



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ANA CAROLINA GHEZZI

MODULAÇÃO DA INFILTRAÇÃO E POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS NO
TECIDO ADIPOSEO MARROM E BRANCO DE RATOS OBESOS: EFEITOS
DO TRATAMENTO COM ANÁLOGO DE GLP-1, INIBIDOR DE DPP-4 E
EXERCÍCIO FÍSICO

CAMPINAS

2017

ANA CAROLINA GHEZZI

MODULAÇÃO DA INFILTRAÇÃO E POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS NO
TECIDO ADIPOSEO MARROM E BRANCO DE RATOS OBESOS: EFEITOS
DO TRATAMENTO COM ANÁLOGO DE GLP-1, INIBIDOR DE DPP-4 E
EXERCÍCIO FÍSICO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

ORIENTADOR: MARIO JOSE ABDALLA SAAD

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA ANA CAROLINA GHEZZI, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. MARIO JOSE ABDALLA SAAD.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

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

G343m Ghezzi, Ana Carolina, 1986-
Modulação da infiltração de macrófagos no tecido adiposo marrom e branco de ratos obesos : efeitos do tratamento com análogo de GLP-1, inibidor de DPP-4 e exercício físico / Ana Carolina Ghezzi. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Mário José Abdalla Saad.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Macrófagos. 2. Exercícios físicos. 3. Peptídeo 1 semelhante ao glucagon. 4. Inibidores da dipeptidil peptidase IV. 5. Tecido adiposo marrom. I. Saad, Mário José Abdalla, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Modulation of macrophage infiltration in brown adipose tissue and white adipose tissue of obese rats : effects of treatment of GLP-1 analogue, DPP-4 inhibitor and physical exercise

Palavras-chave em inglês:

Macrophages

Physical exercise

Glucagon-like peptide 1

Dipeptidyl-peptidase IV inhibitors

White adipose tissue

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Mario Jose Abdalla Saad

Adelino Sánchez Ramos da Silva

Jose Rodrigo Pauli

Maria Andreia Delbin

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Data de defesa: 10-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ANA CAROLINA GHEZZI

ORIENTADOR: MARIO JOSE ABDALLA SAAD

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. MARIO JOSE ABDALLA SAAD**
 - 2. PROF. DR. ADELINO SANCHÉZ RAMOS DA SILVA**
 - 3. PROF. DR. JOSE RODRIGO PAULI**
 - 4. PROF. DR. MARIA ANDREIA DELBIN**
 - 5. PROF. DR. CARLA ROBERTA DE OLIVEIRA CARVALHO**
-

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 10/03/2017

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por tantas coisas vivenciadas não só nesse período de doutorado, mas durante todas as fases da minha vida!

Agradeço aos meus pais por terem me proporcionado esses anos de estudo e acima de tudo por terem nutrido esse meu sonho na pós graduação.

Mãe, para mim você é um exemplo de mulher virtuosa, te amo muito e quero que você saiba que cada coisa que conquistei na minha vida, cada etapa vencida foi graças à você e também dedicada a você, você é essencial para mim. Obrigada por me apoiar e por me incentivar tanto, te amo muito.

Agradeço aos meus irmãos, Paula, Gislaine e Marcelo por terem crescido comigo e por terem sempre servido de referência e estímulo, vocês fazem parte de mim, pois são muitas histórias em comuns que nos compõe.

Meu muito obrigada também ao meu marido Jonathan, você fez parte de todo esse processo de aprendizado e sabe o quanto muitas vezes foi árduo, mas também gratificante.

Agradeço ao meu orientador Dr. Mário Saad pela oportunidade e pelo prazer que foi fazer parte do laboratório LICRI.

Agradeço também aos professores que compuseram minha banca e que contribuíram de forma tão brilhante para esse trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que compõe o laboratório (graduandos, mestrandos, doutorandos e técnicos), vocês todos foram indispensáveis para a conclusão desse trabalho, mas não poderia deixar de destacar as pessoas que participaram da minha rotina de experimentos de forma mais direta, meu muito obrigada: Carla, Juliana Vecina, Tamires, Flávia, Alexandre e Juzinha Alves.

Aos amigos que me acompanham e torcem por mim, Lucieli, Aline, Paula, Danielle e Karen que a vida sempre proporcione muitos momentos para comemarmos e rirmos juntas.

Às agências de fomento FAPESP, CNPQ, CAPES e INCT; pela bolsa de estudo concedida e pelo financiamento das pesquisas que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”.

Saint-Exupéry – O Pequeno Príncipe

Resumo

A obesidade cresce de forma alarmante, sendo considerada uma epidemia mundial. É uma doença multifatorial, na qual fatores genéticos, metabólicos e ambientais (atividade física e dieta) estão envolvidos. Estudos recentes caracterizam a obesidade como uma inflamação sistêmica de baixo grau, que tem como consequência o desenvolvimento da resistência à insulina (RI). A RI está ligada a ativação de serinas quinases (JNK e IKK) e na síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), que podem influenciar na infiltração de macrófagos no tecido adiposo. Em paralelo o tecido adiposo marrom também está envolvido no processo de termogênese e balanço energético corporal. Atualmente, drogas promissoras com efeito análogo aos hormônios incretina, como o análogo de GLP-1 e o inibidor de DPP-4, vem sendo amplamente utilizadas no tratamento da diabetes. Além disso, o exercício físico, que possui ações comprovadamente anti-inflamatórias, pode atuar como tratamento não medicamentoso da epidemia de obesidade. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do exercício físico aeróbico crônico e dos incretinomiméticos, isolada ou associadamente, na resistência à insulina, na infiltração de macrófagos do tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM) e no fenômeno inflamatório subclínico. Neste estudo, foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, com 6 semanas de idade, divididos, primeiramente, de acordo com alimentação (dieta hiperlipídica (DH) ou ração padrão): animais controle alimentados com dieta padrão para roedores e água *ad libitum* (CTL); - os demais animais foram introduzidos em DH e água *ad libitum*, após 12 semanas de dieta os animais alimentados com DH foram subdivididos em 6 subgrupos: (Veic-S) obesos, sedentários e que receberam solução veículo, (GLP-S) obesos sedentários e tratados com análogo de GLP-1, (DPP-S) obesos, sedentários e tratados com inibidor de DPP-4 (Veic-T) obesos, exercitados e que receberam solução veículo, (GLP-T) obesos, exercitados e tratado com análogo de GLP-1, (DPP-T) obesos, exercitados e tratado com inibidor de DPP-4. Os animais tratados com análogo de GLP-1 receberam injeção subcutânea de liraglutide 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, 2 vezes por dia, por 15 dias, os animais tratados com inibidor de DPP-4 receberam 10mg/Kg de vildagliptina via oral, 2 vezes ao dia, por 15 dias e os animais veículo receberam solução veículo (salina ou água potável). O exercício físico realizado foi de natação 1 hora por dia, 5 vezes na semana por 15 dias. Os medicamentos incretinomiméticos e o exercício físico foram eficientes em diminuir os depósitos do tecido adiposo branco na região visceral, o tamanho dos adipócitos tanto

no TAB quanto no TAM, além de melhorar a sensibilidade à insulina, de aumentar a fosforilação da AKT, da taxa metabólica e da atividade do TAM. Foram capazes também de diminuir a inflamação além de reduzir o número de macrófagos no TAB. O exercício físico por sua vez, diminuiu a quantidade de insulina sérica e promoveu o aumento do número de macrófagos M2 tanto no TAB quanto no TAM. Concluímos que não houve efeito aditivo, sugerindo que tanto o exercício físico quanto os medicamentos incretinomiméticos podem ter ações similares na diminuição da infiltração de macrófagos no TAB e no TAM e na melhora da sensibilidade à insulina.

Palavras-chave: Infiltração de macrófagos; exercício físico; análogo de GLP-1; inibidor de DPP-4; tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom.

Abstract

Obesity has been growing in a threatening way, being considered a worldwide epidemic. It's a multifactorial disease, in which genetic, metabolic and environmental factors are involved (physical activity and diet). Studies characterize obesity as a low-grade systemic inflammation and consequent development of insulin resistance (IR). IR is linked to the activation of serine kinases (JNK and IKK) and pro inflammatory cytokines synthesis (TNF- α and IL-1 β), which may influence the macrophages infiltration into adipose tissue. Parallel, the brown adipose tissue is also involved in the thermogenesis process. Currently, promising drugs with similar effect to the incretin hormones such as GLP-1 and DPP-4 inhibitor, has been widely used in the treatment of diabetes. Furthermore, physical exercise, which has proved anti-inflammatory actions, can act as a non-drug treatment for this obesity epidemic. Therefore, this research aimed to evaluate the effects of physical exercises and the incretin mimetics, alone or associated to the IR, in the macrophage infiltration into the white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT), and also to evaluate the subclinical inflammation phenomenon. Hereing were used Wistar rats, which at 6 weeks of age, were divided, primarily, according to the diet (high fat diet (HFD) or standard diet) CTL; control group was fed with standard diet to rodents and water ad libitum and HFD and the HFD group was fed water ad libitum. After 12 weeks of diet, the HFD group was divided into 6 smaller groups: (Veic-S) obese, sedentary that received vehicle solution; (GLP-S) obese, sedentary, treated with GLP-1 analogue; (DPP-S) obese, sedentary, treated with DPP-4 inhibitor; (Veic-T) obese, exercised that received vehicle solution; (GLP-T) obese, exercised, treated with GLP-1 analogue; (DPP-T) obese, exercised, treated with DPP-4 inhibitor. The animals treated with GLP-1 analogue received subcutaneous Liraglutide, 100 ug/Kg, twice a day, for 15 days; the animals treated with DPP-4 inhibitor received 10mg/Kg of Vildagliptina oral, twice a day; the vehicle group received vehicle solution (saline or potable water). The physical exercise applied was swimming 1 hour per day, 5 times per week for 15 days. As a result, the incretin mimetic drugs and the physical exercises were efficient to decrease the adipose tissue in the visceral region; the size of adipocytes in WAT and BAT improved the insulin sensitivity, increased AKT phosphorylation, metabolic rate, BAT activity and decreased the inflammation and reduced the number of macrophages in the

WAT. Physical exercise by itself also decreased the quantity of serum insulin and increased the M2 macrophage number in WAT and BAT. There was no additive effect, suggesting that physical activity as much as incretin mimetic drugs can have similar actions in the decrease of macrophage infiltration in WAT and in the improvement of insulin sensitivity.

Palavras- chave: macrophage infiltration; physical exercise; GLP-1 analogue; DPP-4 inhibitor; White adipose tissue and Brown adipose tissue.

Lista de Ilustração

Figura 1: Delineamento Experimental.....	21
Figura 2: Esquema de divisão dos grupos	23
Figura 3: Caracterização do peso corporal	28
Figura 4: Caracterização da Tolerância à Glicose.....	29
Figura 5: Caracterização da Tolerância à Insulina.	29
Figura 6: Via de sinalização da insulina no Tecido Adiposo Branco.....	30
Figura 7: Níveis circulantes de, TNF- α , IL-1 β e IL-10 ao final do experimento.	31
Figura 8: Via inflamatória da serina quinase JNK no Tecido Adiposo Branco.	32
Figura 9: Caracterização do peso corporal e da ingestão alimentar.....	33
Figura 10: Caracterização da adiposidade.....	33
Figura 11: Caracterização morfológica do tecido adiposo epididimal	34
Figura 12: Caracterização da Tolerância à Insulina.	35
Figura 13: Caracterização da Tolerância à Glicose	36
Figura 14: Taxa Metabólica.....	36
Figura 15: Insulina Sérica.....	37
Figura 16: Peso Corporal animais pair feeding.....	38
Figura 17: Caracterização da Tolerância à Glicose e à Insulina.	39
Figura 18: Via de sinalização da insulina no Tecido Adiposo Branco.....	40
Figura 19: Níveis circulantes de, TNF- α , IL-1 β e IL-10 ao final do experimento.	41
Figura 20: Vias inflamatórias das serinas quinases JNK e IKK no Tecido Adiposo Branco.....	42
Figura 21: Caracterização da infiltração e polarização de macrófagos	43
Figura 22: Caracterização da adiposidade.....	44
Figura 23: Caracterização morfológica do tecido adiposo marrom	45
Figura 24: Expressão das proteínas UCP-1 no Tecido Adiposo Marrom	46
Figura 25: Caracterização da infiltração e polarização de macrófagos	47
Figura 26: Caracterização do peso corporal: Peso corporal ao final do experimento.....	48
Figura 27: Caracterização da adiposidade.....	49
Figura 28: Caracterização morfológica do tecido adiposo epididimal	50
Figura 29: Caracterização da Tolerância à Insulina.....	51
Figura 30: Caracterização da Tolerância à Glicose	52
Figura 31: Taxa Metabólica.....	52
Figura 32: Insulina Sérica.....	53
Figura 33: Via de sinalização da insulina no Tecido Adiposo Branco.....	54
Figura 34: Níveis circulantes de, TNF- α , IL-1 β e IL-10 ao final do experimento.	55
Figura 35: Vias inflamatórias das serinas quinases JNK e IKK no Tecido Adiposo Branco.....	56
Figura 36: Caracterização da infiltração e polarização de macrófagos	57
Figura 37: Caracterização da adiposidade.....	58
Figura 38: Caracterização morfológica do tecido adiposo marrom	59
Figura 39: Expressão das proteínas UCP-1 no Tecido Adiposo Marrom	60
Figura 40: Caracterização da infiltração e polarização de macrófagos	61
Figura 41: Esquema dos resultados dos efeitos do análogo de GLP-1:	69
Figura 42: Esquema dos resultados dos efeitos do inibidor do DPP-4:	70
Figura 43: Esquema dos resultados dos efeitos do exercício físico:.....	71

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição da Dieta Padrão e da Dieta hiperlipídica.....	21
--	----

Sumário

1.Introdução.....	15
2. OBJETIVOS	19
Objetivo Geral	19
Objetivos Específicos.....	19
3.MATERIAS E MÉTODOS	20
Anticorpos e Reagentes.....	20
Animais e dieta	20
Modelo de obesidade	20
Protocolo de exercício físico crônico.	23
Tratamento com análogo de GLP-1.	23
Tratamento com inibidor DPP-4.....	23
Determinação da massa corporal.....	24
Teste de tolerância à insulina.	24
Teste de tolerância à glicose.....	25
Extração de Tecidos.....	25
Quantificação dos níveis séricos de insulina, TNF- α , IL-1 β , IL-10.....	26
Microscopia Óptica	27
Imunofluorescência.	27
Análise dos resultados.....	27
4-Resultados	28
4.1- Caracterização dos animais em dieta hiperlídica.....	28
4.2- Animais tratados com análogo de GLP-1	32
- <i>Pair feeding</i> com animais tratados com análogo de GLP-1	38
4.3 Animais tratados com inibidor de DPP-4.....	48
5.Discussão	62
6.REFERÊNCIAS.....	72

1. Introdução

A prevalência da obesidade cresce de forma alarmante, sendo considerada uma epidemia mundial, visto que atualmente acomete cerca de 600 milhões de pessoas (1) e atingirá em 2025 18% dos homens e 21% das mulheres em todo o mundo. (2)

É uma doença multifatorial, na qual podem atuar fatores genéticos e ambientais (atividade física e dieta). Além disso, estudos sugerem ser caracterizada por uma inflamação sistêmica de baixo grau, que leva o organismo a desenvolver resistência à ação da insulina (3-5)

O aumento da gordura corporal está fortemente ligado a outras doenças. O incremento de 20% no peso corporal eleva o risco de desenvolvimento de resistência à insulina (RI) , hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares, resultando no aumento exponencial dos gastos públicos com saúde (6). A Federação Internacional do Diabetes estima que os gastos com a DM2 em todo o mundo em 2015 foi de pelo menos US \$ 673 bilhões (7).

O tecido adiposo até alguns anos atrás era conhecido somente como um órgão de armazenamento de energia. Porém, visto que os adipócitos secretam diversos peptídeos e não peptídeos, denominados adipocinas, este tecido também é considerado um importante órgão com funções endócrinas (8-10).

As citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), têm sido descritas na literatura pelo efeito deletério que exercem sobre a atividade da via de sinalização da insulina (11-14). Na obesidade diversas células e tecidos podem produzir tais citocinas, mas aparentemente, a produção pelo tecido adiposo e principalmente pelos macrófagos infiltrados nesse tecido são a fonte mais relevante.

Suganami e colaboradores (col.) demonstraram que a inibição da infiltração de macrófagos para o tecido adiposo, por meio de estratégias genéticas ou farmacológicas, é capaz de reduzir a inflamação e melhorar a sensibilidade à insulina na obesidade (15).

Os fenótipos de macrófagos mais descritos na literatura são M1 (inflamatório) e M2 (alternativo): o M1 também conhecido como macrófago de ativação clássica, tem

como principal função a atividade antimicrobiana, pela produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico .

Tal fenótipo é ativado na presença de interferon (IFN) ou produtos microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) (16), sendo responsável por grande parte da expressão de TNF- α e quantidades significativas de expressão de iNOS e IL-6 do tecido adiposo, portanto está diretamente ligado a inflamação (17)

O TNF- α tem como principal função promover a resposta imune pelo recrutamento e ativação de neutrófilos e monócitos durante um quadro inflamatório, enquanto o papel da IL-6 é induzir a produção hepática de Proteína-C reativa (PCR), conhecida como marcador de risco cardiovasculares (18)

Por outro lado, a ativação do M2 ocorre por influência de citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) (19, 20). Além disso, estas células estão associadas a homeostase do organismo, reparação tecidual e angiogênese (20-22). Suas principais características são a presença de MGL-1 e o predomínio da expressão de produtos, como Interleucina 10 (IL-10) e arginase-1, com o objetivo de reduzir a inflamação (20-22).

Em paralelo, um órgão que tem ganhado destaque no contexto da obesidade e RI é o tecido adiposo marrom, o qual está envolvido com o processo de termogênese e balanço energético devido a sua capacidade de oxidação de ácidos graxos para ser usado como combustível da termogênese (23). Em seres humanos adultos, o TAM está localizado na região supraclavicular e cervical, apresentando rica inervação e grande quantidade de mitocôndrias, o que dá a característica da cor deste tecido.

A termogênese representa um importante mecanismo regulatório para a manutenção da temperatura corporal dentro de uma estreita faixa de variação (24) e ocorre através da percepção ao frio pelo hipotálamo, dessa forma o sistema nervoso simpático (SNS) é ativado com consequente liberação de noradrenalina no tecido adiposo marrom (TAM).

A produção de calor pelo TAM é resultado da ineficiência da cadeia respiratória em produzir ATP devido ao desacoplamento do gradiente de prótons entre o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial pela atividade da proteína UCP-1 (Proteína Desacopladora 1) (25).

A UCP-1 é portanto uma proteína chave para a transformação de energia química em calor. A concentração da mesma está diretamente relacionada à maior atividade do TAM (25).

Um dos primeiros estudos que demonstraram a importância do TAM foi desenvolvido por Cypess e col., no qual conseguiram identificar este tecido funcionalmente ativo em adultos, por meio de Pet CT computadorizada (26).

Foi constatado que a quantidade do mesmo é inversamente correlacionada com o IMC (índice de massa corporal), o que levou a hipótese de que o aumento da massa ou da atividade nesse tecido, poderia ser alvo de intervenção farmacológica ou nutricional para a modulação do gasto energético (27).

Uma maneira não farmacológica de aumentar o TAM é a realização de exercício físico (28), o qual atua transformando algumas células adiposas brancas em células adiposas com características marrom, mediante estímulo adrenérgico causando um fenômeno chamado "*browning*" (28, 29).

Portanto, o exercício tem um importante papel no aumento da atividade do TAM, além de seus benefícios fisiológicos, como melhorar a sensibilidade à insulina. Sabe-se que essa melhora está diretamente relacionada com a polarização de macrófagos para o perfil de ativação alternativa - M2. Além disso, ainda possui capacidade de reverter a ativação de vias inflamatórias, como a JNK, bem como reduzir a atividade da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) (30-32).

Estudo recente mostrou que células do sistema imune estão intimamente ligadas com a termogênese e que o estresse agudo ao frio leva à ativação do macrófago M2, os quais secretam localmente catecolaminas que sustentarão a lipólise no tecido adiposo branco (23).

Os ácidos graxos liberados serão utilizados como substrato para a termogênese no tecido adiposo marrom, porém a participação do sistema imune não pára por aí, ele é também responsável pela remodelação induzida pelo frio no tecido adiposo branco em tecido adiposo bege (33, 34).

Para o tratamento da obesidade e da diabetes mellitus tipo 2, além da mudança de estilo de vida dos pacientes, terapias medicamentosas têm sido necessárias, atualmente

as drogas chamadas incretinomiméticas, transmissores endócrinos de liberação de insulina, tem sido utilizadas para aumentar a secreção de insulina pelas células- β do pâncreas e diminuir a gliconeogênese pelo fígado.

O conceito incretina foi usado pela primeira vez em 1964 por Elrick e col., cujo estudo constatou que a sobrecarga de glicose administrada oralmente resultava numa curva insulinêmica maior do que a mesma sobrecarga de glicose via endovenosa (35).

Tal fato foi atribuído ao trato gastrointestinal, pois as células K do duodeno e as células L do íleo secretam as principais incretinas: Polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) e o Peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1), respectivamente, as quais estão envolvidas no metabolismo glicêmico e secreção de insulina (35-37).

É importante destacar que o GLP-1 e o GIP são liberados em resposta a chegada do alimento no trato gastrointestinal, porém são rapidamente inativados, sofrendo clivagem pela enzima DPP-4 (37, 38).

O hormônio GLP-1 tem como principal função o aumento da produção de insulina pelas células β -pancreáticas e diminuição da glicogenólise do fígado, diminuindo dessa forma a glicemia (39). É também conhecido que sua liberação em resposta a alimentação em pacientes diabéticos é comprometido, justificando o tratamento com GLP-1 nos pacientes com DM2 (40).

Dessa forma, o melhor entendimento desses hormônios permitiu o desenvolvimento de duas novas modalidades terapêuticas. A primeira são medicamentos chamados inibidores da enzima DPP-4. Inativando-a, ocorre o aumento de GLP-1 circulante, aumento da secreção de insulina e conseqüente redução da glicemia.

Outra modalidade são os análogos de GLP-1, substâncias que são 97% homólogos ao GLP-1 endógeno, porém não são clivados pela enzima DPP-4.

Estudos clínicos demonstraram que o tratamento crônico com GLP-1, além de aumentar a secreção de insulina também melhora a sensibilidade à insulina (39-41). Lee e col., mostraram que camundongos *ob/ob* tratados com GLP-1 apresentaram menor grau de inflamação e maior sensibilidade à insulina (42).

Além disso, relatos recentes mostraram que sua administração leva a uma redução na infiltração de macrófagos na parede aórtica diminuindo dessa forma o risco de aterosclerose (43).

Segundo Bem-Shlomo e col., (44) roedores deficientes para o inibidor de DPP-4, e portanto com níveis elevados de GLP-1, mantidos em dieta hiperlipídica, possuem menores valores de triglicérides, colesterol e também são mais sensíveis à insulina quando comparados aos selvagens.

Devido à crescente epidemia de obesidade e DM2, tratamentos farmacológicos tem evoluído, bem como o conhecimento de terapias alternativas. Por outro lado, ainda permanece a necessidade de associar ambos, mas para isso o desenvolvimento de pesquisas ajudam a esclarecer os mecanismos de atuação de cada tratamento e se os efeitos são aditivos ou sinérgicos.

De acordo com o exposto, o projeto tem como objetivo investigar o efeito do exercício físico e dos incretinomiméticos, isolados e associadamente, na RI, na infiltração dos macrófagos no TAB e TAM e o fenômeno inflamatório subclínico.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do exercício físico aeróbico crônico e dos medicamentos incretinomiméticos, isolados ou associadamente, na RI, na infiltração de macrófagos no TAB e TAM e o fenômeno inflamatório subclínico em ratos obesos.

Objetivos Específicos

Analisar, em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, variação *albinus*, alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas e em seguida tratados com análogo de GLP-1 ou inibidor de DPP-4 por 2 semanas, os seguintes parâmetros:

1. Peso corporal;

2. Sensibilidade à insulina: Teste de Tolerância à insulina e Teste de Tolerância à Glicose ;
3. Taxa metabólica;
4. Sinalização à insulina no Tecido Adiposo Branco: Fosforilação da proteína chave da via de sinalização de insulina no tecido adiposo branco: Akt;
5. Marcadores inflamatórios circulantes (IL-1 β , TNF- α e IL-10);
6. Infiltração de macrófagos no tecido adiposo branco e marrom;
7. Marcadores inflamatórios no tecido adiposo branco: JNK, IKK;
8. Expressão da proteína UCP-1 no tecido adiposo marrom;
9. Efeito do exercício físico aeróbico crônico durante duas semanas nas variáveis enumeradas anteriormente.

3. MATERIAS E MÉTODOS

Anticorpos e Reagentes.

Todos os anticorpos são provenientes da Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA) ou CellSignaling Technology (Beverly, MA). Os reagentes de rotina do laboratório foram comprados da SigmaChemical (St. Louis, MO).

Animais e dieta.

Para os experimentos do presente trabalho foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* provenientes do biotério da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram 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 ração padrão de acordo com o grupo de estudo). E em um dos experimentos do análogo de GLP-1 realizamos *pair feeding* ou consumo pareado. Todo experimento foi realizado de acordo com as normas da Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade (CEUA/IB - UNICAMP) – protocolo nº3317-1.

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 12 semanas para os grupos específicos.

Tabela 1: Composição da Ração 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



Figura 1: Delineamento Experimental

Divisão dos grupos

Os ratos após atingiram 6 semanas de idade foram divididos, primeiramente de acordo com alimentação (DH ou ração padrão) os animais controle alimentados com ração padrão para roedores e água *ad libitum* (CTL); os demais foram introduzidos em dieta hiperlipídica e água *ad libitum* (DH), após 12 semanas da introdução da dieta hiperlipídica, esse grupo foi subdivididos em 6 subgrupos:

(Veic-S) obesos, sedentários e que receberam solução veículo,
 (GLP-S) obesos, sedentários e tratados com análogo de GLP-1,
 (DPP-S) obesos, sedentários e tratados com inibidor de DPP-4
 (Veic-T) obesos, exercitados e que receberam solução veículo
 (GLP-T) obesos, exercitados e tratado com análogo de GLP-1
 (DPP-T) obesos, exercitados e tratado com inibidor de DPP-4.

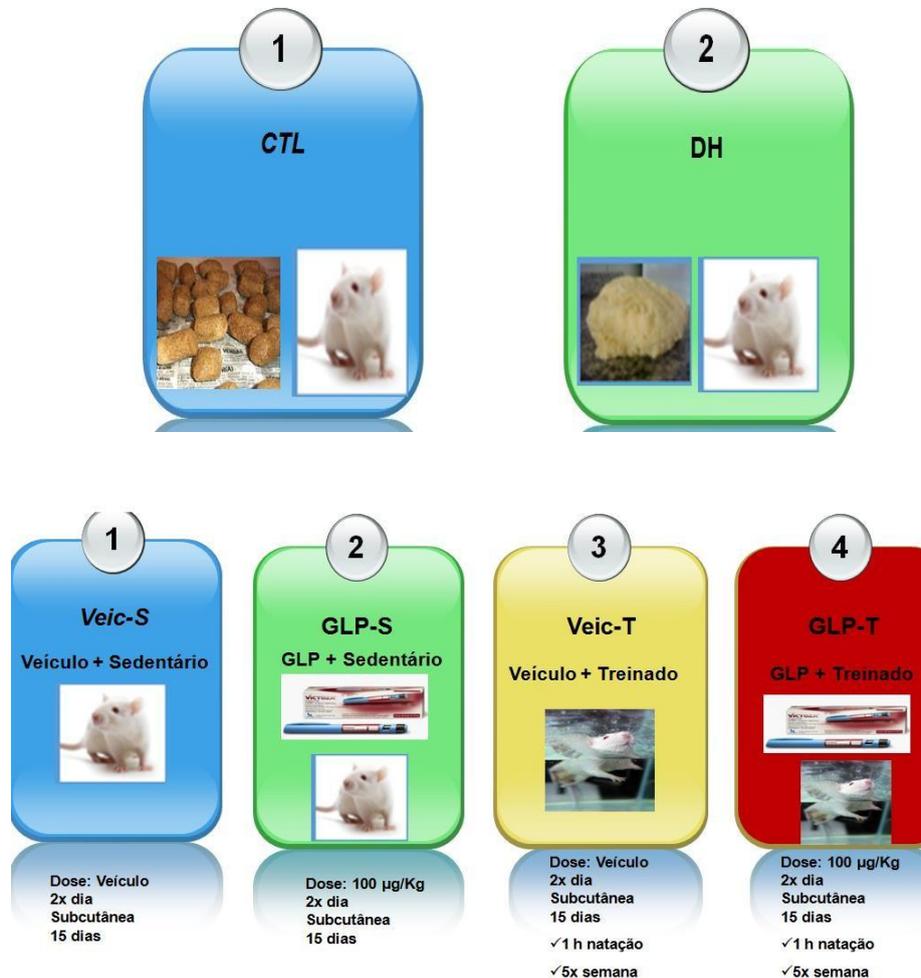




Figura 2: Esquema de divisão dos grupos

Protocolo de exercício físico crônico.

Visando a adaptação ao exercício de natação, os ratos foram inseridos ao meio líquido (água a 34°C) durante 10 minutos por 2 dias consecutivos. Para então, os animais serem exercitados em grupo de três animais no interior de baldes plásticos de 50 cm de diâmetro e com 100 cm de profundidade, contendo água mantida em aproximadamente 34°C num período de 1 hora por dia, 5 dias por semana, durante 2 semanas, suportando uma carga de 5% do peso corporal, ajustada semanalmente, de acordo com o peso do animal na semana. Este protocolo foi previamente padronizado em nosso laboratório (30, 45).

Tratamento com análogo de GLP-1.

Foi administrado o análogo de GLP-1, via subcutânea (sc) (Liraglutide, Victoza®, Novo Nordisk, 100 µg/Kg) através de uma seringa própria, duas vezes ao dia (9 h e 16 h), durante 15 dias e o grupo Veic receberam injeção sc de solução veículo (salina) (46).

Tratamento com inibidor DPP-4.

Foi administrada o inibidor de DPP- 4 (Vildagliptina, Galvus®, Novartis, 10mg/Kg) via oral (vo) duas vezes ao dia (9 h e 16 h), durante 15 dias (47). O grupo Veic recebeu somente o veículo (água potável).

Determinação da massa corporal.

A massa corporal foi determinada pela balança de precisão, sempre no início de cada semana e ao final do experimento.

Controle de Ingestão.

Ao final 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 cm² 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.

Teste de tolerância à insulina.

O teste foi realizado 24 horas após o exercício físico. Foi realizado o jejum alimentar (6 horas) antes da realização do teste. A primeira coleta de sangue equivale ao tempo 0 do teste. Após, a insulina (1,5U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente (ip) e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sérica. A concentração de glicose foi determinada com fitas reativas e glicosímetro (Optium Xceed – Abbot, Berkshire, Inglaterra). A velocidade constante do decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. Cálcula-se o $t_{1/2}$ da glicose a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear.

Taxa Metabólica.

Afim de analisar os efeitos dos tratamentos sobre o metabolismo dos animais, foram realizadas mensurações de taxa metabólica ao final do experimento. O equipamento utilizado foi o analisador de concentrações de O₂ e CO₂ (Oxygen/Carbon Dioxide Analyzer, Model 902D DualTrak, Quantek Instruments, EUA), que quantifica as porcentagens de oxigênio e de gás carbônico presentes na câmara utilizada para este ensaio. Para a avaliação da taxa metabólica dos animais, foi realizado o seguinte procedimento: os animais foram pesados e colocados em câmara hermética por três

minutos e as concentrações de O₂ e CO₂ foram medidas nos tempos 0 (logo após colocar o animal na câmara, valor de calibração), 1, 2 e 3 minutos. A partir desses valores e do peso corpóreo dos animais, foi possível, através da fórmula abaixo, calcular a taxa metabólica destes, expressa em kcal x min⁻¹ x 100g⁻¹:

$$[(VO_{2i} - VO_{2f}) / \text{tempo}] \times 4,85 \text{ kcal} \times 100$$

Peso do animal (g)

Teste de tolerância à glicose.

O teste foi realizado após 24 horas após o exercício físico, amostras sanguíneas foram coletadas da cauda. O nível de glicose sanguínea foi determinado por glicosímetro (Optium Xceed – Abbot, Berkshire, Inglaterra). Foi realizado o jejum alimentar (6 horas) antes da realização do teste. O alimento foi retirado seis horas antes do teste e a primeira coleta de sangue equivale ao tempo 0 do teste. Após, uma solução de 20% de glicose (2.0g/kg peso corporal) foi administrada ip, amostras foram coletadas da cauda em 15, 30, 60, 90 e 120 minutos para realização, posterior da curva. A concentração de glicose foi determinada com fitas reativas e glicosímetro (Optium Xceed – Abbot, Berkshire, Inglaterra).

Extração de Tecidos.

Após 24 horas da última sessão de exercício, após 12 horas de jejum os animais foram anestesiados (Tiopental, 15mg/kg ip). Posteriormente a perda do reflexo corneano e podal, foi realizada a incisão da cavidade abdominal e a veia porta exposta para administração de salina ou insulina (10⁻⁶M). Transcorridos 90 segundos, as amostras de tecido adiposo branco e marrom foram extraídas para serem utilizados na análise de proteína, histologia e imunofluorescência.

Para a análise proteica as amostras dos tecidos foram 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 somente o sobrenadante para as etapas seguintes: uma parte para determinar a concentração proteica pelo método colorimétrico de biureto e outra para avaliar o extrato total 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 e *immunoblotting*.

Quantificação dos níveis séricos de insulina, TNF- α , IL-1 β , IL-10.

As amostras de sangue foram coletadas da veia cava dos ratos previamente anestesiados e centrifugadas para obtenção do soro. As concentrações sorológicas de TNF- α , IL-1 β e IL-10 foram determinadas utilizando-se kits Milliplex Map Kit (Rat Cytokine/Chemokine, Magnetic Bead Panel) segundo instruções do fabricante. E as análises das concentrações de insulina do soro foram realizadas por Elisa, segundo instruções do fabricante.

Análise da expressão das proteínas.

Akt (fosforilada) envolvidas na sinalização da insulina no tecido adiposo epididimal; JNK e IKK (fosforiladas) no tecido adiposo epididimal; UCP-1 (total) envolvida no processo de termogênese no TAM.

- Análise proteica por immunoblotting Os extratos proteicos foram ressuspensos em tampão de Laemmli (100 μ L de tampão/400 μ L de amostra), contendo 100 mM de DTT. Após aquecimento a 100°C por 5 minutos, foram aplicadas no SDS-PAGE de 1,5mm, 100 μ g de proteína por amostra, sendo o gel balizado por marcador de peso molecular comercial (PageRuler, Bio Rad). A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio Rad, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 60 volts inicialmente até a passagem pela fase de empilhamento 35 (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD banhadas com tampão de transferência durante 60 minutos a 120 volts em gelo, como descrito por Towbin e col. (1979). Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) por duas horas a temperatura ambiente. Depois de lavadas em solução basal e incubadas com anticorpos específicos, mantidas a 4 °C, *overnight*, sob agitação contínua (rocker). Em seguida, as membranas foram lavadas com solução basal e a detecção das bandas foi realizada utilizando anticorpo secundário ligado a uma

molécula de peroxidase, que reagiu à solução de quimioluminescência (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. As membranas foram reveladas através do software Image Lab em fotodocumentadora. Após a revelação e identificação das bandas, estas foram quantificadas utilizando o software UNSCAN-IT™ 6.0, para então realizar a análise estatística comparativa entre as bandas obtidas dos diferentes grupos.

Microscopia Óptica.

Após dissecação, foram fixados por imersão de formaldeído 4%, com tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por menos de 24h, sendo, então, desidratados, clareados e, por fim, embebidos em parafina. Cinco seções seriadas de 5µm de espessura foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina, a fim de se analisar a morfologia por microscopia óptica (Zeiss).

Imunofluorescência.

Para detectar os antígenos F4/80 e MGL-1, a fixação nas lâminas foi realizada em forno microondas (Panasonic Junior) à 700W. Em seguida, 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). Para então, serem incubados com os anticorpos secundários conjugados com seus respectivos fluoróforos (Santa Cruz Biotechnology) durante uma hora a temperatura ambiente e marcadas com DAPI. Após a marcação nuclear, as lâminas foram montadas com Entelan® (Merck, Darmstadt, Germany). Os experimentos foram realizados em triplicata para cada animal e analisados em microscópio (Zeiss).

Análise dos resultados.

Os dados foram expressos como médias ± desvio padrão. Para as comparações entre as dietas utilizou-se teste t de Student's e para as comparações dos animais ao final do experimento utilizou-se Anova Two-Way, seguida de Post-Hoc de Newman-Keuls quando necessário. O nível de significância adotado foi de 5% (p<0,05)

4. Resultados

4.1- Caracterização dos animais em dieta hiperlipídica

Inicialmente foi feita a caracterização dos animais após a alimentação por 12 semanas com dieta hiperlipídica (DH) ou com ração (CTL). Os resultados mostraram que o grupo DH alcançou maior peso corporal do que os animais CTL (Figura 3A). Em relação ao peso do tecido adiposo branco, o grupo DH exibiu mais que o dobro do peso da gordura epididimal do que os animais do grupo CTL (Figura 3B)

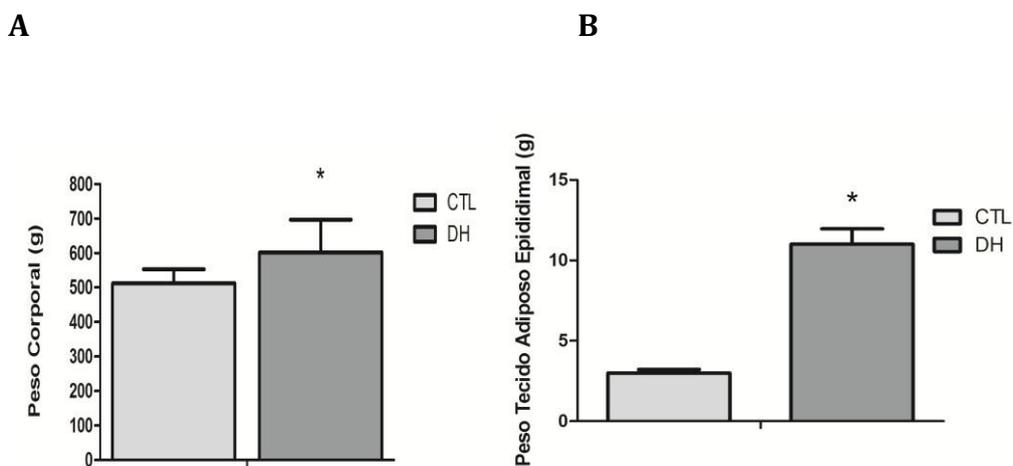


Figura 3: Caracterização do peso corporal (A): Peso corporal ao final do experimento. B: Peso do tecido adiposo epididimal ao final do experimento. Os dados estão apresentados em média \pm Desvio Padrão (n=5), *Teste T de Student*. * $P < 0,05$ vs. CTL.; CTL animais alimentados com dieta padrão para roedores e DH animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica.

A Figura 4-A mostra a cinética da glicemia durante o TTG, nele podemos observar que os animais do grupo CTL apresentaram menores valores de glicemia ao longo do teste, com destaque para os tempos de 15 e 30 minutos. Enquanto que na Figura 4-B vemos que o grupo DH possui maior área sob a curva de glicose (AUC) durante o TTG do que o grupo CTL, indicando que os animais em dieta hiperlipídica apresentavam significativa intolerância à glicose.

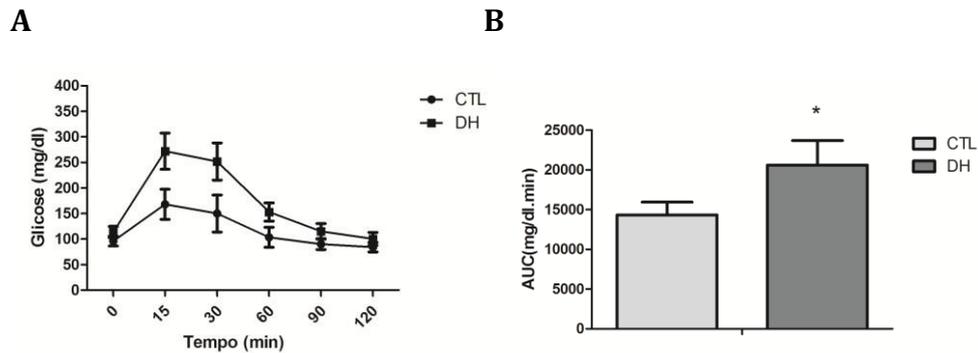


Figura 4: Caracterização da Tolerância à Glicose. (A): Teste de tolerância à glicose ao final do experimento. (B): AUC. * $P < 0.05$ vs CTL. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo. *Teste T de Student*. CTL animais alimentados com dieta padrão para roedores e DH animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica.

O passo seguinte foi observar o desenvolvimento da resistência à insulina no final das 12 semanas da introdução da dieta hiperlipídica. Na Figura 5-A, vemos a glicemia do grupo DH que esteve elevada em relação ao grupo CTL ao longo de todo o desafio. Ao calcularmos a constante de remoção de glicose (KITT) os animais DH possuem menor KITT do que os animais CTL (Figura 5B), indicando assim a presença de intolerância à insulina como consequência da dieta hiperlipídica.

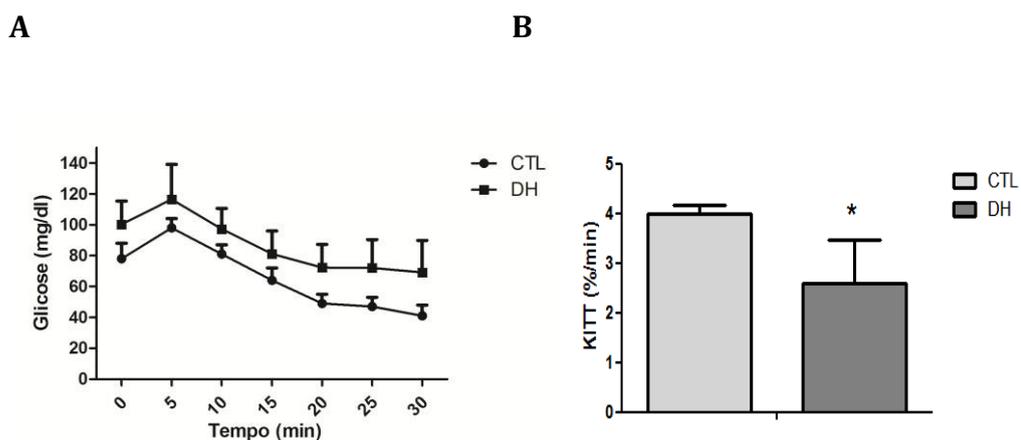


Figura 5: Caracterização da Tolerância à Insulina. (A): Curva de resposta da glicose durante o teste de tolerância à insulina ao final do experimento. (B): KITT. * $P < 0.05$ vs CTL. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo.

Teste T de Student. CLT animais alimentados com dieta padrão para roedores e DH animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica.

O efeito da DH na sinalização da insulina no tecido adiposo branco foi observado monitorando-se as alterações na fosforilação de uma das moléculas chave envolvidas na cascata da sinalização da insulina a proteína quinase B (Akt). Os resultados mostraram que fosforilação em serina da Akt em decorrência da estimulação com insulina foi significativamente menor nos animais do grupo DH (Figura 6)

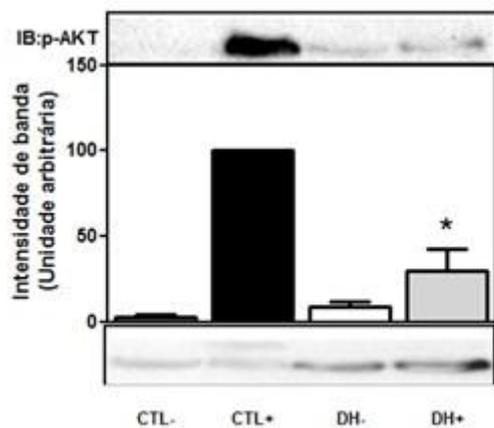


Figura 6: Via de sinalização da insulina no Tecido Adiposo Branco. Blots representativos demonstram no tecido adiposo branco a fosforilação em serina 473 da proteína Akt. Expressão da proteína total. * $P < 0,05$ vs CTL. Os dados estão apresentados em média \pm desvio Padrão de 4 animais por grupo. *Teste T de Student.* CLT animais alimentados com dieta padrão para roedores e DH animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica.

Para analisarmos o estado de inflamação sistêmica, analisamos as citocinas séricas e foi constatado que o grupo DH tem maior quantidade de TNF- α (figura 7-A) e IL-1 β (figura 7-B) do que o grupo CTL. Já em relação a IL-10, nossos resultados mostraram que o grupo DH apresenta redução nessa citocina quando comparado com grupo CTL (Figura 7-C).

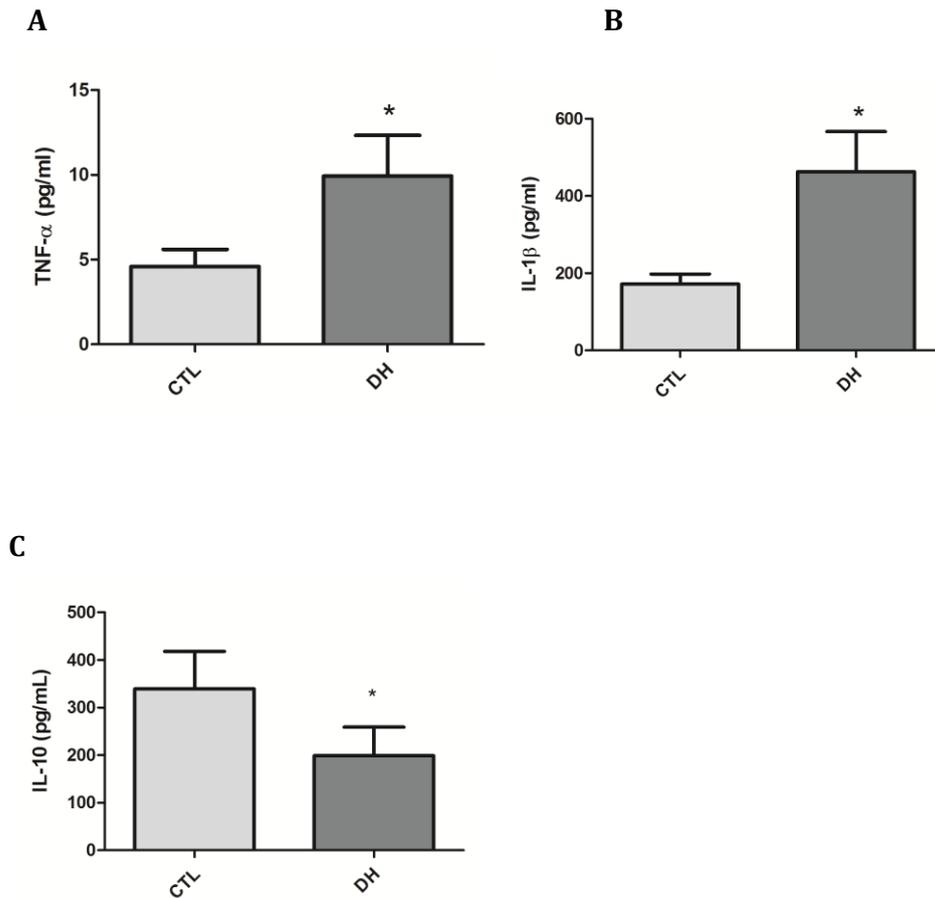


Figura 7: Níveis circulantes de, TNF- α , IL-1 β e IL-10 ao final do experimento. (A) TNF- α . (B) IL-1 β (C) IL-10. * $P < 0,05$ vs CTL. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo. *Teste T de Student*. CTL animais alimentados com dieta padrão para roedores e DH animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica.

Na sequência, verificamos a influência da dieta hiperlipídica no perfil de ativação da serina quinase JNK do tecido adiposo branco. Nesse sentido, vemos maior fosforilação da proteína JNK no grupo DH do que no grupo CTL (Figura 8).

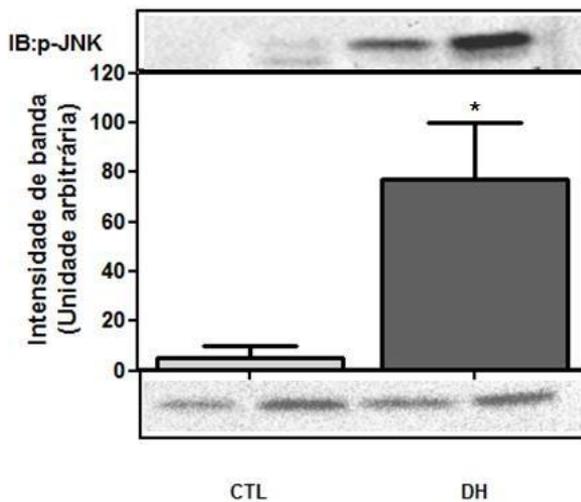


Figura 8: Via inflamatória da serina quinase JNK no Tecido Adiposo Branco. Blots representativos demonstram no tecido adiposo branco a fosforilação de JNK. Expressão da proteína total. # $P < 0,05$ vs CTL. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo. *Teste T de Student*. CTL animais alimentados com dieta padrão para roedores e DH animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica.

Com o conjunto desses dados vemos que 12 semanas de dieta hiperlipídica conduziu o animal a um perfil de resistência à insulina e inflamação.

Na próxima sessão serão apresentados os resultados dos animais que após 12 semanas em dieta hiperlipídica receberam injeções subcutânea do análogo de GLP-1 (liraglutide) por duas semanas e receberam treinamento físico crônico pelo mesmo período, para analisarmos os efeitos dessas intervenções nas alterações provocadas pela dieta hiperlipídica.

4.2- Animais tratados com análogo de GLP-1

Em relação ao peso corporal final, observamos que os animais tratados com análogo de GLP-1 apresentaram redução quando comparados aos animais que receberam solução veículo, enquanto o exercício físico de duas semanas não foi eficiente em diminuir o peso corporal (figura 9-A). Já na figura 9-B, podemos observar que os animais que receberam o análogo de GLP-1 tiveram menor ingestão alimentar do que os animais veículo e que o treinamento não foi capaz de afetar esse parâmetro.

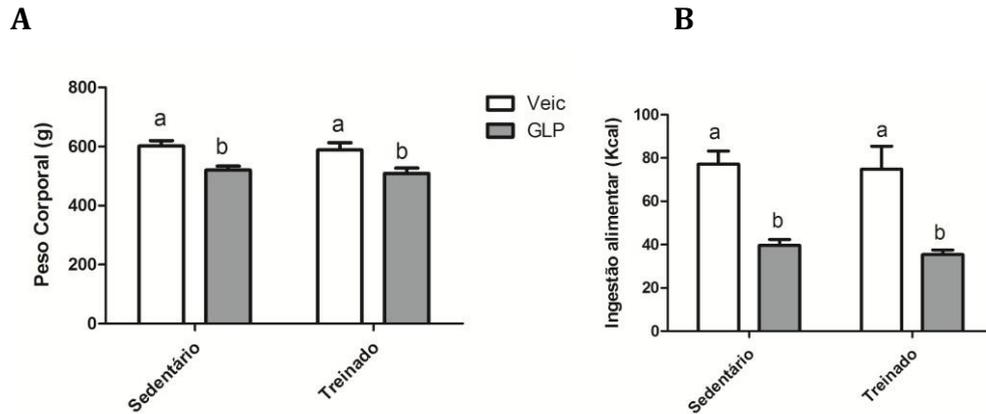


Figura 9: Caracterização do peso corporal e da ingestão alimentar (A): Peso corporal ao final do experimento. B: Ingestão alimentar. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 14 animais por grupo, *Anova Two-way*; Teste Newman-Keuls * $P < 0,05$ a \neq b.Veic; animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP; animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1;

A Figura 10-A mostra que tanto o análogo de GLP-1 quanto o exercício físico foi eficiente em reduzir o peso do TAB (figura 10-A). Já na figura 10-B estão apresentados os dados do peso do TAB relativo, onde podemos observar que o exercício físico foi eficiente em diminuir essa variável, enquanto que o tratamento isolado com GLP não resultou em redução significativa da gordura epididimal dos animais.

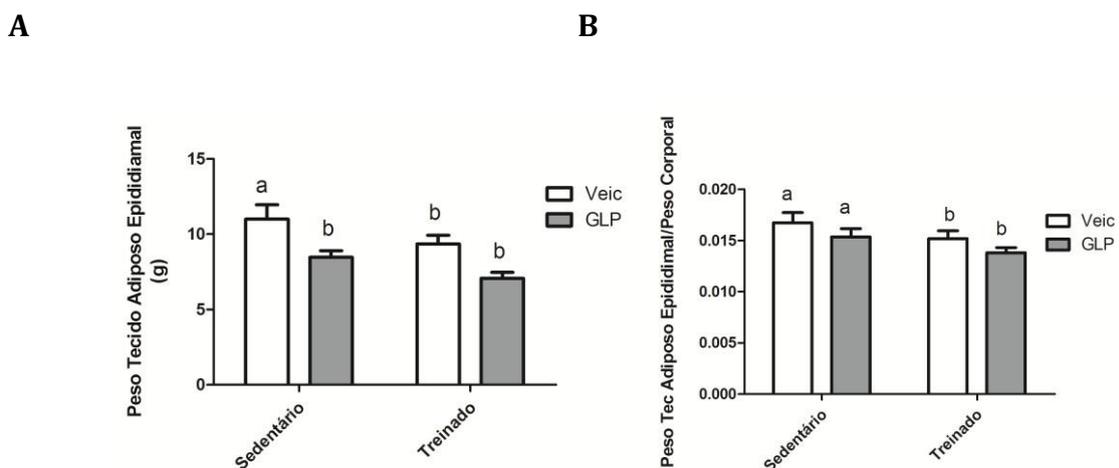


Figura 10: Caracterização da adiposidade. A: Peso do tecido adiposo epididimal ao final do experimento (g). B: Peso adiposo relativo. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 14 animais por grupo, *Anova Two-way*; Teste Newman-Keuls

* $P < 0,05$ a \neq b.Veic; animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP; animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1;

O passo seguinte foi analisar as condições morfológicas do TAB. Na figura 11 vemos maior área do adipócito nos animais veículo sedentário e constatamos que as intervenções com análogo de GLP-1 e exercício físico foram eficientes em diminuir a área do adipócito dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, contudo nenhum efeito sinérgico do análogo de GLP-1 em conjunto com o treinamento fora observado nesse parâmetro.

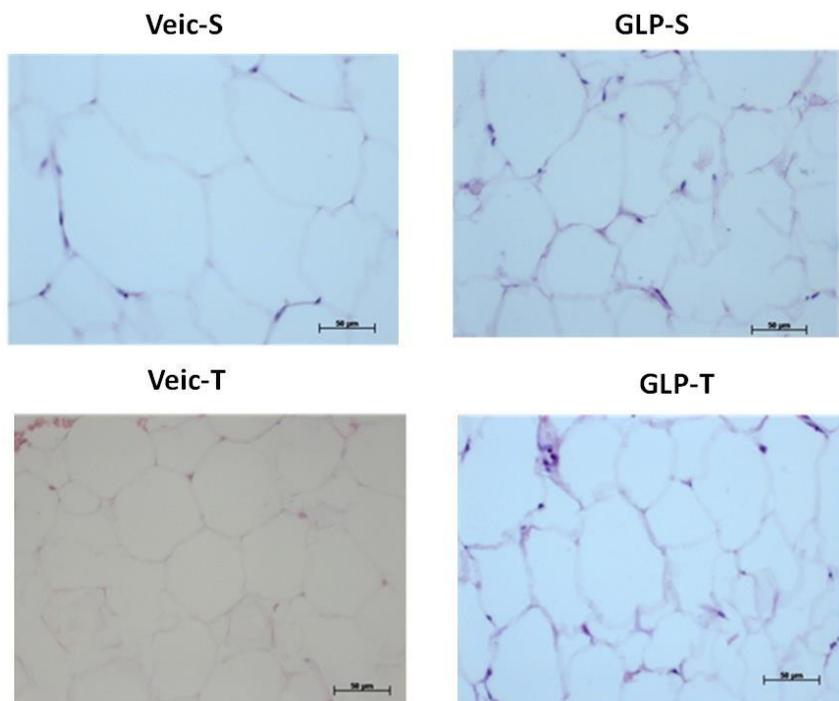


Figura 11: Caracterização morfológica do tecido adiposo epididimal. Microfotografias de marcação de HE ao final do experimento. As imagens são representativas de 1 animal por grupo. Veic-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e foi mantido sedentário; GLP-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1 e foi mantido sedentário; Veic-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e treinado; GLP-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1 e treinado.

Avaliamos o grau de desenvolvimento da resistência à insulina após o tratamento com análogo de GLP-1 e exercício físico. Na Figura 12-A vemos que a glicemia do grupo Veic-S esteve elevada em relação aos demais grupos ao longo de todo o desafio. Ao calcularmos a constante de remoção de glicose (KITT) os animais Veic-S possuem menor KITT do que os demais grupos (Figura 12B), indicando assim o exercício físico e o tratamento com o análogo de GLP-1 como possíveis tratamentos para a intolerância à insulina.

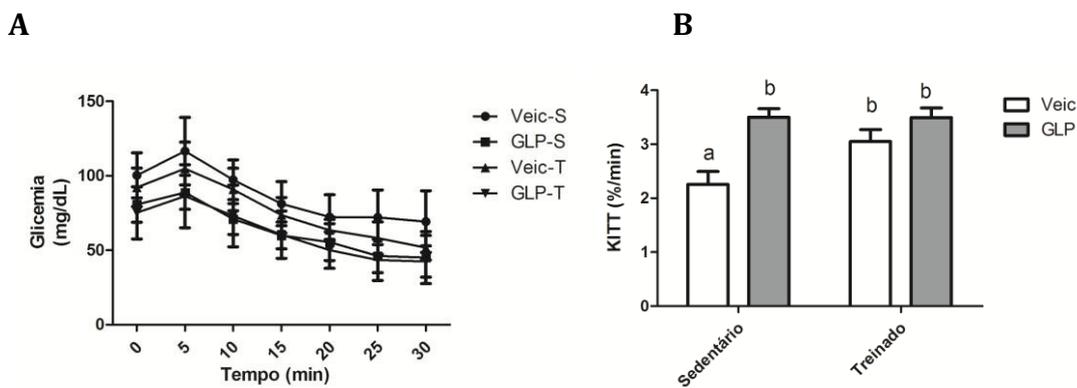


Figura 12: Caracterização da Tolerância à Insulina. (A): Curva de resposta da glicose durante o teste de tolerância à insulina ao final do experimento. (B): KITT. $a \neq b$. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 12 animais por grupo. Anova. *Two way*. Teste Newman-Keuls. Veic; animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP; animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1;

O passo seguinte foi observar o desenvolvimento da intolerância à glicose ao fim do tratamento com exercício físico e o análogo de GLP-1. A Figura 13-A, mostra a cinética da glicemia durante o TTG, nela podemos observar que os animais dos grupos tratados com análogo de GLP-1 e do grupo treinado apresentaram menores valores de glicemia ao longo do teste, com destaque para os tempos de 15, 30 e 60 minutos. Enquanto que na figura 4-B vemos que o grupo Veic-S possui maior área sob a curva de glicose (AUC) durante o TTG do que os demais grupos, indicando que os animais sedentários e sem a intervenção com o medicamento apresentavam significativa intolerância à glicose.

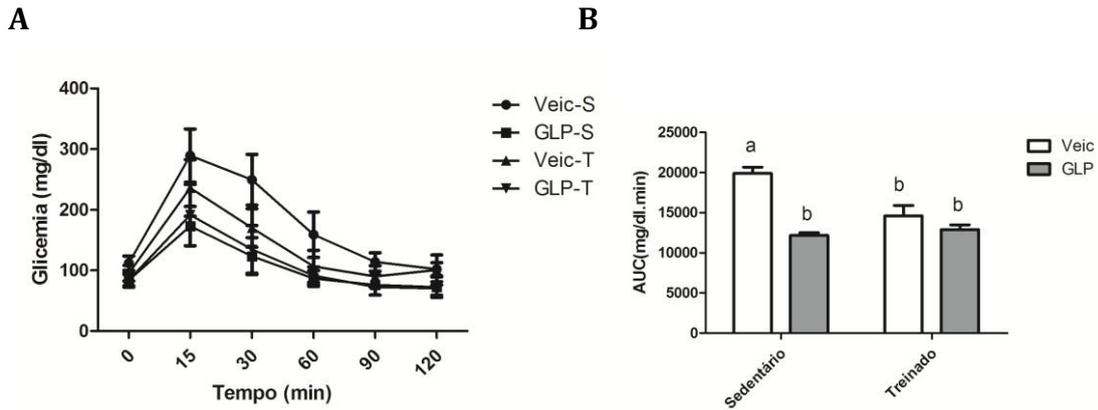


Figura 13: Caracterização da Tolerância à Glicose. (A): Teste de tolerância à glicose ao final do experimento. (B): AUC. $a \neq b \neq c$. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 12 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls. Veic; animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP; animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1;

Analizamos também a taxa metabólica dos animais ao final do experimento e observamos que o grupo Veic-S possui menor taxa metabólica do que os demais grupos (Figura 14), o que pode ser correlacionado com o maior peso corporal encontrado nesses animais, demonstrando que houve um aumento do tecido metabolicamente menos ativo (tecido adiposo). Portanto, o exercício físico e o tratamento com o análogo de GLP-1 mostram-se eficientes em aumentar a taxa metabólica nos animais obesos.

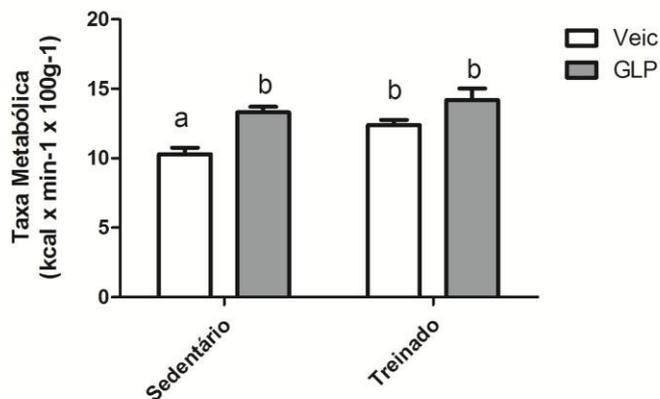


Figura 14: Taxa Metabólica. Taxa metabólica ao final do experimento. $a \neq b$. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 8 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls. Veic; animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica,

recebeu solução salina; GLP; animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1;

Após verificarmos que as intervenções com análogo de GLP-1 e exercício físico foram positivas para a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, analisamos os níveis sérico de insulina e verificamos níveis reduzidos desse hormônio nos animais exercitados quando comparados aos sedentários, e a droga não produziu qualquer efeito significativo (figura 15).

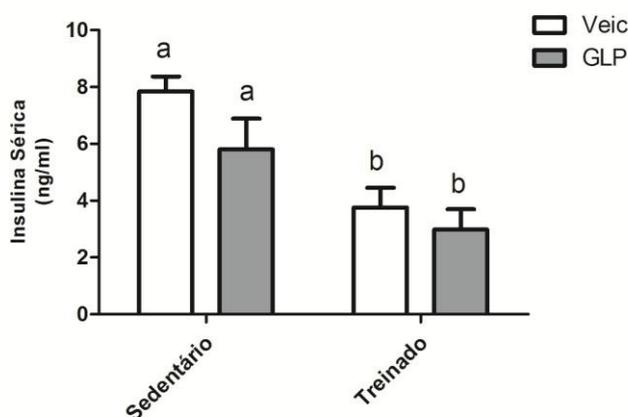


Figura 15: Insulina Sérica. Insulina sérica ao final do experimento. $a \neq b$. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 8 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1;

Após a constatação da melhora na sensibilidade à insulina nos animais tratados com a droga, decidimos verificar se essa melhora não era decorrente somente da diminuição de peso corporal. Para isso realizamos outros experimentos *com "pair feeding"* ou consumo pareado e os resultados estão apresentados a seguir.

- *Pair feeding* com animais tratados com análogo de GLP-1

Em relação ao peso corporal final no experimento com consumo pareado, ao contrário do experimento anterior, observamos que não houve diferença de peso corporal entre os grupos (Figura .16). Mostrando que quando pareamos a quantidade de alimento para todos os grupos não é observada diferença significativa entre os valores, indicando que o efeito da droga pode ter importante ação no controle da ingestão alimentar.

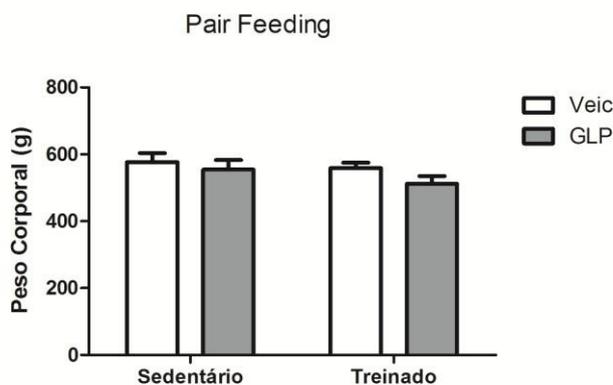


Figura 16: Peso Corporal animais pair feeding . Peso corporal ao final do experimento. $a \neq b$. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 8 animais por grupo. ANOVA; *Two Way. Teste Newman-Keuls*. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1 .

Após não verificarmos diferença no peso corporal entre os grupos do experimento de consumo pareado, calculamos a constante de remoção de glicose (KITT). Nesse experimento os animais Veic-S apresentaram menor KITT do que os demais grupos (Figura 17A), indicando assim que a diferença de peso corporal não foi determinante para a melhora na tolerância à insulina, mas sim efeito da droga e do exercício físico.

Na mesma linha, os resultados do TTG também foram semelhantes aos observados sem o pareamento da alimentação, ou seja, os animais veículo sedentários foram os que apresentaram maior área sob a curva de glicose, indicando que os

tratamentos promoveram melhora na tolerância a glicose independentemente de não ocorrer alteração ponderal (Figura 17-B).

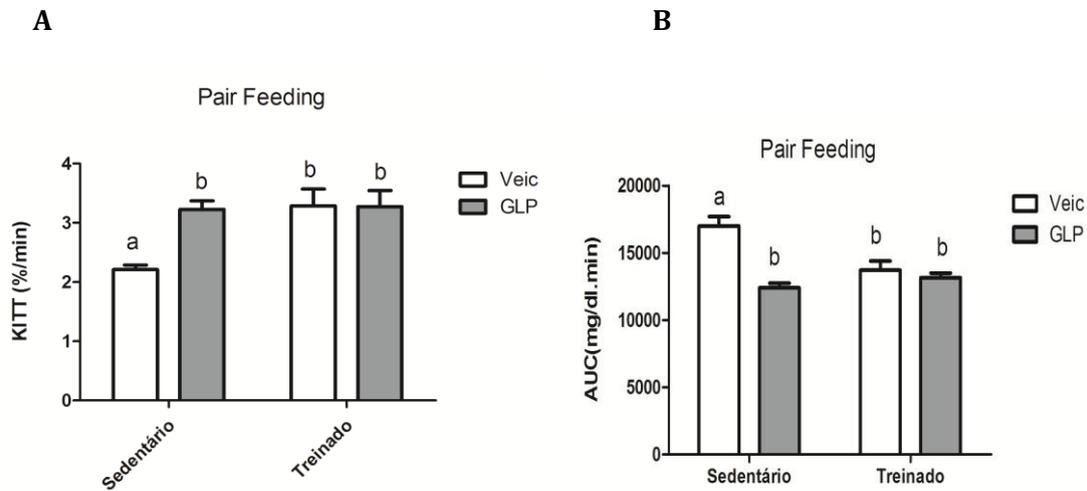


Figura 17: Caracterização da Tolerância à Glicose e à Insulina. KITT e AUC ao final do experimento. $a \neq b$. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 8 animais por grupo. ANOVA. Two way; Teste Newman-Keuls. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1

Após os experimentos com os animais "*pair feeding*" verificamos que apesar de não existir diferença no peso corporal a melhora na sensibilidade à insulina persistiu nos animais tratados, portanto os próximos resultados apresentados são dos animais com alimentação *ad libitum*, já que a melhora na sensibilidade à insulina não foi acarretada unicamente pela perda de peso.

O passo seguinte foi analisar o TAB para determinar se a melhora na sensibilidade à insulina induzida pelo tratamento com o análogo de GLP-1 e exercício físico foi acompanhada pela melhora na sinalização de insulina neste tecido. Para isso, avaliamos a fosforilação Akt. Observamos que a fosforilação em serina, em decorrência da estimulação com insulina, mostrou-se melhorada tanto no grupo tratado com análogo de GLP-1 quanto no tratado com exercício físico de forma isolada e que o tratamento concomitante resultou em um incremento ainda mais acentuado, ou seja, a presença de efeito aditivo entre os tratamentos (Figura 18)

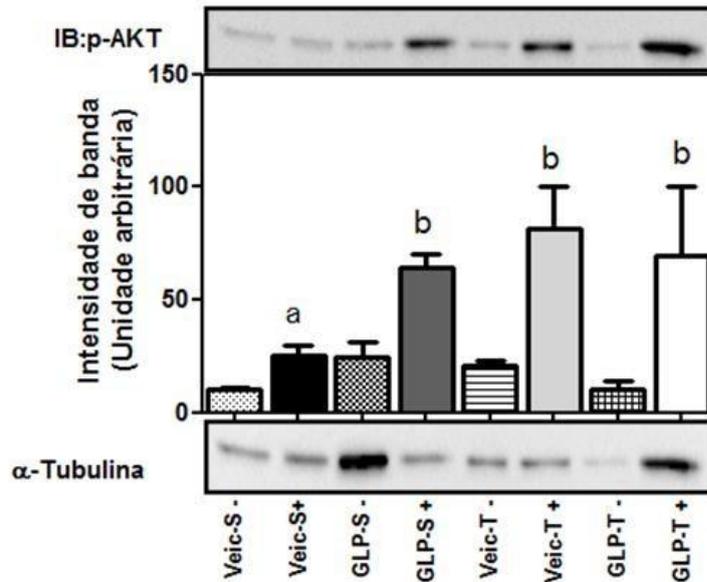


Figura 18: Via de sinalização da insulina no Tecido Adiposo Branco. Blots representativos demonstram no tecido adiposo branco a fosforilação em serina 473 da proteína Akt. Expressão da proteína total. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 4 animais por grupo. *Anova; Two way*. Teste Newman-Keuls $a \neq b$. Veic-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e foi mantido sedentário; GLP-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1 e foi mantido sedentário; Veic-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e treinado; GLP-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1 e treinado.

Para verificarmos o estado de inflamação sistêmica, analisamos as citocinas séricas e foi constatado que apenas os grupos tratados com análogo de GLP-1 apresentaram reduções significativas das concentrações de TNF- α (Figura 19-A), IL-1 β (figura 19-B) do que os grupos que receberam solução veículo. Já em relação à citocina IL-10, anti-inflamatória, não houve diferença entre os qualquer um dos grupos.

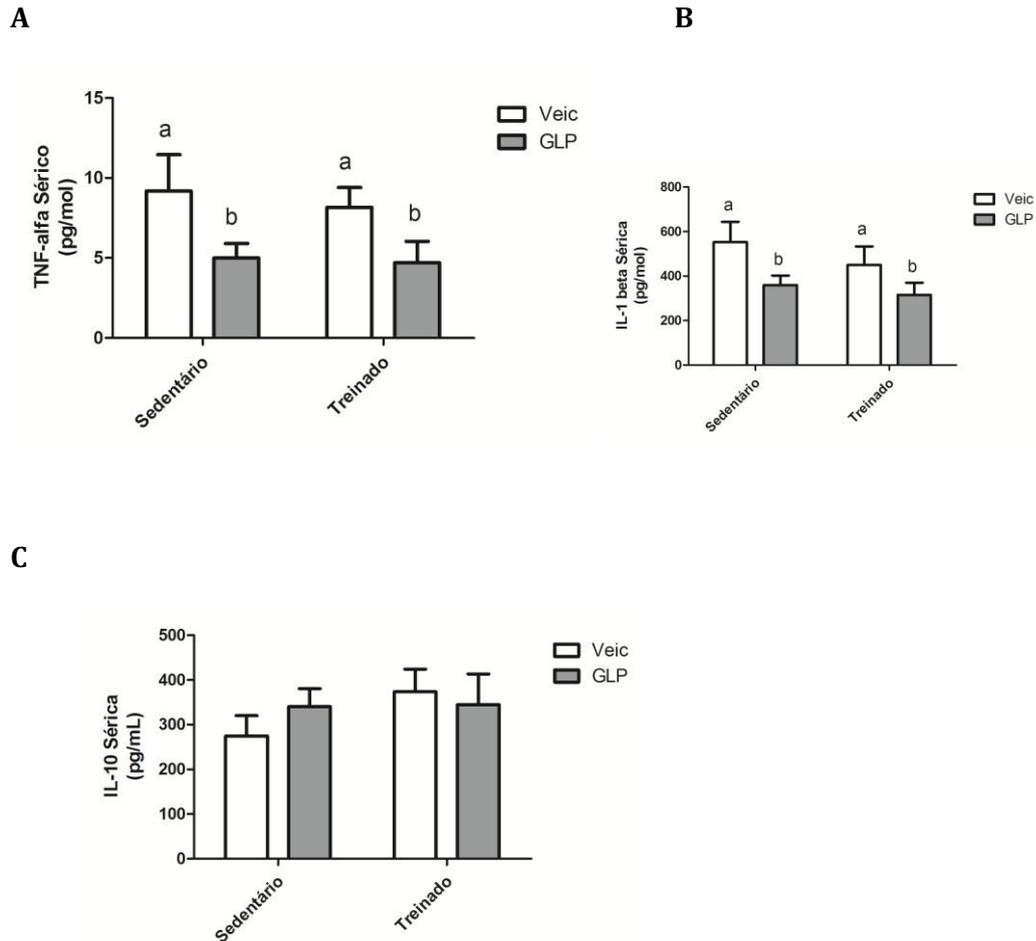


Figura 19: Níveis circulantes de, TNF- α , IL-1 β e IL-10 ao final do experimento. (A) TNF- α . (B) IL-1 β (C) IL-10. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 10 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls. $a \neq b$. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1;

Detectada as alterações nas citocinas inflamatórias circulantes, verificamos a influência do tratamento com o análogo de GLP-1 e do exercício físico no perfil de ativação das serinas quinases JNK e IKK no tecido adiposo branco. Encontramos que os animais que passaram por intervenção, seja da droga ou do treinamento físico apresentaram menor fosforilação da proteína JNK e também da IKK (figura 20-A e B).

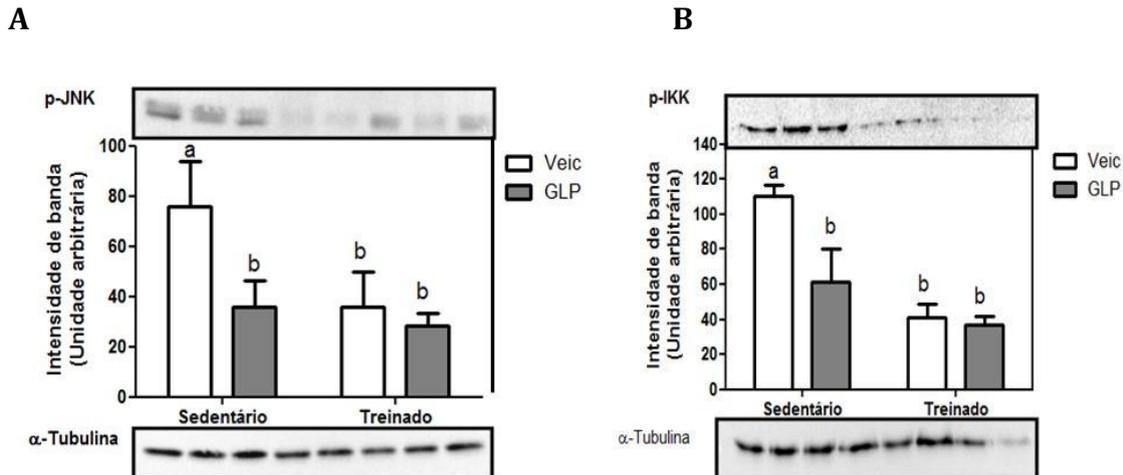


Figura 20: Vias inflamatórias das serinas quinases JNK e IKK no Tecido Adiposo Branco. Blots representativos demonstram no tecido adiposo branco a fosforilação de JNK e IKK. Expressão da proteína total. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 4 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls. $a \neq b$. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1;

Uma vez verifica a redução das serinas quinases, buscamos investigar o número de macrófagos M1 e M2, pois a literatura afirma que uma fonte importante de inflamação presente na obesidade é a infiltração de macrófagos para esse tecido.

As imagens de imunofluorescência foram examinadas para F4/80 (marcador de macrófagos) ao final do experimento, e constatamos a diminuição dessa marcação para os animais treinados e também para os tratados com análogo de GLP-1 (Figura 21-A).

A mesma técnica foi utilizada para determinar o número de macrófagos M2, usamos para esse fim a co-marcação de F4/80 (vermelho) para macrófagos e MGL-1 (verde) para macrófagos M2. Na figura 21-B observamos que o exercício físico foi capaz de aumentar a relação de macrófagos M2/número total de macrófagos e a que mesma não foi influenciada pelo medicamento.

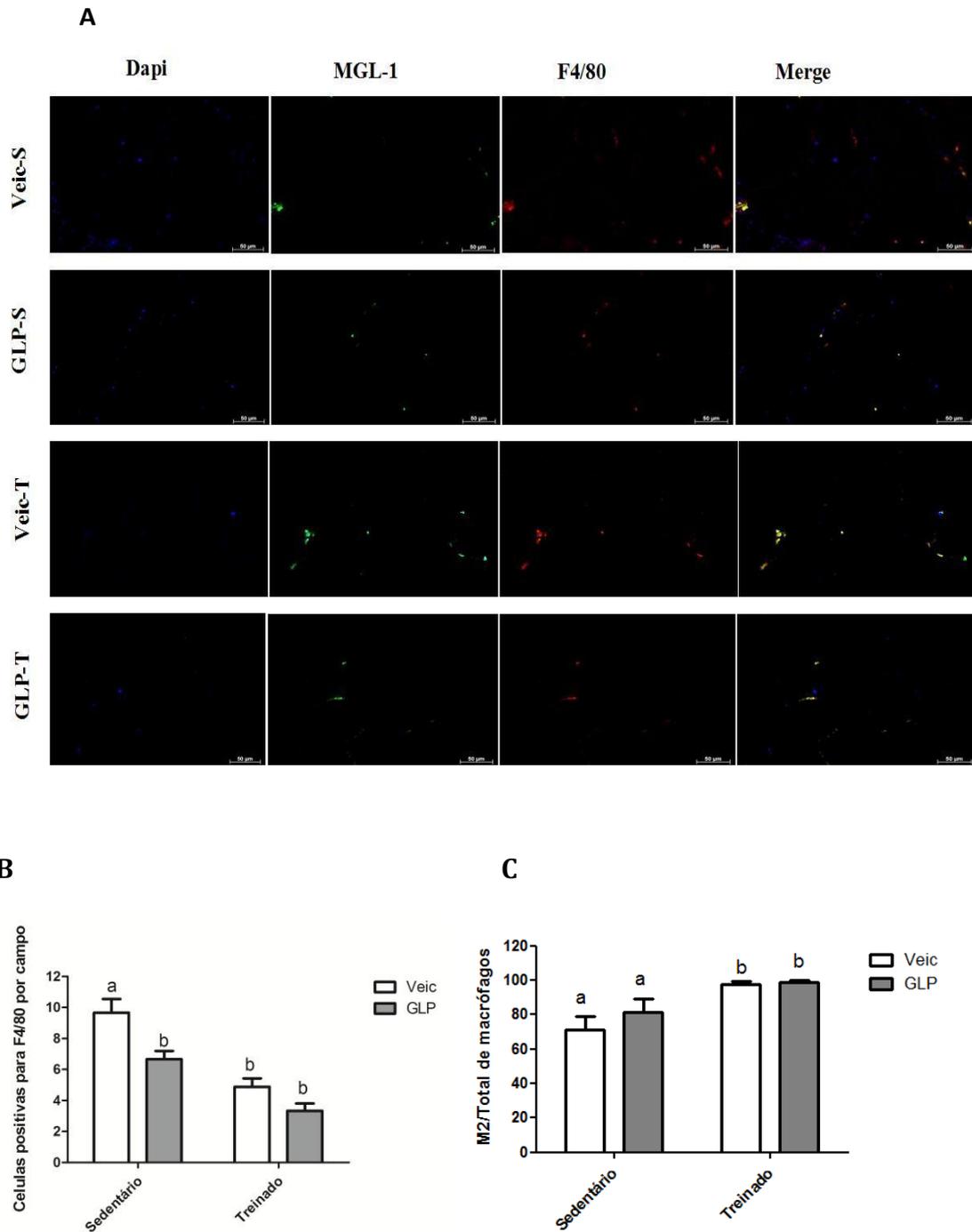


Figura 21: Caracterização da infiltração e polarização de macrófagos. Microfotografias representativas de marcação F4/80 acompanhadas de quantificações de células positivas para F4/80 (vermelho) e MGL-1 (verde) em tecido adiposo branco dos grupos Veic-S, GLP-S, Veic-T e GLP-T ao final do experimento. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 3 a 5 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls. * \neq Veic-S. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta

hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1;

Como já destacado na introdução, a importância do tecido adiposo marrom vem aumentando a cada dia, quando se trata de obesidade e resistência à insulina, portanto esse tecido também foi alvo das nossas pesquisas no presente trabalho.

Em relação ao peso do tecido adiposo marrom no final do experimento observamos que não houve efeito do tratamento com análogo de GLP-1 ou do exercício físico sobre essa variável (Figura 22A). Porém o exercício físico de duas semanas foi eficiente em aumentar o peso relativo do tecido adiposo marrom, ou seja, a quantidade desse tecido em relação ao peso corporal total (figura 9-A).

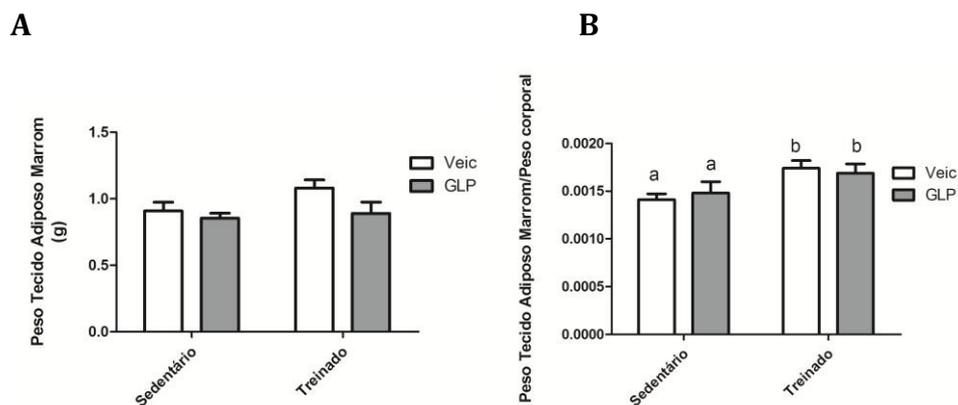


Figura 22: Caracterização da adiposidade. A: Peso do tecido adiposo marrom ao final do experimento (g). B: Peso adiposo marrom relativo. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 10 animais por grupo, *Anova Two-way*; Teste Newman-Keuls $P < 0,05$ $a \neq b$. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1;

Analizamos também a morfologia do TAM através da histologia e constatamos que os animais Veic-S apresentam maior quantidade de gordura no interior dos adipócitos do que os grupos treinados e tratados com análogo de GLP-1 (Figura 23).

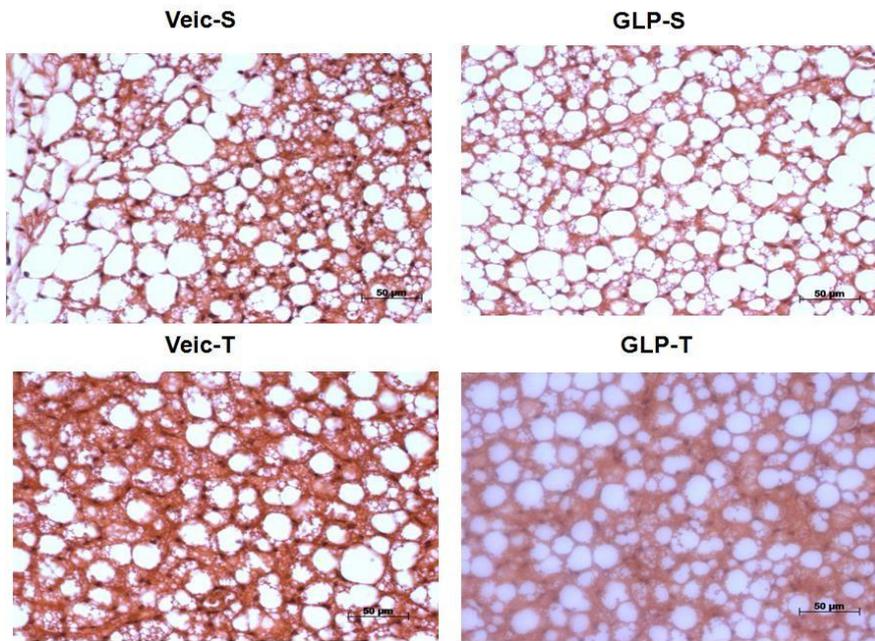


Figura 23: Caracterização morfológica do tecido adiposo marrom. Microfotografias de marcação de HE ao final do experimento. As imagens são representativas de 1 animal por grupo. Veic-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e foi mantido sedentário; GLP-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1 e foi mantido sedentário; Veic-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e treinado; GLP-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1 e treinado.

Não somente o tamanho do TAM é importante, mas também sua atividade e em nosso trabalho mensuramos a atividade do tecido adiposo marrom através da expressão da proteína UCP-1 e constatamos que os grupos treinados e tratados com GLP-1 possuem maior atividade da UCP-1 do que o grupo veículo sedentário (figura 24), caracterizando maior ativação do tecido adiposo marrom nos animais treinados e tratados com análogo de GLP-1.

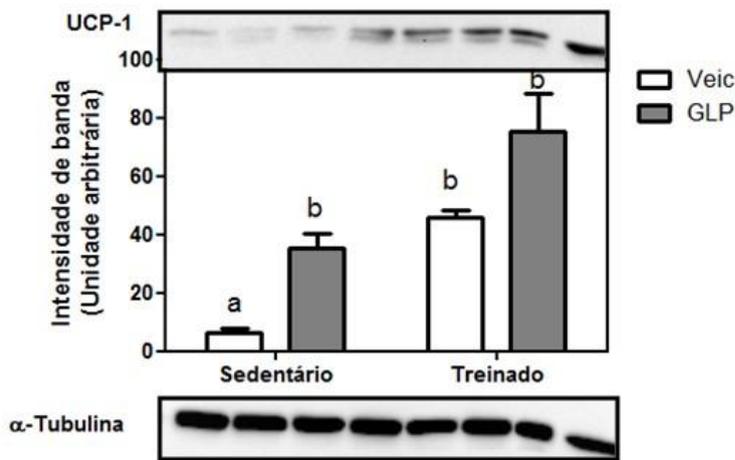
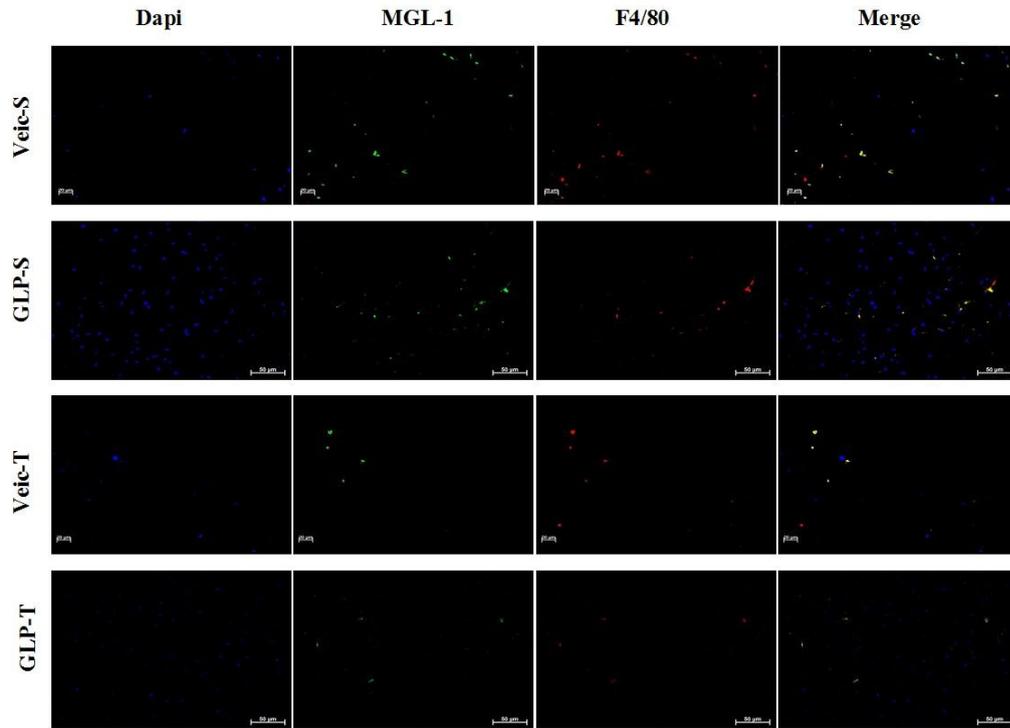


Figura 24: Expressão das proteínas UCP-1 no Tecido Adiposo Marrom. Blots representativos demonstram no tecido adiposo marrom a UCP-1. Expressão da proteína total. $P < 0,05$ $a \neq b$. Os dados estão apresentados em \pm EPM de 4 animais por grupo. *Anova Two-way*; Teste Newman-Keuls. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; GLP: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1;

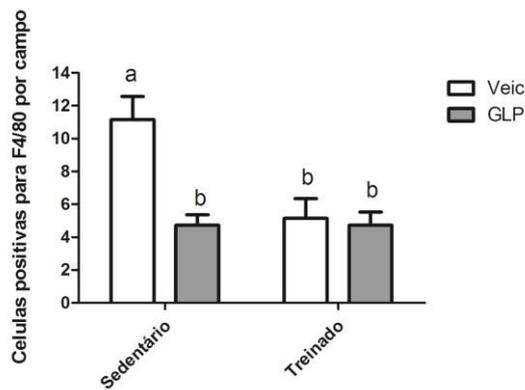
Para determinarmos a infiltração de macrófagos no tecido adiposo marrom, examinamos as imagens de imunofluorescência utilizando a marcação F4/80 (marcador de macrófagos) ao final do experimento, e constatamos a diminuição dessa marcação para os animais treinados e também para os tratados com análogo de GLP-1 (Figura 25-A). Podemos dizer desse modo que os animais treinados e tratados com análogo do GLP-1 possuem menor quantidade total de macrófagos no tecido adiposo marrom do que os animais Veic-S.

A mesma técnica foi utilizada para determinar o número de macrófagos M2, usamos para esse fim a co-marcação de F4/80 (vermelho) para macrófagos e MGL-1 (verde) para macrófagos M2. Os resultados mostraram que somente o exercício físico foi eficiente em aumentar a razão M2/total de macrófagos no tecido adiposo marrom (Figura 25C).

A



B



C

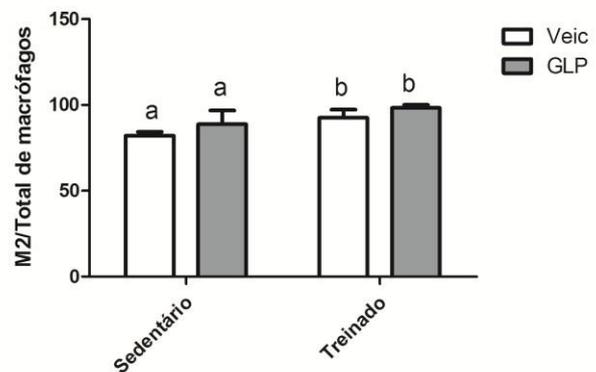


Figura 25: Caracterização da infiltração e polarização de macrófagos. Microfotografias representativas de marcação F4/80 acompanhadas de quantificações de células positivas para F4/80 (vermelho) e MGL-1 (verde) em tecido adiposo marrom dos grupos Veic-S, GLP-S, Veic-T e GLP-T ao final do experimento. Os dados estão apresentados em \pm Desvio padrão de 3 a 6 animais por grupo. $P < 0.05$ $a \neq b$. *Anova Two-way*; Teste Newman-Keuls. Veic-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e foi mantido sedentário; GLP-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1 e foi

mantido sedentário; Veic-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e treinado; GLP-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu análogo de GLP-1 e treinado.

4.3 Animais tratados com inibidor de DPP-4

Em relação ao peso corporal final, não observamos diferença entre os grupos (Figura 26), portanto o tratamento com inibidor de DPP-4 ou o exercício físico não mostraram efeito sobre o peso corporal, ou seja, qualquer alteração encontrada terá ocorrido em virtude dos tratamentos.

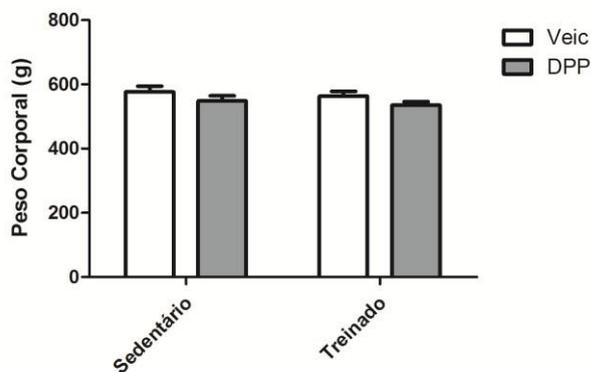


Figura 26: Caracterização do peso corporal: Peso corporal ao final do experimento. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 10 animais por grupo, *Anova Two-way*; Teste Newman-Keuls; Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; DPP-S: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4

A Figura 27-A mostra que o exercício físico foi eficiente em reduzir o peso do TAB, sem efeito do medicamento inibidor de DPP-4. Já na figura 27-B estão apresentados os dados do peso do TAB relativo, onde podemos observar que o exercício físico também foi eficiente em diminuir essa variável.

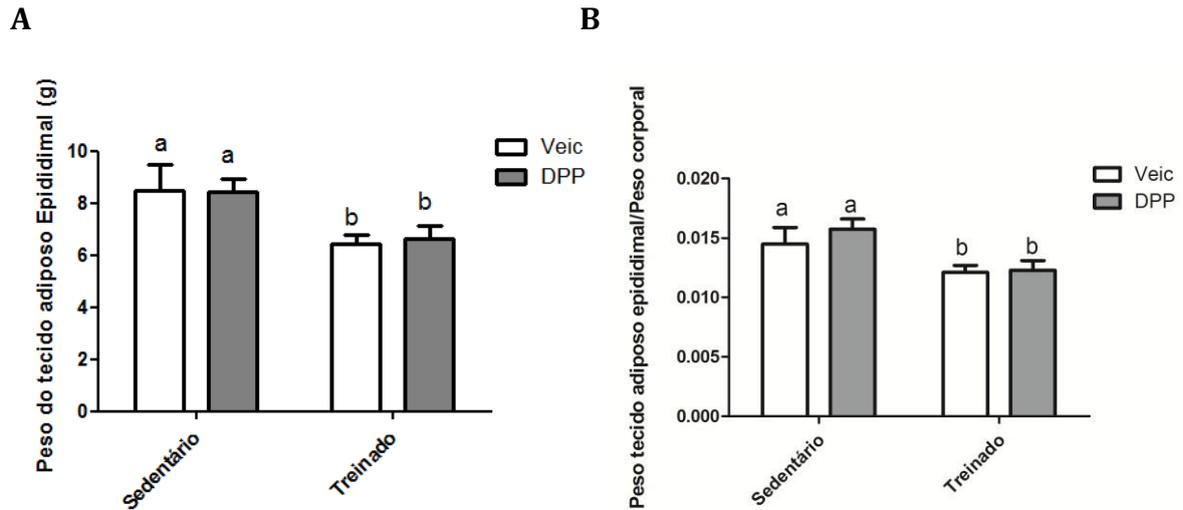


Figura 27: Caracterização da adiposidade. A: Peso do tecido adiposo epididimal ao final do experimento (g). B: Peso adiposo relativo. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 10 animais por grupo, *Anova Two-way*; Teste Newman-Keuls $P < 0,05$ $a \neq b$. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; DPP-S: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4

O passo seguinte foi analisar as condições morfológicas do TAB. Nesse contexto, observamos que a maior área do adipócito e formação de *crown like structure* foram encontradas nos animais sedentários, que o exercício físico foi eficiente em atenuar ambos (Figura 28). Contudo, nenhum efeito fora observado em relação ao tratamento com o inibidor de DPP4

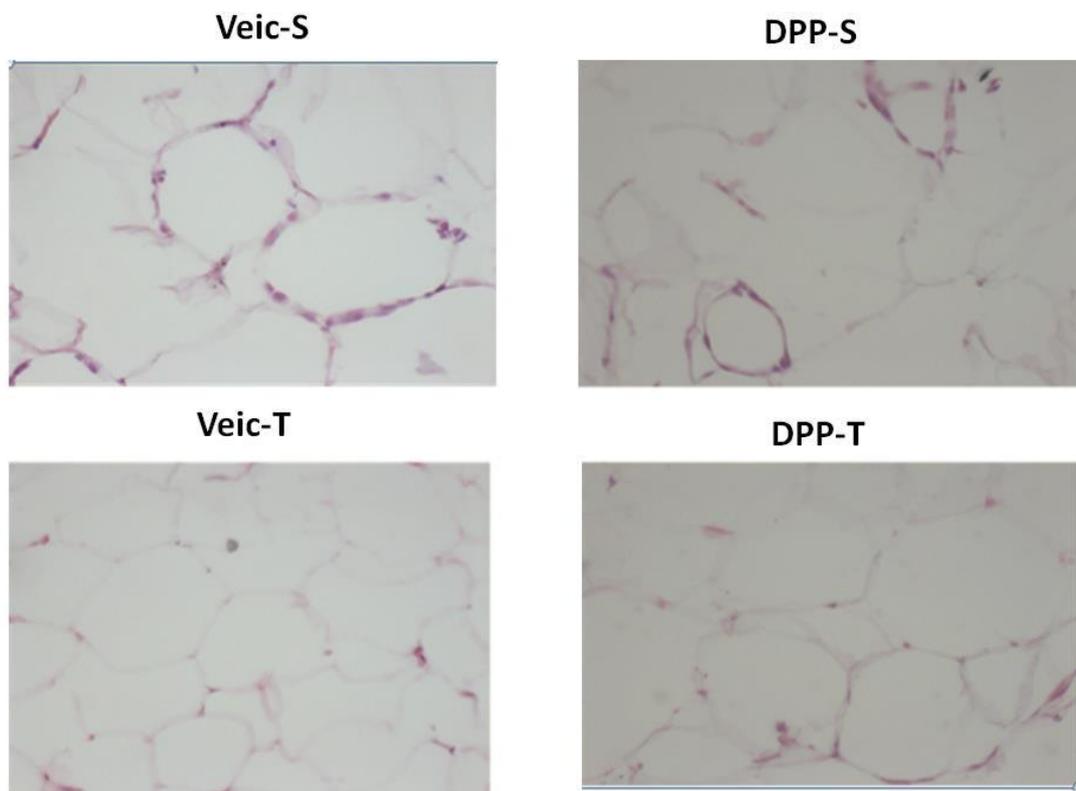


Figura 28: Caracterização morfológica do tecido adiposo epididimal. Microfotografias de marcação de HE ao final do experimento. As imagens são representativas de 1 animal por grupo. Veic-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e foi mantido sedentário; DPP-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4 e foi mantido sedentário; Veic-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e treinado; DPP-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4 e treinado.

Avaliamos o grau de desenvolvimento da resistência à insulina após os tratamentos isolados ou concomitantes com o inibidor de DPP4 e exercício físico. Na Figura 29-A vemos que a glicemia do grupo Veic-S esteve elevada em relação aos demais grupos ao longo de todo o desafio. Ao calcularmos a constante de remoção de glicose (KITT) verificamos que os animais Veic-S possuem menor KITT do que os demais grupos (Figura 29B).

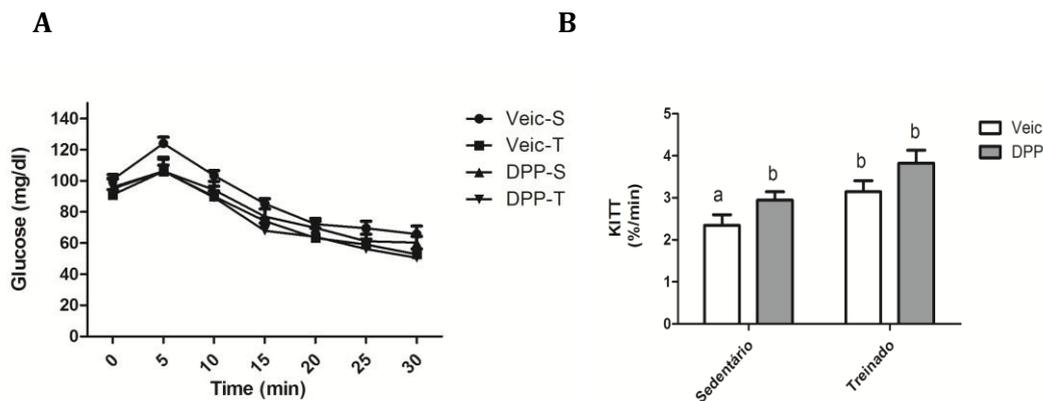


Figura 29: Caracterização da Tolerância à Insulina. (A): Curva de resposta da glicose durante o teste de tolerância à insulina ao final do experimento. (B): KITT. $a \neq b$. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 10 animais por grupo. Anova. *Two way*. Teste Newman-Keuls. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; DPP-S: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4

O passo seguinte foi observar o desenvolvimento da intolerância à glicose ao fim do tratamento com exercício físico e o inibidor de DPP-4. A Figura 30-A mostra a cinética da glicemia durante o TTG, nele podemos observar que os animais dos grupos tratados com inibidor de DPP-4 e do grupo treinado apresentaram menores valores de glicemia ao longo do teste. Enquanto que na figura 30-B vemos que o grupo Veic-S possui maior área sob a curva de glicose (AUC) durante o TTG do que os demais grupos, indicando que os animais sedentários e sem a intervenção com o medicamento apresentavam significativa intolerância à glicose.

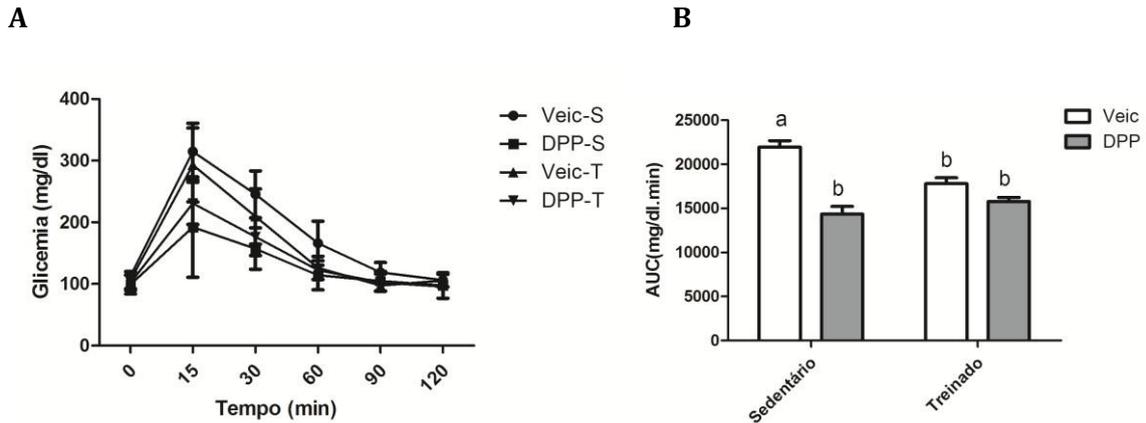


Figura 30: Caracterização da Tolerância à Glicose. (A): Teste de tolerância à glicose ao final do experimento. (B): AUC. $a \neq b$. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 12 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; DPP-S: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4

Na Figura 31 estão presentes os dados de taxa metabólica, os animais treinados e os tratados com inibidor de DPP-4 possuem maiores valores de taxa metabólica do que os animais Veic-S.

Analizamos também a taxa metabólica dos animais ao final do experimento e observamos que o grupo Veic-S possui menor taxa metabólica do que os demais grupos (Figura 31). Portanto o exercício físico e o tratamento com o inibidor de DPP-4 mostram-se eficientes em aumentar a taxa metabólica nos animais obesos.

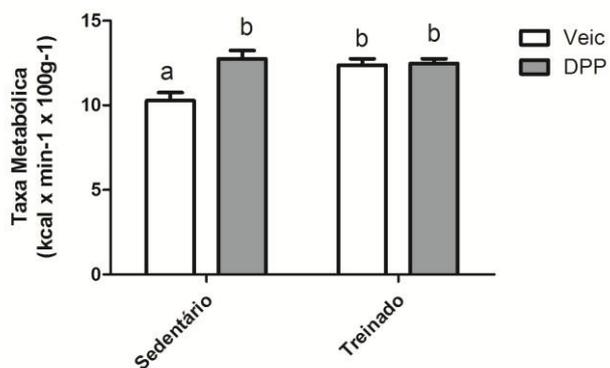


Figura 31: Taxa Metabólica. Taxa metabólica ao final do experimento. $a \neq b$. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 8 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução

salina; DPP-S: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4

Após verificarmos que as intervenções com inibidor de DPP-4 e exercício físico foram positivas para a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose averiguamos os níveis sérico de insulina e verificamos níveis reduzidos desse hormônio nos animais exercitados quando comparados aos sedentários, e a droga não produziu qualquer efeito significativo (figura 32).

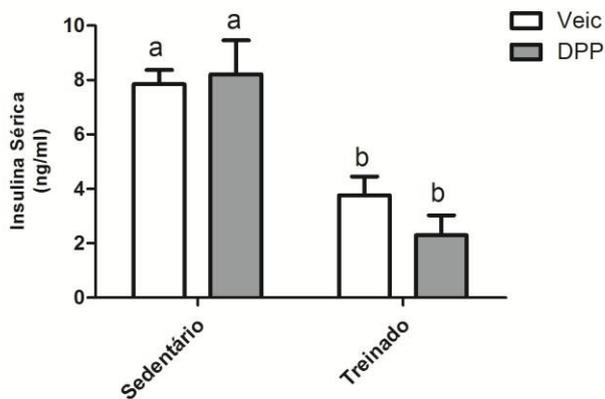


Figura 32: Insulina Sérica. Insulina sérica ao final do experimento. $a \neq b$. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 8 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls $a \neq b$. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; DPP-S: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4

O passo seguinte foi analisar o TAB para determinar se a melhora na sensibilidade à insulina induzida pelo tratamento com o inibidor de DPP-4 e exercício físico foi acompanhada pela melhora na sinalização de insulina neste tecido. Para isso, avaliamos a fosforilação Akt. Observamos que a fosforilação em serina, em decorrência da estimulação com insulina, mostrou-se melhorada tanto no grupo tratado com inibidor de DPP-4 quanto no tratado com exercício físico de forma isolada e que o tratamento concomitante resultou em um incremento ainda mais acentuado, ou seja, a presença de efeito aditivo entre os tratamentos (Figura 33)

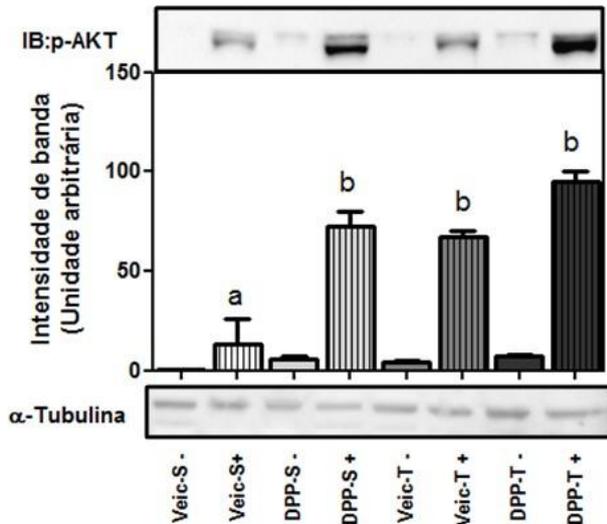


Figura 33: Via de sinalização da insulina no Tecido Adiposo Branco. Blots representativos demonstram no tecido adiposo branco a fosforilação em serina 473 da proteína Akt. Expressão da proteína total. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 4 animais por grupo. *Anova; Two way*. Teste Newman-Keuls $a \neq b$. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; DPP-S: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4

Para verificarmos o estado de inflamação sistêmica analisamos as citocinas séricas e foi constatado que apenas os grupos tratados com inibidor de DPP-4 apresentaram reduções significativas das concentrações de TNF- α (Figura 34-A), IL-1 β (figura 34-B) do que os grupos que receberam solução veículo. Já em relação à citocina IL-10, anti-inflamatória, não houve diferença entre os qualquer um dos grupos.

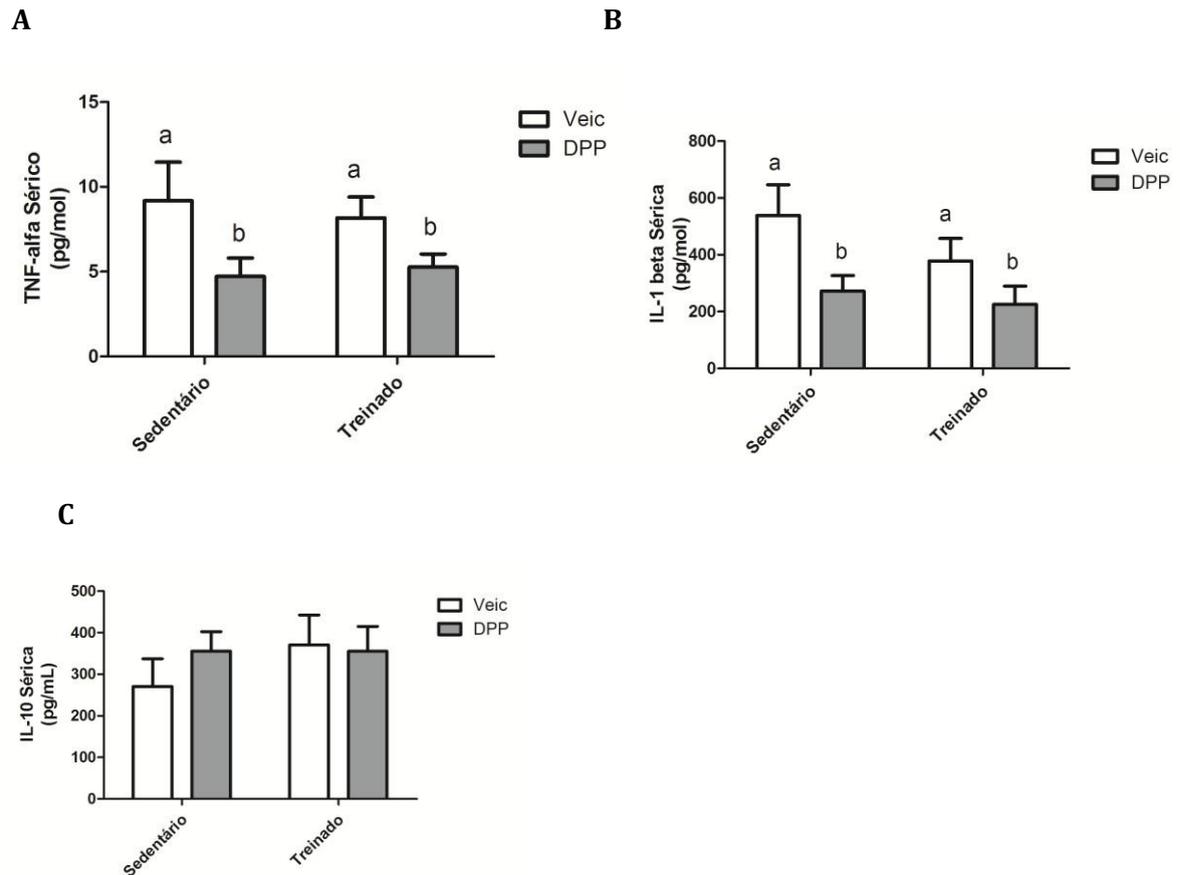


Figura 34: Níveis circulantes de, TNF- α , IL-1 β e IL-10 ao final do experimento. (A) TNF- α . (B) IL-1 β (C) IL-10. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 10 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls. $a \neq b$. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; DPP-S: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4

Detectada as alterações nas citocinas inflamatórias circulantes, verificamos a influência do tratamento com o inibidor de DPP-4 e do exercício físico no perfil de ativação das serinas quinases JNK e IKK no tecido adiposo branco. Encontramos que os animais que passaram por intervenção, seja da droga ou do treinamento físico apresentaram menor fosforilação da proteína JNK e também da IKK (figura 35-A e B).

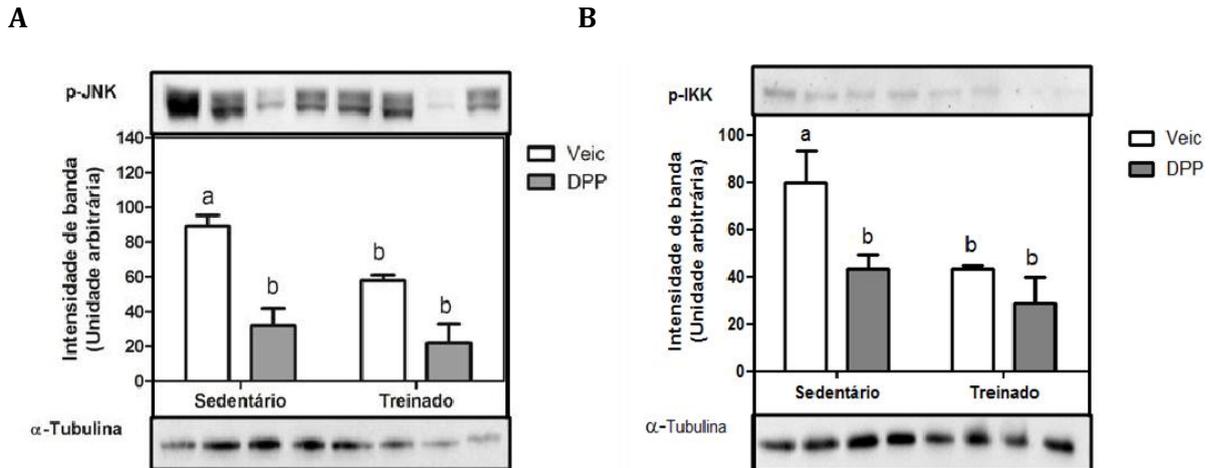


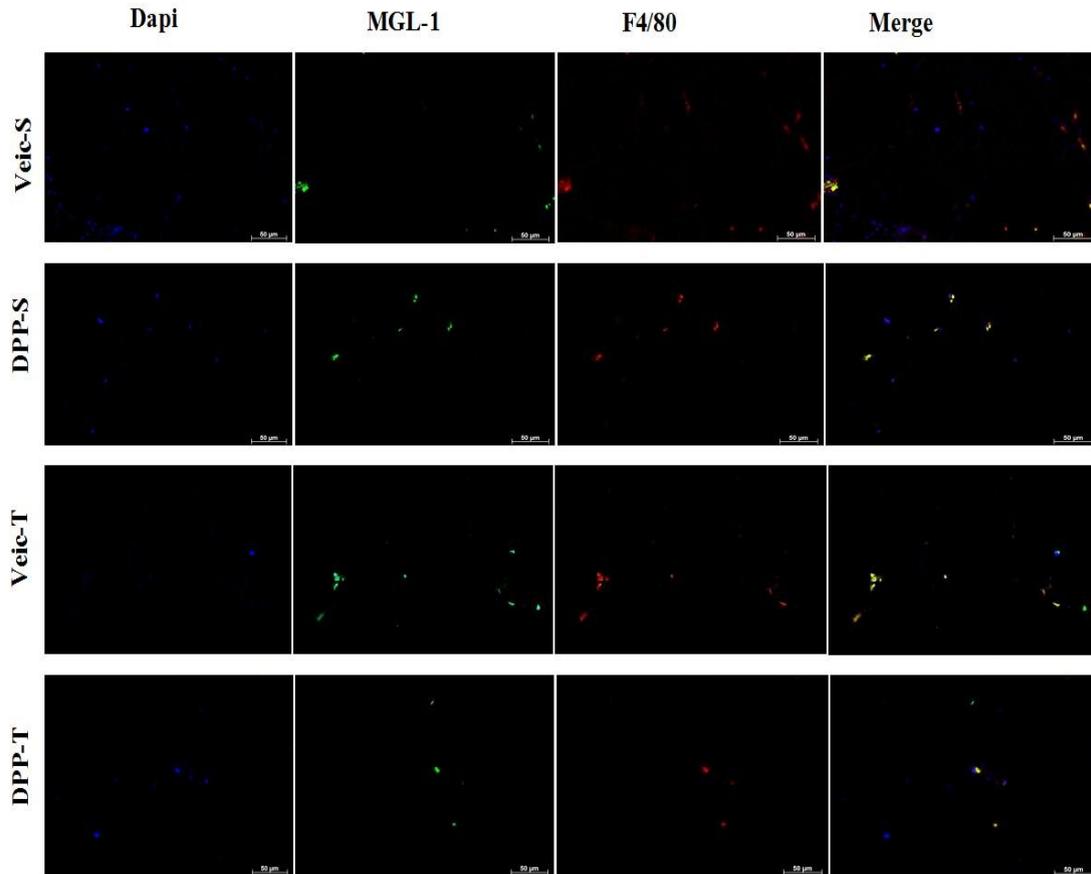
Figura 35: Vias inflamatórias das serinas quinases JNK e IKK no Tecido Adiposo Branco. Blots representativos demonstram no tecido adiposo branco a fosforilação de JNK e IKK. Expressão da proteína total. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 4 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls. $a \neq b$. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; DPP-S: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4

Uma vez verifica a redução das serinas quinase buscamos investigar o número de macrófagos total e M2, pois a literatura afirma que uma fonte importante de inflamação presente na obesidade é a infiltração de macrófagos para esse tecido.

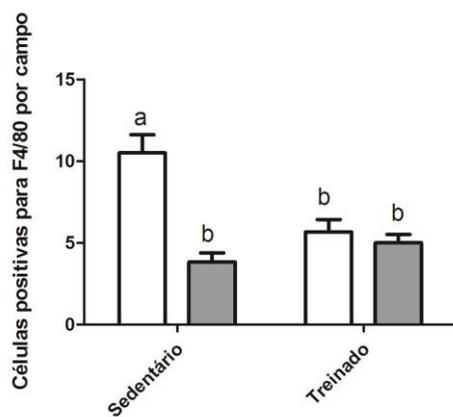
As imagens de imunofluorescência foram examinadas para F4/80 (marcador de macrófagos) ao final do experimento, e constatamos a diminuição dessa marcação para os animais treinados e também para os tratados inibidor de DPP-4 (Figura 36-A).

A mesma técnica foi utilizada para determinar o número de macrófagos M2, usamos para esse fim a co-marcação de F4/80 (vermelho) para macrófagos e MGL-1 (verde) para macrófagos M2. Na figura 36-B observamos que o exercício físico foi capaz de aumentar a relação de macrófagos M2/número total de macrófagos e a que a mesma não foi influenciada pelo medicamento.

A



B



C

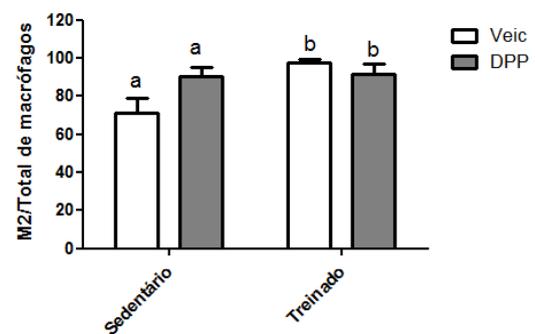


Figura 36: Caracterização da infiltração e polarização de macrófagos.

Microfotografias representativas de marcação F4/80 acompanhadas de quantificações de células positivas para F4/80 (vermelho) e MGL-1 (verde) em tecido adiposo branco dos grupos Veic-S, GLP-S, Veic-T e GLP-T ao final do experimento. Os dados estão

apresentados em média \pm desvio padrão de 3 a 5 animais por grupo. ANOVA; Teste Newman-Keuls. $a \neq b$. Veic-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e foi mantido sedentário; DPP-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4 e foi mantido sedentário; Veic-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e treinado; DPP-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4 e treinado.

Como já destacado na introdução, a importância do tecido adiposo marrom vem aumentando a cada dia, quando se trata de obesidade e resistência à insulina, portanto esse tecido também foi alvo das nossas pesquisas no presente trabalho.

Em relação ao peso do tecido adiposo marrom no final do experimento observamos que não houve efeito do tratamento com inibidor de DPP-4 ou do exercício físico sobre essa variável (Figura 37A). Porém, o exercício físico de duas semanas foi eficiente em aumentar o peso relativo do tecido adiposo marrom, ou seja, a quantidade desse tecido em relação ao peso corporal total (Figura 37-A).

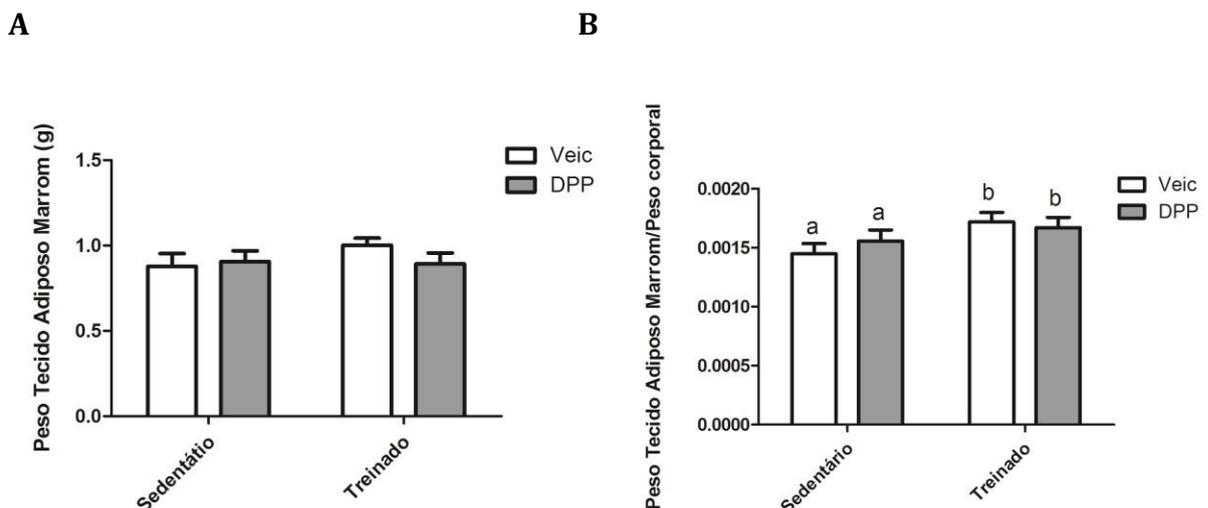


Figura 37: Caracterização da adiposidade. A: Peso do tecido adiposo marrom ao final do experimento (g). B: Peso adiposo marrom relativo. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 10 animais por grupo, *Anova Two-way*; Teste Newman-Keuls $P < 0,05$ $a \neq b$. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu

solução salina; DPP-S: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4

Analisamos também a morfologia do TAM através da histologia e constatamos que os animais Veic-S apresentam maior quantidade de gordura no interior dos adipócitos do que os grupos treinados e tratados com inibidor de DPP-4 (Figura 38).

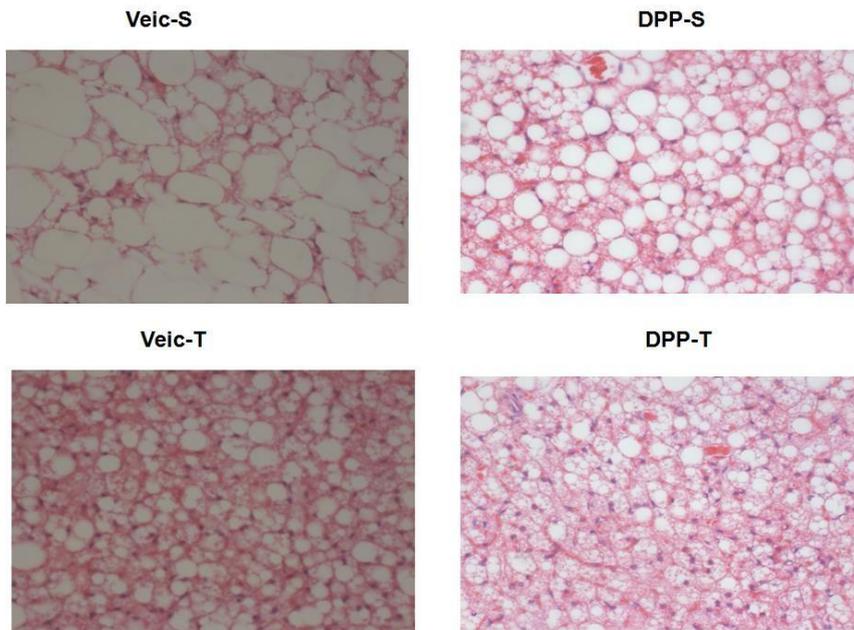


Figura 38: Caracterização morfológica do tecido adiposo marrom. Microfotografias de marcação de HE ao final do experimento. As imagens são representativas de 1 animal por grupo. Veic-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e foi mantido sedentário; DPP-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4 e foi mantido sedentário; Veic-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e treinado; DPP-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4 e treinado.

Não somente o tamanho do TAM é importante, mas também sua atividade e em nosso trabalho mensuramos a atividade do tecido adiposo marrom através da expressão da proteína UCP-1 e constatamos que os grupos treinados e tratados com inibidor de DPP-4 possuem maior atividade da UCP-1 do que o grupo veículo sedentário (figura 39),

caracterizando maior ativação do tecido adiposo marrom nos animais treinados e tratados com inibidor de DPP-4.

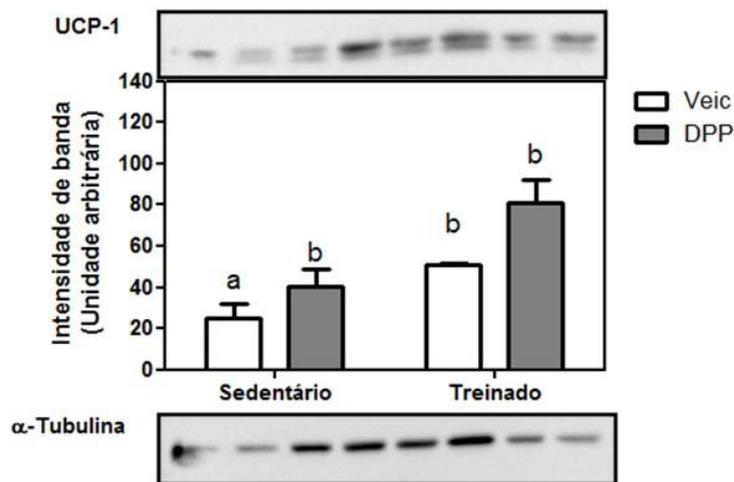
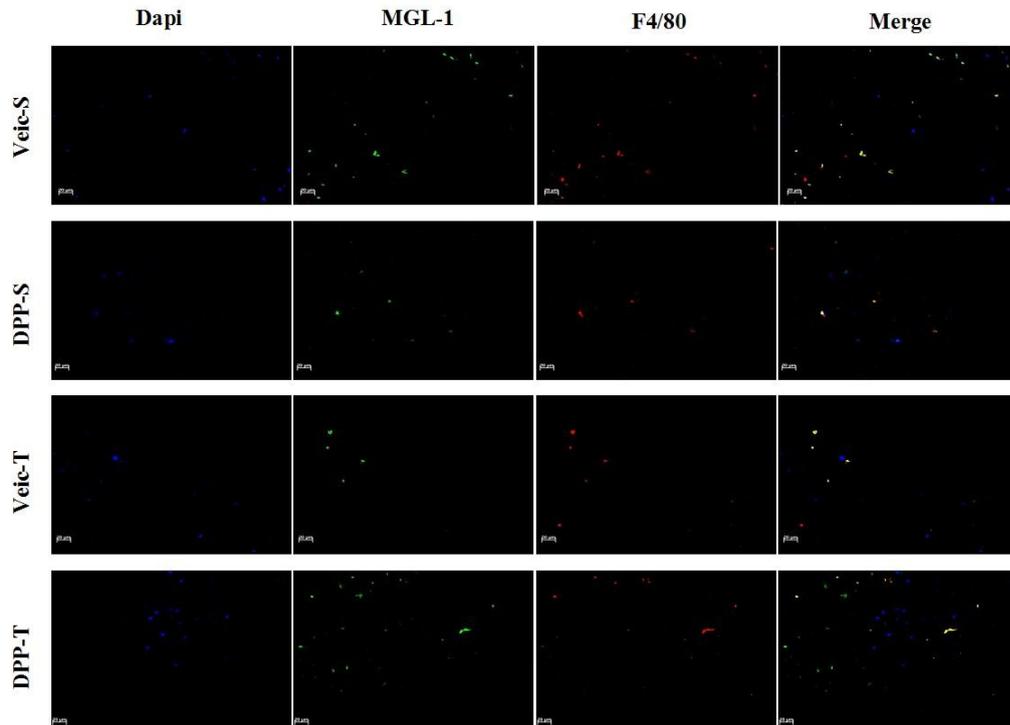


Figura 39: Expressão das proteínas UCP-1 no Tecido Adiposo Marrom. Blots representativos demonstram no tecido adiposo marrom a UCP-1. Expressão da proteína total. $P < 0,05$ $a \neq b$. Os dados estão apresentados em \pm EPM de 4 animais por grupo. *Anova Two-way*; Teste Newman-Keuls. Veic: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina; DPP-S: animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4

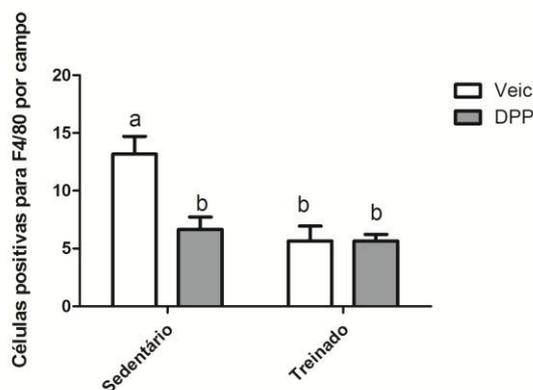
Para determinarmos a infiltração de macrófagos no tecido adiposo marrom, examinamos as imagens de imunofluorescência utilizando a marcação F4/80 (marcador de macrófagos) ao final do experimento, e constatamos a diminuição dessa marcação para os animais treinados e também para os tratados com inibidor de DPP-4 (Figura 40-A). Podemos dizer desse modo que os animais treinados e tratados com inibidor de DPP-4 possuem menor quantidade total de macrófagos no tecido adiposo marrom do que os animais Veic-S.

A mesma técnica foi utilizada para determinar o número de macrófagos M2, usamos para esse fim a co-marcação de F4/80 (vermelho) para macrófagos e MGL-1 (verde) para macrófagos M2. Os resultados mostraram que somente o exercício físico foi eficiente em aumentar a razão M2/total de macrófagos no tecido adiposo marrom (Figura 40C).

A



B



C

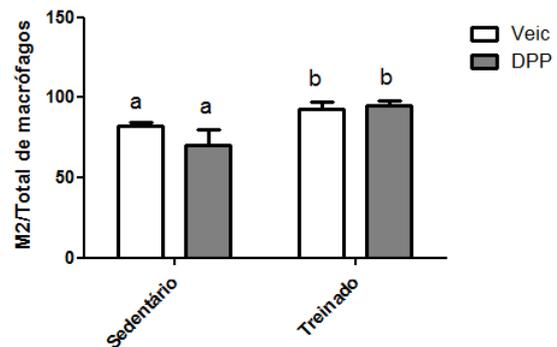


Figura 40: Caracterização da infiltração e polarização de macrófagos. Microfotografias representativas de marcação F4/80 acompanhadas de quantificações de células positivas para F4/80 (vermelho) e MGL-1 (verde) em tecido adiposo marrom dos grupos Veic-S, DPP-S, Veic-T e DPP-T ao final do experimento. Os dados estão apresentados em \pm EPM de 3 a 6 animais por grupo. * $P < 0.05$ vs. Veic-S. ANOVA; Teste de Bonferroni. Veic-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e foi mantido sedentário; DPP-S animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4 e foi mantido sedentário;

Veic-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica, recebeu solução salina e treinado; DPP-T animais alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica recebeu inibidor de DPP-4 e treinado.

5. Discussão

Para o tratamento da DM2, inicialmente preconiza-se mudança no estilo de vida, exercício físico e alimentação balanceada (principalmente redução do consumo de carboidratos simples). Porém, muitas vezes essas medidas não são suficientes para controlar a glicemia (48). Sendo assim, o tratamento medicamentoso é necessário. Há diversas classes de medicamentos para o tratamento do DM2, dentre elas temos as sulfoniluréias, que aumentam a secreção de insulina e os inibidores de alfa glucosidade, diminuem a velocidade de absorção dos carboidratos, resultando em uma diminuição da glicemia após as refeições. Na classe dos sensibilizadores, temos a metformina, que aumenta a sensibilidade periférica à insulina e reduz a neoglicogênese pelo fígado. As tiazolidinedionas, estimulam a diferenciação de adipócitos e reduzem a circulação de citocinas inflamatórias. Temos também os inibidores da SGLT2, provocam aumento da glicosúria e conseqüentemente redução na glicemia (49)

Uma classe de medicamentos mais recentes e que tem se destacado são os inibidores de DPP-4 e os análogos de GLP-1, pois dentre os medicamentos são os que possuem menor incidência de eventos hipoglicemiantes e possuem boa aderência por parte dos pacientes, com raros efeitos colaterais. Essas drogas aumentam os níveis de GLP-1, acarretando aumento da síntese e secreção de insulina, além da redução do glucagon (50). Entretanto, é possível que essas drogas induzam também outros efeitos benéficos ainda não investigados.

No presente estudo, avaliamos o efeito do exercício físico e dos incretinomiméticos, isolados ou associados, na RI, na infiltração de macrófagos no TAB e TAM e o fenômeno inflamatório subclínico em ratos da linhagem Wistar alimentados com dieta hiperlipídica.

Inicialmente foi realizado uma caracterização dos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas. A comparação desses animais com os animais que foram

alimentados com dieta padrão para roedores, mostram que os animais em dieta hiperlipídica possuem maior peso corporal, menor sensibilidade à insulina, níveis elevados de citocinas inflamatórias circulantes bem como maior inflamação do tecido adiposo branco e menor sensibilidade à insulina nesse mesmo tecido, caracterizando o modelo como adequado aos nossos objetivos.

Nossos resultados mostram que o tratamento com análogo do GLP-1 foi eficiente em diminuir o peso corporal e a ingestão alimentar de ratos alimentados com DH, em concordância com a literatura, tanto em modelos experimentais como em humanos (51-56).

O mecanismo pelo qual a diminuição da ingestão alimentar ocorre nos animais que receberam o análogo de GLP-1 já é descrito. Basicamente existe atuação do análogo de GLP-1 tanto no hipotálamo quanto nas vias vagais, levando a um quadro de anorexia (57, 58).

Outra possível explicação para a diminuição do peso corporal e melhora metabólica é o aumento da atividade do TAM, que está diretamente ligado ao aumento da atividade da proteína UCP-1 encontrado no presente estudo, acarretando maior taxa metabólica.

O estudo de Xu e col. mostrou que o tratamento com o exenatide aumentou a atividade da UCP-1 do TAB e esse aumento foi mediado principalmente pela SIRT1 (59).

Outro estudo mostrou o aumento da atividade da UCP-1 no TAM, porém a infusão do análogo de GLP-1 foi realizado via intracerebroventricular (60). Lockie e col. demonstraram que a administração aguda de GLP-1 aumentou a temperatura do TAM e diminuiu a ingestão alimentar na janela de 24 h. Esses autores afirmam ainda que a termogênese do TAM é um dos mecanismos utilizados para a manutenção do balanço energético (61).

Por outro lado, o exercício físico não alterou o peso corporal. A literatura é rica em estudos que mostraram melhora na sensibilidade à insulina induzida pelo exercício físico agudo ou crônico, sem alteração no peso corporal (32, 62-64).

Em acordo com nossos dados Carvalho e col. não encontraram diferença de peso corporal em animais alimentados com dieta palatável e submetidos ao exercício físico

(65). Esses dados também são observados em humanos. Adolescentes classificados com sobrepeso ou obesidade que foram submetidos a diferentes modalidades de treinamento (resistidos, aeróbios ou combinados) não mostraram diferença no peso corporal (66).

Os estudos da literatura que apresentaram alteração no peso corporal, provocados pelo exercício físico, utilizaram diferentes protocolos de exercícios ou até diferentes linhagens de animais. Xu e col. mostraram alteração de peso corporal nos animais treinados, porém utilizaram camundongos e o treinamento físico foi realizado concomitantemente à introdução da dieta hiperlipídica (67). Entretanto, no presente trabalho o exercício físico foi introduzido após 12 semanas de dieta hiperlipídica, portanto já com um quadro de obesidade instalado.

Apesar de não termos encontrado diferença no peso corporal para os animais treinados, verificamos que o peso do TAB foi menor nesses animais e nos animais tratados com o análogo de GLP-1. Uma menor área do adipócito também foi encontrada nos respectivos grupos e isso é de grande importância, pois em indivíduos obesos com grande aumento do tamanho do adipócito, a infiltração de macrófagos M1 é aumentada e o aumento do adipócito também pode ser relacionado com a resistência à insulina (20, 68).

Corroborando nossos dados Zhu e col. mostraram que o análogo de GLP-1 foi eficiente em diminuir a área do adipócito tanto no tecido adiposo epididimal quanto no tecido adiposo perirrenal (56).

A diminuição do tecido adiposo visceral é de grande importância, pois diversos estudos demonstram que a centralização do tecido adiposo nessa região, tem papel importante na indução da resistência à insulina. Isso se deve ao fato de que o tecido adiposo visceral secreta maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias do que o tecido adiposo da região subcutânea (69). Mudanças no estilo de vida pode levar a um decréscimo nesses depósitos viscerais, melhorando a resistência à insulina (70, 71).

Já o tratamento com inibidor de DPP-4 não mostrou influência sobre o peso corporal ou sobre o depósito do tecido adiposo epididimal, traduzindo bem o que ocorre em humanos, como demonstrado recentemente em uma metanálise (72). Ainda, segundo a mesma metanálise, apesar de não haver mudança no peso corporal o inibidor

de DPP-4 apresenta boa eficácia sobre o controle glicêmico e o mesmo foi observado por nosso estudo.

O efeito clássico, dos medicamentos incretinomiméticos é aumentar a secreção de insulina dependente de glicose. Entretanto, em estudos posteriores foram constatados novos efeitos, como diminuição da secreção de glucagon, aumento da sensibilidade periférica à insulina, entre outros. Esses efeitos vem sendo demonstrado por diferentes estudos tanto em modelo experimental quanto na prática clínica (73-77).

Assim como os medicamentos incretinomiméticos o exercício físico também demonstrou benefícios na sensibilidade à insulina, melhorando a tolerância à glicose e a tolerância à insulina, e adicionalmente, reduziu os níveis de insulina circulantes em jejum, dados já estabelecidos na literatura (77-79).

A diminuição dos níveis circulantes de insulina encontrada nos animais treinados, merece destaque, pois Pedersen e col. demonstraram que a hiperinsulinemia relacionada à obesidade, pode contribuir para a inflamação do tecido adiposo. A diminuição dos níveis de insulina circulante em ratos obesos, por tratamento com estreptozotocina, diminuiu o teor de macrófagos no TAB, aumentando a fosforilação de Akt estimulada pela insulina e a lipogênese (80).

A melhora na sensibilidade à insulina induzida pelo exercício físico e pelos medicamentos incretinomiméticos, provavelmente é consequência da recuperação da sinalização de insulina, com aumento da fosforilação da proteína AKT no tecido adiposo branco desses animais. É conhecido que a AKT quando estimulada por insulina faz com que o GLUT-4 se transloque para a membrana plasmática promovendo entrada da glicose na célula (81).

Após constatarmos a diminuição do peso corporal e a melhora na sensibilidade à insulina, nos animais tratados com análogo de GLP-1, realizamos um experimento com consumo de alimento pareado, para que fosse descartada a possibilidade de que o incremento da sensibilidade à insulina fosse devido unicamente a perda de peso corporal.

Os resultados desse experimento mostraram que apesar de não existir diferença de peso corporal entre os grupos, a diferença na sensibilidade à insulina persistiu, também em conformidade com a literatura (32, 63).

É fato bem estabelecido que na obesidade há um aumento na secreção das citocinas inflamatórias (68). As citocinas inflamatórias e os sinais quimiotáticos, como o MCP1, secretados pelos adipócitos hipertrofiados, recrutam monócitos circulantes, os quais infiltram o tecido adiposo (5). Os monócitos ao se infiltrarem no tecido adiposo disfuncional, tornam-se macrófagos M1, que reforçam a produção das citocinas inflamatórias.

Já os macrófagos M2 presentes no tecido adiposo, quando inseridos em um ambiente inflamatório podem se polarizar para o perfil M1, causando um desequilíbrio na razão de macrófagos M1/M2, que por sua vez está diretamente ligada com o aumento da resistência à insulina (20).

O bloqueio de vias de sinalização inflamatória ou infiltração de células imunes no tecido adiposo melhora a sensibilidade à insulina (82). Algumas drogas tem sido usadas para reduzir a quimiotaxia de macrófagos para o TAB, acarretando melhora na sensibilidade à insulina (83).

As drogas incretinomiméticas, foram capazes de diminuir as citocinas inflamatórias circulantes, assim como promover a diminuição da ativação da JNK e da IKK no tecido adiposo branco.

Segundo Hotamisligil e colaboradores a ativação da JNK e da IKK é um dos principais mecanismos que desencadeia a resistência à insulina (84). Portanto a melhora encontrada na sensibilidade à insulina nesse estudo pode estar diretamente ligada a diminuição da inflamação.

Corroborando nossos dados, vários estudos apontam que tanto o tratamento com análogo de GLP-1 (85), inibidor de DPP-4 (86) quanto o exercício físico tem propriedades anti-inflamatórias (87). Porém nenhum estudo conjugou o tratamento medicamentoso e o exercício físico para verificar os níveis de melhora nos aspectos inflamatórios e conseqüentemente na sensibilidade à insulina.

Estudo com ilhotas pancreáticas humanas mostrou que o tratamento com exenatide, um agonista do GLP-1, não apenas diminuiu mediadores inflamatórios, mas também regulou o recrutamento de células do sistema imune, protegendo dessa forma as ilhotas pancreáticas (88). Em nosso estudo, verificamos que o aumento de GLP-1 circulante diminui a inflamação no tecido adiposo.

O tecido adiposo de indivíduos obesos possuem maior número de macrófagos M1 do que em indivíduos magros e isso está relacionado ao desenvolvimento da resistência à insulina, verificamos que o aumento da disponibilidade de GLP-1 e o exercício físico foi eficiente em diminuir o número de macrófagos M1, tanto no tecido adiposo branco quanto no tecido adiposo marrom, o que pode contribuir para a melhora da sensibilidade à insulina encontrada nesses grupos.

O exercício físico também foi capaz de aumentar os macrófagos M2 tanto no tecido adiposo branco quanto no tecido adiposo marrom. Isso é de extrema relevância, pois esse perfil de células imunes tem a capacidade de secretar citocinas anti-inflamatórias. O aumento dos macrófagos M2 está ligado ainda a melhora da sinalização à insulina e a diminuição da inflamação do TAB (20).

Os macrófagos de ativação alternativa tem um importante papel também na termogênese. Em ambientes frios, os macrófagos M2 liberam catecolaminas no tecido adiposo branco para que haja liberação de lipídios, os quais servirão de combustível para o tecido adiposo marrom produzir calor. Os macrófagos anti-inflamatórios residentes no tecido adiposo marrom também secretam catecolaminas para reforçar e manter a termogênese (23).

Corroborando nossos dados Kawanishi e col. utilizando protocolo de exercício crônico em animais alimentados com DH, também constataram o papel do exercício físico em coordenar a resposta inflamatória, demonstrando diminuição do número de macrófagos M1 e maior número de macrófagos M2 em animais treinados (89). No nosso grupo, Oliveira e col. demonstraram que o exercício físico agudo em animais obesos é capaz de levar a um aumento de macrófagos M2 no tecido adiposo branco (32).

Segundo uma recente revisão da literatura tanto medicamentos inibidores de DPP-4 quanto análogo de GLP-1 tem um importante papel na diminuição da aterosclerose e

esse efeito é atribuído principalmente a capacidade desses medicamentos de diminuir a inflamação e o número de macrófagos (90).

Em resumo, os medicamentos incretinomiméticos e o exercício físico foram eficientes em diminuir os depósitos do tecido adiposo na região visceral, o tamanho dos adipócitos tanto no TAB quanto no TAM, melhoraram a sensibilidade à insulina, aumentaram a fosforilação da AKT, taxa metabólica, atividade do TAM, diminuíram a inflamação e reduziram o número de macrófagos no TAB e TAM.

O exercício físico por sua vez, ainda diminuiu a quantidade de insulina sérica e aumentou o número de macrófagos M2 tanto no TAB quanto no TAM. Não houve efeito aditivo, sugerindo que tanto o exercício físico quanto os medicamentos incretinomiméticos podem ter ações similares na diminuição da infiltração de macrófagos no TAB e na melhora da sensibilidade à insulina.

O tratamento não medicamentoso com exercício físico para indivíduos portadores de DM2 e não diabéticos deve ser encorajado, pois o exercício acarreta diversas alterações metabólicas e não metabólicas benéficas, que vão além das melhoras alcançadas por medicamentos; como exemplo vemos melhora da aptidão cardiorrespiratória, aumento da massa magra, aumenta a expectativa de vida, melhora na saúde mental, melhora a qualidade do sono, diminui o risco de doenças coronarianas, hipertensão, osteoporose e alguns tipos de cânceres.

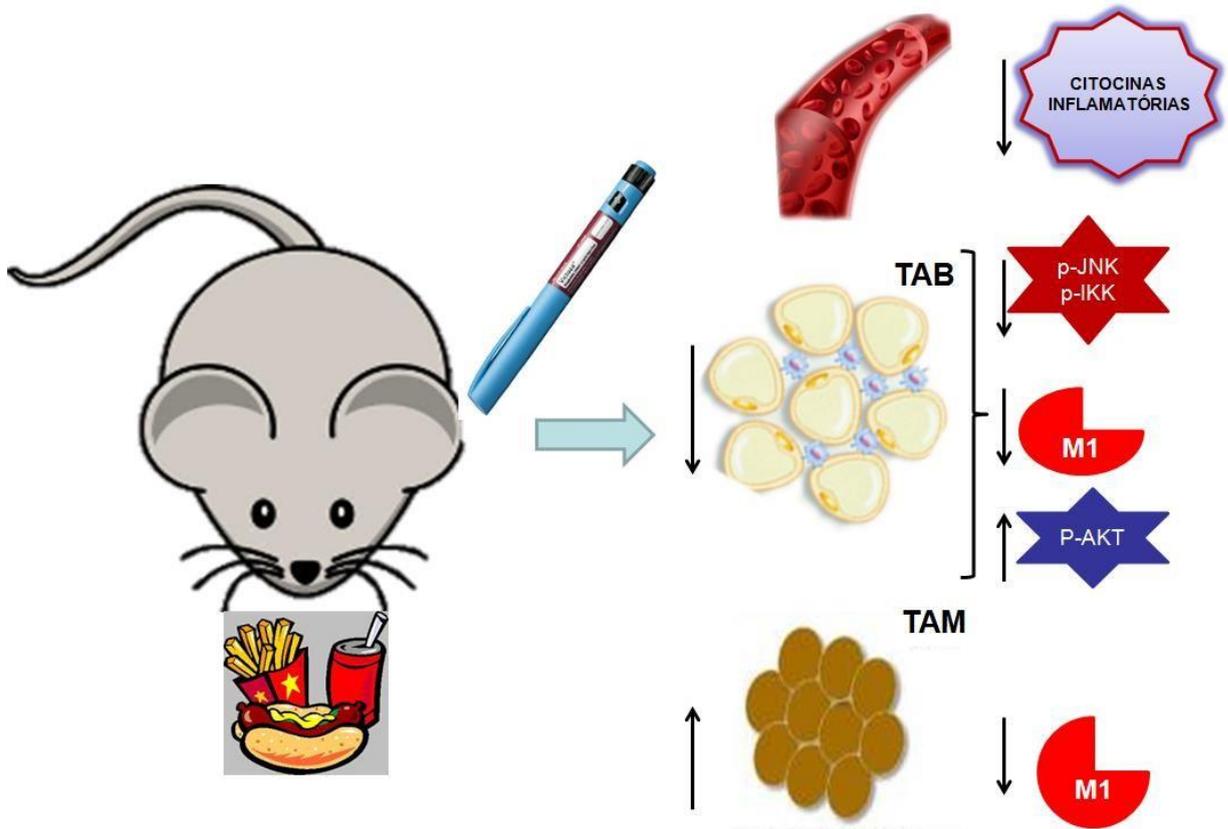


Figura 41: Esquema dos resultados dos efeitos do análogo de GLP-1: Diminuição das citocinas inflamatórias circulantes, redução do TAB, diminuição da fosforilação da JNK e IKK, diminuição dos macrófagos e aumento da fosforilação da AKT do TAB, aumento da atividade da proteína UCP-1 do TAM e diminuição da infiltração de macrófagos no mesmo tecido.

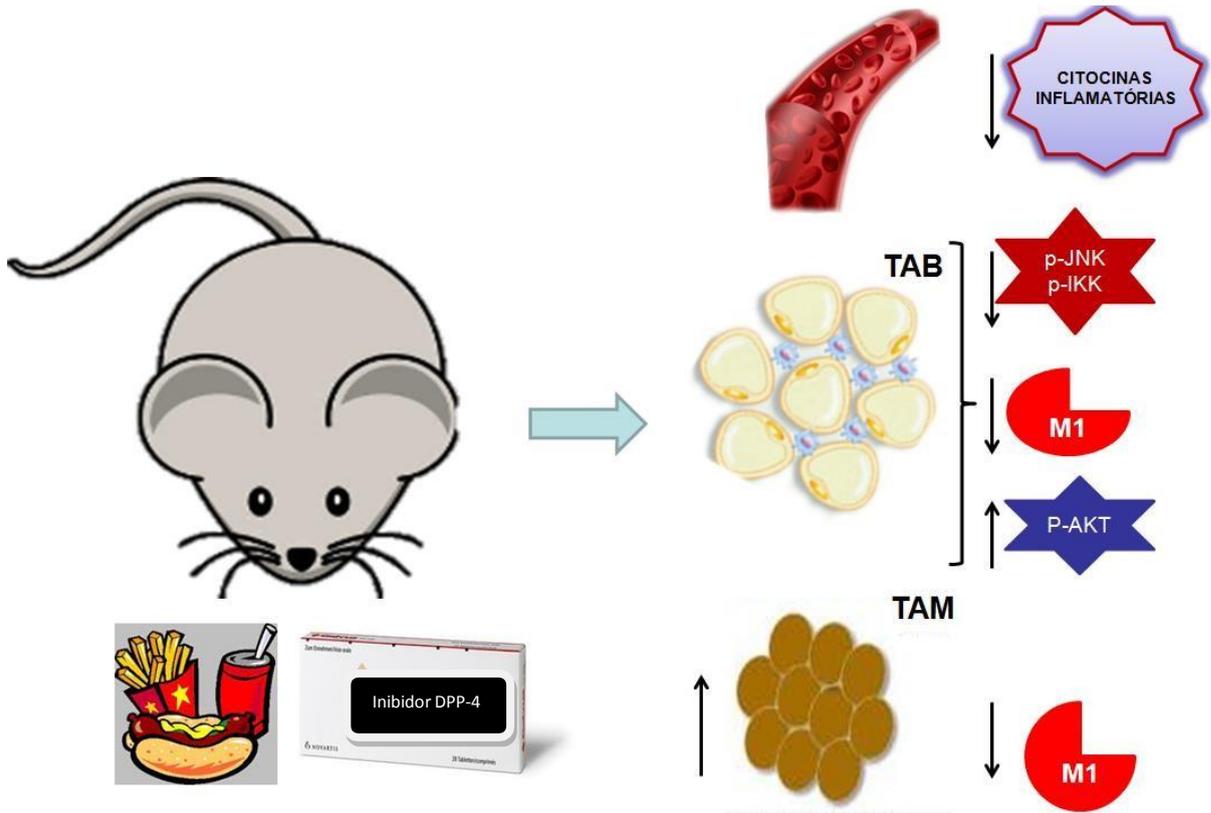


Figura 42: Esquema dos resultados dos efeitos do inibidor do DPP-4: Diminuição das citocinas inflamatórias circulantes, diminuição da fosforilação da JNK e IKK, diminuição dos macrófagos e aumento da fosforilação da AKT no TAB, aumento da atividade da proteína UCP-1 do TAM e diminuição da infiltração de macrófagos no mesmo tecido.

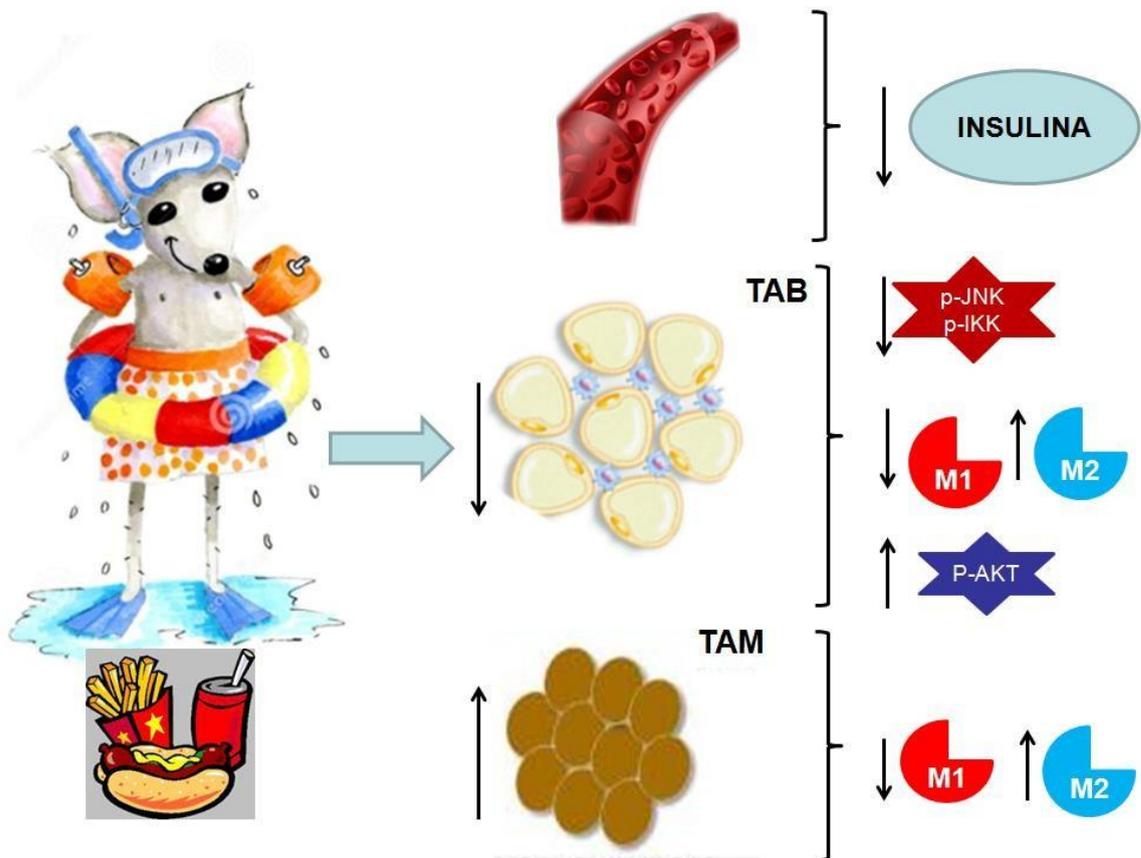


Figura 43: Esquema dos resultados dos efeitos do exercício físico: Diminuição da insulina sérica, redução do TAB, diminuição da fosforilação da JNK e IKK, diminuição dos macrófagos, aumento dos macrófagos M2 e aumento da fosforilação da AKT do TAB, aumento da atividade da proteína UCP-1 do TAM e diminuição da infiltração de macrófagos e aumento dos macrófagos M2 no mesmo tecido.

6.REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization . Obesity and overweight 2016.
2. NCD-RisC NRFC. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *Lancet*. 2016;387(10026):1377-96.
3. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1111-9.
4. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1785-8.
5. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821-30.
6. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. . 2002.
7. IDF. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. edition S, editor. Brussels, Belgium 2015.
8. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004;92(3):347-55.
9. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(8):327-32.
10. Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep*. 2009;9(1):26-32.
11. Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*. 1998;41(10):1241-8.
12. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(4):473-81.
13. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7(8):941-6.
14. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(3):813-23.

15. Suganami T, Mieda T, Itoh M, Shimoda Y, Kamei Y, Ogawa Y. Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(1):45-9.
16. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003;73(2):209-12.
17. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-808.
18. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation.* 2003;107(3):363-9.
19. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453-61.
20. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175-84.
21. 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.* 2004;25(12):677-86.
22. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35.
23. Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature.* 2011;480(7375):104-8.
24. Himms-Hagen J. Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity. *Can J Physiol Pharmacol.* 1989;67(4):394-401.
25. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359.
26. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1509-17.
27. Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(2):143-9.
28. Hofmann T, Elbelt U, Stengel A. Irisin as a muscle-derived hormone stimulating thermogenesis--a critical update. *Peptides.* 2014;54:89-100.

29. Virtanen KA. BAT thermogenesis: Linking shivering to exercise. *Cell Metab.* 2014;19(3):352-4.
30. Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, Ropelle ER, Pauli JR, Bagarolli RA, et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes.* 2011;60(3):784-96.
31. Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, de Souza CT, Picardi PK, Faria MC, et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol.* 2006;577(Pt 3):997-1007.
32. Oliveira AG, Araujo TG, Carvalho BM, Guadagnini D, Rocha GZ, Bagarolli RA, et al. Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21(12):2545-56.
33. Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I, et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell.* 2014;157(6):1279-91.
34. Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, Cui X, Tian X, Locksley RM, et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell.* 2014;157(6):1292-308.
35. Elrick h, stimmler l, hlad cj, arai y. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1964;24:1076-82.
36. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. Intestinal factors in the control of insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1965;25(10):1317-24.
37. Dupré J, Beck JC. Stimulation of release of insulin by an extract of intestinal mucosa. *Diabetes.* 1966;15(8):555-9.
38. Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature.* 2001;414(6865):821-7.
39. Ritzel R, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA. Pharmacokinetic, insulinotropic, and glucagonostatic properties of GLP-1 [7-36 amide] after subcutaneous injection in healthy volunteers. Dose-response-relationships. *Diabetologia.* 1995;38(6):720-5.
40. Lugari R, Dell'Anna C, Ugolotti D, Dei Cas A, Barilli AL, Zandomenighi R, et al. Effect of nutrient ingestion on glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) secretion in human type 1 and type 2 diabetes. *Horm Metab Res.* 2000;32(10):424-8.

41. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet*. 2002;359(9309):824-30.
42. Lee YS, Park MS, Choung JS, Kim SS, Oh HH, Choi CS, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 2012;55(9):2456-68.
43. Nagashima M, Watanabe T, Terasaki M, Tomoyasu M, Nohtomi K, Kim-Kaneyama J, et al. Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia*. 2011;54(10):2649-59.
44. Ben-Shlomo S, Shlomo SB, Zvibel I, Rabinowich L, Goldiner I, Shlomai A, et al. Dipeptidyl peptidase 4-deficient rats have improved bile secretory function in high fat diet-induced steatosis. *Dig Dis Sci*. 2013;58(1):172-8.
45. Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CR, Carvalheira JB, Peres SB, Reis MA, et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol*. 2002;147(1):149-57.
46. Challa TD, Beaton N, Arnold M, Rudofsky G, Langhans W, Wolfrum C. Regulation of adipocyte formation by GLP-1/GLP-1R signaling. *J Biol Chem*. 2012;287(9):6421-30.
47. Akarte AS, Srinivasan BP, Gandhi S. A novel long acting DPP-IV inhibitor PKF-275-055 stimulates β -cell proliferation resulting in improved glucose homeostasis in diabetic rats. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(2):241-52.
48. Garber AJ, Abrahamson MJ, Barzilay JI, Blonde L, Bloomgarden ZT, Bush MA, et al. Consensus statement by the american association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology on the comprehensive type 2 diabetes management algorithm - 2017 executive summary. *Endocr Pract*. 2017.
49. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*. 2005;54(12):3427-34.
50. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006;368(9548):1696-705.

51. Reiner DJ, Mietlicki-Baase EG, McGrath LE, Zimmer DJ, Bence KK, Sousa GL, et al. Astrocytes Regulate GLP-1 Receptor-Mediated Effects on Energy Balance. *J Neurosci*. 2016;36(12):3531-40.
52. Decara J, Arrabal S, Beiroa D, Rivera P, Vargas A, Serrano A, et al. Antiobesity efficacy of GLP-1 receptor agonist liraglutide is associated with peripheral tissue-specific modulation of lipid metabolic regulators. *Biofactors*. 2016.
53. Hoang V, Bi J, Mohankumar SM, Vyas AK. Liraglutide improves hypertension and metabolic perturbation in a rat model of polycystic ovarian syndrome. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126119.
54. Rizzo M, Rizvi AA, Patti AM, Nikolic D, Giglio RV, Castellino G, et al. Liraglutide improves metabolic parameters and carotid intima-media thickness in diabetic patients with the metabolic syndrome: an 18-month prospective study. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15(1):162.
55. Burmeister MA, Ayala JE, Smouse H, Landivar-Rocha A, Brown JD, Drucker DJ, et al. "The Hypothalamic Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Receptor (GLP-1R) is Sufficient but Not Necessary for the Regulation of Energy Balance and Glucose Homeostasis in Mice". *Diabetes*. 2016.
56. Zhu E, Yang Y, Zhang J, Li Y, Li C, Chen L, et al. Liraglutide suppresses obesity and induces brown fat-like phenotype via Soluble Guanylyl Cyclase mediated pathway in vivo and in vitro. *Oncotarget*. 2016.
57. Kanoski SE, Fortin SM, Arnold M, Grill HJ, Hayes MR. Peripheral and central GLP-1 receptor populations mediate the anorectic effects of peripherally administered GLP-1 receptor agonists, liraglutide and exendin-4. *Endocrinology*. 2011;152(8):3103-12.
58. Secher A, Jelsing J, Baquero AF, Hecksher-Sørensen J, Cowley MA, Dalbøge LS, et al. The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4473-88.
59. Xu F, Lin B, Zheng X, Chen Z, Cao H, Xu H, et al. GLP-1 receptor agonist promotes brown remodelling in mouse white adipose tissue through SIRT1. *Diabetologia*. 2016;59(5):1059-69.
60. Kooijman S, Wang Y, Parlevliet ET, Boon MR, Edelschaap D, Snaterse G, et al. Central GLP-1 receptor signalling accelerates plasma clearance of triacylglycerol and glucose by activating brown adipose tissue in mice. *Diabetologia*. 2015;58(11):2637-46.

61. Lockie SH, Heppner KM, Chaudhary N, Chabenne JR, Morgan DA, Veyrat-Durebex C, et al. Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes*. 2012;61(11):2753-62.
62. Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJ, de Pinho RA, Velloso LA, et al. Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats. *J Physiol*. 2009;587(Pt 9):2069-76.
63. Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva AS, Bertoli FC, et al. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *J Cell Physiol*. 2012;227(7):2917-26.
64. de Moura LP, Souza Pauli LS, Cintra DE, de Souza CT, da Silva AS, Marinho R, et al. Acute exercise decreases PTP-1B protein level and improves insulin signaling in the liver of old rats. *Immun Ageing*. 2013;10(1):8.
65. Carvalho de Lima D, Guimarães JB, Rodovalho GV, Silveira SA, Haibara AS, Coimbra CC. Exercise training starting at weaning age preserves cardiac pacemaker function in adulthood of diet-induced obese rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2014;39(8):888-94.
66. Alberga AS, Prud'homme D, Sigal RJ, Goldfield GS, Hadjiyannakis S, Gougeon R, et al. Does exercise training affect resting metabolic rate in adolescents with obesity? *Appl Physiol Nutr Metab*. 2016:1-8.
67. Xu X, Ying Z, Cai M, Xu Z, Li Y, Jiang SY, et al. 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*. 2011;300(5):R1115-25.
68. Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renström F, Ruge T, Eriksson JW. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia*. 2007;50(3):625-33.
69. Hocking SL, Wu LE, Guilhaus M, Chisholm DJ, James DE. Intrinsic depot-specific differences in the secretome of adipose tissue, preadipocytes, and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells. *Diabetes*. 2010;59(12):3008-16.
70. Boyer M, Lévesque V, Poirier P, Marette A, Mathieu P, Després JP, et al. Impact of a 1-year lifestyle modification program on plasma lipoprotein and PCSK9 concentrations in patients with coronary artery disease. *J Clin Lipidol*. 2016;10(6):1353-61.

71. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(9):607-15.
72. Cai X, Gao X, Yang W, Chen Y, Zhou L, Zhang S, et al. DPP-4 Inhibitor Treatment in Chinese Type 2 Diabetes Patients: A Meta-Analysis. *Diabetes Technol Ther.* 2016.
73. Saunders WB, Nguyen H, Kalsekar I. Real-world glycemic outcomes in patients with type 2 diabetes initiating exenatide once weekly and liraglutide once daily: a retrospective cohort study. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2016;9:217-23.
74. Divino V, DeKoven M, Hallinan S, Varol N, Wirta SB, Lee WC, et al. Glucagon-like Peptide-1 receptor agonist treatment patterns among type 2 diabetes patients in six European countries. *Diabetes Ther.* 2014;5(2):499-520.
75. Bergenstal RM, Wysham C, Macconell L, Malloy J, Walsh B, Yan P, et al. Efficacy and safety of exenatide once weekly versus sitagliptin or pioglitazone as an adjunct to metformin for treatment of type 2 diabetes (DURATION-2): a randomised trial. *Lancet.* 2010;376(9739):431-9.
76. Chai W, Fu Z, Aylor KW, Barrett EJ, Liu Z. Liraglutide prevents microvascular insulin resistance and preserves muscle capillary density in high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311(3):E640-8.
77. Yamazaki S, Satoh H, Watanabe T. Liraglutide enhances insulin sensitivity by activating AMP-activated protein kinase in male Wistar rats. *Endocrinology.* 2014;155(9):3288-301.
78. Chen CH, Huang TH, Cheng TL, Chang CF, Wang CZ, Wu MH, et al. Exercise training ameliorates glucosamine-induced insulin resistance in ovariectomized rats. *Menopause.* 2016.
79. Horii N, Sato K, Mesaki N, Iemitsu M. Increased Muscular 5 α -Dihydrotestosterone in Response to Resistance Training Relates to Skeletal Muscle Mass and Glucose Metabolism in Type 2 Diabetic Rats. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165689.
80. Pedersen DJ, Guilherme A, Danai LV, Heyda L, Matevossian A, Cohen J, et al. A major role of insulin in promoting obesity-associated adipose tissue inflammation. *Mol Metab.* 2015;4(7):507-18.
81. Kupriyanova TA, Kandror KV. Akt-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. *J Biol Chem.* 1999;274(3):1458-64.

82. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med.* 2009;15(8):921-9.
83. Sullivan TJ, Miao Z, Zhao BN, Ertl LS, Wang Y, Krasinski A, et al. Experimental evidence for the use of CCR2 antagonists in the treatment of type 2 diabetes. *Metabolism.* 2013;62(11):1623-32.
84. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-7.
85. Lee YS, Jun HS. Anti-Inflammatory Effects of GLP-1-Based Therapies beyond Glucose Control. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:3094642.
86. Dobrian AD, Ma Q, Lindsay JW, Leone KA, Ma K, Coben J, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300(2):E410-21.
87. Thyfault JP, Wright DC. "Weighing" the effects of exercise and intrinsic aerobic capacity: are there beneficial effects independent of changes in weight? *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016;41(9):911-6.
88. Cechin SR, Pérez-Álvarez I, Fenjves E, Molano RD, Pileggi A, Berggren PO, et al. Anti-inflammatory properties of exenatide in human pancreatic islets. *Cell Transplant.* 2012;21(4):633-48.
89. 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.* 2010;16:105-18.
90. Hirano T, Mori Y. Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of glucagon-like peptide-1, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in experimental animals. *J Diabetes Investig.* 2016;7 Suppl 1:80-6.

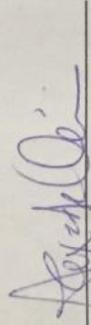
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

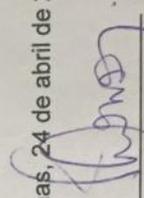
Certificamos que o projeto "RESISTÊNCIA À INSULINA E POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS, EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO TRATAMENTO COM ANÁLOGO DE GLP-1 OU INIBIDOR DPP-IV" (protocolo nº 3317-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad / Ana Carolina Ghezzi, está de acordo com os Princípios 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.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 24 de abril de 2014.



Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

Campinas, 24 de abril de 2014.