAM) ao longo das oito semanas de treino verificamos o aumento da sua massa nos grupos DH e CTL, ou seja, a administração de DH e dieta padrão promoveu o ganho relativo desse tecido, contudo este fora bem menos expressivo que o constatado junto ao TAB (Figura 14A-B). Por outro lado, quando comparamos o ganho obtido pelo grupo EXE com o do DH, verificamos a impressionante capacidade do treinamento de natação em promover o crescimento do TAM, uma vez que este fora observado tanto em termos absolutos quanto relativamente ao peso corporal (Figura 14A-B).

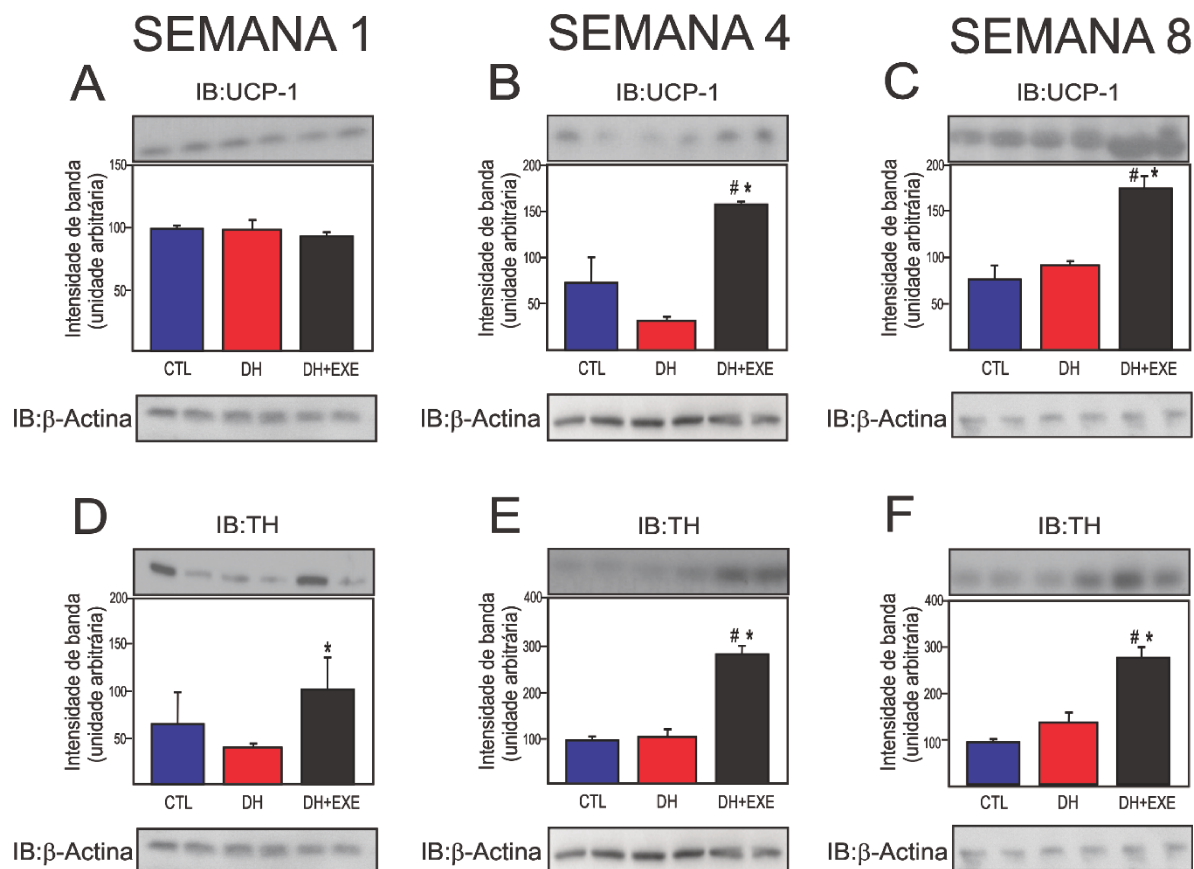


**Figura 14-. Caracterização do crescimento do tecido adiposo marrom.** (A): Evolução temporal do tecido adiposo marrom interescapular relativo. (B): Evolução temporal do tecido adiposo marrom interescapular absoluto. #  $P < 0,001$  vs. CTL e \*  $P < 0,001$  vs. DH. Ao longo das 8 semanas em animais CTL, DH e EXE. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.7.2- Expressão das proteínas totais UCP-1 e TH

O passo seguinte foi analisar a ativação do TAM a partir da expressão de duas proteínas chaves envolvidas no processo de termogênese, UCP-1 e Th. Nossos resultados foram capazes de mostrar que o exercício físico promove aumento da expressão de UCP1 a partir da quarta semana de treino mantendo sua expressão elevada até a oitava semana de treino, quando comparada com os grupos CTL e DH (Figura 15A-C).

Ao analisarmos a expressão da Th, verificamos que o grupo EXE também apresentou os maiores níveis de expressão de Th ao final da oitava semana do protocolo, quando comparados com os apresentados pelos grupos DH e CTL (Figura 15D-F). Vale a pena destacar que esse efeito pode ser visto desde a primeira semana de estudo.

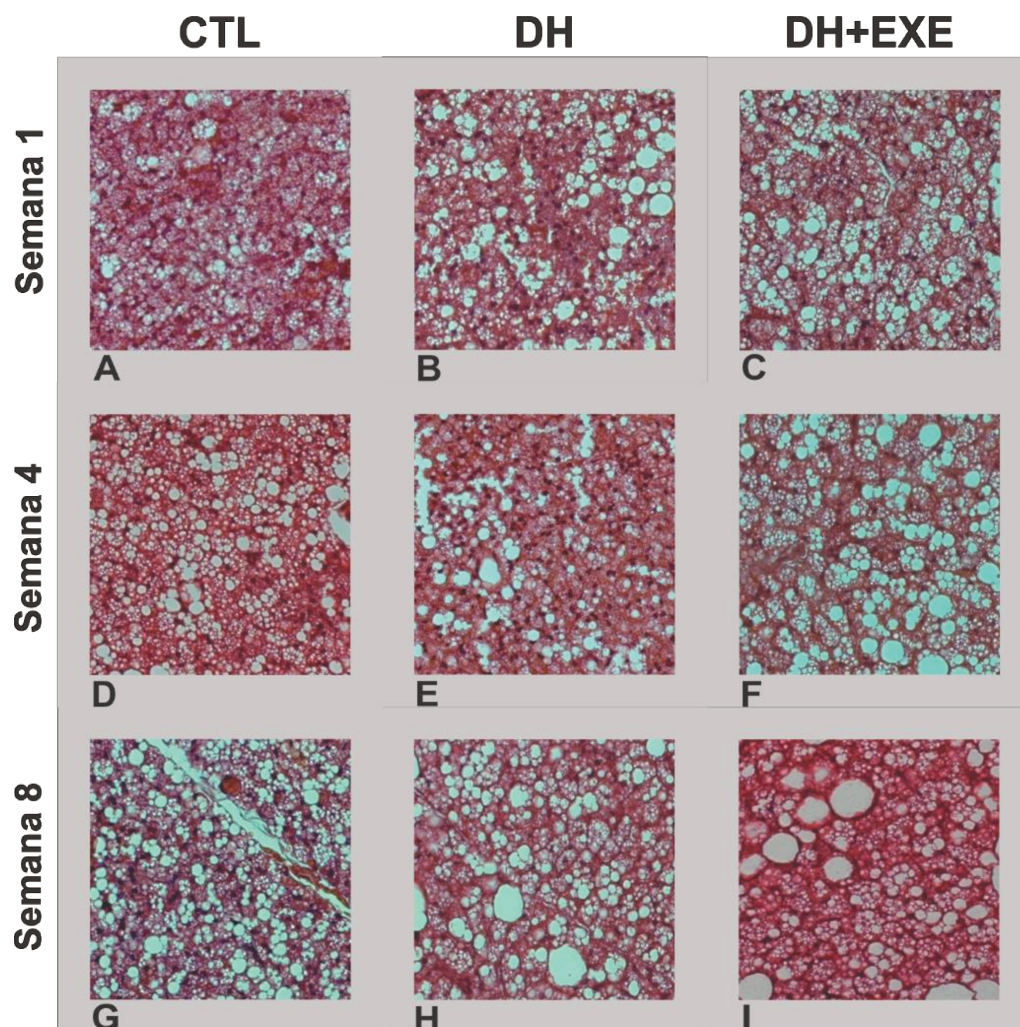


**Figura 15- Expressão das proteínas UCP-1 e TH no Tecido Adiposo Marrom.** Blots representativos demonstram no tecido adiposo marrom a UCP-1 (A-C), e a TH (D-F). Expressão da proteína total. #  $P < 0,05$  vs CTL e \*  $P < 0,05$  vs DH. Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.7.3- Morfologia do TAM

Uma vez caracterizado o efeito protetor do treinamento de natação sobre a resistência à insulina, níveis circulantes de fatores inflamatórios e a expressão de proteínas inflamatórias do TAB em decorrência da DH, os passos subsequentes foram: verificar o efeito da DH sozinha, e em conjunto com o exercício na morfologia e na infiltração e polarização de macrófagos do TAM. Para tanto lançamos mão da utilização de estudos histológicos de HE (morfologia) e técnica de imunofluorescência, fazendo co-marcação de F4/80 (vermelho) para macrófagos e MGL (verde) para polarização M2.

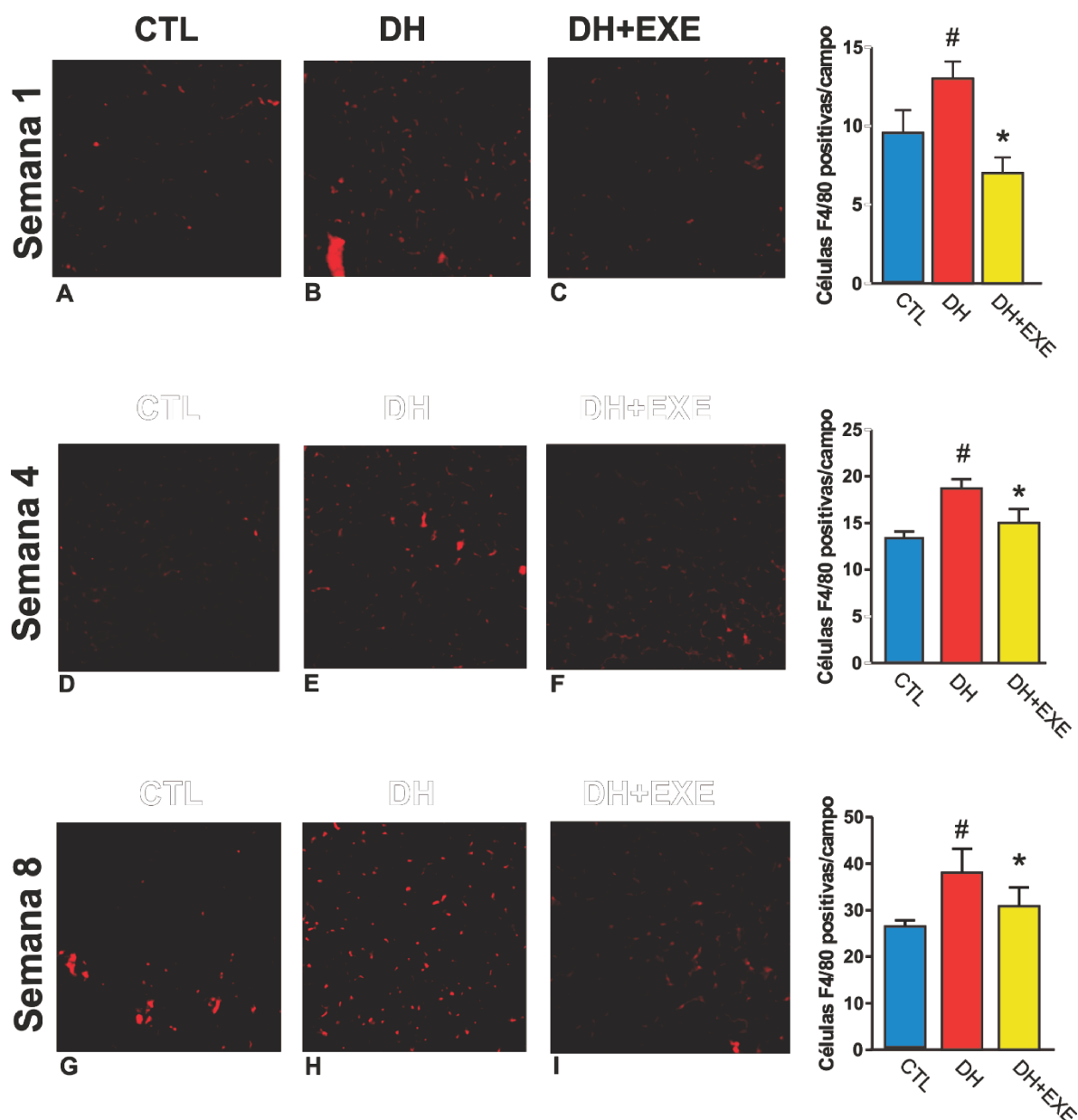
Os estudos histológicos evidenciaram que a dieta hiperlipídica é capaz de alterar a estrutura normal do TAM, como demonstrado pelo aumento na quantidade de gordura no interior dos adipócitos. Esse aumento foi progressivo da primeira à oitava semana (Figura 16A-I). O grupo EXE não foi capaz de proteger desse efeito da dieta hiperlipídica, sendo que em alguns casos os animais desse grupo apresentaram maior acúmulo de gordura nos adipócitos ao final das 8 semanas do protocolo, quando comparado aos grupos CTL e DH (Figura 16A-I). Entretanto, analisando mais profundamente, o tamanho das gotículas de gordura nos pareceu menor nos animais treinados do que nos sedentários.



**Figura 16- Caracterização morfológica do tecido adiposo marrom.** Microfotografias de marcação de HE ao final da semana 1 (A-C), semana 4 (D-F) e semana 8 (G-I). As imagens são representativas de 3 animais por grupo.

#### 4.7.4- Infiltração de macrófagos

Para determinar a infiltração de macrófagos, examinamos imagens de fluorescência para F4/80 (marcador de macrófagos) ao longo das 8 semanas de DH, e pudemos constatar o progressivo aumento dessa marcação para os animais sedentários e que, em contrapartida, os animais exercitados apresentaram uma atenuação nessa infiltração (Figura 17A-I).

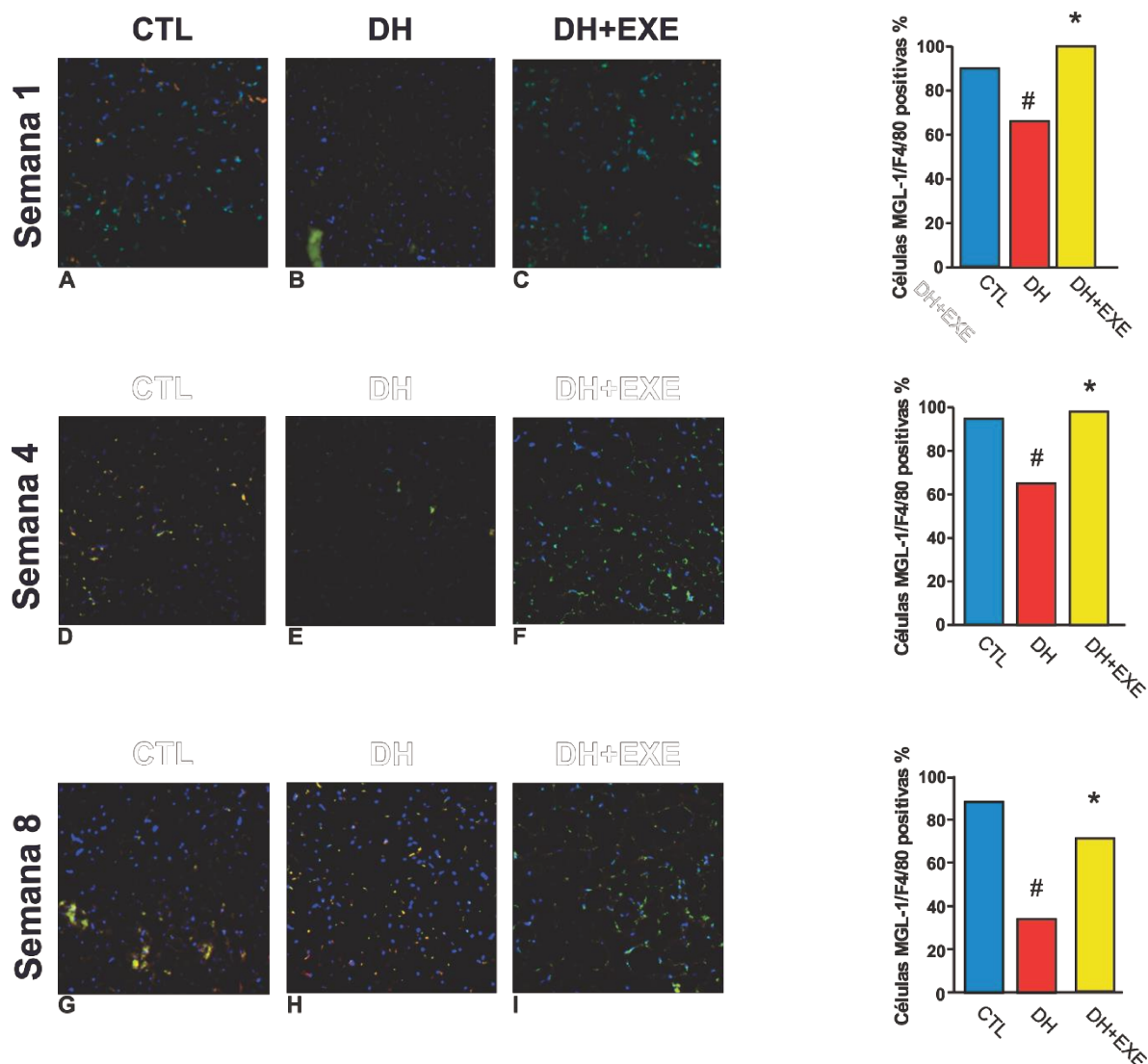


**Figura 17- Caracterização da infiltração de macrófagos.** Microfotografias representativas de marcação F4/80 acompanhadas de quantificações de células positivas para F4/80 (vermelho) em tecido adiposo marrom dos grupos CTL, DH e EXE ao final da semana 1 (A-C), semana 4 (D-F), semana 8 (G-I). Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 3 a 6 animais por grupo. <sup>#</sup>  $P < 0.05$  vs. CTL, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$  vs. HFD. ANOVA; Teste de Bonferroni.

#### 4.7.5- Polarização do tipo M2

Por último, avaliamos como estava a ativação alternativa de macrófagos do tipo M2, já que recentemente foi demonstrado a importância dessa ativação alternativa (M2) para a manutenção da termogênese no TAM (Nguyen *et al.*, 2011). Para isso, analisamos as imagens de fluorescência para MGL-1 (marcador de M2). Notamos que ao longo das 8 semanas, o grupo DH apresentou um declínio na razão M2/M1 no TAM, quando comparado com a marcação observada no grupo controle (Figura 18A-I). Já o grupo EXE não sofreu tal alteração, ou seja, teve a razão M2/M1 mantida a níveis bem próximos, se não muitas vezes maiores, àqueles encontrados nos animais do grupo CTL (Figura 18A-I).





**Figura 18- Caracterização da polarização de macrófagos.** Microfotografias representativas de marcação MGL-1 (verde) e F4/80 (vermelho), quantificações de células positivas para MGL-1 em relação à F4/80 (vermelho) em tecido adiposo marrom de animais dos grupos CTL, DH e EXE ao final da semana 1 (A-C), semana 4 (D-F), semana 8 (G-I). Os dados estão apresentados em  $\pm$  EPM de 3 a 6 animais por grupo. #  $P < 0.05$  vs. CTL, \*  $P < 0.05$  vs. HFD. ANOVA; Teste de Bonferroni.



## **5- DISCUSSÃO**



## 5- DISCUSSÃO

A obesidade é considerada uma epidemia mundial. Isso a torna um problema de saúde pública global, e para agravar essa condição, está frequentemente associada ao desenvolvimento da DM2, alteração metabólica que primeiramente é caracterizada por RI e hiperglicemia.

Dentre os fatores que contribuem para o seu desenvolvimento destacam-se os fatores ambientais como as dietas ricas em gorduras saturadas e o sedentarismo. O balanço energético positivo, que ocorre quando a ingestão calórica é superior a energia gasta, é o fator chave para o estabelecimento da obesidade, promovendo crescimento nos estoques de gordura o que contribui para o aumento no peso corporal. Estudos realizados com animais demonstraram que a alimentação hipercalórica e rica em lipídeos é um dos fatores mais importantes que leva a obesidade (Carneiro, 2005). Desta maneira, animais submetidos à dieta hiperlipídica palatável mostram, a partir de três semanas, um aumento na quantidade de tecido adiposo, com tendências a alterações no perfil lipídico e nas etapas iniciais da sinalização da insulina (Estadella *et al.*, 2004).

Em nosso estudo pudemos observar que os animais alimentados com a dieta hiperlipídica foram os que alcançaram os maiores valores de peso corporal. Especificamente ao analisar os dois grupos alimentados com dieta hiperlipídica, verificamos que a partir da sétima semana o exercício físico foi capaz de atenuar esse aumento. Em acordo com nossos resultados, estudo realizado por Xu e colaboradores em 2011, com camundongos submetidos a 8 semanas de exercício associado com dieta hiperlipídica, obteve diferença entre o peso dos camundongos exercitados e sedentários, ambos com dieta hiperlipídica, a partir da sexta semana. Outro estudo, realizado com ratos submetidos somente a 4 semanas de exercício, também verificou diferença no peso dos animais exercitados e sedentários alimentados com dieta hiperlipídica (Gollisch *et al.*, 2009). Essa diferença observada precocemente, ou seja, após 4 semanas, pode estar relacionada com diferenças no protocolos de exercício utilizados. Na sequência, em nosso estudo, comparamos a ingestão dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica, DH e EXE, ao longo das 8 semanas para verificar se essa diferença no peso corporal deu-se em virtude do gasto energético em decorrência do treinamento ou devido a

diferenças no padrão alimentar. Ao analisarmos os resultados constatamos que não houve diferença de ingestão entre esses grupos. Quando tomados em conjunto, esses dados mostram que o exercício pode desempenhar um papel importante na manutenção do peso corporal quando o animal é submetido a longos períodos de dieta hiperlipídica, o que justifica o emprego do exercício físico como ferramenta terapêutica no intuito de prevenir o desenvolvimento da obesidade, mesmo naqueles indivíduos que se alimentam com dietas ricas em gorduras saturadas.

Na mesma linha, o crescimento do TAB epididimal, da massa gorda absoluta e relativa foi maior no grupo DH, quando comparados com os demais grupos. Esses resultados estão de acordo com os apresentados por Baynard e colaboradores (2012) em que camundongos C57BL submetidos a 6 semanas de exercício em esteira, concomitante com dieta, mostraram redução na massa de gordura epididimal do grupo exercitado comparado com o grupo alimentado com dieta hiperlipídica sedentário. Em outras palavras, os resultados obtidos comprovam a capacidade do exercício aeróbio proteger a composição corporal em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

Visto que a adipogênese é modulada por alguns fatores de transcrição incluindo PPAR $\gamma$  e CEBP $\alpha$ , os quais são cruciais para a formação do adipócito, fomos verificar a expressão dessas proteínas envolvidas no processo de crescimento do TAB. Em conjunto verificamos ao final do experimento uma maior expressão das proteínas CEBP $\alpha$  e SREBP-1c no grupo DH, corroborando com os demais resultados apresentados no presente estudo. No entanto, a expressão de PPAR $\gamma$  surpreendentemente foi muito mais elevada no grupo EXE. Muitas pesquisas apontam que PPAR $\gamma$  é uma molécula complexa que está envolvida não somente na formação do adipócito como também na função do adipócito maduro, controlando genes envolvidos na homeostase da glicose, na remodelação do tecido e na diferenciação das células do TAB em TAM (Ahmadian *et al.*, 2013). Essas outras funções podem ser responsáveis pelo aumento na expressão do PPAR $\gamma$  durante o protocolo de treinamento. Dentre elas podemos destacar o papel do PPAR $\gamma$  como um regulador essencial para a diferenciação de macrófagos do tipo M2, o que contribui para um estado anti-inflamatório do tecido (Vats *et al.*, 2006). Nesse contexto, em 2010, um grupo japonês

apresentou indícios de polarização de macrófagos no sentido M2 em camundongos C57BL após 16 semanas de treinamento em esteira (Kawanishi *et al.*, 2010). Apesar de no presente estudo não verificarmos o estado de polarização de macrófagos no TAB, outro estudo realizado por nosso laboratório comprovou maior polarização do tipo M2 no tecido adiposo de ratos *Wistar* alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos a um treinamento de 4 semanas de natação (dados não publicados). Nosso grupo ainda demonstrou, que mesmo uma única sessão de exercício agudo já é capaz de promover a polarização de macrófagos no sentido M2 em ratos *Wistar* com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Oliveira *et al.*, 2013). Avaliando o exposto, podemos considerar a hipótese de que o PPAR $\gamma$  pode desempenhar um papel na polarização de macrófagos induzida pelo exercício físico aeróbio.

Outro aspecto interessante dos nossos resultados foi a capacidade do exercício físico em atenuar a intolerância à glicose e a RI, normalmente observadas em animais submetidos à dieta hiperlipídica, indicando assim um papel protetor sobre a sensibilidade à insulina nesses animais. Nossos resultados estão em acordo com os obtidos em estudo prévio realizado em camundongos C57BL (4 semanas de idade) submetidos à DH sozinha e também concomitantemente com exercício físico aeróbico por 8 semanas, onde foi demonstrado que o exercício de esteira diminuía o efeito da DH sobre a intolerância à glicose (Xu *et al.*, 2011). No entanto, podemos destacar que o efeito protetor do exercício foi ainda mais evidente em nosso estudo, o que pode ter ocorrido devido a algumas diferenças metodológicas empregadas entre os dois estudos, como modelo animal, tipo e intensidade do exercício utilizado. Outro estudo realizado por Bradley e colaboradores (2008) também observou melhora na tolerância a glicose e sensibilidade à insulina em animais exercitados voluntariamente e alimentados com dieta hiperlipídica. Em relação ao modelo animal utilizado, está bem estabelecido que os ratos *Wistar* apresentam maior capacidade de elevar seus níveis de insulina quando comparados com camundongos, o que pode ser facilmente observado pela diferença em sua glicemia de jejum, visto que os ratos *Wistar*, ao contrário dos camundongos, não apresentam hiperglicemia mesmo depois de 20 semanas de DH, como demonstrado em estudo prévio de nosso laboratório (Oliveira *et al.*, 2011). Ainda nesse contexto, inúmeros estudos, de nosso e de outros grupos, em humanos ou modelos animais, demonstraram que o exercício físico aeróbico pode ser utilizado como uma importante

ferramenta terapêutica no combate a RI associada à obesidade (Ross *et al.*, 2004, Frosiq e Richter, 2009, Gollisch *et al.*, 2009, Praet e Van Loon, 2009, Vieira *et al.*, 2009, Oliveira *et al.*, 2011).

A RI é o principal ponto de intersecção entre a obesidade, o DM2 e suas complicações (Shoelson *et al.*, 2006). Muitas pesquisas já consolidaram sua associação com redução na fosforilação de IR $\beta$ , IRS-1 e Akt nos tecidos-alvo desse hormônio (Boura-Halfon e Zick, 2009). Nossos resultados demonstraram a influência do exercício na via de sinalização da insulina no TAB, pelo aumento dos níveis de fosforilação de proteínas, tais como IR $\beta$ , IRS-1 a partir da quarta semana de treino e Akt a partir da oitava semana. Em conjunto, estes dados suportam a ideia que o exercício atua aumentando a sensibilidade à insulina no TAB e, conseqüentemente, impede o efeito deletério sobre a sinalização de insulina induzida pela dieta rica em gordura.

Já está bem estabelecido que a quantidade circulante de citocinas e combustíveis metabólicos, como os AGLs não esterificados são liberados pelo tecido adiposo e podem modular a ação da insulina. Um aumento na massa de triglicerídeos armazenados, especialmente no tecido adiposo visceral, leva a grandes adipócitos os quais são resistentes à capacidade da insulina em suprimir a lipólise. Isso resulta em um aumento da liberação de AGLs não esterificados, o que agrava a RI em tecidos como músculo, fígado e tecido adiposo (Praet e Van Loon, 2009). Nossos resultados mostraram que a dieta hiperlipídica causou um aumento significativo na liberação de AGLs a partir da quarta semana no grupo DH e que o exercício físico foi capaz de atenuar esse aumento na oitava semana. Já ao analisar o LPS, uma endotoxina inflamatória, notamos que o grupo DH apresentou valores significativamente elevados somente na oitava semana. E da mesma forma que os AGLs o exercício foi capaz de atenuar esse aumento. Esse resultado pode colaborar com a tese de efeito anti-inflamatório do exercício físico, uma vez que há evidências de que os AGLs, assim como o LPS, podem promover a inflamação através da ativação do TLR-4 e também de outros receptores como o TNFR (Gregor e Hotamisligil, 2011, Oliveira *et al.*, 2011). Sendo assim, com base em nossos resultados, sugerimos que a capacidade de atenuar o aumento de AGLs e LPS, pode ser um dos mecanismos possíveis para a melhoria da sensibilidade à



insulina induzida pelo exercício. Além disso, o exercício modulou o processo inflamatório diminuindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias através do bloqueio a ativação das vias inflamatórias.

Da mesma forma, os níveis circulantes de TNF- $\alpha$  também se mostraram elevados no grupo DH na oitava semana, e o exercício foi capaz de minimizar esse aumento. Esses dados estão de acordo com estudo, realizado com camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e exercício de corrida voluntária por 8 semanas, no qual foi analisado a expressão de RNAm de TNF $\alpha$  no TAB e verificou-se que o exercício foi capaz de atenuar o aumento da sua transcrição (Huang *et al.*, 2010).

Muitas pesquisas já comprovaram que a ativação de JNK e IKK é um dos principais mecanismos na RI (Hotamisligil, 2006). Essas serinas quinases são ativadas em consequência da ação de citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$  e também AGLs, e a partir daí são capazes de inibir a ação da insulina através da fosforilação do IRS-1 em serina. Em nosso estudo observamos que o exercício foi capaz de minimizar a fosforilação dessas serinas quinases algumas vezes até mesmo abaixo daqueles apresentados pelo grupo CTL.

Diante de todo esse efeito anti-inflamatório apresentado pelo exercício, fomos verificar os níveis séricos de IL-10, citocina anti-inflamatória fortemente relacionada com a sensibilidade à insulina em indivíduos saudáveis e que se apresenta reduzida em indivíduos obesos (Hong *et al.*, 2009). Nesse sentido, nosso estudo comprovou a menor circulação de IL-10 a partir da quarta semana no grupo DH, e evidenciou o aumento dessa citocina após 8 semanas de treino no grupo EXE. O aumento de IL-10 no grupo EXE, pode estar contribuindo para uma maior polarização de macrófagos M2 nesse tecido, o que contribui para os resultados obtidos no presente estudo. Baseamos essa afirmação em estudo prévio realizado por Lumeng e colaboradores (2007), o qual demonstrou que macrófagos do TAB de animais magros expressam maior polarização do tipo M2, e isso foi associado com o aumento na expressão de IL-10. Este mesmo estudo também mostrou que IL-10 atuou positivamente na via de sinalização da insulina, melhorando a absorção de glicose e protegendo contra à RI mediada por TNF $\alpha$  em adipócitos isolados.

Além de IL-10, o TAM vem sendo fortemente associado com melhora da sensibilidade à insulina e com menor massa do TAB (Stanford *et al.*, 2013). Em nosso estudo pudemos comprovar o efeito direto do exercício sobre o aumento da massa do TAM. Esses resultados em conjunto, indicam um papel protetor do exercício físico sobre a composição corporal diante da dieta hiperlipídica, acompanhado de aumento na massa do TAM e redução na do TAB epididimal. Esse aumento na massa do TAM se faz particularmente importante tendo em vista as crescentes evidências de que esse tecido pode proteger contra o ganho de peso e consequentemente contra a obesidade em humanos (Slocum *et al.*, 2013). Nesse contexto, estimativas apontam que 50g de TAM humano, sob máxima estimulação, seria responsável por até 20% das necessidades calóricas diárias (Rothwell *et al.*, 1983). Assim, a capacidade de promover aumentos da massa e consequentemente da atividade do TAM poderia ter implicações importantes para o tratamento da obesidade e também de suas comorbidades em humanos.

Recentemente, um fator liberado pelas células musculares, em decorrência do exercício aeróbico, foi relacionado com surgimento de células com características de adipócitos marrons, ou seja, que expressam UCP1, no interior do TAB (Bostrom *et al.*, 2012). Esse estudo colocou novamente o exercício em foco para o tratamento da obesidade, uma vez que esse aumento de células com UCP1, provavelmente colaborariam para o melhor controle do peso corporal, por apresentarem alta atividade metabólica. Contudo, somente o aumento na massa do TAM não é suficiente, torna-se importante a busca por mecanismos que possam levar a sua ativação e assim promover o aumento do gasto energético. Está bem estabelecido que a termogênese do TAM ocorra em resposta à exposição ao frio e também à alimentação (Valverde *et al.*, 2005). Existem ainda indícios de que o exercício físico aeróbico também promova essa ativação. Nesse contexto, nossos resultados foram capazes de mostrar que o exercício físico promove aumento da expressão de UCP1 após as 8 semanas de DH concomitante com exercício. Importante destacar que essa diferença fora verificada a partir do término da sexta semana de estudo (dados não apresentados). Esse resultado está em acordo com estudo prévio, o qual demonstrou que 6 semanas de natação aumentavam os níveis de RNAm de UCP1 em TAM de camundongos db/db (Oh *et al.*, 2007).

A seguir investigamos o papel da Th, enzima chave da síntese de catecolaminas. O estudo dessa enzima se faz importante, visto que recentemente foi demonstrada sua necessidade para indução de termogênese em resposta ao frio mediada pelos macrófagos M2 (Nguyen *et al.*, 2011). Nossos resultados mostraram que o exercício foi capaz de elevar substancialmente os níveis de expressão de Th desde a primeira até a oitava semana do protocolo, quando comparados com os demais grupos. Esse resultado está totalmente em acordo com os anteriormente apresentados nesse estudo, uma vez que observamos aumento na massa e expressão de UCP1 em TAM de ratos exercitados. Como a enzima Th é limitante da síntese de catecolaminas pelos macrófagos M2 e sendo esses últimos responsáveis pela ativação de UCP1 era de se esperar seu aumento como consequência do exercício aeróbico.

Quando analisamos a morfologia do TAM, os estudos histológicos mostraram que a DH promove a alteração da estrutura normal do TAM, como evidenciado pelo aumento na quantidade de gordura no interior dos adipócitos, e podemos destacar que esse aumento ocorreu de maneira progressiva ao longo das 8 semanas. De forma interessante, o treinamento de natação não foi capaz de proteger desse efeito da DH, sendo que em alguns casos os animais do grupo EXE ainda apresentaram maior acúmulo de gordura nos adipócitos ao final das 8 semanas do protocolo. Entretanto, analisando mais profundamente, o tamanho das gotículas de gordura nos pareceu menor nos animais treinados do que nos sedentários. Esse aumento do acúmulo de gordura no TAM não foi observado em estudo anterior, no qual o treinamento em esteira promoveu a redução das gotículas no TAM (Slocum *et al.*, 2013). Cabe aqui destacar que tal divergência tenha ocorrido em virtude da diferença do tipo de exercício, da intensidade do mesmo e pelo fato do exercício ter sido feito em animais já obesos, enquanto o nosso foi realizado durante o processo do ganho de peso. Quando tomado em conjunto com os resultados observados no desenvolvimento do TAM, esse efeito do exercício nos parece razoável, uma vez que o TAM dos animais exercitados é o que atinge a maior média de peso. Além disso, esse aumento na deposição de gordura, nos adipócitos do TAM, pode colaborar com o efeito protetor do exercício sobre o desenvolvimento da RI, visto que essa gordura armazenada no TAM pode ser menos deletéria que seu armazenamento no TAB. Dando suporte a essa hipótese, alguns estudos demonstram que o exercício é capaz de promover o aumento da deposição de lipídios no tecido muscular e ainda

sim promover melhora na sensibilidade à insulina (De Fronzo *et al.*, 1987; Bruce *et al.*, 2006). Esse fenômeno conhecido como “paradoxo do atleta”, não é exclusividade de atletas, uma vez que o exercício agudo pode promover esse efeito mesmo em indivíduos sedentários. De fato, foi demonstrado em estudo com modelo animal, que o exercício aumenta a atividade da diacilglicerol aciltransferase em músculo esquelético, o que em troca direciona os substratos de ácidos graxos em triglicerídeos, resultando assim na redução dos níveis de diacilglicerol e também de ceramida, substâncias com conhecidos efeitos negativos sobre a via de sinalização da insulina (Liu *et al.*, 2007). Tendo em vista que as células do TAM apresentam algumas características que as aproximam mais das do tecido muscular do que aquelas presentes no TAB, como por exemplo, elevado conteúdo mitocondrial e alta capacidade de oxidar lipídios, fica essa hipótese de que o exercício também direciona o excesso de lipídios para o TAM, onde ele é estocado e poderá ser prontamente utilizado como combustível para a termogênese do TAM.

Sabe-se que a infiltração de macrófagos M1 no tecido adiposo aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais exercem efeitos deletérios sobre a sinalização de insulina e o metabolismo da glicose (Lumeng *et al.*, 2007). Diante disso, analisamos as imagens de fluorescência para F4/80 ao longo das 8 semanas de DH, e pudemos constatar o progressivo aumento dessa marcação para os animais sedentários e que, em contrapartida, os animais exercitados apresentaram uma atenuação nessa infiltração. Vale a pena mencionar que os animais do grupo EXE apresentaram marcação de F4/80 similar àquela apresentada pelos animais do grupo CTL, evidenciando assim um papel protetor do exercício crônico sobre a infiltração de macrófagos, que é um dos principais mecanismos de promoção de inflamação e consequentemente RI em decorrência de dietas ricas em gordura saturada. Essa capacidade do exercício crônico em reduzir a infiltração de macrófagos foi observada anteriormente pelo nosso (dados não publicados) e também por outro grupo, contudo esse efeito fora demonstrado apenas no TAB (Kawanishi *et al.*, 2010). Outro diferencial do nosso estudo consiste em utilizar o exercício como profilaxia e não apenas como ferramenta terapêutica.

Tendo em vista a importância da ativação alternativa (M2) dos macrófagos para a principal atividade metabólica do TAM, como demonstrado em um elegante estudo

publicado na Nature em 2011 (Nguyen *et al.*, 2011), a etapa seguinte dessa caracterização consistiu na investigação do balanço da polarização de macrófagos no TAM em decorrência da DH e do exercício físico. Ao longo das 8 semanas, o grupo DH apresentou um declínio na razão M2/M1 no TAM, quando comparado com a marcação observada no grupo controle. Ao contrário, o grupo EXE não sofreu tal alteração, ou seja, teve a razão M2/M1 mantida a níveis bem próximos, se não muitas vezes maiores, àqueles encontrados nos animais do grupo CTL.

Dessa forma, podemos concluir, que o exercício físico crônico promove maior atividade do TAM através de um mecanismo orquestrado pela ativação alternativa de macrófagos com a participação de Th. Esses achados nos ajudam a entender um pouco melhor mais um mecanismo pelo qual o exercício pode ajudar no controle do peso para o tratamento e prevenção da obesidade e suas complicações, surgindo como uma alternativa não farmacológica.



## **6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel E.D., Peroni O., Kim J.K., Kim Y., Boss O., Hadro E., Minnemann, T., Shulman G.I., Kahn B.I. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, v. 409, p. 729-33, 2001.

ABESO. Diretrizes brasileiras de obesidade: Associação brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica. São Paulo, 3 edição, 2009.

Ahmadian M., Suh J.M., Hah N., Liddle C., Atkins A. R., Downes M., Evans R. M. PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine*, v. 19, n. 5, p. 557- 566, may 2013.

Ailhaud G., Massiera F., Weill P., Legrand P., Alessandri G.M., Guesnet P. Temporal changes in dietary fats: Role of *n*-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. *Progress in Lipid Research*. v. 45, n.3, p. 203-236, 2006.

Armani A., Mammi C., Marzolla V., Calanchini M., Antelmi A., Rosano G.M.C., Fabbri A., Caprio M. Cellular Models for Understanding Adipogenesis, Adipose Dysfunction, and Obesity. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.110, p.564–572, 2010.

Azevedo J.L. Jr., Carey J.O., Pories W.J., Morris P.G. and Dohm G.L. Hypoxia stimulates glucose transport in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes*, v.44, n.6, p. 695-698, 1995.

Bastard J.P., Maachi M., Lagathu C., Kim M.J., Caron M., Vidal H., Capeau J., Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* , v. 17, n. 1, p.4-12, 2006.

Baynard T., Vieira-Potter V.J., Valentine R.J., Woods J.A.. Exercise training effects on inflammatory gene expression in white adipose tissue of young mice. *Mediators of Inflammation*, 2012.



Bluher M., Fasshauer M., Tönjes A., Kratzsch J., Schön M.R., Paschke R. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, v. 113, n. 9, p. 534–537, 2005.

Boström P., Wu J., Jedrychowski M.P., Korde A., Ye L., Lo J.C., Rasbach K.A., Boström E.A., Choi J.H., Long J.Z., Kajimura S., Zingaretti M.C., Vind B.F., Tu H., Cinti S., Højlund K., Gygi S.P., Spiegelman B.M. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, v.481, n.7382, p. 463-468, 2012.

Boura-Halfon, S., Zick, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.296, n. 4, p. E581-91, 2009.

Bradley R.L., Jeon J.Y., Liu F.F., Maratos-Flier E. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 295, n. 3, p. E586-594, 2008.

Bruce C.R., Thrush A.B., Mertz V.A., Bezaire V., Chabowski A., Heigenhauser G.J., Dyck D.J. Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 291, n.1, p. E99-E107, 2006.

Calder P.C., Grimble R.F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr.*,v. 56, p.S14–9, 2002.

Cancello R., Henegar C., Viguerie N., Taleb S., Poitou C., Rouault C., Coupaye M., Pelloux V., Hugol D., Bouillot J.L., Bouloumié A., Barbatelli G., Cinti S., Svensson P.A., Barsh G.S., Zucker J.D., Basdevant A., Langin D., Clément K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, v.54, n.8, p. 2277-2286, 2005.

Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N.M., Alessi, M.C. and Burcelin, R. Metabolic Endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, v. 56, n. 7, p. 1761-1772, 2007.

Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, v.84, n. 1, p.277-359, 2004.

Carneiro, G. Patogênese. In: Claudino, A.M., Zanella, M.T. Transtornos alimentares e obesidade. Barueri, SP: Manole, 2005, 203p.

Cypess A.M., Lehman S., Williams G., Tal I., Rodman D., Goldfine A.B., Kuo F.C., Palmer E.L., Tseng Y.H., Doria A., Kolodny G.M., Kahn C.R. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult. Humans. *N Engl J Med*, v. 360, n. 15, p. 1509-17, 2009.

Cypess A. M. and Kahn C. R. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, v. 17, n. 2, p. 143–149, 2010.

DeFronzo, R.A., Sherwin R.S., Kraemer, N. Effect of physical training on insulin action in obesity. *Diabetes*, v. 36, n. 12, p. 1379-85, 1987.

De Matteis R, Lucertini F, Guescini M, Polidori E, Zeppa S, Stocchi V, Cinti S, Cuppini R. Exercise as a new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*,23(6):582-90, jun. 2013.

Donath, M.Y., Shoelson, S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*, v.11, n. 2, p. 98-107, 2011.

Estadella, D., Oyama, L.M., Dâmaso, A.R., Ribeiro, E.B., Oller do Nascimento, C.M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*, v. 20, n. 2, p. 218-224, 2004.

Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 115, n. 5, p. 911-919, 2005.

Famer, S.R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism*. v. 4, p.263–273, 2006.

Frosiq, C. e Richter, E.A. Improved insulin sensitivity after exercise: focus on insulin signaling. *Obesity (Silver Spring)*, v. 17, Suppl 3, p. S15-20, 2009.

Gan S.K., Kriketos A.D., Ellis B.A., Thompson C.H., Kraegen E.W., Chisholm D.J. Changes in aerobic capacity and visceral fat but not myocyte lipid levels predict increased insulin action after exercise in overweight and obese men. *Diabetes Care*, v. 26, n. 6, p.1706–1713, 2003.

Gesta S., Tseng Y., Kahn, R. Developmental origin of Fat: Tracking Obesity to its Source. *Cell*, v. 13, p. 242-56, 2007.

Giannopoulou I., Fernhall B., Carhart R., Weinstock R.S., Baynard T., Figueroa A., Kanaley J.A. Effects of diet and/or exercise on the adipocytokine and inflammatory cytokine levels of postmenopausal women with type 2 diabetes. *Metabolism*, v. 54, n. 7, p.866-875, 2005.

Gleeson, M., Bishop, N. C., Stensel, D. J., Lindley, M. R., Mastana, S.S. and Nimmo, M. A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol*, v.11, n.9, p. 607-615, 2011.

Gollisch K.S.C., Brandauer J., Jessen N., Toyoda T., Nayer A., Hirshman M. F., Goodyear L. J. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 297, n. 2, p. E495–E504, 2009.

Gordon, S. and Taylor, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005.

Gregor, M.F., Hotamisligil, G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.*, v.29, p. 415-45, 2011.

Hammett C.J., Prapavessis H., Baldi J.C., Varo N, Schoenbeck U, Ameratunga R, French JK, White HD, Stewart RA. Effects of exercise training on 5 inflammatory markers associated with cardiovascular risk. *Am Heart J.*, v. 151, n. 2, 2006.

Harcourt, B.E., Penfold, S.A., Forbes, J.M. Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation *Nat Rev Endocrinol.*, v.9, n. 2, p. 113-23, 2013.

Hassan M., Latif N., Yacoub, M. Adipose tissue: friend or foe? *Nature*, v.9, n. 12, p. 689-702, 2012.

Hauner H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav.*, v. 83, n.4, p. 653-658, 2004.

Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M., Hotamisligil, G. S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, v.420, n. 6913, p. 333-6, 2002.

Hocking S., Samocha-Bonet D., Milner K.L., Greenfield J. R., Chisholm D. J. Adiposity and Insulin Resistance in Humans: The Role of the Different Tissue and Cellular Lipid Depots *Endocrine Reviews*, v. 34, n. 4, p. 463–500, 2013.

Hong E.G., Ko H.J., Cho Y.R., Kim H.J., Ma Z., Yu T.Y., Friedline R.H., Kurt-Jones E., Finberg R., Fischer M.A., Granger E.L., Norbury C.C., Hauschka S.D., Philbrick W.M., Lee C.G., Elias J.A., Kim J.K. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance

by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes*, v. 58, n. 1, p. 2525–2535, 2009.

Horowitz J.F. Exercise-Induced Alterations in Muscle Lipid Metabolism Improve Insulin Sensitivity. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v. 35, n. 4, p. 192-196, 2007.

Hotamisligil G.S., Murray D.L., Choy L.N., Spiegelman B.M.. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.91, n. 11, p. 4854-4858, 1994.

Hotamisligil G.S., Peraldi P., Budavari A., Ellis R., White M.F., Spiegelman B.M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science*, v.271, n. 5249, p. 665–668, 1996.

Hotamisligil G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, v. 444, n. 7121, p.860-867, 2006.

Huang, P., Li, S., Shao, M., Qi, Q., Zhao, F., You, J., Mao, T., Li, W., Yan, Z., Liu, Y. Calorie restriction and endurance exercise share potent anti-inflammatory function in adipose tissues in ameliorating diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Nutrition & Metabolism*, v. 7, p.2-9, 2010.

Kahn, B. B. and Flier, J. S. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest*, v. 106, p. 473–481, 2000.

Kawanishi N., Yano H., Yokogawa Y., Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev*, v.16, p. 105-118, 2010.

King D.S., Baldus P.J., Sharp R.L., Kesl L.D., Feltmeyer T.L., Riddle M.S. Time course for exercise-induced alterations in insulin action and glucose tolerance in middle-aged people. *J Appl Physiol*, v. 78, p.17–22, 1995.

Kopelman P.G. Obesity as a medical problem. *Nature* v. 404, p. 635-43, 2000.

Jakicic J.M and Otto A.D. Physical activity considerations for the treatment and prevention of obesity. *Am J Clin Nutr.* v. 82, Suppl1, p. 226S-229S, 2005

Jankord R. and Jemiolo B. Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men. *Med Sci Sports Exerc*, v. 36, n. 6, p. 960-964, 2004.

Lefterova M.I., Lazar M.A. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.*, v.20, p.107–114, 2009.

Lidell, M. E. and Enerbäck, S. Brown adipose tissue—a new role in humans? *Nat. Rev. Endocrinol*, v. 6, n. 6, p. 319–325, 2010.

Linhart H.G., Ishimura-Oka K., DeMayo F., Kibe T., Repka D., Poindexter B., Bick R.J., Darlington G.J. C/EBPalpha is required for differentiation of white and brown adipose tissue. *Proc Natl. Acad. Sci.*, v.98, p.12532-12537, 2001.

Liu L., Zhang Y., Chen N., Shi X., Tsang B., Yu Y.H. Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, v. 117, n. 6, p. 1679-89, 2007.

Luciano E., Carneiro E.M., Carvalho C.R., Carvalheira J.B., Peres S.B., Reis M.A., Saad M.J., Boschero A.C., Velloso L.A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol*, v. 147, n. 1, p. 149-157, 2002.

Lumeng C.N., Bodzin J.L., Saltiel A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, v. 117, n. 1, p.175–184, jan 2007.

Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, v. 25, n.12, p. 677-686, 2004.

Nguyen K.D., Qiu Y., Cui X., Goh Y.P., Mwangi J., David T., Mukundan L., Brombacher F., Locksley R.M., Chawla A. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptative thermogenesis. *Nature*, v. 480, n. 7375, p.104-108, 2011.

Nicklas B.J., Ambrosius W., Messier S.P., Miller G.D., Penninx B.W., Loeser R.F., Palla S., Bleecker E., Pahor M. Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older, obese adults: a randomized controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr.*, v. 79, n. 4, p. 544-551, 2004.

Oberbach A., Tönjes A., Klöting N., Fasshauer M., Kratzsch J., Busse M.W., Paschke R., Stumvoll M., Blüher M. Effect of a 4 week physical training program on plasma concentrations of inflammatory markers in patients with abnormal glucose tolerance. *Eur. J. Endocrinol*, v. 154, n. 4, p.577–585, 2006.

Oh K.S., Kim E.Y., Yoon M., Lee C.M. Swim training improves leptin receptor deficiency-induced obesity and lipid disorder by activating uncoupling proteins. *Exp Mol Med*, v. 39, n. 3, p. 385-94, 2007.

Oliveira A.G., Carvalho B.M., Tobar N., Ropelle E.R., Pauli J.R., Bagarolli R.A., Guadagnini D., Carvalheira J.B., Saad M.J. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes*, v. 60, n. 3, p. 784-96, 2011.

Oliveira A.G., Araújo T.G., Carvalho B.M., Guadagnini D., Rocha G.Z., Bagarolli R.A., Carvalheira J.B., Saad M.J. Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats. *Obesity*, v. 21, n.12, p. 2545-2556, 2013.

Pessin, J.E., Saltiel, A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*, v. 106, n. 2, p. 165-169, 2000.

Phillips M.D., Patrizi R.M., Cheek D.J., Wooten J.S., Barbee J.J., Mitchell J.B. Resistance training reduces subclinical inflammation in obese, postmenopausal women. *Med Sci Sports Exerc.*, v. 44, n.11, p. 2099-20110, 2012.

Praet S.F. e Van Loon L. J. Exercise therapy in Type 2 diabetes. *Acta Diabetol*, v. 46, n.4, p. 263–278, 2009.

Poissonnet C.M., Burdi A.R., Garn S.M. The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum Dev*, v. 10, p. 1–11, 1984.

Reaven G.M. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev.*, v. 75, p. 473-86, 1995.

Rennie K.L., McCarthy N., Yazdgerdi S., Marmot M., Brunner E. Association of metabolic syndrome with both vigorous and moderate physical activity. *Int J Epidemiol*, v. 32, n. 4, p. 600-606, 2003.

Ropelle E.R., Pauli JR, Prada PO, De Souza CT, Picardi PK, Faria MC, Cintra DE, Fernandes MF, Flores MB, Velloso LA, Saad MJ e Carvalheira JB. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PT1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol*. p.997-1007, 2006.

Ross R., Janssen I., Dawson J., Kungl A.M., Kuk J.L., Wong S.L., Nguyen-Duy T.B., Lee S., Kilpatrick K., Hudson R. Exercise – induced reduction in obesity and insulin resistance in women: a randomized controlled trial. *Obes Res.*, v. 12, n. 5, p.789-98, 2004.



Rothwell, N.J. and M.J. Stock, Luxuskonsumption, diet-induced thermogenesis and brown fat: the case in favour. *Clin Sci (Lond)*, v. 64, n. 1, p. 19-23, 1983.

Saely C.H., Geiger K., Drexel, H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology*, v. 58, n. 1, p. 15-23, 2012.

Sakurai T., Endo S., Hatano D., Ogasawara J., Kizaki T., Oh-ishi S., Izawa T., Ishida H., Ohno H. Effects of exercise training on adipogenesis of stromal-vascular fraction cells in rat epididymal white adipose tissue. *Acta Physiol*, v. 200, n. 4, p.325–338, 2010.

Saltiel, A.R., Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

Schulz T.J., Huang P., Huang T.L., Xue R., McDougall L.E., Townsend K.L., Cypess A.M., Mishina Y., Gussoni E., Tseng Y.H. Brown-fat paucity due to impaired BMP signaling induces compensatory browning of white fat. *Nature*, v. 495, n. 7441, p. 379-83, 2013.

Sethi J.K., Vidal-Puig A.J. Thematic review series: Adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res.*, v. 48, p. 1253–1262, 2007.

Shoelson S.E., Lee J., Goldfine A.B. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, v.116, n.7, p.1793-1801, 2006.

Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest*, v. 106, n. 2, p.171–176, 2000.

Slocum N., Durrant J.R., Bailey D., Yoon L., Jordan H., Barton J., Brown R.H., Clifton L., Milliken T., Harrington W., Kimbrough C., Faber C.A., Cariello N., Elangbam C.S. Responses of brown adipose tissue to diet-induced obesity, exercise, dietary restriction and ephedrine treatment. *Exp Toxicol Pathol*, v. 65, n. 5, p. 549-57, 2013.

Solinas G., Karin, M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J*, v.24, n. 8, p. 2596-611, 2010.

Stanford K.I., Middelbeek R.J., Townsend K.L., An D., Nygaard E.B., Hitchcox K.M., Markan K.R., Nakano K., Hirshman M.F., Tseng Y.H., Goodyear L.J.. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest*, v. 123, n. 1, p.215–223, 2013.

Strackowski M., Kowalska I., Nikolajuk A., Krukowska A., Gorska M. Plasma interleukin-10 concentration is positively related to insulin sensitivity in young healthy individuals. *Diabetes Care*, v. 28, n.8, p. 2036 –2037, 2005.

Stumvoll M., Goldstein B.J., Van Haeften, T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.*, v. 365, n. 9467, p. 1333-46, 2005.

Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev*. v.5, p.571-6, 1995.

Towbin, H., Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.76, Sep, n.9, p.4350-4, 1979.

Valverde, A.M., Benito, M., Lorenzo, M. The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance. *Acta Physiol Scand*, v. 183, n. 1, p. 59-73, 2005.

Van der Lans A.A., Hoeks J., Brans B., Vijgen G.H., Visser M.G., Vosselman M.J., Hansen J., Jörgensen J.A., Wu J., Mottaghy F.M., Schrauwen P., Van Marken Lichtenbelt WD. Cold acclimation recruits brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest*, v. 123, n. 8, p.3395-403, 2013.

Vats D., Mukundan L., Odegaard J.I., Zhang L., Smith K.L., Morel C.R., Wagner R.A., Greaves D.R., Murray P.J., Chawla A. Oxidative metabolism and PGC-1 $\beta$  attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab*, v. 4, n. 1, p.13–24, 2006.

Vieira V.J., Valentine R.J., Wilund K.R., Woods J.A. Effects of diet and exercise on metabolic disturbances in high-fat diet-fed mice. *Cytokine*, v. 46, n. 3, p.339-45, 2009.

Virtanen K.A., Lidell M.E., Orava J., Heglind M., Westergren R., Niemi T., Taittonen M., Laine J., Savisto N.J., Enerbäck S., Nuutila P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med*, v. 360, n. 15, p.1518–1525, 2009.

Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S. Inflammation, stress and diabetes. *J. Clin.Invest*, v.115, n.5, p.1111-1119, 2005.

White U.A., Stephens J.M. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.*, v. 318, n. 1-2, p. 10-14, 2010.

Whittle A.J., Vidal-Puig A. Physiology: Immune cells fuel the fire. *Nature*, v. 480, n. 7375, p.46-7, 2011.

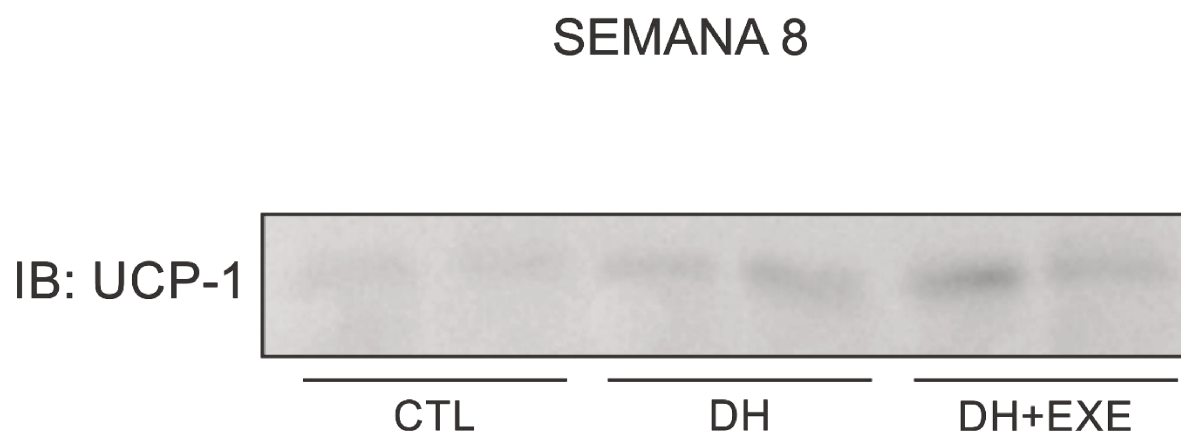
WHO. World Health Organization. Global recommendations on physical activity for health. 2010.

Wu J., Boström P., Sparks L.M., Ye L., Choi J.H., Giang A.H., Khandekar M., Virtanen K.A., Nuutila P., Schaart G., Huang K., Tu H., Van Marken Lichtenbelt W.D., Hoeks J., Enerbäck S., Schrauwen P., Spiegelman B.M. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, v. 150, n. 2, p. 366–376, 2012.

Xu H., Barnes G.T., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C.J., Sole J., Nichols A., Ross J.S., Tartaglia L.A., Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity related insulin resistance. *J Clin Invest*, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

Xu X., Ying Z., Cai M., Xu Z., Li Y., Jiang S.Y., Tzan K., Wang A., Parthasarathy S., He G., Rajagopalan S., Sun Q. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 300, n. 5, p. R1115-25, 2011.

## **7- ANEXOS**



**Figura 19- Expressão de UCP-1 no Tecido Adiposo Branco na oitava semana de treino.**  
Blot representativo de UCP-1 no TAB de animais CTL, DH e DH+EXE, realizado na oitava semana de treino.

## ANEXO II



CEUA/Unicamp

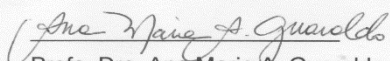
### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

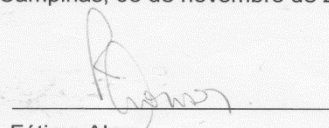
#### CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "O efeito do exercício crônico sobre a adipogênese em ratos wistar submetidos a dieta hiperlipídica" (protocolo nº 2562-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad / Juliana Paula Leite, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 08 de novembro de 2011.

Campinas, 08 de novembro de 2011.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

