UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM

MARIANA AGUIAR DE MATOS

EFEITOS DE UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO EM COMPONENTES CELULARES E MOLECULARES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA A INSULINA EM INDIVÍDUOS OBESOS

DIAMANTINA - MG

2012

MARIANA AGUIAR DE MATOS

EFEITOS DE UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO EM COMPONENTES CELULARES E MOLECULARES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA A INSULINA EM INDIVÍDUOS OBESOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, na área de Ciências Fisiológicas II, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Trigueiro Amorim, UFVJM

Co-orientadores: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra, UFMG

Prof[a]. Dr[a]. Etel Rocha Vieira, UFVJM

DIAMANTINA - MG

2012

EFEITOS DE UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO EM COMPONENTES CELULARES E MOLECULARES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA A INSULINA EM INDIVÍDUOS OBESOS

Mariana Aguiar de Matos

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, na área de Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 17/08/2012

Prof. Cândido Celso Coimbra- UFMG
Co-Orientador

Prof.ª Etel Rocha Vieira- UFVJM
Co-Orientadora

Prof.ª Danusa Dias Soares- UFMG

Prof. Sérgio Henrique Sousa Santos- UFMG

Prof. Fabiano Trigueiro Amorim- UFVJM
Presidente

DIAMANTINA
2012

AGRADECIMENTOS

A minha mãe por todo cuidado e suporte durante mais essa etapa da minha vida.

A minhas irmãs, meu pai e demais familiares pelo apoio constante.

Ao professor Dr. Fabiano Trigueiro Amorim pela orientação, confiança e auxílio na minha formação acadêmica. Pela audácia, tranquilidade e otimismo durante toda a execução do projeto.

A professora Dr[a]. Etel Rocha Vieira pela orientação, incentivo, ensinamentos e bons momentos de convivência.

Ao aluno *post-doc* Flávio de Castro Magalhães pelas correções, sugestões e realização do procedimento de *western blot*.

Ao professor Dr. Cândido Celso Coimbra pela acolhida em seu laboratório durante a realização das disciplinas.

A todos do grupo de pesquisa Bioex pelos momentos de discussão e crescimento.

Aos alunos de iniciação científica, Vinícius, Tamiris, Pâmela e Karine pelo auxílio em cada etapa da execução desse projeto. Vocês fizeram possível a realização desse estudo!

Aos alunos de graduação que voluntariamente auxiliaram nas coletas: Herivelton, Jonathan e Jennifer.

Ao professor Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo pela realização dos experimentos no laboratório de imunologia e disposição para ajudar.

A professora Dr[a]. Ana Cristina Rodrigues Lacerda por ter me apresentado o mundo da pesquisa.

Aos colegas dos laboratórios de imunologia (Labimuno) e fisiologia do exercício (Lafiex) pelos momentos de convivência e aprendizado.

A todos os colegas e professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelo apoio e amizade.

Ao Dr. Miguel Corrêa Ponte Neves pela realização do procedimento de biópsia muscular.

A Dr[a].Cheyenne Alves Fonseca pela realização da eletrocardiografia durante os testes de esforço físico.

A Santa Casa de Caridade de Diamantina pelo espaço cedido para a realização das coletas.

Ao professor Dr. Valmor Tricoli (USP) por permitir o aprendizado do procedimento de biópsia muscular em seu laboratório.

Aos voluntários da pesquisa, que mesmo com todo complexidade das coletas estavam sempre dispostos a colaborar.

As agências de fomento FAPEMIG (CDS APQ-01621-10), CNPq (477154/2011-5) e CAPES (PNPD - 2455/2011) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A maior quantidade de ácidos graxos livres e de citocinas pró-inflamatórias plasmática presentes na obesidade**,** podem desencadear a resistência a insulina, dentre outros fatores, pela fosforilação inibitória do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), via ativação de quinases relacionadas ao estresse, como a quinase C-jun N-terminal (JNK). Em obesos, a resistência a insulina correlaciona-se com alterações do sistema imune, e com a baixa expressão da proteína de choque térmico de 72kDa (Hsp72) e aumento da ativação da JNK no músculo esquelético. Considerando que o exercício físico aeróbico promove melhora da sensibilidade a insulina e tem um efeito anti-inflamatório. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de uma sessão de exercício físico aeróbico na expressão da HSP70, ativação da JNK e fosforilação do IRS-1 no resíduo de serina 612 (IRS-1 ser^{612}) no músculo esquelético de obesos. Além disso, foi avaliada a frequência dos linfócitos T auxiliares ($CD4^{+}$) e citolíticos ($CD8^{+}$) e das subpopulações de monócitos clássicos ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediários ($CD14^{++}CD16^{+}$) e não clássicos ($CD14^{+}CD16^{++}$). Os participantes do estudo (n=27) foram alocados em três grupos experimentais (eutróficos sensíveis a insulina, obesos sensíveis a insulina, obesos resistentes a insulina) de acordo com a classificação do estado nutricional, de acordo com o índice de massa corporal e presença ou não de resistência a insulina, definida pelo modelo de avaliação da homeostase (HOMA1-IR). Amostras de sangue venoso e do músculo vasto lateral foram obtidas antes e após uma sessão de exercício físico aeróbico realizado a 60% do VO_2pico,em cicloergômetro, com duração de 60 minutos. Para avaliar a frequência das diferentes populações de monócitos e linfócitos T circulantes utilizou-se a citometria de fluxo. As análises da expressão da HSP70, ativação da JNK e fosforilação do IRS-1 ser^{612} no músculo esquelético foram feitas pelo procedimento de *western blot*. Nossos resultados demonstraram que obesos resistentes a insulina apresentam uma maior frequência de monócitos intermediários e maior fosforilação do IRS-1 ser^{612} comparado aos eutróficos, maior ativação da JNK e menor expressão da HSP70 em relação aos demais grupos. Após 1 hora do término da sessão de exercício aeróbico houve redução da frequência dos monócitos intermediários ($CD14^{++}CD16^{+}$) e dos linfócitos auxiliares ($TCD4^{+}$) circulantes. Adicionalmente, a sessão de exercício induziu no músculo esquelético maior expressão da HSP70, redução da fosforilação do IRS-1 ser^{612} nos grupos de indivíduos obesos e menor atividade da JNK nos obesos resistentes a insulina. Conclui-se que uma sessão de exercício aeróbico promove alterações que caracterizam redução da inflamação e/ou estresse celular,

que podem contribuir para a modulação da sensibilidade a insulina promovida pelo exercício físico.

Palavras-chave: Obesidade, resistência a insulina, exercício, proteína de choque térmico 72, monócitos.

ABSTRACT

The great amount of free fatty acids and proinflammatory cytokines present in obese individuals may trigger insulin resistance, through the inhibitory phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), via activation of kinases related to stress, such as kinase C-Jun N-terminal (JNK). In obese individuals, insulin resistance correlates with alterations of the immune system and lower expression of the heat shock protein of 72kDa (Hsp72) and increased activation of JNK in skeletal muscle. Considering that aerobic exercise improve insulin sensitivity and has an anti-inflammatory effect, the purpose of this study was to evaluate the effects of a bout of aerobic exercise in the expression of HSP70, activation of JNK and phosphorylation of IRS-1 in serine residue 612 (IRS-1 ser612) in skeletal muscle of obese patients. Furthermore, we assessed the frequency of helper T lymphocytes (CD4 +) and cytolytic (CD8 +) and subpopulations of classical (CD14 + + CD16-), intermediate (CD14 + + CD16 +) and non-classical (CD14 + CD16 + +) monocytes. Study participants (n = 27) were divided into three experimental groups (eutrophic sensitive to insulin, insulin-sensitive obese, insulin-resistant obese) according to the classification of nutritional status, according to the body mass index, and the presence or absence of insulin resistance, defined by the homeostasis assessment model (HOMA1-IR). Venous blood and vastus lateralis samples were obtained before and after a bout of aerobic exercise performed at 60% of VO_2peak on a cycle ergometer, lasting 60 minutes. To assess the frequency of the different populations of monocytes and T lymphocytes circulating we used flow cytometry. Analyses of of HSP70 expression, JNK activation and IRS-1 phosphorylation of ser612 in skeletal muscle were performed by western blot. Our results showed that obese insulin resistant subjects have an increased frequency of intermediate monocytes and higher phosphorylation of IRS-1 ser612 compared to normal weight individuals, and greater activation of JNK and lower expression of HSP70 than the other two groups. 1 hour after the exercise bout, we observed reductions on the frequency of intermediate circulating monocytes (CD14 + + CD16 +) and helper cells (CD4 +). Additionally, the exercise bout induced in the skeletal muscle higher expression of HSP70, decreased phosphorylation of IRS-1 ser612 in the obese groups and lower activity of JNK in the obese insulin resistant individuals. It is concluded that a bout of aerobic exercise promotes changes that characterize reduction of inflammation and / or cellular stress, which may contribute to the modulation of insulin sensitivity promoted by exercise.

Keywords: Obesity, insulin resistance, exercise, heat shock protein 70, monocyte.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Via de sinalização da insulina..... 23
Figura 2- Grupos experimentais de acordo com o IMC e resistência à insulina..... 33
Figura 3- Etapas do estudo..... 36
Figura 4- Procedimento de biópsia do músculo vasto lateral..... 37
Figura 5- Estratégia de análise das subpopulações leucocitárias..... 43
Figura 6-Delimitação dos quadrantes a partir do posicionamento das células marcadas com os controles de isotipo..... 43
Figura 7- Estratégia de análise das subpopulações linfocitárias..... 44
Figura 8- Estratégia para identificação da subpopulação de monócitos..... 45
Figura 9- *Blot* representativo de 1 voluntário de cada grupo (A) e dados da ativação da JNK1/2 (B) nos grupos CTRL, OB e OBR nas situações basal e após exercício agudo... 48
Figura 10- *Blot* representativo de 1 voluntário de cada grupo (A) e dados da fosforilação do p-IRS-1 ser^{612}(B) nos grupos CTRL, OB e OBR nas situações basal e após exercício..... 49
Figura 11- *Blot* representativo de 1 voluntário de cada grupo (A) e quantificação da expressão das proteínas Hsp72/73 (B) nos grupos CTRL, OB e OBR nas situações basal e após exercício..... 50
Figura 12- Correlação entre a ativação da JNK e níveis de insulina (A) e entre a ativação da JNK e expressão da HSP70 (B)..... 50
Figura 13- Percentual de linfócitos T $CD4^+$ (A) e T $CD8^+$ (B) nas situações basal e após exercício... 51
Figura 14- Percentual das subpopulações de monócitos clássicos ($CD14^{++}$ $CD16^-$) (A), intermediários ($CD14^{++}$ $CD16^+$) (B) e não clássico ($CD14^+CD16^{++}$) (C) nas situações basal e após o exercício..... 52
Figura 15- Na obesidade observa-se uma maior quantidade de ácidos graxos livres e citocinas pró-inflamatórias que atuam a nível sistêmico e muscular desencadeando diversas alterações que culminam no desenvolvimento da resistência a insulina..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração do gel SDS-PAGE de acordo com o peso molecular da proteína alvo..... 40

Tabela 2- Relação dos anticorpos utilizados para detecção das proteínas do músculo esquelético..... 41

Tabela 3- Relação dos anticorpos utilizados nos experimentos de citometria de fluxo..... 42

Tabela 4- Dados da caracterização dos voluntários participantes do estudo..... 47

Tabela 5- Correlações das subpopulações de monócitos com variáveis bioquímicas e antropométricas..... 53

Tabela 6- Dados de glicose, insulina e HOMA1-IR na caracterização e no dia após a realização do exercício..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt- proteína quinase B

AS160- substrato da Akt de 160 kD

BGP-15- derivado de hidroxilamina

CAP- proteína associada a Cbl

CSF1- fator estimulador de colônia 1

DLK- quinase contendo zíper de leucina duplo)

DM2- diabetes *mellitus* do tipo 2

ERK-quinase regulada por sinal extracelular

FITC- isotiocianato de fluoresceína

GLUT-4- transportador de glicose 4

HOMA- modelo de avaliação da homeostase

Hsp72- proteína de choque térmico 72

IFN- γ-interferon-gama

IKK- quinase do inibidor do fator nuclear κB

IL- interleucina

IL-1Ra-antagonista do receptor da interleucina-1

IMC- índice de massa corporal

IR- receptor de insulina

IRS-1- substrato receptor de insulina-1

JIP1- proteína que interage com a JNK1

JNK- quinase C-jun N-terminal

LPS- lipopolissacarídeo

MAPK- proteína quinase ativada por mitógeno

MAPKKs- quinases das MAPKs

MCP-1- proteína quimiotática de monócitos1

MIF-1 fator inibitório da migração de macrófagos 1

MKP-1–fosfatase-1 de MAP quinase

MLK- proteínas quinases de linhagem mista

mTOR – proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NF-κB- fator nuclear κB

PCR- proteína C reativa

PDK1-quinase dependente de fosfoinositídeos-1

PIP3–fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

PE- ficoeritrina

PECy5- ficoeritrina-cianina-5

PerCP- proteína clorofila peridinina

PI3K- fosfatidilinositol 3–quinase

PKC- proteína quinase C

PTB- domínio de ligação à fosfotirosina

Rab- proteínas reguladoras do tráfego de vesículas

ROS-espécies reativas de oxigênio

S6K- quinase p70S6

TNF-α- fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 15

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 17

3 JUSTIFICATIVA..... 30

4 OBJETIVOS..... 31

5 MATERIAIS E MÉTODOS..... 32

5.1 Cuidados éticos..... 32

5.2 Amostra..... 32

5.3 Caracterização da amostra..... 34

5.3.1 Parâmetros antropométricos..... 34

5.3.2 Análise do consumo de oxigênio..... 34

5.4 Procedimentos..... 36

5.4.1 Biópsia muscular..... 36

5.4.2 Sessão de exercício aeróbico..... 38

5.4.3Determinação da expressão e fosforilação de proteínas no músculo esquelético..... 39

5.4.3.1 Extratos protéicos..... 39

5.4.3.2 Dosagem de proteínas..... 38

5.4.3.3 Fracionamento eletroforético..... 39

5.4.3.4 Transferência das proteínas e bloqueio..... 40

5.4.3.5 Reação com anticorpos e revelação..... 40

5.4.4 Análise do fenótipo de leucócitos sanguíneos..... 41

5.4.5 Análise estatística..... 45

6 RESULTADOS..... 46

7 DISCUSSÃO..... 54

8 CONCLUSÃO..... 64

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 65

ANEXO A- Versão brasileira do *Veterans Specific Activity Questionnaire* (VSAQ)..... 80

1 INTRODUÇÃO

A resistência a insulina é caracterizada por redução da resposta dos tecidos sensíveis a insulina, em que as concentrações fisiológicas deste hormônio não são suficientes para induzir seus efeitos metabólicos. Uma hiperinsulinemia compensatória seria a primeira fase do distúrbio glicêmico, que pode progredir para o diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) (SCHENK *et al*., 2008; STUMVOLL *et al*., 2005). O mecanismo de desenvolvimento da resistência a insulina induzida pela obesidade não é totalmente compreendido. Sugere-se que a expansão do tecido adiposo, que resulta em maior liberação de ácidos graxos e de adipocinas com ação pró-inflamatória, poderiam estar envolvidos na fisiopatologia da resistência a insulina (OLEFSKY e GLASS, 2010; WISSE, 2004) e que células do sistema imune também participariam desse processo (CANCELOO *et al*., 2005). Entre os mecanismos propostos estão o efeito dos ácidos graxos livres e adipocinas pró-inflamatórias, que ativam vias de sinalização envolvidas na promoção da fosforilação de resíduos de serina, do substrato do receptor de insulina 1(IRS-1), através da ação de quinases, desencadeando a resistência à insulina (SCHENK *et al*., 2008). Algumas quinases que desempenham esse papel incluem a quinase C-jun N-terminal (JNK), a proteína quinase C (PKC) e a quinase do inibidor do fator nuclear κB (IKK) (HOTAMISLIGIL, 2010; SCHENK *et al*., 2008; SCHMITZ-PEIFFER *et al*., 1997).

Existem várias estratégias terapêuticas farmacológicas e não farmacológicas que são utilizados no intuito de se restaurar a sensibilidade a insulina em indivíduos obesos. Interessantemente, alguns estudos têm reportado que a indução, no músculo esquelético, de uma proteína da família de proteínas de choque térmico (HSP), a proteína de choque térmico 72 (Hsp72), atua nesse sentido (CHUNG *et al*., 2008; GUPTE *et al*., 2009). Esses estudos reportaram que a indução dessa proteína pela exposição ao calor, assim como por manipulações genéticas e farmacológicas estariam relacionadas com um aumento da sensibilidade a insulina e menor atividade da JNK e IKK, evidenciando um possível papel da Hsp72 na modulação a sensibilidade a insulina. Um suporte para essa hipótese é o fato de diabéticos e obesos resistentes a insulina apresentarem menor expressão dessa proteína no músculo esquelético (BRUCE *et al*.,2003; CHUNG *et al*., 2008; KURUEZ *et al*., 2002).

Adicionalmente, tem sido estabelecido na literatura que o exercício físico é uma ferramenta eficiente na melhora da sensibilidade a insulina, tanto agudo ou crônico

(GARETTO *et al*., 1984; RICHTER *et al*., 1984), embora não seja totalmente compreendido o mecanismo de seu efeito. Considerando que exercício físico atua sobre células do sistema imune (YATES *et al*., 2008; BALDUCCII *et al*., 2009) e induz a expressão muscular da Hsp72 (LIU *et al*., 1999; THOMPSON *et al*., 2003), poderíamos propor a participação de células do sistema imune e dessa proteína no mecanismo de melhora da sensibilidade a insulina promovida pelo exercício. Apesar dessas evidências, não há na literatura estudos que mostrem se uma sessão de exercício físico em obesos resistentes a insulina modularia a frequência de células do sistema imune e a expressão muscular da Hsp72, assim as quinases envolvidas na inibição da via de sinalização da insulina pela fosforilação de resíduos de serina do IRS-1.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidades: epidemiologia e etiologia

A obesidade, definida como o excesso de gordura corporal, é considerada uma epidemia mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2011), em 2008, 1,5 bilhão de adultos, com 20 anos ou mais, estavam acima do peso (IMC >25 kg/m^2). Destes, mais de 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres foram classificados como obesos (IMC ≥ 30 kg/m^2). As projeções para 2015 são de aproximadamente 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso e 700 milhões com obesidade (OMS, 2011).

De acordo com o monitoramento de fatores de risco e proteção para doenças crônicas não transmissíveis por meio de inquérito telefônico (BRASIL, 2011), o excesso de peso já atinge 48,1% dos brasileiros e a obesidade 15%. De forma mais detalhada, os dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (2008-2009) (IBGE, 2010) mostram que em 2008, o excesso de peso atingiu 33,5% das crianças de cinco a nove anos, sendo que desse total 16,6% dos meninos e 11,8% das meninas estavam obesos. O aumento de peso em adolescentes de 10 a 19 anos foi contínuo nos últimos 34 anos. No gênero masculino o excesso de peso passou de 3,7% para 21,7% e no feminino de 7,6% para 19,0%. Na população de 20 anos ou mais o excesso de peso quase triplicou entre homens, de 18,5% em 1974-75 para 50,1% em 2008-09. Nas mulheres, o aumento foi menor: de 28,7% para 48%. Já a obesidade cresceu mais de quatro vezes entre os homens, de 2,8% para 12,4% e mais de duas vezes entre as mulheres, de 8% para 16,9% (IBGE, 2010).

Embora o aumento na prevalência da obesidade nas últimas décadas não possa ser explicado por mudanças no *pool* genético humano, variáveis genéticas que estavam anteriormente silenciadas poderiam se manifestar. Influências ambientais, juntamente com a susceptibilidade genética, seriam a base do aumento da prevalência da obesidade (WEINSIER *et al.*, 1998). Acredita-se que mudanças no padrão alimentar e no gasto energético estejam entre os principais fatores que contribuem para a etiologia da obesidade. A mudança comportamental, no âmbito do padrão alimentar, inclui o aumento na ingestão de lipídios de origem animal, açúcares e baixo consumo de cereais e fibras (KOPELMAN, 2000). Paralelamente, a diminuição do gasto energético relacionada às atividades físicas diárias pode ser o fator mais importante que contribui para o aumentodo peso corporal nos países ocidentalizados (WEINSIER *et al.*, 1998).

2.2 Obesidade como fator de risco para resistência a insulina e diabetes do tipo 2

A obesidade está relacionada com risco aumentado de mortalidade e morbidade por doenças cardiovasculares (MANSON *et al*., 1990; KANNEL *et al*., 2002 e MÁCHOVÁ *et al*., 2007), alguns tipos de cânceres (POLESEL *et al*., 2009; SIEGEL *et al*., 2010), desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 (COLDITZ *et al*., 1990; SASAI *et al*., 2010).

Mizuno (2010) investigou as principais co-morbidades associadas à obesidade no período de 1998 a 2009, no Brasil. Essa análise foi feita a partir das informações de saúde sobre morbidade hospitalar no Sistema Único de Saúde (SUS). Em relação ao número de internações relacionadas à obesidade, observou-se um aumento contínuo com o decorrer dos anos, que passaram de 292 internações em 1998, a 37.906 internações, em 2009. Apenas a condição de obesidade foi responsável por 17% do total das internações hospitalares realizadas no sistema público de saúde ao longo do período estudado. Destaca-se que o diabetes *mellitus* representou a principal causa de internação atribuível à obesidade (1998 a 2009).

De acordo com Blackburn *et al.* (2005), adultos obesos têm risco de 50% a 100% maior de morte prematura em comparação com adultos com um IMC entre 20 e 25 kg/m^2. Os autores ressaltam que aproximadamente 80% dos adultos com DM2 estão com sobrepeso ou obesidade. Colditz *et al*. (1990) reportaram a partir de um estudo de corte prospectivo (1976-1990) que o IMC foi um preditor de risco dominante para o DM2, e mulheres que perderam mais de 5 kg reduziram o risco de DM2 em 50% ou mais.

Sugere-se que a resistência a insulina seja um fator primário no desenvolvimento do DM2. Na presença de obesidade e histórico familiar de diabetes pode-se observar um quadro de resistência a insulina prévio ao diagnóstico do DM2. Indivíduos resistentes a insulina são inicialmente normoglicêmicos devido à produção aumentada de insulina pelo pâncreas (CEFALU, 2001). A resistência a insulina a longo prazo e a hipersecreção desse hormônio podem levar à falência das células beta pancreáticas (STUMVOLL *et al*., 2005). Os estágios iniciais dessa falência consistem em intolerância a glicose, que podem progredir para hiperglicemia e DM2 (KALUPAHANA *et al*., 2012).

2.3 Inflamação crônica de baixo grau na obesidade: papel das células imunológicas

A obesidade é caracterizada pela presença de uma inflamação crônica, subclínica, de baixo grau, que parece ser iniciada no tecido adiposo. Esse tecido não é considerado somente um depósito de gordura, mas também um órgão que secreta ácidos graxos e uma variedade de polipeptídeos denominados adipocinas, que podem funcionar de modo endócrino ou parácrino (OLEFSKY e GLASS, 2010). Alguns exemplos desses polipeptídeos são o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-1β (IL-1β), a leptina, a adiponectina, a resistina, o antagonista do receptor da interleucina 1 (IL-1Ra) e o fator inibitório da migração de macrófagos 1 (MIF-1) (WISSE, 2004).

Tem sido mostrado que na obesidade ocorre um aumento de alguns peptídeos pró-inflamatórios no tecido adiposo e na circulação. Hotamisligil *et al.* (1995) encontraram que indivíduos obesos expressavam 2,5 vezes mais o RNAm para TNF-α no tecido adiposo, quando comparados à indivíduos magros. Xu *et al.* (2003) reportaram que genes relacionados a inflamação são superexpressos no tecido adiposo de animais com obesidade induzida geneticamente ou por dieta rica em gordura.

Neste contexto, Dandona *et al.* (1998) observaram níveis plasmáticos aumentados de TNF-α em obesos, que foram reduzidos após perda de peso. Já Park *et al.*, (2005) também verificaram que indivíduos obesos apresentavam valores plasmáticos aumentados de TNF-α e de outros peptídeos pró-inflamatórios, como proteína C reativa (PCR) e IL-6. Além disso, foi observado redução da produção da adiponectina em indivíduos obesos, que é considerada um fator anti-inflamatório (STEFAN *et al.*, 2002).

Esse quadro inflamatório de baixo grau descrito no tecido adiposo de obesos é explicado não somente pela secreção de substâncias inflamatórias pelo próprio adipócito (TRAYHURN e WOOD, 2004; ROSEN e SPIEGELMAN, 2006), mas também por uma maior infiltração de células do sistema imunológico nesse tecido. Entre as células que infiltram o tecido adiposo, os macrófagos são funcional e numericamente dominantes (JUSTIN *et al.*, 2007; ODEGAARD e CHAWLA, 2011). Em animais eutróficos, aproximadamente 10 a 15% das células do tecido adiposo expressam o marcador de macrófagos F4/80, enquanto 45 a 60% das células no tecido adiposo de animais obesos são $F4/80^{+}$, indicando que a obesidade substancialmente altera a relação macrófagos/adipócitos (WEISBERG *et al.*, 2003; CINTI *et al.*, 2005).

Inúmeras teorias têm sido propostas para explicar a maior infiltração de macrófagos no tecido adiposo de obesos (HEILBRONN e CAMPBELL, 2008). Estudos realizados em

animais mostram que o aumento da massa do tecido adiposo, sem um aumento concomintante no suporte vascular pode provocar hipóxia tecidual e, consequentemente, morte celular. Como resultado ocorre ativação do fator induzível por hipóxia 1 e de genes inflamatórios (YE *et al*., 2007), que funcionam como um gatilho para a inflamação do tecido adiposo. Além disso, acredita-se que o recrutamento de macrófagos ocorra em resposta à sinalização alterada de adipocinas: redução da adiponectina e aumento da leptina e de fatores envolvidos no recrutamento de macrofágos como o fator estimulador de colônia-1 (CSF-1), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e MIF-1 (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005; XU *et al*., 2003).

A obesidade parece estar associada não apenas ao aumento do número de macrófagos no tecido adiposo (CANCELOO *et al*., 2005), mas também à mudança no estado de ativação destas células do fenótipo M2 para M1. Os macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-6 e TNF-α, assim como, IL-12 e IL-23, e derivados oxidativos do óxido nítrico e do oxigênio. Já as células de fenótipo M2 apresentam um perfil menos inflamatório,expressam arginase e produzem altos níveis de IL-10 e de IL-1Ra, e baixos níveis de IL-12 e IL-23 (MANTOVANI *et al*., 2005; NGUYEN *et al*., 2005).

Recentemente foi demonstrado que a frequência de macrófagos M1 no tecido adiposo subcutâneo de indivíduos com obesidade mórbida é 4 vezes maior comparado com indivíduos eutróficos, e que a perda de peso resulta em uma redução concomitante de macrófagos M1 e aumento de células M2 (ARON-WISNEWSKY *et al*., 2009). A aquisição e manutenção do fenótipo M1 em macrófagos recrutados para o tecido adiposo em animais obesos parecem envolver uma série de mediadores como as adipocinas, condições de hipóxia, presença de lipopolissacarídeo (LPS) e ácidos graxos (NGUYEN *et al*., 2005; MURDOCH *et al*., 2008; ANTUNA-PUENTE *et al*., 2008).

Os macrofágos não são as únicas células do sistema imunológico que contribuem para a inflamação no tecido adiposo. A participação de outras populações tem sido investigada, como os linfócitos T auxilares ($CD3^+CD4^+$) e citolíticos ($CD3^+CD8^+$). Os linfócitos T $CD4^+$ apresentam dois fenótipos distintos (Th1 e Th2). As células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias como interferon-gama (IFN-γ) e promovem uma resposta imune mediada por células. As células anti-inflamatórias Th2 produzem IL-4 e IL-3 e contribuem para a resposta imune humoral. Já os linfócitos T $CD8^+$estão envolvidos no reconhecimento e eliminação de células cancerosas e infectadas por vírus (MOSRNANN e COFFMAN, 1989; MOSMANN e SAD, 1996).

Winer *et al*. (2009), demostraram que, em animais magros, ambas as células Th1 e Th2 estão presentes no tecido adiposo em proporções semelhantes, enquanto que a obesidade induzida por dieta provoca um aumento no número de linfócitos Th1, sem modificações nas células Th2. Nishimura *et al*. (2009) reportaram, em animais com obesidade induzida por uma dieta rica em gordura, um grande número de células T $CD8^+$ infiltradas no tecido adiposo epididimal, enquanto que o número de células T $CD4^+$ e células T reguladoras estavam diminuídas. Além disso, estes autores observaram que o acúmulo de células T $CD8^+$ precedia a infiltração de macrófagos, e dessa forma, as células T $CD8^+$ teriam um papel essencial na iniciação e propagação da inflamação do tecido adiposo. Essas alterações favorecem a produção de citocinas pró-inflamatórias, que poderiam desempenhar um papel importante na determinação do fenótipo M1-M2 dos macrófagos do tecido adiposo (KALUPAHANA *et al*., 2012).

As alterações imunológicas no contexto da obesidade não se restringem ao tecido adiposo e vários estudos têm avaliado a expressão e/ou função das células circulantes. O'Rourke *et al*. (2005) avaliaram a frequência de diferentes subpopulações leucocitárias em células mononucleares do sangue periférico e reportaram uma maior frequência de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e redução na frequência de linfócitos $CD3^+CD8^+$, ao se comparar indivíduos obesos (IMC≥35) com eutróficos. Weerd *et al*. (2012), ao analisarem a frequência de células T $CD4^+$, encontraram um aumento das mesmas nos indivíduos obesos mórbidos e não reportaram diferença na frequência das células T $CD8^+$. Esses autores, ao avaliarem a atividade efetora das células T $CD4^+$ (estimuladas com phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) e ionomicina), observaram que o número de células produtoras de IL-4 (Th2) foi similar entre os grupos, enquanto o número de células produtoras de IFN-γ (Th1) foi aumentado nos obesos.

Adicionalmente, alguns estudos avaliaram a frequência de outra subpopulação de leucócitos circulantes em obesos, os monócitos. Essas células apresentam grande diversidade fenotípica e funcional (NORRIS *et al*., 1979; WANG *et al*., 1992; GRAGE-GRIEBENOW *et al*., 2001). A diferença da expressão do co-receptor de LPS (CD14) e do receptor de FC tipo III (CD16) tem sido utilizada para distinguir as diferentes populações de monócitos (PASSLICK *et al*., 1989). Aproximadamente 90% dos monócitos consistem em células $CD14^{++}CD16^-$, denominados monócitos clássicos. O restante consiste em outras duas subpopulações que expressam CD16, mas têm diferentes níveis de expressão de CD14: monócitos intermediários ($CD14^{++}CD16^+$) e monócitos não clássicos ($CD14^+CD16^{++}$)

(ZIEGLER-HEITBROCK *et al*., 2010). Uma maior frequência de monócitos $CD16^+$ tem sido reportada em diferentes doenças, principalmente em infecções ou condições inflamatórias (FINGERLE *et al*., 1993; KAWANAKA *et al*., 2002; CASTANO *et al*., 2011). Essa subpopulação ($CD16^+$) é geralmente denominada de monócitos inflamatórios em função da capacidade de produzir quantidades elevadas de TNF-α e IL-1β (FRANKENBERGER *et al*., 1996; BELGE *et al*., 2002). No estudo de Poitou *et al*., (2011) foi reportado que a frequência das subpopulações de monócitos $CD16^+$ (intermediários e não clássicos) é aumentada em obesos, com um incremento maior da subpopulação $CD14^+CD16^{++}$ em obesos diabéticos.

Esses estudos mostram que existe na obesidade uma inflamação crônica de baixo grau no tecido adiposo, que pode ser refletida por alterações importantes no número e no fenótipo de linfócitos circulantes e monócitos. Esses achados, em conjunto, sugerem que o sistema imunológico responde à obesidade e está envolvido no desenvolvimento da inflamação de baixo grau observada nesta condição.

2.4 Mecanismos moleculares de resistência a insulina induzida pela obesidade

A insulina participa de vários processos celulares como o metabolismo da glicose, proteínas e lipídios, crescimento e diferenciação celular, dentre outros (PESSIN e SALTIEL, 2000) (FIGURA 1). Umas das ações da insulina é aumentar o transporte de glicose nos tecidos muscular e adiposo, promovendo a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4). A sinalização intracelular da insulina inicia-se com a sua ligação ao receptor de insulina (IR). O IR apresenta atividade tirosina quinase intrínseca e é autofosforilado quando ligado à insulina. Em sequência, o IR fosforila resíduos de tirosina de vários substratos protéicos, dentre esses a família dos substratos do receptor de insulina (IRS), Shc e Cbl (PESSIN e SALTIEL, 2000). O IRS-1 é um dos principais substratos do receptor de insulina. A fosforilação em tirosina do IRS-1 cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src-2 (SH2), como a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K).

O IRS-1 fosforilado associa-se, dessa forma, com a subunidade regulatória p85 da PI3K e esta interação recruta a subunidade catalítica p110 da PI3K para a membrana plasmática, resultando na formação do segundo mensageiro fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). Como resultado, ocorre a ativação da quinase dependente de fosfoinositídeos-1(PDK1), que promove a ativação da proteína quinase B (Akt/PKB) por meio da fosforilação de um resíduo de treonina em seu sítio ativo. A Akt/PKB ativada fosforila e inativa seu

substrato de 160 kD (AS160), uma proteína que apresenta um domínio GAP (*GTPases activating protein)* específico para proteínas reguladoras do tráfego de vesículas (Rab). Quando o domínio GAP da AS160 é inibido, ocorre a conversão das Rabs em suas formas ativas levando a reorganização do citoesqueleto e translocação do GLUT-4 para a membrana da célula, aumentando assim a captação de glicose pelas células dos tecidos adiposo e muscular (WATSON e PESSIN, 2007). Adicionalmente a fosforilação do proto-oncogene Cbl funciona como um segundo sinal para a translocação da proteína GLUT-4, em paralelo à ativação da via da PI3K (RIBON *et al*., 1997). O Cbl está associado com a proteína adaptadora CAP. Esse complexo quando fosforilado migra para a membrana celular e interage com a proteína CrkII, que também está constitutivamente associada com a proteína C3G. A C3G, uma proteína trocadora de nucleotídeos, catalisa a troca de GDP por GTP da proteína TC10, ativando-a e gerando o sinal para a translocação do GLUT-4 (BAUMANN *et al*., 2000).

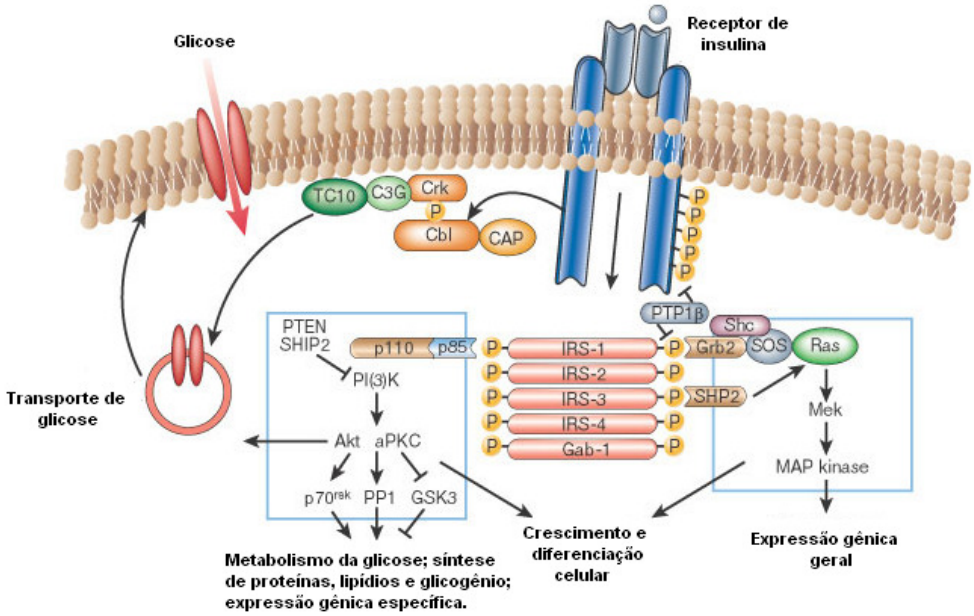

Figura 1- Via de sinalização da insulina. O receptor de insulina quando ativado promove a fosforilação de resíduos de tirosina de vários substratos protéicos, como do IRS, Shc e Cbl, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como PI3K, cascata da MAPK e CAP/Cbl. Adaptado de Saltiel e Kahn (2001).

A obesidade pode induzir um estado de resistência a insulina, em que concentrações fisiológicas de insulina não são suficientes para induzir o efeito metabólico nos tecidos sensíveis a esse hormônio. Como conseqüência, o indivíduo desenvolve uma hiperinsulinemia a fim de compensar a redução na captação de glicose pelos tecidos muscular e adiposo, do

aumento da gliconeogênese hepática e da liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo (SCHENK *et al*., 2008; STUMVOLL *et al*., 2005).

Como revisado por Taniguchi, Emanuelli e Kahn (2006) a fosforilação de resíduos de serina do IRS-1 está aumentada em estados de resistência a insulina, e poderia ter um papel na patogênese desse quadro. Existem mais de 70 resíduos de serina no IRS-1 que podem ser fosforilados e regular negativamente a sinalização da insulina. O mecanismo pelo qual a fosforilação de resíduos de serina altera a função do IRS-1 não é conhecido. Uma possibilidade é que a serina fosforilada interfere com a função do domínio funcional do IRS-1 no qual ela reside. A fosforilação da serina 307 do IRS-1, que é localizada no domínio *PTB* (domínio de ligação à fosfotirosina) impede a interação entre o receptor de insulina e o IRS-1 (AGUIRRE *et al*., 2000). Já a fosforilação da serina 612 inibe a fosforilação da tirosina do IRS-1 induzida pela insulina e a sua associação com a PI3K (De FEA e ROTH , 1997).

A fosforilação inibitória do IRS-1 pode ser promovida pela ação de algumas quinases como a JNK e IKK, bem como a PKC, quinase p70S6 (p70S6K), proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (HOTAMISLIGIL, 2010). As JNKs, também chamadas de proteínas ativadas pelo estresse (SAPKs), consistem de 10 isoformas derivadas a partir de 3 genes: JNK1 (4 isoformas), JNK2 (4 isoformas) e JNK3 (2 isoformas). JNK1 e JNK2 são expressas em todos os tecidos, enquanto a JNK3é expressa principalmente no cérebro, mas também no coração e nos testículos (TARANTINO e CAPUTI, 2011). As JNKs são ativadas por dupla fosforilação pelas quinases das MAPKs (MAPKKs), MKK4 e MKK7 (WESTON e DAVIS, 2007). De acordo com uma recente revisão (VALLERIE e HOTAMISLIGIL, 2010) a JNK pode ser ativada por diversos estímulos, como citocinas inflamatórias, ácidos graxos livres, espécies reativas de oxigênio (ROS) e estresse do retículo endoplamástico. Alguns estudos têm apontado uma correlação positiva entre a ativação da JNK1 e resistência a insulina. Chung *et al*. (2008) observaram uma maior ativação da JNK1/2 no músculo esquelético de indivíduos obesos resistentes a insulina comparado com indivíduos eutróficos saudáveis. Adicionalmente foi reportado que na obesidade induzida pela dieta, ou por manipulação genética em camundongos, a JNK1 no tecido adiposo é superativada e pode interferir na sinalização do metabolismo da glicose (HIROSUMI *et al*., 2002). Nesse mesmo estudo, camundongos $JNK1^{-/-}$ foram protegidos da resistência a insulina induzida pela dieta.

Existem duas hipóteses principais para explicar o desenvolvimento da resistência a insulina, no músculo esquelético, induzida pela obesidade: a inflamação de baixo grau e a sobrecarga lipídica (TAUBES, 2009). Ambos os mecanismos promovem a fosforilação inibitória de resíduos de serina do IRS-1, através da ação de quinases, desencadeando a resistência a insulina. Na hipótese da obesidade associada à inflamação de baixo grau, citocinas inflamatórias liberadas pelo tecido adiposo, como TNF-α, IL-1β e IL-6 podem se ligar a receptores específicos na membrana muscular resultando na ativação da JNK (TAUBES, 2009). Alguns estudos demonstram essa relação entre adipocinas/citocinas e miócitos e o desenvolvimento da resistência a insulina (KAMEI *et al.*, 2006; SELL *et al.*, 2009). No estudo de KAMEI *et al.* (2006) foi reportado que camundongos *knockout* para MCP-1 apresentaram melhora da resistência a insulina e a super-expressão do MCP-1 no tecido adiposo desencadeou resistência a insulina no músculo esquelético. Já Del Aquila et al. (1999) demonstraram que o aumento do TNF-α promoveu resistência a insulina em células musculares C2C12,evidenciada pela inibição da ativação PI3K mediada pelo IRS-1 e IRS-2.

Ao se considerar a sobrecarga lipídica, acredita-se que a não inibição da lipólise, que acontece no tecido adiposo resistente a insulina, aumenta a taxa de ácidos graxos plasmáticos livres. A maior disponibilidade de ácidos graxos livres pode aumentar a quantidade de gordura ectópica em outros locais que não o tecido adiposo, como no músculo esquelético, e os metabólitos desses lipídios estariam envolvidos com o desenvolvimento da resistência a insulina nesse tecido (UNGER *et al.*, 2000). Esses depósitos de lipídios geram metabólitos bioativos como o diacilglicerol e as ceramidas, que podem ativar a PKC (SCHMITZ-PEIFFER *et al.*, 1997; ITANI *et al.*, 2005) e as quinases IKK e JNK. Yu *et al.* (2004) a partir de estudos *in vitro* e com animais, demonstraram que o aumento das concentrações de ácidos graxos plasmáticos resultou em aumento das concentrações de acil-CoA e diacilglicerol, desencadeando a ativação da PKC-θ e consequente fosforilação inibitória do IRS-1 (Ser1101).

2.5 Hsp72 e sensibilidade a insulina

As proteínas de choque térmico (*heats hock proteins,* HSP*)* consistem em uma família de proteínas presentes em células eucarióticas e procarióticas que atuam em diversos processos celulares. As HSPs foram descritas em células de glândulas salivares de *Drosophila* expostas ao estresse térmico (TISSIÉRES, 1974). Como revisado por Kiang e Tsokos (1998) outros fatores, além do choque térmico, podem induzir a síntese dessas proteínas, como análogos de aminoácidos e glicose, metais pesados, estimuladores da PKC, agentes que

elevam a concentração intracelular de cálcio, isquemia, infecções, óxido nítrico, hormônios e antibióticos. Essas proteínas são agrupadas em famílias de acordo com sua sequência de aminoácidos e com seu peso molecular. Em células de mamíferos, as HSPs mais induzidas em resposta ao estresse celular fazem parte da família de proteínas de 70 kD (HSP70), que inclui Hsp72, Hsp73, GRP78 e GRP75 (MEYER e SILVA, 1999).

A proteção celular mediada pelas HSP70 é, em parte, devido a capacidade das mesmas de funcionar como chaperonas moleculares, evitando a agregação inadequada de proteínas e, mediando o transporte de proteínas imaturas para as organelas de destino, para o empacotamento final, a degradação ou reparo (KIANG e TSOKOS, 1998). Adicionalmente essas proteínas são descritas por atuarem no controle da sinalização celular (CALDERWOOD *et al.*, 2007) e modulação da resposta imune (CHEN *et al.*, 2006). A HSP70 pode agir como molécula pró- e anti-inflamatória, alterando a produção e liberação de moduladores inflamatórios. Como efetor anti-inflamatório, o aumento intracelular de HSP70 modula a expressão de genes inflamatórios, pela inibição da translocação do fator nuclear kappa B (NF-κB) para o núcleo (SCHELL *et al.*, 2005). Como efetor pró-inflamatório, a liberação ativa (exossomos) ou passiva (ruptura da membrana celular) da HSP70 no meio extracelular induz uma resposta imune/inflamatória envolvendo a ativação de uma variedade de células efetoras imunes e induzindo a liberação de citocinas (AMORIM e MOSELEY, 2010).

Hooper (1999) foi o primeiro a sugerir a participação da Hsp72 na modulação da sensibilidade a insulina. Nesse estudo, a temperatura corporal de pacientes diabéticos do tipo 2 foi elevada (aumento médio de 0,8°C) através de imersão em água aquecida, durante 30 minutos, seis dias por semana, durante três semanas, um processo similar a aclimatação ao calor passiva, que eleva a expressão de Hsp72 em diversos tecidos corporais (YAMADA *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2010). Após a terapia com calor, os pacientes apresentaram melhora no controle glicêmico, evidenciado pela diminuição dos valores de hemoglobina glicosilada. O autor propôs que a melhora no controle glicêmico poderia estar relacionada com a maior expressão de Hsp72 no tecido muscular esquelético, embora medidas da Hsp72 não tenham sido realizadas (HOOPER, 1999).

Outros autores (CHUNG *et al.*, 2008; GUPTE *et al.*, 2009) utilizaram modelos animais para investigar se a ativação da Hsp72 no músculo esquelético poderia reduzir o desenvolvimento da resistência a insulina. No estudo de Chung *et al.* (2008) a expressão da Hsp72 foi induzida no músculo esquelético de animais obesos resistentes a insulina. Os

autores utilizaram diferentes meios para essa indução: exposição ao calor (41.5°C de temperatura interna, uma vez por semana, durante 16 semanas), indução farmacológica da Hsp72 (administração do derivado de hidroxilamina, BGP-15, durante 15 dias) ou superexpressão gênica da Hsp72. Todas as formas de induzir aumento na expressão de Hsp72 protegeram os camundongos contra a resistência a insulina. Resultado semelhante foi reportado por Gupte *et al*. (2009) que induziram a expressão da Hsp72 através do calor em ratos submetidos a uma dieta com alto teor de gordura. Após o tratamento (imersão por 20 minutos até alcançar a temperatura de 41°C, uma vez por semana durante 12 semanas) observaram melhora da tolerância à glicose.

Adicionalmente, a indução da Hsp72 no fígado de ratos com obesidade induzida através de dieta com alto teor de gordura também foi relacionada à melhora da resistência a insulina (ADACHI *et al*., 2010). Estes autores utilizaram um fármaco (geranilgeranilacetona) que foi administrado oralmente, durante 4 semanas em animais obesos e diabéticos. Os autores reportaram aumento da expressão da Hsp72 no fígado, juntamente com melhora da sensibilidade a insulina. Em todos os estudos (CHUNG *et al*., 2008; GUPTE *et al*., 2009) a indução da Hsp72 promoveu redução na ativação da JNK e da IKK, sugerindo, dessa forma, um papel potencial da Hsp72 em bloquear vias de sinalização relacionadas à resistência a insulina no contexto da obesidade genética ou em casos de alimentação rica em gordura.

Chung *et al*. (2008) observaram ainda no músculo esquelético de indivíduos obesos resistentes a insulina, redução na expressão de Hsp72 e aumento de JNK fosforilada, em comparação com indivíduos eutróficos saudáveis. Além disso, a redução na expressão de Hsp72 no músculo esquelético também foi encontrada em indivíduos com DM2 (KURUEZ *et al*., 2002; BRUCE *et al*., 2003). Esses achados apontam para uma possível associação entre a ativação de sinalizadores intracelulares, sensibilidade a insulina e a Hsp72.

2.6 Exercício físico reduz inflamação e melhora a sensibilidade a insulina

O exercício físico tem sido largamente empregado no tratamento e prevenção da obesidade e das doenças associadas. Vários trabalhos demonstram que o treinamento aeróbico apresenta uma ação antiinflamatória (PETERSEN e PEDERSEN, 2005; YATES *et al*., 200). Como revisado por Walsh *et al*. (2011), evidências sugerem que o benéficio do exercício relacionado a seu efeito anti-inflamatório na obesidade é mediado pela redução na massa de gordura visceral e / ou por indução de um ambiente antiinflamatório (aumento dos níveis

circulantes de citocinas anti-inflamatórias incluindo a IL-1Ra e IL-10) a cada sessão de exercício.

Já está claro na literatura que uma única sessão de exercício é capaz de aumentar a captação de glicose no músculo esqueletico por mecanismos independentes da insulina, assim como por melhora da sensibilidade a insulina (GARETTO *et al*., 1984; RICHTER *et al*., 1989). O aumento da captação de glicose estimulada pela contração muscular é revertido dentro de poucas horas após o término do exercício. Em contraste o aumento da sensibilidade a insulina persiste por um período maior, que pode durar até 48 horas (MIKINES *et al*.,1988; CARTEE *et al*., 1989).

Alguns estudos demonstraram aumento da sensibilidade a insulina após 30 a 60 minutos de ciclismo, tanto em indivíduos saudáveis, quanto em resistentes a insulina e diabéticos do tipo 2 (BOGARDUS *et al*., 1983; DEVLIN e HORTON 1985; DEVLIN *et al*., 1987, MIKINES *et al*., 1988). Embora esse efeito do exercício seja bem descrito na literatura, os mecanismos moleculares não são totalmente compreendidos. Alguns estudos sugerem que o aumento na sensibilidade a insulina induzida pelo exercício ocorra independentemente de alterações em componentes inicias da via de sinalização da insulina (WOJTASZEWSKI *et al*., 1997 e 2000; FROSIG *et al*., 2007), contudo a maior parte desses estudos não investigaram indivíduos obesos resistentes a insulina.

Embora existam evidências da participação de sinalizadores intracelulares, como a JNK e IKK, no desenvolvimento da resistência a insulina, poucos estudos investigaram o efeito do exercício nessas variáveis. Em um dos poucos estudos encontrados Ropelle *et al*. (2006) analisaram as respostas metabólicas e da via de sinalização da insulina em resposta a infusão de insulina em 3 grupos: animais alimentados com um dieta padrão, animais com obesidade induzida por dieta e resistentes a insulina que realizaram ou não uma sessão de exercício. A sessão de exercício de natação consistiu em 2 séries com duração de 3 horas, sendo as séries separadas por um período de repouso de 45 minutos. Após o exercício a sensibilidade a insulina foi restaurada para os valores do grupo controle nos animais com obesidade induzida por dieta. Além disso, a maior fosforilação do IRS-1 (Ser 307) e da JNK (Thr183/Tyr185) e maior degradação do inibidor do fator de transcrição κB (IκBα) observadas no grupo com obesidade induzida por dieta, foram todas restauradas para os valores do grupo controle. Esses achados ilustram que o músculo previamente exercitado responde melhor à insulina, o que pode estar relacionado a uma menor fosforilação em serina

do IRS-1, da JNK e da IKK (que refletiria menor degradação do IκBα) induzidas pela sessão aguda de exercício.

No estudo de Schenk e Horowitz (2007) foi avaliado o efeito do exercício físico em indivíduos com resistência a insulina induzida por infusão de lipídios. Inicialmente, os participantes realizaram uma sessão de exercício físico aeróbico a 65% do VO_{2pico} em 2 séries de 45 minutos ou permaneceram sem realizar a atividade (dia 1). Uma hora após o término do exercício, os participantes receberam uma infusão de lipídio que foi mantida até o dia seguinte (dia 2). No terceiro dia, foram obtidas amostras musculares. Foi reportado que quando os indivíduos realizaram o exercício, eles foram protegidos do desenvolvimento da resistência a insulina, e apresentaram uma maior síntese de triglicérides, menor acúmulo de metabólitos lipídicos e menor ativação da JNK e da via IKK/NFκB no músculo esquelético.

Considerando que a Hsp72 pode atuar em sinalizadores intracelulares (como a JNK) (PARK *et al*., 2001) que interferem na sinalização da insulina e que sua expressão é aumentada com o exercício (LIU *et al*., 1999), é possível que essa proteína participe do aumento da sensibilidade a insulina induzida pelo exercício, por meio da inibição de quinases que fosforilam o IRS-1 em resíduos de serina.

Considerando que a ativação de quinases que fosforilam de forma inibitória o IRS-1 é um dos mecanismos propostos para o desenvolvimento da resistência a insulina induzida pela obesidade no músculo esquelético. Além disso, o possível papel da Hsp72 em modular a sensibilidade a insulina e que o exercício físico promove melhora da sensibilidade a insulina e induz a expressão da Hsp72, o presente estudo avaliou o efeito de uma sessão de exercício físico aeróbico na frequência de linfócitos e monócitos no sangue periférico, e na expressão da HSP70 e estado de ativação da JNK e do IRS-1 no músculo esquelético de indivíduos eutróficos sensíveis a insulina, obesos sensíveis a insulina e obesos resistentes a insulina.

3 JUSTIFICATIVA

A obesidade é um agravo de saúde para as sociedades modernas, pela sua incidência crescente, e por estar associada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes do tipo 2 e doenças cardiovasculares (OPAS, 2003). Estima-se que os gastos públicos com a obesidade comprometem entre 2% a 7% dos investimentos no âmbito da saúde (OMS, 2000). Os custos de saúde no Brasil relacionados à obesidade chegam a mais de um bilhão de reais por ano (SCHIERE *et al*., 2006), e se considerados os custos indiretos este valor ultrapassa R$1,5 bilhão. Só o Sistema Único de Saúde (SUS) destina R$600 milhões para as internações relativas à obesidade. Segundo o relatório de Estatísticas Mundiais de Saúde (OMS, 2000) a obesidade, juntamente com as doenças relacionadas, é a causa de morte de 2,8 milhões de pessoas por ano.

Sugere-se que a resistência a insulina induzida pela obesidade seja um fator primário no desenvolvimento do DM2. Isso porque essa disfunção a longo prazo pode levar à falência das células beta pancreáticas (STUMVOLL *et al*., 2005). Os estágios iniciais dessa falência consistem em intolerância à glicose, que podem progredir para hiperglicemia e DM2 (KALUPAHANA *et al*., 2012).

Considerando a incidência crescente da obesidade e o alto risco de desenvolvimento de resistência a insulina, além do impacto negativo dessas desordens na qualidade de vida do indivíduo e os altos custos para a saúde, torna-se evidente a implementação de medidas para se prevenir o estágio mais avançado da disfunção glicêmica, o DM2. Neste contexto, o exercício físico surge com uma medida de prevenção e tratamento para a obesidade e resistência a insulina. Mesmo sendo demonstrado o papel terapêutico do exercício na redução da resistência a insulina, os mecanismos moleculares ainda não foram completamente elucidados. Portanto, faz-se necessária a investigação do efeito do exercício físico em componentes moleculares e celulares envolvidos na resistência a insulina em indivíduos obesos.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar os efeitos de uma sessão de exercício físico aeróbico em componentes celulares e moleculares relacionados ao desenvolvimento da resistência a insulina em indivíduos eutróficos sensíveis a insulina, obesos sensíveis e resistentes a insulina.

4.2 Específicos

1. Avaliar o efeito de uma sessão de exercício físico aeróbico na frequência das subpopulações de monócitos e linfócitos no sangue periférico.

2. Avaliar o efeito de uma sessão de exercício físico aeróbico na ativação da MAP quinase JNK no músculo esquelético.

3. Avaliar o efeito de uma sessão de exercício físico aeróbico na fosforilação do resíduo de serina 612 do IRS-1 no músculo esquelético.

4. Avaliar o efeito de uma sessão de exercício físico aeróbico na expressão muscular da HSP70.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cuidados éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (protocolo 54/2010). A coleta de dados e as análises das amostras foram executadas na Santa Casa de Caridade de Diamantina (Minas Gerais) e no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Diamantina, Minas Gerais), respectivamente.

5.2 Amostra

Para participar do estudo os voluntários preencheram os seguintes critérios de inclusão: idade entre 18 e 55 anos, não fumantes, não praticar atividade física regularmente, reportar massa corporal estável, nos 3 meses anteriores a participação no estudo, não ter participado de programas de redução de peso nos últimos seis meses, não fazer o uso de medicamentos anti-inflamatórios, hipoglicemiantes ou outros conhecidos por afetar o metabolismo. Além disso, os voluntários não apresentaram diagnóstico de DM2 e não reportaram presença de doenças agudas ou crônicas como cardiovasculares, cerebrovasculares, hepáticas, renal, hematológica, respiratória, tireoidianas, neoplásicas, inflamatórias e imunológicas.

Posteriormente, o voluntário foi classificado como obeso ou eutrófico, de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC $\geq$30 kg/m^{2}ou entre 18,5 e 24,9 kg/m^2, respectivamente) (OMS, 1998). Para esse cálculo, foram mensurados estatura e peso corporal, através de uma balança analógica (Welmy, modelo 110, precisão de 0.1 kg) com estadiômetro acoplado (precisão de 0,5 cm). O IMC foi calculado através da divisão da massa corporal (kg) pelo quadrado da estatura (m).

Dos 45 voluntários obesos, inicialmente recrutados, 27 foram excluídos do estudo por não preencherem os critérios de inclusão: 11 faziam uso de medicamento anti-hipertensivo, 9 eram fumantes, 1 portadora de síndrome dos ovários policísticos, 2 voluntárias estavam amamentando, 3 faziam uso de medicamento hipoglicemiante e 1 estava em tratamento de câncer.

Os voluntários enquadrados nos critérios de inclusão foram submetidos à realização dos seguintes exames laboratoriais, após 12 horas de jejum: perfil lipídico (colesterol total e frações e triglicérides), glicemia e insulinemia. Além disso, os voluntários classificados como obesos foram submetidos ao teste de tolerância oral à glicose. Estes exames foram realizados em um laboratório de análises clínicas de acordo com as técnicas empregadas pelo mesmo. Após essa etapa, foram excluídos 3 voluntários por apresentam os valores de glicemia de jejum ou glicemia no teste de tolerância oral a glicose acima dos valores de normalidade.

A partir dos dados de glicemia e insulinemia de jejum foi estimada a resistência a insulina a partir do modelo de avaliação da homeostase (HOMA1-IR). Esse modelo foi descrito por Matthews *et al*., (1985) que reportaram uma correlação desse método (r^2=0,88 e p<0,0001) com o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, considerado o padrão ouro para avaliação da resistência a insulina. O cálculo foi feito a partir da equação: HOMA1-IR = glicemia (mmol) x insulina (µU/mL) ÷ 22,5. O ponto de corte que adotamos foi baseado no estudo de Geloneze *et al*. (2006), em que um índice maior que 2,71 caracteriza resistência a insulina. De acordo com os autores esse ponto de corte para o índice possui aplicação clínica e epidemiológica na identificação de resistência a insulina em populações miscigenadas multiétnicas ocidentalizadas.

Os indivíduos eutróficos recrutados para o estudo não apresentavam resistência a insulina, e foram pareados de acordo com a idade e o gênero aos voluntários obesos. Ao final de todo experimento, o n de cada grupo foi de 9 participantes. Cada voluntário foi alocado em um dos três grupos experimentais descritos abaixo (FIGURA 2) de acordo com a classificação do estado nutricional e presença ou não de resistência a insulina.

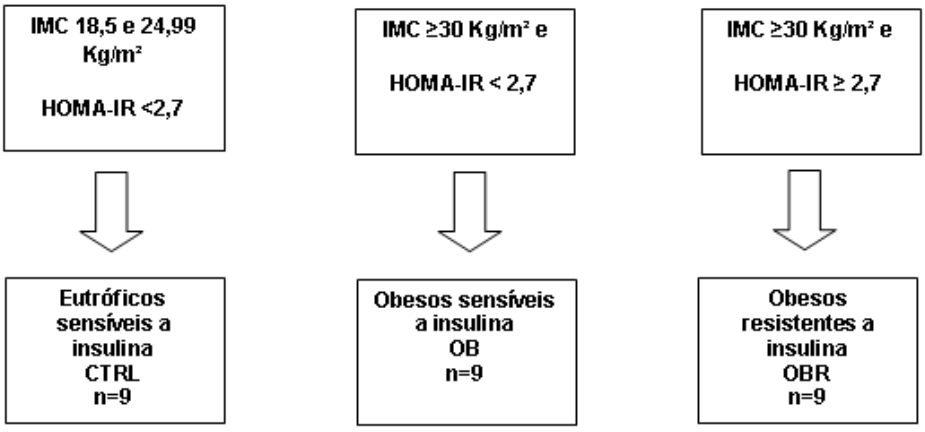

Figura 2- Grupos experimentais de acordo com o IMC e resistência a insulina.

5.3 Caracterização da amostra

5.3.1 Parâmetros antropométricos

Foram medidas a composição corporal e a circunferência da cintura dos voluntários. A composição corporal foi avaliada utilizando-se um aparelho de bioimpedância tetrapolar (Biodynamics®, 450, EUA). Ao voluntário foram fornecidas as seguintes orientações antes do teste: ingerir pelo menos 2 litros de líquido no dia anterior ao exame, não ingerir bebidas alcoólicas e cafeína, ou realizar exercício físicos ou sauna nas 12 horas que antecedem o teste e não ingerir líquidos e alimentos nas 4 horas que antecedem a avaliação. Além disso, a medida não foi realizada no período menstrual. Durante a avaliação o voluntário permaneceu na posição supina com braços e pernas abduzidos na angulação aproximada de 45°. Foram colocados quatro eletrodos na superfície da pele previamente limpa com álcool. Os eletrodos proximais foram afixados na superfície dorsal do pulso e na superfície dorsal do tornozelo. Os eletrodos distais foram afixados entre o segundo e terceiro metacárpicos e metatársicos. Uma corrente elétrica de baixa intensidade foi aplicada nos eletrodos emissores, e a diferença na voltagem entre os eletrodos foi determinada como impedância ou resistência. A partir destes procedimentos foram obtidos os percentuais de massa magra e massa gorda.

Na sequência, mensurou-se a circunferência da cintura, que possui uma relação com a gordura intra-abdominal. Para essa medida, os voluntários foram instruídos a ficar de pé, abdômen relaxado, braços estendidos ao longo do corpo e pés separados numa distância de 25 a 30 cm. A fita métrica foi passada, niveladamente, ao redor da cintura no ponto localizado entre a última costela e as cristas ilíacas, região que ficou despida durante a mensuração. Considera-se como medida ideal para mulheres e homens valor menor que 88 e 102 centímetros, respectivamente (ACSM, 2006).

5.3.2 Análise do consumo de oxigênio

Para a avaliação do consumo de oxigênio realizou-se um teste de esforço físico progressivo máximo em bicicleta ergométrica (Corival, Medgraphics, EUA) utilizando-se o protocolo de rampa (MYERS e BELLIN, 2000). Durante esse teste utilizou-se um analisador de gases (K4b2, Cosmed, Itália) com dados coletados respiração por respiração.

Os voluntários receberam as seguintes orientações pré-teste: comparecer com vestimenta adequada para a realização de exercício (short, meia, camiseta e tênis), realizar

uma refeição leve e ingerir 500 mL de água no mínimo duas horas antes, não ingerir bebidas com cafeína ou álcool 24 horas antes, dormir no mínimo 8 horas na noite anterior ao teste e evitar realizar atividades extenuantes e de longa duração (ACSM, 2006).

Inicialmente, para determinar a potência máxima do protocolo de rampa o *Veterans Specific Activity Questionnaire* (VSAQ) (ANEXO A) foi aplicado. Esse questionário apresenta uma lista de atividades com aumento progressivo de intensidade em termos de equivalentes metabólicos (METs). Os voluntários foram instruídos a determinar no questionário a primeira atividade que poderia causar fadiga ou dispnéia que levaria à interrupção do exercício após 5 a 10 minutos.

A partir dos METs derivados do VSAQ e idade foi utilizado um nomograma (Myers *et al*, 1994) para determinar a capacidade máxima de trabalho de cada voluntário:

$$METs = 4,7 + 0,97\ (VSAQ) - 0,06\ (idade).$$

Posteriormente, foi predita a capacidade máxima para o exercício a partir da equação (MYERS,1996):

Capacidade de trabalho (watts): (METs nomogram - 1) x peso corporal (kilograms) /3.486.

A partir do dado da capacidade de trabalho (watts), foi elaborado o protocolo para o teste de esforço máximo, no qual foram feitos incrementos de carga a cada 1 minuto, de tal forma que a fadiga ocorresse entre o oitavo e décimo segundo minutos de teste. Durante a espirometria, a ventilação ocorreu através de uma máscara de borracha, acoplada a uma válvula bidirecional onde o ar inspirado do ambiente e parte do ar expirado foi captado servindo de amostra para a leitura das variáveis ventilatórias e metabólicas. Durante o teste foram monitoradas a frequência cardíaca e a percepção subjetiva de esforço (PSE, BORG,1998). Nos grupos obesos o traçado eletrocardiográfico foi acompanhado por uma cardiologista. O teste foi considerado máximo se pelo menos três dos seguintes parâmetros fossem atingidos: quociente respiratório superior a 1,15; PSE superior a 18, frequência cardíaca maior que 90 % da máxima prevista pela idade (FCmax = 220 – idade), fadiga (POOLE *et al*., 2008). O teste foi interrompido na presença de sintomas tontura, náuseas, vista turva, dispnéia, dor precordial, elevação da pressão arterial diastólica (PAD) até 120

mmHg, queda sustentada da pressão arterial sistólica (PAS) ou elevação acentuada da PAS até 260 mmHg e pelo desejo do voluntário.

A partir desse teste obteve-se o pico de consumo de oxigênio (VO_2pico) de cada voluntário, uma vez que, não observamos o platô no consumo de oxigênio após incremento de carga. Além disso, determinou-se a potência máxima (watts) no teste, definida como a potência desenvolvida no último estágio completo do protocolo.

5.4 Procedimentos

No mínimo 48 horas após essas avaliações foi realizada a primeira coleta de amostra muscular. No mínimo 7 dias após esse procedimento, foi realizada a primeira coleta de sangue, seguida por uma sessão de exercício físico aeróbico, segunda coleta de amostras muscular (no máximo 30 minutos após o término do exercício) e sanguínea (1 hora após o término do exercício). Essas etapas do estudo estão ilustradas no esquema abaixo (FIGURA 3) e descritas nas próximas sessões.

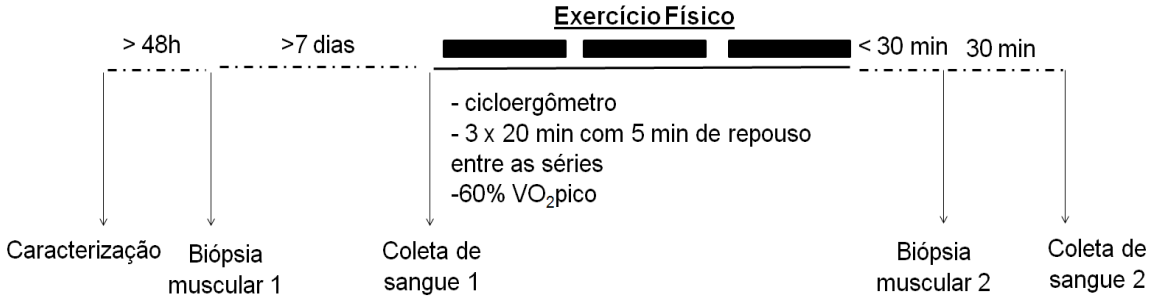

Figura 3- Etapas do estudo.

5.4.1Biópsia muscular

A biópsia muscular foi realizada no músculo vasto lateral da perna dominante utilizando-se a técnica de Bergstrom (BERGSTROM e HULTMAN, 1996). Esse procedimento foi realizado em 2 momentos do estudo, sendo executado por um médico cirurgião. A primeira biópsia foi realizada para avaliar a expressão ou o estado de ativação basal das proteínas de interesse. O procedimento foi realizado no período da manhã, entre 2 a 3 horas após a realização de um desjejum padronizado (valor energético total 249 Kcal; 60,6% de carboidratos, 17,3% de proteína e 22,4% de gordura) e repouso de 15 minutos. A

segunda biópsia foi realizada após uma sessão de exercício físico aeróbico para avaliar o efeito agudo do exercício na expressão das proteínas de interesse (descrito na seção 5.8).

Para a realização da biópsia muscular os voluntários ficaram na posição supina em uma maca e a assepsia da pele no local da biópsia foi realizada com uma solução tópica anti-séptica Riohex® 0,5% (Rioquímica®, Brasil). Um campo cirúrgico incisional estéril foi fixado ao redor do local da incisão. Em seguida, a pele e o tecido adiposo foram anestesiados com 6 a 7 mL de uma solução de xilocaína 2% com epinefrina (Cristália, Brasil).Uma incisão de aproximadamente 0,75cm foi realizada na pele do voluntário utilizando um bisturi para incisões delicadas (número 11) (SwannMorton®,Reino Unido). Uma agulha específica para biopsia muscular (DL MICOF, Brasil) foi inserida na incisão e, após a sucção promovida por uma pressão, criada por uma seringa descartável de 20 ml acoplada a uma mangueira, uma amostra de aproximadamente 50 a 100 mg de tecido muscular esquelético foi coletada. A amostra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada na sequência em ultrafreezer -80°C. Após a biópsia, pressão manual com gaze estéril (Neve, Brasil) foi aplicada ao local e a pele coberta com fita cirúrgica (Cremer®, Brasil) (FIGURA 4).

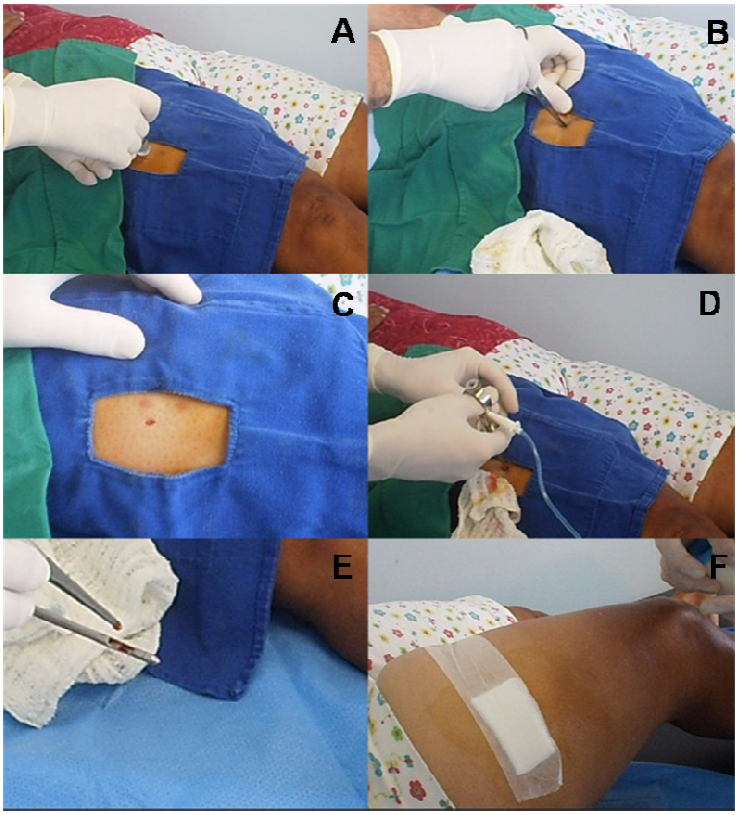

Figura 4- Procedimento de biópsia do músculo vasto lateral. A- anestesia. B e C incisão. D- inserção da agulha de biópsia. E- amostra de tecido coletada. F- curativo no local da incisão.

5.4.2 Sessão de exercício aeróbico

Os voluntários receberam as mesmas orientações pré-teste da avaliação do VO_2pico e realizaram um desjejum padronizado (valor energético total 249 Kcal; 60,6% de carboidratos, 17,3% de proteína e 22,4% de gordura) 2 horas antes do início da sessão. Ao chegar à Santa Casa, uma amostra de urina do voluntário foi coletada, e o estado de hidratação analisado utilizando-se um refratômetro portátil (Biobrix, 301). Considerou-se como euhidratado o voluntário que apresentou valores da gravidade específica da urina inferior a 1030sg (ARMSTRONG *et al*, 1998). Em seguida, o voluntário permaneceu em repouso na posição supina por 30 minutos, em uma maca.

Após o período de repouso, aproximadamente 10mL de sangue foram coletados por punção da veia antecubital, em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As amostras de sangue foram utilizadas para fenotipagem das células sanguíneas (seção 5.4.3).

Após a coleta de sangue, o voluntário deslocou-se para a bicicleta ergométrica, que estava ajustada de acordo com sua estatura, para realização do exercício experimental. Inicialmente, o voluntário realizou um exercício preparatório, pedalando na bicicleta com uma carga correspondente a 20% da potência máxima atingida no teste de esforço. Na sequência, realizou três séries de 20 minutos a 50% da potência máxima atingida no teste de esforço físico máximo (aproximadamente 60% do pico de consumo de oxigênio), separadas por um período de repouso passivo de 5 minutos. Nos primeiros 10 minutos da segunda série do exercício analisou-se o consumo de oxigênio para verificação da intensidade do exercício. Quando necessário, a potência do exercício foi ajustada para assegurar que o mesmo fosse realizado na intensidade pré-determinada. Ao final das três séries de exercício o voluntário realizou um período de recuperação ativa pedalando a 20% da potência máxima no teste de esforço físico durante 3 minutos.

A cada 5 minutos de exercício foram registradas a frequência cardíaca, monitorada por um cardiofrequencímetro (RS800cx, Polar, Finlândia). A cada 10 minutos foram registradas a temperatura ambiente e umidade relativa do ar. A ingestão de líquido, *ad libitum,* ocorreu nos períodos de intervalo entre as séries. Ao final do exercício foi realizada a segunda biópsia muscular e coleta de sangue venoso.

5.4.3 Determinação da expressão e fosforilação de proteínas no músculo esquelético

5.4.3.1 Extratos protéicos

Amostras de músculos (aproximadamente 50mg) foram lisadas por maceração, no gelo, em 100µl de tampão de lise (Triton X1001%; Tris 1M pH 8,0; glicerol 20%; EDTA 0,2 mM) contendo inibidores de protease (*Complete Protease Inhibitor Cocktail,*Roche, Germânia) e fosfatase (*PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail*, Roche, Germânia). Os lisados foram centrifugados a 2700*xg*, durante 20 minutos, a 4^0C e o sobrenadante contendo as proteínas foi coletado.

5.4.3.2 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas nos extratos foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD,1976) utilizando-se a albumina de soro bovino (BSA)(1mg/mL) como padrão. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (SpectranMax®190, Molecular Devices, EUA) e os valores de proteína, em mg/mL, determinados pelo *software* Softmaxpro® (V5.4, Molecular Devices, EUA).

5.4.3.3 Fracionamento eletroforético

As amostras foram diluídas em tampão Laemmli (QualityBiological Inc., MD, EUA) na proporção de 1:1 e fervidas por 2 a 4 minutos. Aproximadamente 50 a 150 µg das proteínas totais foram fracionados em gel de poliacrilamida (de 8 a 12%, dependendo do peso molecular da proteína a ser analisada conforme descrito na tabela 1) contendo duodecil sulfato de sódio (20%) (SDS-PAGE). As amostras foram distribuídas de modo pareado, onde grupos, constituídos por um voluntário eutrófico, obeso e obeso resistente a insulina, foram formados de acordo com o gênero e idade. Aos géis foram também aplicados 8 µL do padrão de peso molecular (*Page Ruler Protein Ladder*, Fermentas, EUA), além de controles positivos para algumas proteínas (p-JNK e p-IRS-1). A eletrofororese foi realizada a 90V, por aproximadamente 18 horas, a uma temperatura entre 4 e 8°C.

Tabela 1- Concentração do gel SDS-PAGE de acordo com o peso molecular da proteína alvo.

Proteína alvo	**Peso molecular (kDa)**	**% gel**
HSP70	72, 73	10
GAPDH (14C10)	37	10
SAPK/JNK	46, 54	12
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	46, 54	12
IRS-1 (59G8)	180	8
Phospho-IRS-1(Ser612) (C15H5)	180	8

5.4.3.4 Transferência das proteínas e bloqueio

Inicialmente, a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Milipore, EUA) foi ativada por cinco segundos em metanol (100%), seguida da lavagem em água. Os géis foram colocados sobre a membrana de PVDF, previamente umedecida em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%) gelado, onde foi montado o aparato para a transferência. A transferência foi realizada a uma amperagem constante de 350mA, durante 2 horas, a 4ºC. Após a transferência, as membranas foram coradas com *Ponceau* 0,1% para visualização da eficiência do procedimento. As membranas foram lavadas para retirada do corante e bloqueadas com BSA5% em tampão contendo tampão tris salina (TBS)-*tween* 0,1% (NaCl 5M, Tris 1M, pH 7,6 e *tween*-20 0,1%), por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação.

5.4.3.5 Reação com anticorpos e revelação

As membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 min com TBS-*tween* 0,1% e incubadas com anticorpos primários (1:1000) a 4ºC, sob agitação, por aproximadamente 18 horas. As membranas foram lavadas novamente em TBS-*tween* 0,1%, 3 vezes, 5 min, e incubadas por 120 minutos a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (1:2000) ligado à peroxidase. Após três sessões de lavagens, por 5 min com TBS-*tween* 0,1% as membranas foram incubadas em solução ECL (*enhanced chemiluminescence*) por 15 minutos, protegidas da luz. Na sequência, as membranas foram expostas ao filme de raio x (Hyperfilm,Amersham, EUA) que foram revelados utilizando-se revelador e fixador (RP X-Omat, Kodak, EUA), de acordo com recomendações do fabricante. A relação dos anticorpos utilizados está descrita na Tabela 2.

O *software Image* J (1.45s,Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland) foi usado para processar e analisar as densidades das bandas. A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizada como normalizador na análise da expressão da Hsp70. A p-JNK foi normalizada pela JNK total e a p-IRS-1 pelo IRS-1 total.

Tabela 2- Relação dos anticorpos utilizados para detecção das proteínas do músculo esquelético.

Anticorpo	**Tipo**	**Fonte**	**# catálogo***
HSP70	policlonal	Coelho	4872
SAPK/JNK	policlonal	Coelho	9252
Phospho-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)	policlonal	Coelho	9251
IRS-1 (59G8)	monoclonal	Coelho	2390
Phospho-IRS-1(Ser612) (C15H5)	monoclonal	Coelho	3203
GAPDH (14C10)	monoclonal	Coelho	2118
Anti-coelho IgG ligado a HRP		Cabra	7074

Cell Signaling. HRP: *Horseradish peroxidase*

5.4.4 Análise do fenótipo de leucócitos do sangue periférico

O fenótipo de linfócitos e monócitos do sangue periférico foi determinado por marcação de antígenos de superfície específicos, por citometria de fluxo, utilizando sangue total. Para isso, aproximadamente 50 µL de sangue periférico foram incubados por 30 minutos, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, com anticorpos monoclonais (TABELA 3), dirigidos contra moléculas expressas na superfície de leucócitos, conjugados com os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrinacianina-5 (PECy5) ou proteína clorofila peridinina (PerCP). Como controle de isotipo uma amostra de sangue foi incubada por igual período com imunoglobulinas de rato anti-camundongo dos mesmos isotipos dos anticorpos utilizados. Após a incubação, foi realizada uma lavagem (7 minutos, *200xg*) com 1mL de tampão fosfato salina (PBS 0,015 M pH 7,4). Quando anticorpos biotinilados foram utilizados, após esta etapa foi realizada a marcação com estreptavidina conjugada com FITC (SA-FITC) (10µl, 1:20) por 30 minutos, ao abrigo da luz. Na sequência as preparações marcadas com SA-FITC foram novamente lavadas (7 minutos, *200xg*).

Tabela 3- Relação dos anticorpos utilizados nos experimentos de citometria de fluxo.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	# catálogo*
anti-CD14	PerCP	MφP9	340585
anti-CD3	PECy5	HIT3a	555341
anti-CD56	PE	B159	555516
anti-CD16	FITC	3G8	560996
anti-CD3-biotinilado	SA-FITC	HIT3a	555338
anti-CD8	PECy5	MOPC-21	560662
anti-CD4	PE	RPA-T4	555347
anti-CD25	FITC	M-A251	560990

* BD Biosciences

Em seguida, para lise das hemácias foi adicionado 1mL de solução de lise eritrocitária às amostras, e estas foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Na sequência as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS por centrifugação a 200xg, 7 min, 4°C. O precipitado de leucócitos foi então ressuspenso em 150µL de PBS e fixado pela adição de 150µL de paraformaldeído 4%. As amostras foram mantidas a 4° C por até 48 horas para posterior leitura em citometria de fluxo, utilizando o FACScan (Becton&Dickenson, EUA) com aquisição de pelo menos 30.000 eventos na região de linfócitos e monócitos (R1 e R2).

Os dados adquiridos na citometria de fluxo foram analisados utilizando o programa Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Inicialmente, as populações de interesse, linfócitos (R1) e monócitos (R2), foram identificadas em gráficos de distribuição pontual de tamanho (dispersão frontal - FSC –*Forward Scatter*) em função da granulosidade (dispersão lateral - SSC- *Side Scatter*) como ilustrado na figura 5.

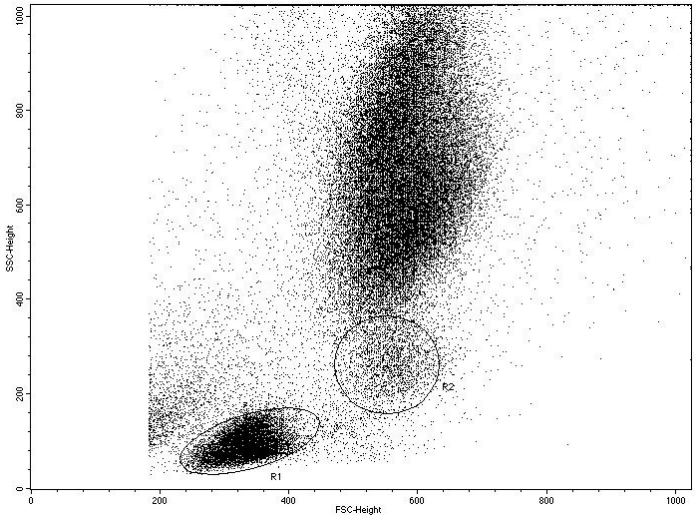

Figura 5- Estratégia de análise das subpopulações leucocitárias. Gráfico de distribuição pontual FSC x SSC, onde estão delimitados os linfócitos (R1) e monócitos (R2).

A delimitação dos quadrantes para quantificação da frequência das diferentes subpopulações de linfócitos T e monócitos foi determinada a partir do posicionamento das células marcadas com os controles de isotipo em gráficos pontuais de FL1 x FL3 e FL2 x FL3, de maneira que 99% das células ocupassem o quadrante inferior esquerdo (FIGURA 6).

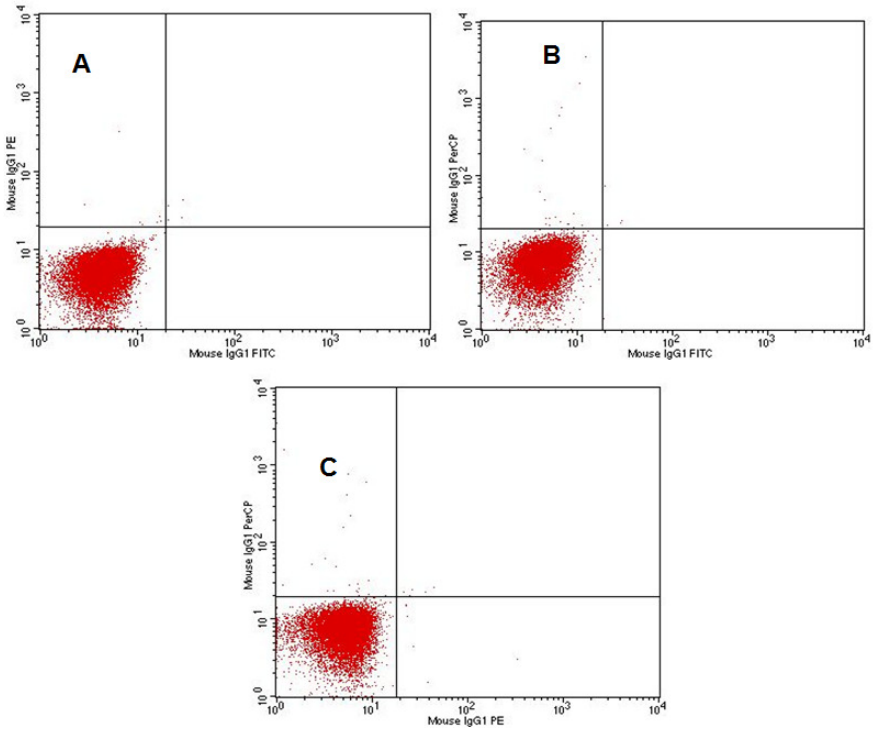

Figura 6- Delimitação dos quadrantes a partir do posicionamento das células marcadas com os controles de isotipo. FITC x PE (A); FITC x PerCP (B); PE x PerCP (C).

A partir dos eventos em R1 foram construídos gráficos pontuais de fluorescência 2 (FL2) versus fluorescência 3 (FL3) para determinar a frequência de linfócitos T auxiliares ($CD3^+CD4^+$) (FIGURA 7A) e de fluorescência 3 (FL2) versus fluorescência 1 (FL1) para determinar a frequência de linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) (FIGURA 7B). Também foi determinada na população de linfócitos auxiliares a frequência de células $CD25^+$. Para isso a partir de R1 foi construído um histograma de FL3 (FIGURA7C), onde foram delimitadas as células $CD3^+$ (R3)a partir das quais foi determinada a frequência de células $CD4^+CD25^+$ (FIGURA7D) em gráficos pontuais de FL2 x FL1.

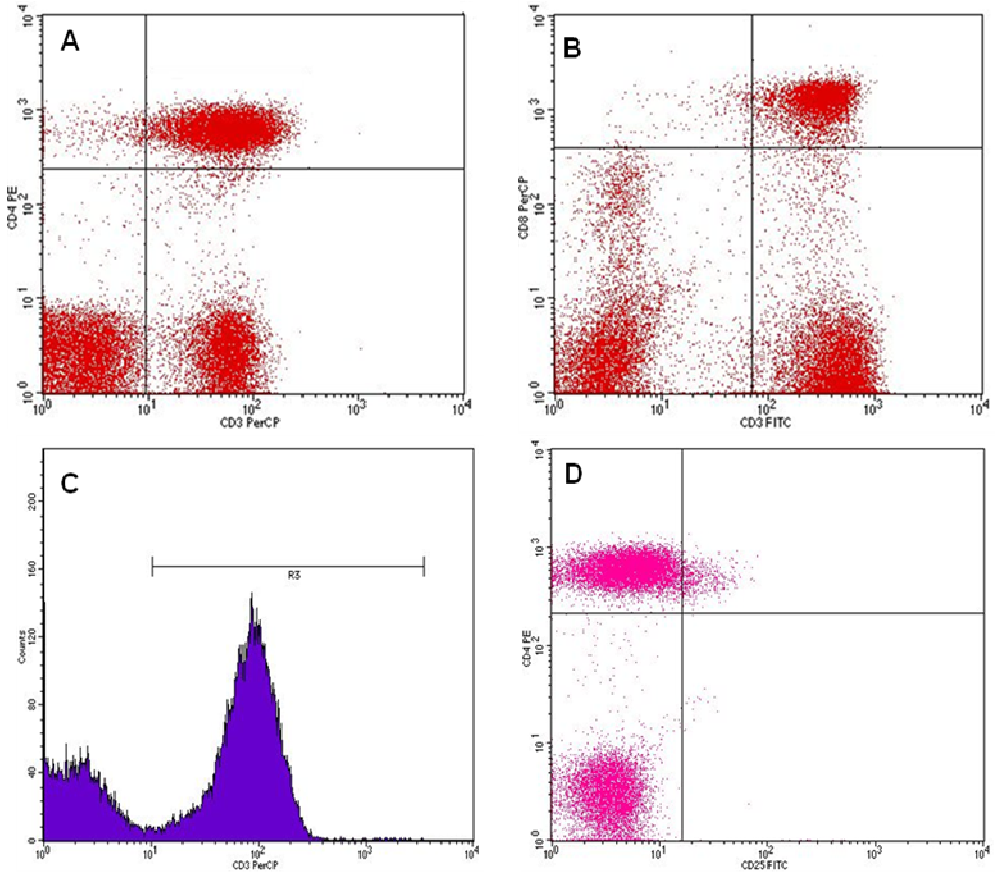

Figura 7- Estratégia de análise das subpopulações linfocitárias. (**A**) Gráfico CD3PerCP x CD4PE para identificação dos linfócitos auxiliares ($CD3^+CD4^+$). (**B**) Gráfico CD3FITC x CD8PerCP para identificação dos linfócitos citotóxicos ($CD3^+CD8^+$). (**C**) Histograma para identificação das células $CD3^+$ delimitadas pelo marcador R3. (**D**) Gráfico CD25FITC x CD4PE para identificação das células $CD4^+CD25^+$ contidas em R3.

Para quantificação da frequência de diferentes subpopulações de monócitos foram construídos gráficos pontuais de CD14 (FL3) por CD16 (FL1) a partir de R2. A partir desses foi determinada a frequência de monócitos clássicos $CD14^+CD16^-$ (M1), intermediários $CD14^{++}CD16^+$ (M2) e não clássicos $CD14^+CD16^{++}$ (M3) (FIGURA 8).

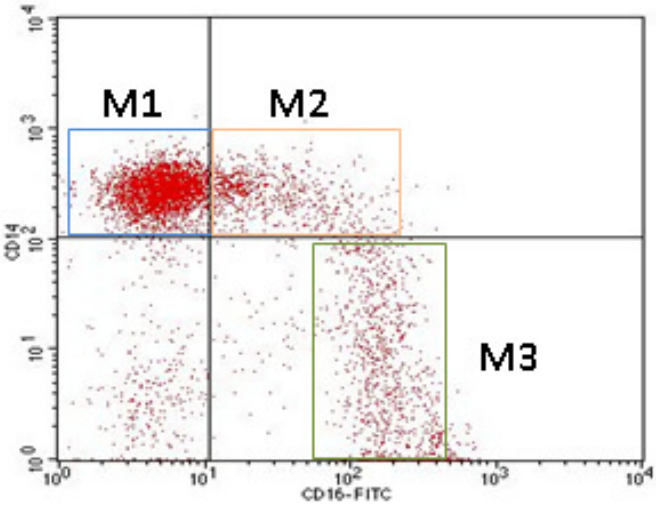

Figura 8- Estratégia para quantificação da subpopulação de monócitos. Gráfico CD14PerCP x CD16FITC para identificação das células $CD14^{+}CD16^{-}$ (M1), $CD14^{++}CD16^{+}$ (M2) e $CD14^{+}CD16^{++}$ (M3).

5.4.5 Análise estatística

Para análise estatística dos dados utilizou-se o *software* Statistica (v8.0, StatSoft, Inc) . O n da amostra foi estimado com base no estudo de O'Leary *et al*. (2006), sendo utilizada a variável insulina plasmática em jejum. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. Para comparar os dados de caracterização entre os grupos foi utilizada a análise de variância simples (*one-way* ANOVA). Para avaliar o efeito do exercício sobre os parâmetros estudados, nos diferentes grupos, utilizou-se a análise de medidas repetidas (*two-way* ANOVA). Em ambas as análises os testes foram seguidos de *post hoc* de Tukey. Utilizou-se o teste de correlação de Pearson para avaliar a correlação entre as subpopulações de monócitos e as variáveis IMC, CC, triglicérides, insulina, HOMA1-IR e a correlação entre a expressão muscular da HSP70, ativação da JNK e níveis de insulina. Foi utilizado nível de significância de $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

Os dados da caracterização dos voluntários estão apresentados na tabela 4. Cada grupo experimental foi constituído por 9 voluntários, sendo três do gênero masculino e seis do gênero feminino. Os valores referentes à idade, estatura, VO_{2pico} e potência não foram diferentes entre os grupos.

Em relação aos dados antropométricos, os grupos OB e OBR não apresentaram diferenças nos valores de peso corporal, IMC, percentual de gordura e circunferência da cintura, mas esses valores foram maiores, em ambos os grupos, comparados ao grupo CTRL. Em relação às análises bioquímicas, também não houve diferenças entre os três grupos para os dados de glicose, colesterol total, HDL e LDL plasmáticos. Observou-se que o grupo OBR apresentou maiores valores de triglicérides, VLDL e insulina, assim como um maior valor do índice HOMA1-IR em relação aos demais grupos.

Tabela 4- Dados da caracterização dos voluntários participantes do estudo.

Variáveis	CTRL n=9	OB n=9	OBR n=9	p
Gênero (H/M)	3/6	3/6	3/6	-
Idade (anos)	37 ± 7	38 ± 9	40 ± 8	0,91
Massa corporal(kg)	63,2 ± 12,6	88,3 ± 13,6*	96,3 ± 16,6*	<0,001
Estatura (cm)	166,0± 11,0	162,0 ± 12,0	166,0± 12,0	0,72
IMC (kg/m^2)	22,7 ± 2,3	33,6 ± 2,9*	34,8 ± 2,7*	<0,001
Percentual gordura (%)	23,9 ± 5,9	34,2 ± 7,3*	35,5 ± 5,1*	<0,001
CC (cm)	72,9 ± 8,4	95 ± 6,0*	104,1 ± 10,9*	<0,001
VO_2 (ml/(min*kg))	27,1 ± 5,1	24,3 ± 5,0	23,1 ± 4,0	0,46
Potência (watts)	132 ± 62	151 ± 75	151 ± 56	0,60
Insulina (µU/mL)	5,0 ± 1,6	9,0 ± 2,0	20,2 ± 5,4**	<0,001
Glicose (mg/dL)	80,0 ± 5,0	83,0 ± 8,0	83,0 ± 10,0	0,14
HOMA1-IR(mmol)(µU)/L^2	1,0 ± 0,3	1,8 ± 0,5	4,1 ± 1,0**	<0,001
Colesterol total (mg/dL)	179,0 ± 31,0	189,0 ± 32,0	217,0± 26,0	0,13
LDL (mg/dL)	107,0± 37,0	123,0 ± 34,0	135,0 ± 18,0	0,44
HDL (mg/dL)	57,0± 21,0	45,0 ± 8,0	46,0 ± 9,0	0,32
VLDL (mg/dL)	16,7 ± 6,1	20,9 ± 9,8	35,2 ± 16,0**	0,02
Triglicérides (mg/dL)	83,0 ± 31,0	104,0 ± 49,0	176,0 ± 76,0**	0,03

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão.* diferença entre OB e OBR do CRTL. ** diferença entre grupo OBR e os grupos CRTL e OB. **CTRL**: eutrófico; **OB**: obeso; **OBR**: obeso resistente a insulina; IMC: índice de massa corporal. CC: circunferência da cintura. HOMA1-IR: modelo de avaliação da homeostase. LDL: lipoproteína de baixa densidade. HDL: lipoproteína de alta densidade. VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade.

Nesse estudo foi avaliado o efeito de uma sessão de exercício físico aeróbico sobre os componentes moleculares e celulares que poderiam participar do desenvolvimento da resistência a insulina relacionada à obesidade. Durante a realização da sessão de exercício físico os valores médios de temperatura ambiente (p=0,17) e umidade relativa do ar (p=0,4) foram semelhantes para os três grupos (OBR: 23,8 ± 0,64°C e 70,1 ± 6,4%; OB: 23,4 ± 0,9°C e 73,5 ± 9,4%; CTRL: 22,8 ± 0,9°C e 75,8 ± 9,3%).

Conforme o protocolo de exercício adotado a potência desenvolvida durante o exercício foi próxima a 50% da potência máxima para todos os grupos (CTRL: 49,1± 4,7%; OB: 50,6±2,2% e OBR: 51,5±8,9%), assim como o consumo de oxigênio próximo aos 60% do VO_{2pico} (CTRL: 64,3±4,6%; OB: 62,6±8,7% e OBR: 61,1±11,1%).

As coletas de amostra muscular para análise da expressão e fosforilação de proteínas no músculo esquelético foram realizadas em dias diferentes, na situação de repouso e após o exercício físico. O intervalo médio entre a primeira e segunda biópsia, em dias, nos grupos foi: CTRL: 14 (10 a 23); OB: 29 (6 a 68) e OBR: 28 (17 a 46). Já o intervalo médio entre o término do exercício e a realização da biópsia, em minutos, foi: CTRL: 27 (13 a 34); OB: 28 (19 a 34); OBR: 21 (12 a 35).

Na figura 9 estão representados os dados da fosforilação da JNK1/2, nas situações basal, e após a sessão de exercício. A fosforilação da JNK1/2 foi maior nos grupos OB (p=0,03) e OBR (p<0,001), comparados ao grupo CTRL. E entre os grupos OB e OBR a fosforilação da proteína foi maior no grupo OBR (p<0,001). Após o exercício constatou-se redução na fosforilação da JNK1/2 no OBR (p= 0,001). Para os grupos CTRL (p=0,93) e OB (p=0,95) não houve efeito do exercício.

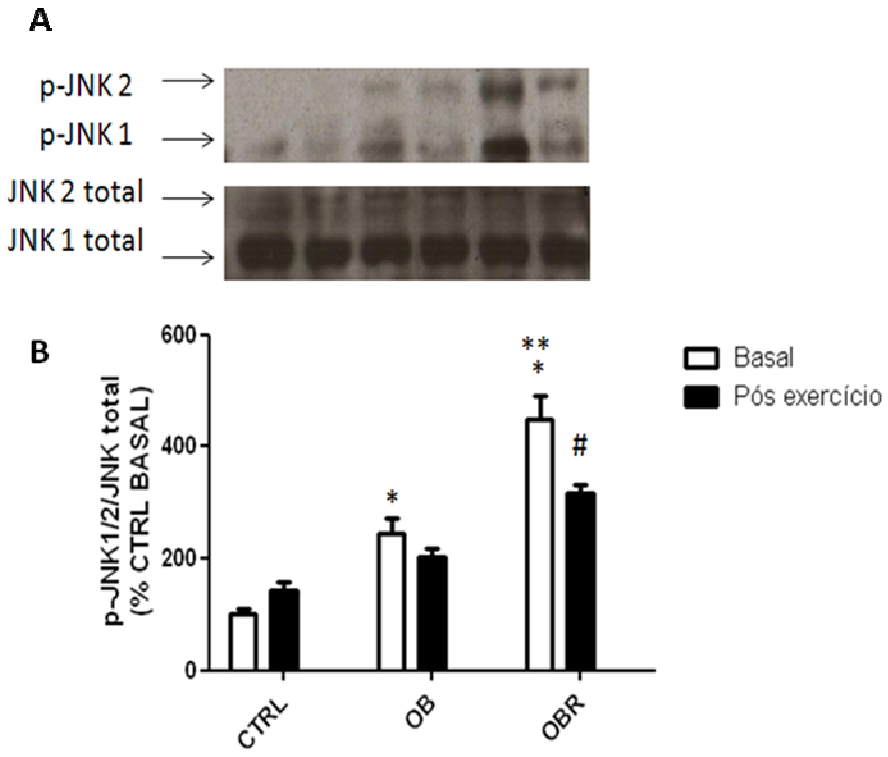

Figura 9- Blot representativo de 1 voluntário de cada grupo (**A**) e dados da ativação da JNK1/2 (**B**) nos grupos CTRL, OB e OBR nas situações basal e após exercício. Os dados estão expressos como média ± erro padrão,

considerando o CTRL como 100%. n= 8, para cada grupo. *diferença do OB e OBR comparado ao CTRL; **diferença entre OB e OBR. #diferença entre OBR basal e OBR após o exercício.

Na figura 10 estão representados os dados relativos à fosforilação do IRS-1 na ser^{612} na situação basal e após a sessão de exercício. Observou-se uma maior fosforilação do IRS-1 na ser^{612} nos grupos obesos comparados ao controle (p< 0,001). Ao se comparar os grupos de obesos, não houve diferença na fosforilação do IRS-1 ser^{612}(p= 0,96). Observou-se uma redução na fosforilação do IRS-1 na ser^{612} após a sessão de exercício para os grupos OB (p<0,001) e OBR (p= 0,002). Não se observou efeito do exercício no grupo CTRL (p=1,0).

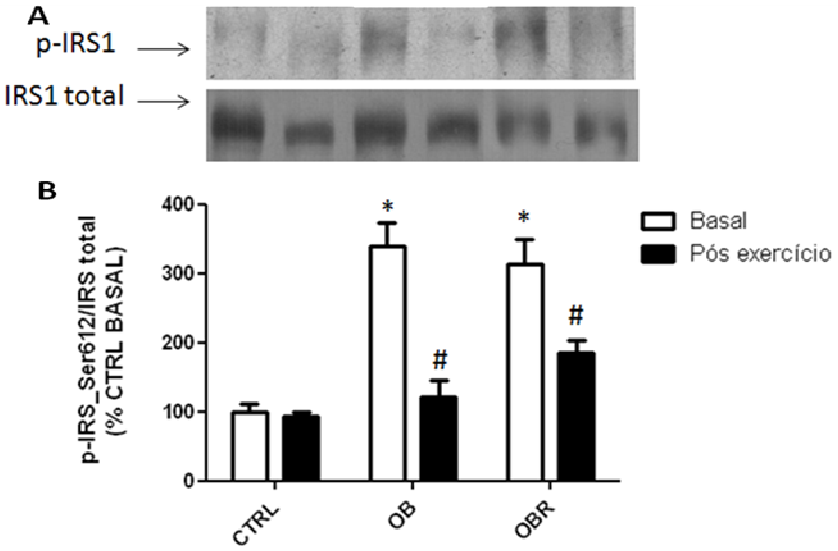

Figura 10- Blot representativo de 1 voluntário de cada grupo (**A**) e dados da fosforilação do p-IRS-1 ser^{612} (**B**) nos grupos CTRL, OB e OBR, nas situações basal e após exercício. Os dados estão expressos como média ± erro padrão, considerando o CTRL como 100%. n= 5 para cada grupo. *diferença do OB e OBR versus CTRL.#diferença entre OBR e OB ao se comparar as situações basal e após exercício.

Na figura 11 estão representados os dados da expressão muscular da HSP70 (Hsp72/73) nas situações basal e após a sessão de exercício. Os grupos OB e OBR apresentaram uma menor expressão da proteína em relação ao grupo CTRL (p< 0,001) e os voluntários do grupo OB apresentaram uma maior expressão da HSP70, comparados aos voluntários do grupo OBR (p= 0,006). Observou-se uma maior expressão da proteína após a sessão de exercício físico nos grupos em conjunto (p= 0,007). Não houve interação entre os fatores (p= 0,90).

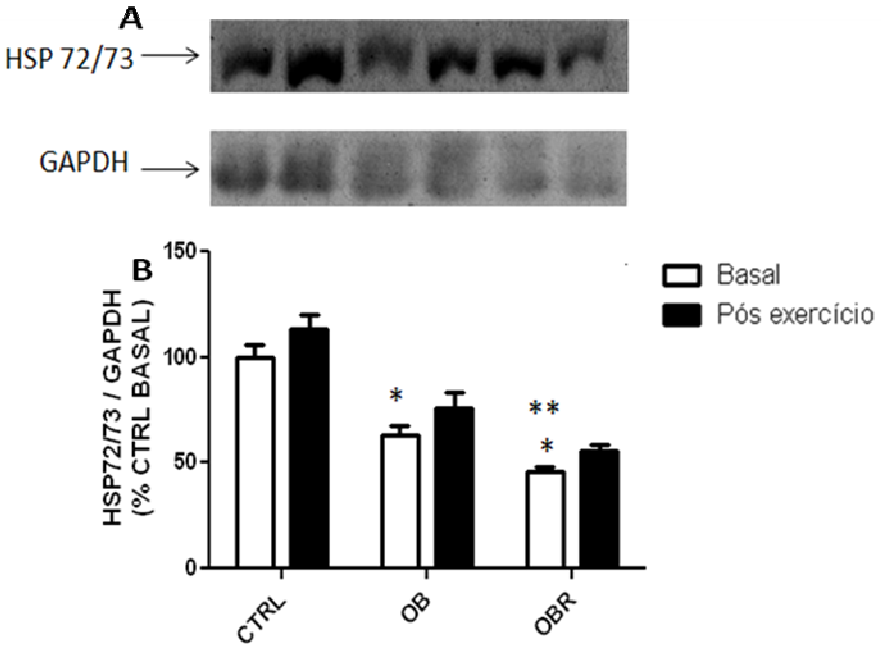

Figura 11- Blot representativo de 1 voluntário de cada grupo (**A**) e quantificação da expressão das proteínas Hsp72/73 (**B**) nos grupos CTRL, OB e OBR nas situações basal e após exercício. Os dados estão expressos como média ± erro padrão, considerando o CTRL como 100%. n= 8, para cada grupo. *diferença do OB e OBR comparado ao CTRL. **diferença entre OB e OBR.

Observou-se uma correlação positiva entre a expressão basal da JNK e os níveis de insulina de jejum (p= 0,0006 e r= - 0,6870) e uma correlação negativa entre a ativação da JNK e expressão da HSP70 (p= 0,0016 e r=0,6872) (FIGURA 12).

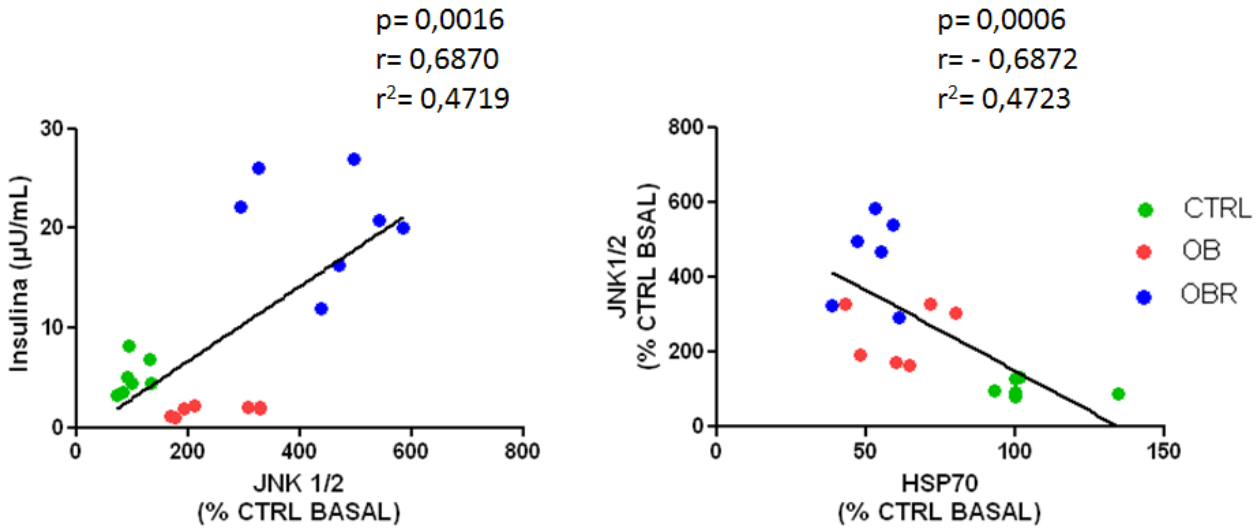

Figura 12- Correlação entre a ativação da JNK e níveis de insulina (**A**) e entre a ativação da JNK e expressão da HSP70 (**B**).

Foram feitas análises da frequência das subpopulações leucocitárias nas situações basal e após o exercício. O tempo médio em minutos da coleta de sangue após o exercício nos grupos foi: CTRL: 66 (59 a 81); OB: 62 (45 a 74) e OBR: 56 (30 a 65).

As frequências das subpopulações de linfócitos T auxiliares ($CD3^+CD4^+$) e T citolíticos ($CD3^+CD8^+$) estão representadas na figura 13. Não foi observada diferença na frequência basal de linfócitos auxiliares (p= 0,19) e citolíticos (p= 0,75) entre os grupos. Na população de células $CD3^+CD4^+$ foi analisada ainda a frequência de linfócitos $CD25^+$. Não houve diferença entre os grupos (p= 0,17). Os valores nas situações basal e após exercício foram os seguintes: OBR: 3,26±0,79% e 3,59±0,90%; OB: 2,99±0,77% e 2,83±0,93%; CTRL: 3,65±1,05 e 3,63±0,88%, respectivamente.

Observou- se após o exercício uma redução da frequência dos linfócitos $CD3^+CD4^+$ (p< 0,001) analisando os grupos em conjunto. Não houve diferença na frequência das células $CD3^+CD8^+$ (p=0,25) e $CD3^+CD4^+$ $CD25^+$ (p= 0,5) em resposta ao exercício.

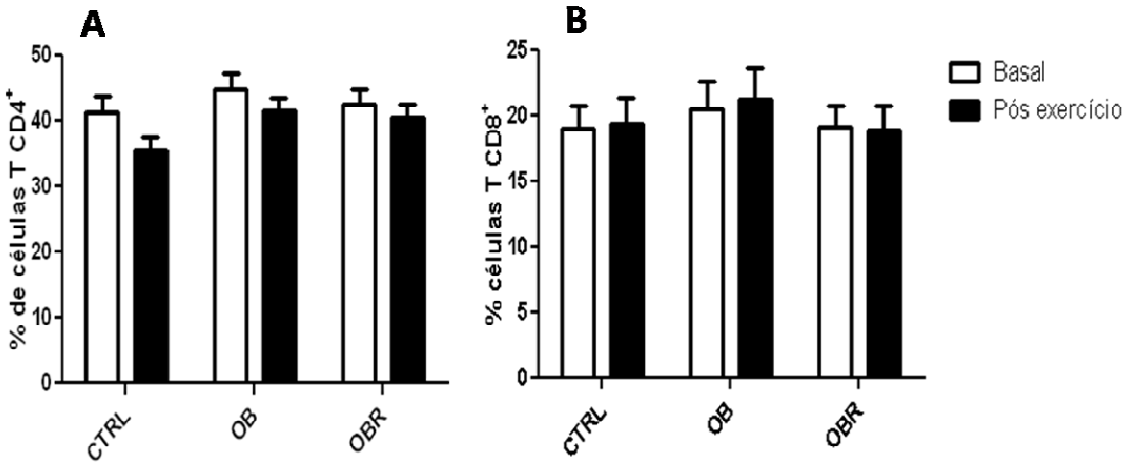

Figura 13- Percentual de linfócitos T $CD4^+$ (A) e T $CD8^+$ (B) nas situações basal e após exercício. Dados expressos como média ± erro padrão para os grupos CTRL (n= 8), OB (n= 9) e OBR (n= 8).

Na figura 14 estão apresentados os dados da frequência das subpopulações de monócitos clássicos $CD14^{++}CD16^-$ (A), intermediários $CD14^{++}CD16^+$ (B) e não clássicos $CD14^+CD16^{++}$ (C). A frequência dos monócitos intermediários ($CD14^{++}CD16^+$) foi maior no grupo OBR (p= 0,013) comparado ao CTRL. Observou-se uma redução da frequência dessas células após o exercício (p= 0,003). Não houve interação entre os fatores (p= 0,060). Para as subpopulações $CD14^{++}CD16^-$ (monócitos clássicos) e $CD14^+CD16^{++}$ (monócitos não

clássicos) não foi observado diferença entre os grupos (p= 0,57 e p= 0,074, respectivamente) e nem efeito do exercício (p=0,924 e p=0,615, respectivamente).

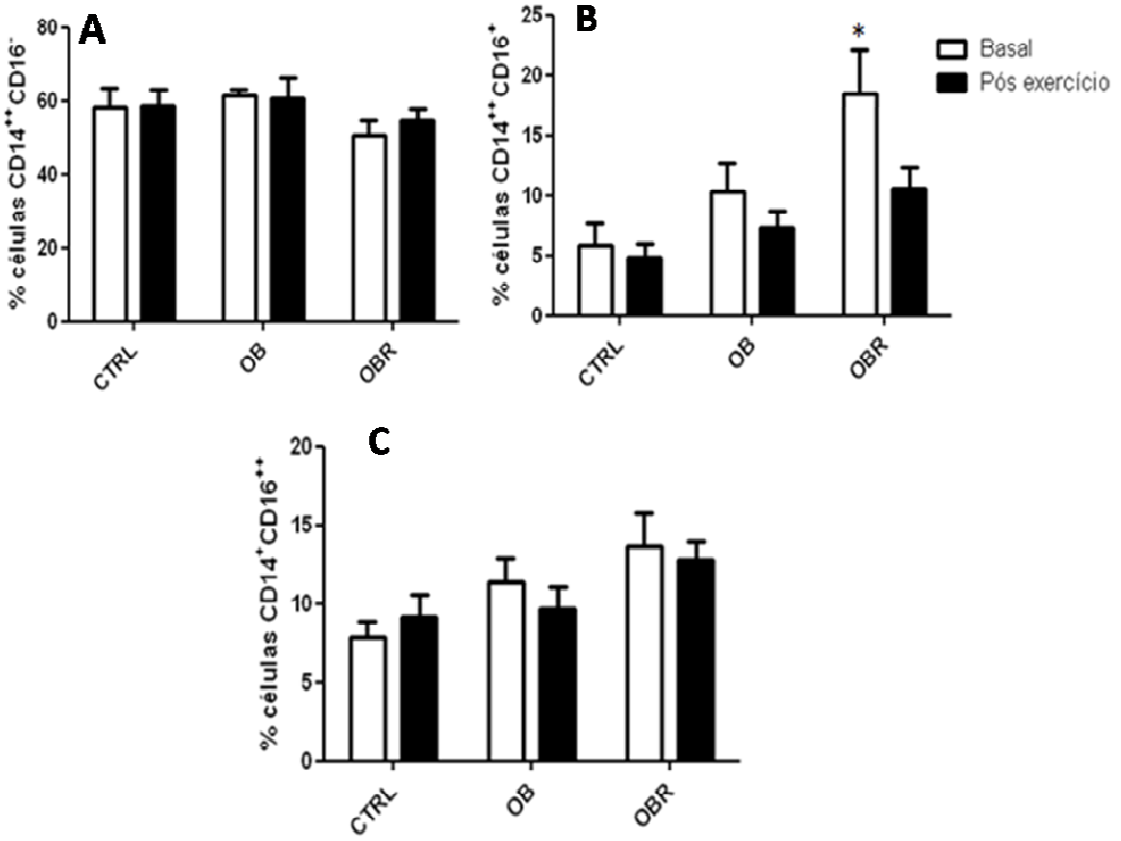

Figura 14- Percentual das subpopulações de monócitos clássicos ($CD14^{++}$ $CD16^{-}$) (**A**), intermediários ($CD14^{++}$ $CD16^{+}$) (**B**) e não clássicos ($CD14^{+}CD16^{++}$) (C) nas situações basal e após o exercício. Dados expressos como média ± erro padrão para os grupos CTRL (n= 7), OB (n= 8) e OBR (n= 8). *diferença entre OBR (p= 0,013) e CTRL.

Foram realizadas correlações entre a frequência de subpopulações de monócitos $CD14^{++}CD16^{+}$, $CD14^{+}CD16^{++}$ e $CD14^{++}CD16^{-}$ com variáveis bioquímicas e antropométricas (TABELA 5). Observou-se correlação positiva entre a frequência de monócitos intermediários ($CD14^{++}CD16^{+}$) e o percentual de gordura e circunferência da cintura. Para a frequência de monócitos não clássicos ($CD14^{+}CD16^{++}$) encontrou-se uma correlação positiva em relação aos níveis plasmáticos de triglicérides. Por fim, foi observada correlação negativa entre a frequência de monócitos clássicos ($CD14^{++}CD16^{-}$) e a circunferência da cintura. Para as demais variáveis não houve correlações.

Tabela 5- Correlações das subpopulações de monócitos com variáveis bioquímicas e antropométricas.

Variáveis	**% células $CD14^{++}CD16^{+}$**		**% células $CD14^{+}CD16^{++}$**		**% células $CD14^{++}CD16^{-}$**	
	R	*P*	*R*	*p*	*R*	*P*
Percentual de gordura (%)	0,311	0,006*	0,000	0,925	0,1222	0,094
IMC (kg/m^2)	0,030	0,404	0,0737	0,189	0,0687	0,205
Insulina (µU/mL)	0,010	0,628	0,115	0,098	0,0295	0,414
HOMA1-IR(mmol)(µU)/L^2	0,010	0,630	0,093	0,137	0,0197	0,508
Triglicérides (mg/dl)	0,017	0,567	0,224	0,01*	0,0321	0,396
CC (cm)	0,380	0,002*	0,107	0,137	-0,2840	0,011*

*correlação significativa. CC: circunferência da cintura

Foi avaliado o efeito do exercício físico, no dia seguinte a sessão de exercício, nas variáveis glicose e insulina de jejum e índice HOMA1-IR, que foram comparados com os valores obtidos na caracterização. Não houve efeito do exercício nessas variáveis (TABELA 6).

Tabela 6- Dados de glicose, insulina e HOMA1-IR na caracterização e no dia após a realização do exercício.

	OBR		**OB**		**CTRL**		**P**
	Antes	**Depois**	**Antes**	**Depois**	**Antes**	**Depois**	
Glicose	83,0±6,4	88,0 ±7,1	83,0 ± 8,2	81,0 ± 9,9	80,0 ±4,6	79,0 ± 4	0,2
Insulina	20 ±9,7	19,4 ± 1,8	8,7 ± 2,0	9,2 ± 2,8	5,1 ±1,6	4,4 ± 2,1	0,76
HOMA1-IR	4,1±2,3	4,2 ± 0,7	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,6	0,9 ± 0,5	0,7 ± 0,4	0,8

Dados estão expressos como média ± desvio padrão. Glicemia: (mg/dl); insulina: µU/mL HOMA1-IR: (mmol)(µU)/L^2.

7 DISCUSSÃO

Este estudou avaliou o efeito de uma sessão de exercício físico aeróbico em componentes celulares e moleculares que podem estar envolvidos no desenvolvimento da resistência a insulina relacionada à obesidade. Nosso estudo foi o primeiro a avaliar a resposta de uma sessão de exercício físico aeróbico em humanos eutróficos sensíveis a insulina, obesos sensíveis e resistentes a insulina nos seguintes componentes: frequência de células imunes circulantes, na expressão da HSP70, ativação da JNK e fosforilação de um resíduo de serina do IRS-1 no músculo esquelético. Observamos que obesos resistentes a insulina apresentam maior frequência de monócitos intermediários e que obesos sensíveis e resistentes a insulina apresentam menor expressão da HSP70, maior fosforilação da JNK e do IRS-1 $ser6^{12}$ comparados a eutróficos. O principal achado desse estudo é que uma sessão de exercício físico foi suficiente para reduzir a frequência dos monócitos intermediários e aumentar a expressão muscular da HSP70 nos voluntários avaliados em conjunto. Além disso, reduziu a ativação da JNK nos obesos resistentes a insulina e a fosforilação da serina 612 do IRS-1 nos grupos de obesos.

Os leucócitos sanguíneos podem apresentar frequência e/ou ativação afetados por diversas situações que envolvam estresse celular. A sobrecarga lipídica e a inflamação de baixo grau presentes na obesidade são dessa forma potentes estímulos para o sistema imune. Considerando que o exercício físico é uma ferramenta capaz de atuar sobre esse sistema, nós avaliamos a frequência das diferentes subpopulações de linfócitos e monócitos antes e após uma sessão de exercício. No presente estudo não observamos diferença na frequência das células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ entre os grupos estudados. Ao contrário de nossos achados, O'Rourke *et al.*, (2005) reportaram uma maior frequência de células $TCD4^+$ e redução na frequência de células $TCD8^+$, ao se comparar indivíduos obesos mórbidos com controle eutróficos, resultados que também foram descritos por Weerd *et al.*, (2012). De maneira semelhante Lynch *et al.*, (2008) observaram uma menor frequência de células T $CD8^+$ em indivíduos obesos mórbidos, embora não tenham verificado diferença na frequência de linfócitos T $CD4^+$. Diferente do presente trabalho, os estudos citados envolveram indivíduos com obesidade mórbida (IMC > $40kg/m^2$) e que apresentavam comorbidades associadas a obesidade (diabetes, apnéia do sono, hipertensão, osteoartrite, doença arterial coronariana e refluxo gastresofágico) e/ou faziam uso de medicamentos (hipoglicemiantes, anti-hipertensivos, antiinflamatórios, anticolesterolémico e hormônio da tireóide). Já os indivíduos que participaram do presente estudo não reportaram qualquer doença crônica ou aguda, assim

como não utilizavam medicamentos, além de apresentarem obesidade moderada ou de grau 1 (IMC = 33,6 kg/m^{2}e 34,8 kg/m^2 nos resistentes e sensíveis a insulina, respectivamente). As únicas alterações metabólicas, do nosso conhecimento, referem-se a maiores níveis de insulina, triglicérides e VLDL plasmáticos no grupo de obesos resistentes a insulina. Isso sugere que as alterações relatadas pelos autores citados podem ser decorrentes não somente da obesidade em si, mas das doenças associadas. Esta hipótese é sustentada pelos achados de Lynch *et al*., (2008) que demonstraram que a redução na frequência de células TCD8$^+$ foi maior nos obesos não saudáveis metabolicamente comparado com o grupo de indivíduos obesos metabolicamente saudáveis.

Em relação à frequência das diferentes subpopulações de monócitos observamos que obesos resistentes a insulina apresentaram uma maior frequência de monócitos CD14^{++}CD16$^+$ em relação aos eutróficos e que a frequência dessa subpopulação foi correlacionada positivamente com o percentual de gordura e circunferência da cintura. Embora não observarmos diferença significativa entre os grupos na frequência das outras subpopulações de monócitos (CD14$^+$CD16^{++} e CD14^{++}CD16$^-$) houve uma tendência de maior frequência das células CD14$^+$CD16^{++} (p= 0,07) nos obesos resistentes a insulina. Adicionalmente encontramos uma correlação positiva entre as células CD14$^+$CD16^{++} com a concentração plasmática de triglicérides e uma correlação negativa entre as células CD14^{++}CD16$^-$ com a circunferência da cintura. Poitou *et al*. (2011) reportaram aumento da frequência das subpopulações de monócitos CD14$^+$CD16$^+$ (CD14$^+$CD16^{++} e CD14^{++}CD16$^+$) em indivíduos obesos mórbidos com um incremento da subpopulação CD14$^+$CD16^{++} em obesos mórbidos diabéticos. Os autores sugeriram que pelo menos na obesidade mórbida, a glicemia aumentada poderia ser um parâmetro de regulação das células CD14$^+$CD16^{++}. Poitou *et al*. (2011) ainda observaram que a redução da frequência de células CD14$^+$CD16^{++} em obesos mórbidos que perderam peso foi correlacionada com redução da massa gorda. Adicionalmente, Rogacev *et al*. (2010) reportaram que a alta frequência de monócitos CD16$^+$ foi associada com maior IMC.

Acreditamos que a maior frequência dos monócitos CD14^{++}CD16$^+$ nos obesos resistentes a insulina possa estar relacionada às alterações do perfil lipídico observadas nesse grupo. O prejuízo na sinalização da insulina aumenta a lipólise no tecido adiposo, resultando em aumento na concentração plasmática de ácidos graxos livres. No fígado, os ácidos graxos livres servem como substrato para a síntese de triglicérides. Além disso, esses ácidos graxos estabilizam a produção da apoliproteína B (apoB), que está presente na partícula de

lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL), resultando em maior produção de VLDL. Adicionalmente, a insulina degrada a apoB por uma via dependente da PI3K. Assim a resistência a insulina aumenta diretamente a produção de VLDL. A insulina também regula a atividade da lipoproteína lipase, mediadora da depuração do VLDL (HUANG, 2009). Dessa forma, a maior concentração plasmática de triglicérides e VLDL nos obesos resistentes a insulina, pode ser o resultado da disfunção da sinalização da insulina. Uma questão que pode suportar o papel da lipemia na maior frequência desses monócitos se refere à presença em sua superfície de receptores do tipo *Toll*, que funcionam como co-receptores de lipídios e a capacidade elevada de monócitos CD16 positivos na captação de colesterol LDL oxidado (MOSIG *et al*., 2008). Em resumo, os nossos resultados indicam que a disfunção da via de sinalização da insulina promove alterações do perfil lipídico e, esse estado de lipemia aumentada pode estimular os monócitos $CD14^{++}CD16^{+}$, que são células que apresentam um perfil funcional inflamatório.

Ao avaliar-se o efeito do exercício sobre as células imunes circulantes, constatou-se que 1 hora após o exercício houve redução da frequência dos monócitos intermediários ($CD14^{++}CD16^{+}$) e dos linfócitos auxiliares (T $CD4^{+}$), considerando todos os voluntários, independente do grupo em que foram alocados. Existem poucos estudos que avaliaram o efeito do exercício físico nas diferentes subpopulações de leucócitos e não foi encontrado nenhum estudo realizado com indivíduos obesos, sensíveis ou resistentes a insulina. Dado similar ao do presente estudo foi reportado por Simpsos *et al*., (2009) que avaliaram a frequência de monócitos antes, imediatamente após e 1 hora após um exercício com duração de 45 minutos a 75% do $VO_{2máx}$ em homens moderadamente treinados. Os autores reportaram que a frequência de células $CD14^{+}CD16^{+}$ foi 49% menor uma hora após o exercício e foi associada com mudanças nas células $CD14^{++}CD16^{+}$, sem mudanças nas células $CD14^{+}CD16^{++}$. A menor frequência dos monócitos $CD14^{++}CD16^{+}$ após o exercício sugere que monócitos intermediários são preferencialmente marginalizados ou removidos da circulação durante a fase de recuperação do exercício, talvez para tecidos periféricos, baço ou áreas de inflamação (SIMPSOS *et al*., 2009).

O músculo esquelético é responsável por cerca de 70 a 80% da captação de glicose, exercendo um importante papel no controle da homeostase glicêmica (De FRONZO *et al*., 1981). Justifica-se dessa forma, a análise de componentes musculares envolvidos no mecanismo de resistência a insulina relacionada à obesidade. Nesse estudo nós observarmos que a ativação da JNK1/2 foi maior nos grupos obesos, com um aumento ainda maior nos

voluntários obesos resistentes à insulina. Observamos, ainda, a presença de uma correlação positiva entre os níveis de insulina e a ativação muscular da JNK. A fosforilação aumentada da JNK na obesidade e resistência a insulina já foi reportada em estudos realizados em humanos e animais. Hirosumi *et al*. (2002) reportaram, em modelos de obesidade genética e induzida por dieta, maior ativação da JNK1 nos tecidos muscular, adiposo e hepático. Já Chung *et al.* (2008) observaram uma maior ativação da JNK1/2 no músculo de indivíduos obesos resistentes a insulina comparado com indivíduos eutróficos saudáveis.

A ativação da JNK nos tecidos sensíveis a insulina é considerada como uma das possíveis causas da resistência a insulina relacionada à obesidade. No estudo de Hirosumi *et al*., (2002) animais *knockout* para JNK ($JNK1^{-}/^{-}$)não desenvolveram resistência a insulina induzida pela obesidade. Já Zhang *et al*., (2011) observaram que camundongos com supressão seletiva da JNK1/2 no tecido adiposo, e que receberam uma dieta rica em lipídios, apresentaram redução no ganho de peso, massa de gordura e tamanho do adipócito. Esses animais foram resistentes aos impactos deletérios da dieta sobre a sensibilidade a insulina, tolerância a glicose e esteatose hepática. Adicionalmente, Sabio *et al*. (2010) reportaram que camundongos com deficiência músculo-específica da JNK1 (MKO) apresentaram melhora da sensibilidade a insulina comparado aos selvagens. Observaram ainda que a ativação da Akt estimulada pela insulina é suprimida no músculo, fígado e tecido adiposo dos animais selvagens, enquanto nos animais MKO essa supressão ocorreu no fígado e tecido adiposo, demonstrando que a JNK1 no músculo contribui para a resistência a insulina em resposta a obesidade induzida pela dieta.

Alguns mecanismos são propostos para explicar a maior ativação da JNK relacionada à obesidade. A obesidade é associada com uma inflamação crônica de baixo grau e maior expressão de citocinas infamatórias, como o TNF-α, que ativam esta quinase (DAVIS *et al*., 2000; UYSAL *et al*., 1997). Outros mecanismos consideram a participação dos ácidos graxos livres que estão aumentados na obesidade. Uma alimentação rica em lipídios ou a exposição *in vitro* de células a ácidos graxos causam estresse do retículo endoplasmático e indução da resposta a proteínas desdobradas, levando a ativação da JNK1 (URANO *et al*., 2000; HOTAMISLIGIL, 2010). Além disso, ácidos graxos saturados podem atuar como ligantes para receptores do tipo *Toll* que ativam a via da JNK (SHI *et al*., 2006; TSUKUMO *et al*., 2007). Por fim, ácidos graxos podem ativar a via da JNK pela ativação de proteínas quinases de linhagem mista (MLK), mediada pela PKC e pela proteína que interage com a JNK1 (JIP1) (JAESCHKE *et al*., 2004; JAESCHKE *et al*., 2007). De acordo com Sabio e Davis (2010) a

contribuição relativa de cada mecanismo e suas inter-relações permanecem a ser determinadas. Embora não tenhamos realizado medidas dos níveis de citocinas e ácidos graxos livres, é possível que ambos estejam envolvidos na ativação da JNK no nosso modelo de estudo, e consequentemente no desenvolvimento da resistência a insulina. Pudemos constatar que o grupo de obesos resistentes a insulina apresentou um perfil de monócitos compatível com um quadro de inflamação, refletido por uma maior frequência das células $CD14^{++}CD16^{+}$, que produzem grande quantidade de TNF-α. Além disso, os obesos resistentes a insulina apresentaram níveis elevados de triglicérides e VLDL, o que sugere que o metabolismo lipídico está alterado nesse grupo, contribuindo para a atividade ainda maior da JNK nesses indivíduos.

Devemos considerar ainda que a maior ativação da JNK nos obesos resistentes a insulina comparado aos obesos sensíveis a insulina pode ter uma contribuição do maior nível de insulinemia desses indivíduos. Isso porque, na fase inicial da resistência a insulina, as células beta pancreáticas podem compensar essa resistência por uma secreção aumentada de insulina. No entanto, a persistência da hiperinsulinemia pode prejudicar a ação da insulina, devido à ativação de mecanismos contra regulatórios envolvidos na dessensibilização do efeito da insulina sobre a captação de glicose. A insulina induz, por meio da ativação de quinases, como a ERK e a JNK, a fosforilação de resíduos de serina/treonina do IRS-1 o que pode ser um mecanismo fisiológico para regular a sinalização à insulina (PAZ *et al*., 1999; GREENE *et al*., 2002). Em um estado de hiperinsulinemia, esse mecanismo pode ser alterado e participar do desenvolvimento da resistência a insulina na obesidade ou diabetes tipo 2 (GUAL*et al*., 2003). Bandyopadhyay *et al*. (2005), por exemplo, observaram em obesos e diabéticos com hiperinsulinemia uma alta fosforilação basal da JNK-1, ERK-2 e p38. Dessa forma, uma maior ativação basal da JNK pode estar relacionada com uma maior concentração plasmática de insulina, juntamente com os estímulos inflamatórios e lipídicos.

O mecanismo proposto para o desenvolvimento da resistência a insulina pela maior atividade de quinases relacionadas ao estresse baseia-se na capacidade dessas quinases em fosforilar resíduos de serina do IRS-1, inibindo a via de sinalização da insulina. Como exemplo, a fosforilação pela JNK do resíduo de serina 307 (312 em humanos) do IRS-1 impede a interação entre o receptor de insulina e o IRS-1 (AGUIRRE *et al*., 2000; AGUIRRE *etal*., 2004; LEE *et al*., 2003; BANDYOPADHYAY *et al*., 2005). Existem mais de 70 resíduos de serina no IRS-1 que podem ser fosforilados e regular negativamente a sinalização

da insulina. No presente estudo, nós observamos aumento da forma fosforilada do IRS-1 na serina 612, nos grupos de obesos comparados ao grupo controle eutrófico.

Morino *et al*. (2008) para avaliarem o papel da fosforilação da serina em mediar a resistência a insulina no músculo induzida pela dieta, geraram camundongos transgênicos onde as serinas 302, 307 e 612 do IRS-1 foram substituídas por alaninas (Tg IRS-1Ser3Ala). Os camundongos Tg IRS-1 Ser3Ala foram protegidos da resistência a insulina, como refletido por redução da concentração de glicose durante o teste de tolerância a glicose e aumento da captação de glicose estimulada pela insulina no *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico. Além disso, os animais também mostraram um aumento da associação entre o IRS-1 e a subunidade p85 da PI3K. Essa maior interação entre o IRS-1 e PI3K pode ser devida à mutação Ser612-Ala612, uma vez que esse resíduo se localiza próximo a dois resíduos de tirosina (Tyr608 e Tyr628), que são importantes locais de fosforilação envolvidos na ligação à PI3K (MOTHE *et al*., 1996; RAVICHANDRAN *et al*., 2001; ESPOSITO *et al*., 2001; ROCCHI *et al*., 1995). Ressalta-se, contudo, que existe um grande número de outros resíduos de serina que podem ser fosforilados, sugerindo que a função do IRS-1 é modulada de maneira complexa, e que aconteça uma combinação da fosforilação de vários resíduos de serina para o desenvolvimento da resistência a insulina (YIET *et al*., 2007).

Nós observamos que a expressão muscular basal da HSP70 nos obesos sensíveis a insulina foi menor em relação aos indivíduos eutróficos, e que essa expressão foi ainda menor nos voluntários obesos resistentes a insulina. Chung *et al*. (2008) encontraram que obesos resistentes a insulina, comparados a eutróficos, apresentaram uma menor expressão muscular da Hsp72. Recentemente, Henstridge *et al*., (2010) reportaram que a expressão da Hsp72 no músculo esquelético foi inversamente relacionada ao percentual de gordura corporal, independente da idade e gênero, em humanos. Entretanto, o presente estudo é o primeiro a demonstrar que obesos com sensibilidade a insulina preservada já apresentam uma redução na expressão muscular da HSP70 comparado a indivíduos eutróficos. Esse achado pode indicar que a redução da expressão da HSP70 antecede o surgimento da resistência a insulina.

Em uma revisão recente, Geiger e Gupte (2011) sugerem que o bloqueio da resposta da HSP e a redução na expressão dessa proteína em tecidos resistentes a insulina poderia ser resultado de uma inibição do fator de transcrição de choque térmico 1 (HSF-1). O HSF-1, na sua forma inativa, encontra-se no citoplasma e apresenta os resíduos de serina fosforilados. A desfosforilação dos resíduos de serina do HSF-1 causa sua translocação para o núcleo,

trimerização, ligação aos elementos de choque térmico (HSE) e transcrição do RNAm das HSPs. A hiperatividade de quinases do estresse, capazes de fosforilar os resíduos de serina do HSF-1 podem reprimir a ativação desse fator em tecidos resistentes a insulina. Quinases como a quinase glicogênio sintase 3 (GSK3), a ERK e a JNK fosforilam o HSF-1 em resíduos de serina específicos, o que o torna inativo e reduz a síntese da Hsp70 (KLINE e MORIMOTO, 1997). Neste contexto, Dai *et al*., (2000), a partir de estudos *in vitro*, observaram que a JNK fosforila a serina 363 do HSF-1 suprimindo a atividade de transcrição desses fator. Essa fosforilação causa a dispersão do HSF-1 dos locais de transcrição mais rapidamente após o choque térmico, o que interfere na síntese das proteínas. Interessantemente, a expressão da Hsp70 apresentou um comportamento inverso à ativação da JNK1/2 no músculo esquelético, evidenciado pela correlação negativa observada entre essas variáveis.

Desta forma, nossos achados suportam os dados da literatura referentes a uma maior ativação da JNK, fosforilação do IRS-1 em um dos resíduos de serina e menor expressão da HSP70 no músculo esquelético de indivíduos obesos resistentes a insulina. Adicionalmente, nossos resultados demonstram que obesos classificados como sensíveis a insulina já apresentam alterações nesses componentes. Considerando as alterações da expressão da HSP70 e fosforilação da JNK e IRS-1ser^{612} na obesidade e resistência a insulina nós avaliamos se os mesmos poderiam ser modulados por uma sessão de exercício físico. Nossos resultados demonstraram que, ao analisarmos os três grupos em conjunto, uma sessão de exercício físico aeróbico promoveu aumento da expressão muscular da HSP70. Além disso, houve redução da ativação muscular da JNK1/2 nos obesos resistentes a insulina e da fosforilação do IRS-1 na ser^{612} nos dois grupos de obesos, mas para níveis ainda superiores aos dos indivíduos eutróficos.

Nos estudos de Oliveira *et al*., (2011) e Ropelle *et al*., (2006) animais com obesidade induzida por dieta e resistentes a insulina realizaram uma sessão de exercício de natação em 2 séries de 3 horas. Após o exercício os animais receberam uma injeção de insulina pela veia porta. Os resultados encontrados incluíram aumento da sensibilidade a insulina, redução da fosforilação da JNK (Thr183/Tyr185), IKKβ e do IRS-1 na ser^{307}. Adicionalmente, Schenk e Horowitz (2007) observaram que uma sessão de exercício físico a 65% do VO_{2pico} durante 90 minutos protegeu indivíduos saudáveis contra a resistência a insulina induzida pela infusão de lipídios. Os autores reportaram redução da atividade das vias de estresse, evidenciada por uma menor ativação da JNK e da via IKK/NFκB no músculo esquelético.

Alguns estudos têm sugerido que a indução da Hsp72 muscular interfere na atividade da JNK e resulta em um aumento da sensibilidade a insulina (CHUNG *et al*., 2008; GUPTE *et al*., 2009). No estudo de Chung *et al*., (2008) foram utilizados diferentes meios para induzir a expressão muscular da Hsp72: exposição ao calor, indução farmacológica (BGP-15) ou superexpressão gênica. Em todas as situações o aumento na expressão de Hsp72 protegeu os camundongos que recebiam uma dieta rica em gordura do desenvolvimento da resistência a insulina. Em outro estudo, a indução da Hsp72 através da exposição ao calor promoveu, em ratos que receberam uma dieta com alto teor de gordura, melhora da tolerância a glicose (GUPTE *et al*., 2009). Nesses estudos a indução da Hsp72 foi associada com uma redução na ativação da JNK e da IKK-β, sugerindo, dessa forma, um papel potencial da Hsp72 em bloquear vias de sinalização relacionadas à resistência a insulina no contexto da obesidade.

Alguns estudos *in vitro* demonstraram a existência de uma atividade inibitória da Hsp72 sobre a JNK. Gabai *et al*. (1997) utilizaram uma linhagem de células de leucemia U937 (nessas células a ativação de JNK parece ser essencial para apoptose por choque térmico, radiação ultravioleta e estresse oxidativo) e uma linhagem de células linfóides PEER (alta produção da Hsp72 sob controle da tetraciclina). Essas células foram pré-aquecidas e, após um período, aquecidas novamente e observou-se redução da atividade da JNK nas células previamente expostas ao calor. Adicionalmente, Hee-Sae *et al*., (2001) observaram que o pré-tratamento de células adiposas NIH 3T3 com choque térmico (43°C, 20 minutos) e a superexpressão constitutiva da Hsp72 suprimiu a atividade da JNK1 estimulada pela radiação ultravioleta. Existem alguns mecanismos propostos para o efeito inibitório da Hsp72 sobre a ativação de JNK. A ligação direta entre a Hsp72 e a JNK poderia prevenir a ativação da JNK por quinases com a SAPK/Erk quinase 1 (SEK1) e quinase de MAP quinase 7 (MKK7) (PARK *et al*., 2001). A interação entre as proteínas também pode inibir a atividade enzimática da JNK ou inibir a interação entre a JNK e seu substrato, o c-Jun. Outros mecanismos incluem a capacidade de Hsp72 em agir sobre fosfatases que inibem a JNK como as MAP quinase fosfatase-1 (MKP-1) e MKP-3 ou que ativam a JNK, como a quinase com zíper de leucina duplo (DLK) (MERIIN *et al*., 1999; DAVIAU *et al*., 2006).

Embora tenhamos observado que o exercício físico foi capaz de modificar a expressão da HSP70 e a ativação da JNK, não podemos afirmar se essas alterações foram suficientes para promover melhora na sensibilidade a insulina no músculo esquelético, já que não realizamos essa medida. O que propomos foi utilizar um protocolo de exercício semelhante a outros protocolos descritos em estudos que observaram melhora na sensibilidade a insulina,

mas que não investigaram os componentes moleculares potencialmente envolvidos. É importante salientar ainda que os diversos estímulos que podem induzir a expressão da HSP70, como elevação da temperatura, estresse oxidativo ou distúrbios metabólicos (depleção de ATP e glicogênio, redução pH) (NOBLE, MILNE e MELLING, 2008; FEBBRAIO *et al*., 2002, OISHI *et al*., 2002) ativam também outras vias, que podem culminar na melhora da sensibilidade a insulina. Dessa forma, embora os achados do presente estudo sugerem o envolvimento da HSP70 na modulação da sensibilidade a insulina na obesidade, não podemos afirmar que o efeito isolado da HSP70, bloqueando a ativação da JNK, promova esse efeito.

Nesse estudo nós utilizamos o índice HOMA1-IR para determinar à presença de resistência a insulina. Esse índice é um modelo matemático que se baseia no equilíbrio entre as concentrações plasmáticas de insulina e glicose no estado de jejum. Reflete o balanço entre a produção hepática de glicose e a secreção de insulina, que é mantido por uma retro-alimentação entre as células hepáticas e as células beta do pâncreas (TURNER *et al*., 1979). Em várias condições que são caracterizadas pela resistência a insulina periférica, a resistência a insulina hepática é também evidente (De FRONZO *et al*., 1991; BONORA *et al*., 1992; Del PRATO*et al*., 1993). Vários estudos que investigaram a utilização do índice HOMA1-IR reportaram ser esse teste um bom preditor da sensibilidade periférica a insulina (EMOTO *et al*., 1999; BONORA *et al*., 2000). De acordo com Wallace *et al*. (2004) o índice HOMA já se tornou uma medida utilizada em diversos estudos clínicos e epidemiológicos para avaliação da resistência a insulina, sendo citado em mais de 500 publicações. Nós observamos que o valor do índice HOMA1-IR no dia seguinte a realização da sessão de exercício não foi modificado. Ressalta-se que esse teste não parece ser uma medida sensível para detectar mudanças na sensibilidade a insulina muscular decorrente de uma sessão de exercício, já que reflete o balanço entre a produção hepática de glicose e a secreção de insulina.

No intuito de continuarmos a investigar o efeito do exercício físico em componentes celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento da resistência a insulina na obesidade, o nosso grupo de pesquisa está realizando um estudo onde avaliamos o efeito de um programa de treinamento físico aeróbico de 12 semanas em obesos resistentes e sensíveis a insulina na expressão da HSP70 e ativação de diversas quinases relacionadas ao estresse.

A figura a seguir ilustra as modificações celulares e moleculares encontradas em indivíduos obesos sensíveis e resistentes a insulina, comparados a eutróficos e o efeito de uma

sessão de exercício físico aeróbico nesses componentes nos três grupos avaliados (FIGURA 15).

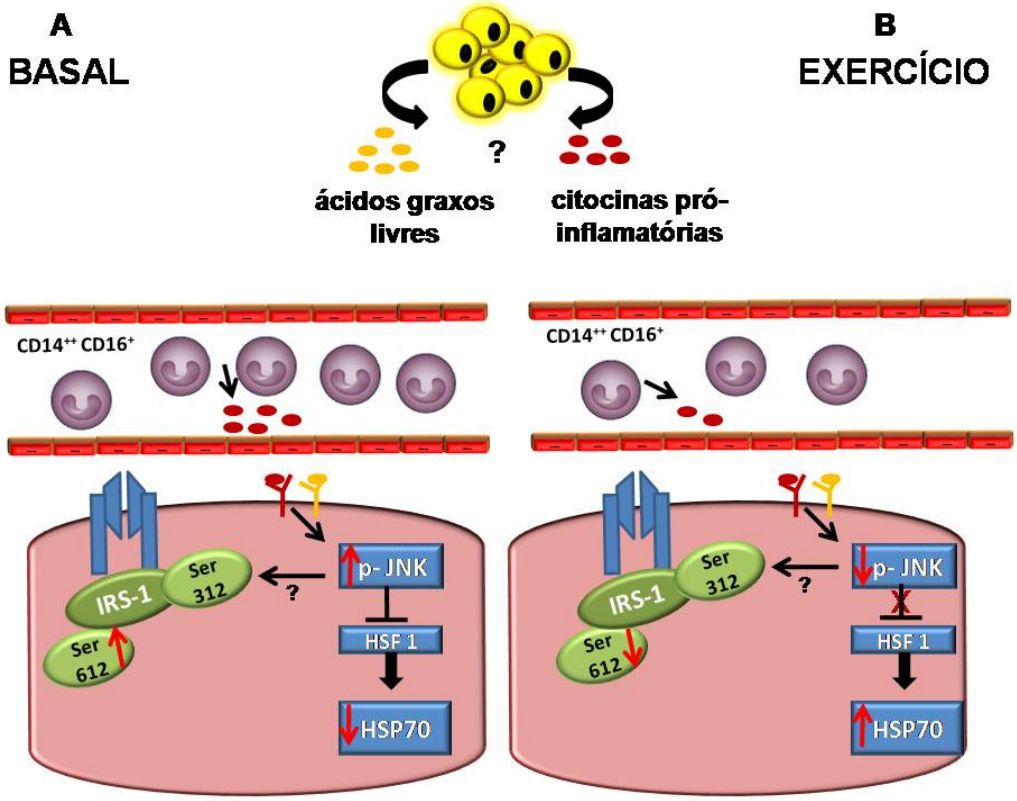

Figura 15- Na obesidade observa-se uma maior quantidade de ácidos graxos livres e citocinas pró-inflamatórias que atuam a nível sistêmico e muscular, desencadeando diversas alterações que culminam no desenvolvimento da resistência a insulina. (**A**) Indivíduos obesos resistentes a insulina apresentam uma maior frequência de monócitos intermediários ($CD14^{++}CD16^{+}$), que produzem grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias. No músculo esquelético ocorre uma maior fosforilação do IRS-1 no resíduo de serina 612, maior fosforilação da JNK e menor expressão da HSP70 nos obesos sensíveis e resistentes a insulina. Os ácidos graxos e citocinas são alguns dos estímulos que ativam a JNK que fosforila o resíduo de serina 312 do IRS-1 (não avaliado) (**B**) Uma sessão de exercício físico aeróbico promove redução da frequência dos monócitos intermediários nos três grupos em conjunto, que podem ser uma fonte de citocinas pró-inflamatórias, envolvidas na ativação da JNK. No músculo esquelético observa-se redução da ativação da JNK nos obesos resistentes a insulina, redução da fosforilação do IRS-1 na serina 612 nos grupos de obesos e aumento da expressão da HSP70 nos voluntários dos três grupos avaliados conjuntamente.

8 CONCLUSÃO

Uma sessão de exercício físico aeróbico promoveu alterações que caracterizam redução da inflamação e/ou estresse (reduções da frequência de monócitos intermediários, da fosforilação da JNK, fosforilação inibitória do IRS-1 e aumento da expressão HSP70 muscular) que podem contribuir na modulação da sensibilidade a insulina pelo exercício físico aeróbico.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2006.

AMORIM, F. e POPE L. Moseley. P.L. Heat Shock Protein and Inflammation.Heat Shock Proteins and Whole Body Physiology, v5, 2010.

ANTUNA-PUENTE, B. *et al*. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. Diabetes Metab, v.34, p.2–11. 2008.

ARON-WISNEWSKY, J. *et al*. Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. J Clin Endocrino Metab, v. 94, p. 4619–4623, 2009.

AGUIRRE, V. *et al*. The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. The Journal of Biological Chemistry, v.275, n.12, p.9047-9054, 2004.

AGUIRRE, V. *et al*. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). J BiolChem, v. 275, p. 9047–9054, 2000.

BALADY, G.J. *et al*. Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 239, 2003.

BALDUCCI, S. *et al*. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. Nutrition, Metabolism& Cardiovascular Diseases, p.1-10, 2009.

BANDYOPADHYAY G.K. et al. Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. Diabetes, v.54, p.2351–2359, 2005.

BAUMANN, C.A. *et al*. CAP defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. Nature, v.407, p.202-7, 2000.

BELGE, K.U. et al.Theproinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. J Immunol, v.168, p.3536–42, 2002.

BERGSTROM, J; HULTMAN, E.Muscle glicogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man. Nature Lond, v.210, p. 309-310, 1966.

BLACKBURN, G. Effect of degree of weight loss on health benefits.Obes Res, Suppl 2:211s-216s, 1995.

BONORA, E. *et al*. Homeostasis Model Assessment Closely Mirrors the Glucose Clamp Technique in the Assessment of Insulin Sensitivity-Studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. Diabetes Care, v. 23, p.57–63, 2000.

BOGARDUS, C. et al. Effect of muscle glycogen depletion on in vivoinsulin action in man. J Clin Invest, v.72, p.1605–1610, 1983.

BORG G. Perceived exertion and pain scales. Champaign: Human Kinetics; 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal Biochem, v.72, p.248-54,1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Vigitel Brasil 2010: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

BRUCE, C.R. et al. Intramuscular Heat Shock Protein 72 and Heme Oxygenase-1 mRNA Are Reduced in Patients With Type 2 Diabetes: Evidence That Insulin Resistance Is Associated With a Disturbed Antioxidant Defense Mechanism. Diabetes,v.52, p.2338–2345, 2003.

CALDERWOOD, S. K., MAMBULA, S. S. e GRAY, P. J., Jr. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. Ann N Y Acad Sci, v. 1113, p. 28–39, 2007.

CANCELLO, R. et al:Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. Diabetes, v.54, p.2277–2286, 2005.

CARTEE, G.D. et al. Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise.Am J Physiol Endocriol Metab, v. 256*, p.*E494–E499, 1989.

CASTANO, D; GARCIA, L.F; ROJAS, M. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection.Tuberculosis,v.91, p.348–60. 2011.

CEFALU, W.T. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. ExpBiol Med, v. 226, n.1, p.13-26, 2001.

CINTI, S.*et al*. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. J Lipid Res,v.46, n.11, p.2347-55, 2005.

CHEN, H. Cellular inflammatory responses: Novel insights for obesity and insulin resistance. Pharmacological Research, v. 53, p.469–477, 2006.

CHUNG, J. *et al*. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. PNAS, v.105, n.5, p.1739–1744, 2008.

COLDITZ, G.A. et al. Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. Am J Epidemiol, v.132, p.501–513, 1990.

DAI, R. *et al*. JNK targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity. J BiolChem, v.275, p.18210-18218, 2000.

DANDONA, P. et al. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. J Clin Endocrinol Metab, v. 83, p.2907–2910, 1998.

DAVIAU, A. et al. Down-regulation of the mixed- lineage dual leucine zipper-bearing kinase by heat shock protein 70 and its co-chaperone CHIP. J Biol Chem, v.281, p.31467Y77, 2006.

DAVIS, R.J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.Cell, v.103, p.239–252. 2000.

DE FEA, K e ROTH, R.A. Protein Kinase C Modulation of Insulin Receptor Substrate-1 Tyrosine Phosphorylation Requires Serine 612. Biochemistry, v.36, p.12939-12947, 1997.

DE FRONZO, R.A. *et al*. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: results from direct and indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. Diabetes, v.30, p.1000–1007, 1981.

DE FRONZO, R.A; FERRANNINI, E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care,v.14, p.173-194, 1991.

DEL AGUILA, L.F; CLAFFEY, K.P; KIRWAN, J.P. TNF-α impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. Am J Physiol, v.276, p. E849–55, 1999

DEL PRATO, S. et al. Characterization of cellular defects of insulin action in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. J Clin Invest, *v*.9, p.1:484–494, 1993.

EMOTO, M. et al. Homeostasis Model Assessment as a Clinical Index of Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients Treated With Sulfonylureas. Diabetes Care, v.22, p. 818–822, 1999.

DEVLIN, J; BARLOW, J; HORTON, E. Whole body and regional fuel metabolism during early postexercise recovery.Am JPhysiolEndocrinol Metab,v.256,p.E167–E172, 1989.

DEVLIN J, HIRSHMAN MF, AND HORTON E. Enhanced peripheral and splanchnic insulin sensitivity in NIDDM men after single bout of exercise. Diabetes, v.36, p.434-439, 1987.

ESPOSITO, D.L *et al*. Tyr(612) and Tyr(632) in human insulin receptor substrate-1 are important for full activation of insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and translocation of GLUT4 in adipose cells. Endocrinology, v. 142, p .2833–2840, 2001.

FEBBRAIO, M.A. *et al*. Reduced glycogen availability is associated with an elevation in HSP72 in contracting human skeletal muscle. J Physiol, v. 538, p.911–917, 2002.

FINGERLE, G. et al. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. Blood, v.82, p. 3170-6, 1993.

FRANKENBERGER, M. et al. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. Blood, v.87, p.373–7, 1996.

FRØSIG, C. et al. Exercise improves phosphatidylinositol-3,4,5trisphosphate responsiveness of atypical protein kinase C and interacts with insulin signalling to peptide elongation in human skeletal muscle.J Physiol, V.582, n.3 p.1289-1301, 2007.

GABAI, V.L. *et al*. Hsp70 prevents activation of stress kinases: a novel pathway of cellular thermotolerance. The Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 29, p. 18033-18037, 1997.

GARETTO, L.P. et al. Enhanced muscle glucose metabolism after exercise in the rat: the two phases. Am J Physiol Endocrinol Metab, v. 246, p.E471–E475, 1984.

GEIGER, P.C; GUPTE, A.A: Heat Shock Proteins Are Important Mediators of Skeletal Muscle Insulin Sensitivity. Exercise & Sport Sciences Reviews, v.39, pp 34-42, 2011.

GELONEZE, B. *et al*. The threshold value for insulin resistance (HOMAIR) in an admixtured population.IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. Diabetes Research and Clinical Practice, v.72, p. 219–220, 2006.

GRAGE-GRIEBENOW, E; FLAD, H.D; ERNST, M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. J Leukocyte Biol, v.69, p.11-20, 2001.

GREENE, M.W; GAROFALO, R.S. Positive and negative regulatory role of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1and IRS-2) serine/threonine phosphorylation. Biochemistry, v.41, p.7082–7091, 2002.

GUAL, P. et al. Hyperosmotic stress inhibits insulin receptor substrate-1 function by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. Diabetologia, v.46, p. 1532–1542, 2003.

GUPTE, A.A. et al. Heat Treatment Improves Glucose Tolerance and Prevents Skeletal Muscle Insulin Resistance in Rats Fed a High-Fat Diet. Diabetes, v. 58, p.567–578, 2009.

HEILBRONN, L.K; CAMPBELL, L.V. Adipose Tissue Macrophages, Low Grade Inflammation and Insulin Resistance in Human Obesity. Current Pharmaceutical Design,v.14, p.1225-1230, 2008.

HENSTRIDGE, D.C. *et al*: The relationship between heat shock protein 72 expression in skeletal muscle and insulin sensitivity is dependent on adiposity. Metabolism Clinical and Experimental, 2010.

HIROSUMI, J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance.Nature,v.420, p. 333–336, 2002.

HOOPER, P.L. Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. New Eng J Med, v.341, p.924–925,1999.

HOTAMISLIGIL, G.S. *et al*. Incresead adipose tissue expression of tumor necrosis factor-α in human obesity and insulin resistence. J Clin Invest, v.95, p. 2409-2415, 1995.

HOTAMISLIGIL, G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease.Cell, v.140, p.900–917, 2010.

HUANG, P.L.A comprehensive definition for metabolic syndrome.Dis Model Mech, v.2, p. 231–237, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE): Pesquisa de Orçamentos Familiares (2008-2009). Rio de Janeiro, 2010.

ITANI S.I. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and Iκß-α. Diabetes, v.51, 2005.

JAESCHKE, A; DAVIS, R.J. Metabolic stress signaling mediated by mixed-lineage kinases. Mol Cell, v.27, p.498–508, 2007.

JAESCHKE, A. *et al*. An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue.Genes, v.18, p.1976–1980, 2004.

JUSTIN, I. *et al*. Macrophage-specific PPARγ controls alternative activation and improves insulin resistance. Nature, v. 28; p.1116–1120, 2007.

KALUPAHANA, N.S; MOUSTAID-MOUSSA, N; CLAYCOMBE, K.J.Immunity as a link between obesity and insulin resistance. Mol Aspects Med, v. 33, n.1, p.26-34, 2012.

KAMEI N. *et al*. Overexpression of monocyte chemoattractant protein–1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. J BiolChem, v.281, p.26602-14, 2006.

KANNEL, W.B. et al. Risk Stratification of Obesity as a Coronary Risk Factor.Am J Cardiol, v.90, p.697–701, 2002.

KAWANAKA, N. *et al*. CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, v.46, p.2578–86, 2002.

KIANG JG, TSOKOS GC: Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology.Pharmacol Ther, v.80, n.2, p.183-201, 1998.

KLINE, M.P; MORIMOTO, R.I. Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. Mol Cell Biol, v. 17, p.2107Y15, 1997.

KOPELMAN, P.G: Obesity as a medical problem. Nature, v. 404, n.6, 2000

KURUEZ, I. et al. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistence. Diabetes, v.51, p.1102-1109, 2002.

LEE YH, et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. J BiolChem, v.278, p.2896–2902, 2003.

LIU, Y. et al. Human skeletal muscle HSP70 response to training in highly trained rowers. J ApplPhysiol, v.86, n.1, p.101-104, 1999.

LYNCH, L.A. et al. Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient? Obesity, v.17, n.3, p.601-5, 2009.

MÁCHOVÁ, L. *et al*. The impact of obesity on cardiovascular disease mortality in the District Sumperk, Czech Republic. Int J Public Health, v52, p.255–258, 2007.

MAGALHÃES F.C. et al.Heat and exercise acclimation increases intracellular levels of Hsp72 and inhibits exercise-induced increase in intracellular and plasma Hsp72 in humans.Cell Stress Chaperones, v.15, n.6, p.885-95, 2010.

MANSON, J.E. et al. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med, v. 322, p. 882–889, 1990.

MANTOVANI, A; SICA, A; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. Immunity, v.23, p.344–346, 2005.

MATTHEWS, D.R. *et al*. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia, v. 28, p.412-19, 1985.

MERIIN, A.B. et al. Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72. Mol Cell Biol, 1999.

MIKINES, K.J. et al. Effect of physical exercise on sensitivity and responsiveness to insulin inhumans.Am J Physiol Endocrinol Metab, v. 254,p.E248–E259, 1988.

MIZUNO, C.H. O custo da obesidade no Brasil: A importância da avaliação econômica na tomada de decisão em políticas públicas de prevenção em saúde.Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao bacharelado em Gestão de Políticas Públicas da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

MORINO, K. *et al*. Muscle-Specific IRS-1 Ser3Ala Transgenic Mice Are Protected From Fat--induced insulin resistance in skeletal muscle. Diabetes, v.57, n.10, p.2644-51, 2008.

MOSIG, S. *et al.* Monocytes of patients with familial hypercholesterolemia show alterations in cholesterol metabolism. *BMC* Med Genomics, v. 1, n.60, 2008.

MOSMANN, T.R; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunology Today,v.17, n.3, p.138-146, 1996.

MOSRNANN, T. R; COFFMAN, R. L.TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. Ann Rev Immunol,v. 7, p.145- 73,1989.

MOTHE, I; VAN OBBERGHEN, E: Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 on Multiple Serine Residues, 612, 632, 662, and 731, Modulates Insulin Action. The Journal of Biological Chemistry, v. 271, n. 19, p.11222±11227, 1996.

MYERS, J; BELLIN, D. Ramp exercise protocols for clinical and cardiopulmonary exercise testing. Sports Med, v .30, p.23–29, 2000.

MYERS J. Essentials of cardiopulmonary exercise testing. 1st ed. Champaign, IL: Human Kinetics, 1996.

MEYER, T.N e DA SILVA A. L. Resposta celular ao estresse. Rev Assoc Med Bras, v.45 n.2, 1999.

NGUYEN, M.T.A. *et al*. JNK and Tumor Necrosis Factor-α Mediate Free FattyAcid-induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes. The Journal of Biological Chemistry, v.280, n. 42, p. 35361–35371, 2005.

NISHIMURA, S. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nature Medicine, v.15, n.8, 2009.

NOBLE, E.G; MILNE, K.J; MELLING, C.W.Heat shock proteins and exercise: a primer. Appl Physiol Nutr Metab, v.33, n.5, p.1050-65, 2008.

NORRIS, D.A. *et al*. Isolation of functional subsets of human peripheral blood monocytes. J Immunol, p.123:166, 1979.

ODEGAARD, J.I; CHAWLA, A. Alternative macrophage activation and metabolism.Annu Rev Pathol, v.6, p.275-297, 2011.

OLEFSKY, J.M; GLASS, C.K.Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. Annu Rev Physiol, v.72, p.219-46, 2010.

OLIVEIRA, A.G. et al. Physical Exercise Reduces Circulating Lipopolysaccharide and TLR4 Activation and Improves Insulin Signaling in Tissues of DIO Rats. Diabetes, v.60, 2011.

OISHI, Y. *et al*. Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature. J Appl Physiol, v. 92, p. 1097-1103, 2002.

O'ROURKE, R.W. et al. Alterations in T-Cell Subset Frequency in Peripheral Blood in Obesity. Obesity Surgery, v.15, p. 1463-1468, 2005.

PARK, H.S. *et al*. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. The EMBO Journal, v.20, n.3, p. 446-456, 2001.

PARK, H.S; PARK, J.Y; YU, R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-α and IL-6. Diabetes Research and Clinical Practice,v.69, p.29–35, 2005.

PASSLICK, B; FLIEGER, D; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L. Identifications and characterization of novel monocyte subpopulation in human peripheral blood.Blood, p. 74:2527, 1989.

PAZ, K. *et al*. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. J Biol Chem, v. 274, p. 28816–28822, 1999.

PESSIN J.E; SALTIEL A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. Journal of Clinical Investigation, v.106, p.165-169, 2000.

PETERSEN, A.M.W; PEDERSEN, B.K.The anti-inflammatory effect of exercise. J Appl Physiol, v. 98, p.1154–1162, 2005.

POITOU, C. *et al*. CD14dimCD16+ and CD14++CD16+ Monocytes in Obesity and During Weight Loss Relationships With Fat Mass and Subclinical Atherosclerosis. Arterioscler ThrombVasc Biol, v.31, p.2322-2330, 2011.

POOLE, D.C. *et al*. Validity of criteria for establishing maximal O2 uptake during ramp exercise tests.Eur J Appl Physiol, v.102, p.403–410, 2008.

RAVICHANDRAN, L.V. *et al*. Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. J BiolChem, v.276, p.3543–3549, 2001.

RICHTER, E.A. *et al*. Effect of exercise on insulin action in human skeletal muscle.J Appl Physiol, v. 66, p.876–88, 1989.

ROCCHI, S. Identification by mutation of the tyrosine residues in the insulin receptor substrate-1 affecting association with the tyrosine phosphatase 2C and phosphatidylinositol 3-kinase. Endocrinology, v.136:5291–5297, 1995.

ROGACEV, K.S. et al. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. European Heart Journal, v. 31, p.369–376, 2010.

ROPELLE, E.R. 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, v.577, n.3, p. 997–1007, 2006.

ROSEN, E.D; SPIEGELMAN, B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis.Nature, v.444, p.847–53, 2006.

SABIO, G; DAVIS, R.J. cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. Trends BiochemSci, v.35, n.9, p.490–496, 2010.

SASAI, H. et al. Relationship Between Obesity and Incident Diabetes in Middle-Aged and Older Japanese Adults: The Ibaraki Prefectural Health Study. Mayo ClinProc, v.85, n.1, p.36-40, 2010.

SCHENK, S; SABERI, M; OLEFSKY, J.M.Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. The Journal of Clinical Investigation, v.118, n.9, 2008.

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

SCHELL, M.T. *et al*. Heat shock inhibits NF-kB activation in a dose- and time-dependent manner. J Surg Res, v.129, n.1, p.90-3, 2005.

SCHMITZ-PEIFFER, C. *et al*. Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. Diabetes, v.46, p.169–78, 1997.

SELL H. *et al*. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. Diabetes,v.58, p.2731–40, 2009.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J Clin Invest,v.116, p.3015–3025, 2006.

SIMPSON, R.J. *et al*. Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans. Brain Behav Immun, v.23, n.2, p.232-9, 2009.

SNOECKX, L. H. *et al*. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. Physiol Rev, v.81, p. 1461–1497, 2001.

STEFAN N; STUMVOLL, M.Adiponectin-its role in metabolism and beyond.Horm Metab Res, v.34, n.9, p.469-74, 2002.

STUMVOLL, M; GOLDSTEIN, B.J; VAN HAEFTEN, T.W.Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. Lancet, v. 365, n.9467, p.1333-46, 2005.

TANIGUCHI, C.M; EMANUELLI, B.; C. RONALD KAHN, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nature Reviews, v.7, 2006.

TARANTINO, G. e CAPUTI, A. JNKs, insulin resistance and inflammation: A possible link between NAFLD and coronary artery disease. World J Gastroenterol, v.17, n.33, p. 3785-3794, 2011.

TAUBES G: Insulin resistance. Prosperity's plague.Science, v.325, n.5938, p.256-60, 2009.

THOMPSON, H.S. et al. Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. Acta Physiol Scand, n.178, p.61–72. 2003

TISSIÈRES, A; MITCHELL, H.K; TRACY, U.M. Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs. J MolBiol, v.84, n.3, p.389-98, 1974.

TURNER, R.C. *et al*. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. Metabolism, v.28, p.1086–1096, 1979.

TRAYHURN, P; WOOD, I.S. Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. Br J Nutr, v.92, p.347–55, 2004.

TSUKUMO, D.M. *et al*. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes, v.56, p.1986–1998, 2007.

UNGER, R.H; ORCI L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity.Int J Obes Relat Metab Disord, v.24, pS28–32, 2000.

URANO, F. et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science, v. 287, p. 664–666, 2000.

UYSAL, K.T. et al. Protection from obesity- induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. Nature, v.389, p.610–614, 1997.

VALLERIE, S.R E HOTAMISLIGIL, G.S.The Role of JNK Proteins in Metabolism. SciTransl Med, v. 2, n.60, p. 60, 2010.

VIARDOT, A. et al. Obesity is associated with activated and insulin resistant immune cells. Diabetes Metab Res Rev, 2012.

XU, H. *et al*. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest, v.112, p.1821–1830, 2003.

ZHANG, X. *et al*. Selective Inactivation of c-Jun NH2-Terminal Kinase in Adipose Tissue Protects Against Diet-Induced Obesity and Improves Insulin Sensitivity in Both Liver and Skeletal Muscle in Mice. Diabetes, v. 60, p.486–495, 2011.

ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+CD16+ subpopulation. Immunol Today, v. 17, p.424–8, 1996.

WALLACE, T.M; LEVY, J.C; MATTHEWS, D.R.Use and abuse of HOMA modeling. Diabetes Care, v. 27, n.6, p.1487-95, 2004.

WALSH, N.P. *et al*. Position Statement- Part one: Immune function and exercise. ExercImmunol Rev, v.17, p.6-63, 2011.

WANG, S.Y. et al. Heterogeneity of human blood monocyte: two subpopulations with different sizes, phenotype and function. Immunology, p.77-298, 1992.

WATSON, R.T; PESSIN, J.E.Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. Recent ProgHorm Res, v.56, p.175-93, 2001.

WEERD, K.V.D. et al. Morbidly Obese Human Subjects Have Increased Peripheral Blood CD4+ T Cells With Skewing Toward a Treg- and Th2-Dominated Phenotype. Diabetes, v.61, p.401–408, 2012.

WEISBERG, S.P. *et al*. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest, v.112, p.1796–1808, 2003.

WEINSIER, R.L. et al. The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity. Am J Med, v.105, n.2, p.145-50, 1998.

WELLEN, K.E; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. The Journal of Clinical Investigation, v.115, n.5, 2005.

WESTON, C. R e DAVIS, R.J. The JNK signal transduction pathway. Curr Opin Cell Biol, v.19, p.142–149, 2007.

WINER, S.*et al*.: Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. Nat Med , v.15, n.8, p.921-9, 2009.

WISSE, BE: The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. J Am Soc Nephrol, v. 15, p. 2792–2800, 2004.

WOJTASZEWSKI, J.F. et al. Insulin signaling in human skeletal muscle: time course and effect of exercise. Diabetes,v.46, p.1775–1781, 1997.

WOJTASZEWSKI, J.F; NIELSEN, J.N; RICHTER, E.A. Invited review: effect of acute exercise on insulin signaling and action in humans. J Appl Physiol, v.93, p.384–392, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO; 2000. OMS, 2012.

YAMADA, P.M. et al. Effect of heat acclimation on heat shock protein 72 and interleukin-10 in humans. J Appl Physiol, n.103, p.1196-204, 2007.

YATES, T. *et al.*: Walking and inflammatory markers in individuals screened for type 2 diabetes. Preventive Medicine, v.47, p.417-421, 2008.

YE, J; GAO, Z; YIN, J; HE, Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of *ob*/*ob*and dietary obese mice. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.293, p. E1118–E1128, 2007.

YU, L. *et al*. PKCθ inhibits insulin signaling by phosphorylating IRS1 at Ser1101. The Journal of Biological Chemistry, v.279, p. 45304-45307, 2004.

ANEXO A

Versão brasileira do Veterans Specific Activity Questionnaire (VSAQ)

Este questionário tem como objetivo avaliar sua capacidade para realização de atividades diárias habituais. A seguir, serão apresentadas várias atividades do dia-a-dia que aumentam de modo crescente o nível de esforço e dificuldade necessários para realizá-las. Após a identificação das atividades, pense cuidadosamente e indique a primeira atividade que, se realizada por um determinado período (poucos minutos), causaria cansaço intenso, falta de ar, dor no peito ou vontade de parar por exaustão. Se você não realiza normalmente alguma das atividades em particular, tente imaginar como seria se as fizesse.

1 MET - Comer e vestir-se. Ficar deitado ou sentado assistindo televisão. Trabalhar sentado escrevendo, digitar no computador ou falar ao telefone.

2 METs - Lavar, passar ou pendurar roupas. Cozinhar, lavar pratos, mudar a roupa de cama, levar lixo para fora, regar plantas, costurar à mão. Tomar banho de chuveiro e secar-se (em pé). Caminhar da casa para o carro ou ônibus. Descer 8 degraus de escada (1 lance). Fazer compras (no mercado, no shopping). Carregar e arrumar as compras (esforço leve).

3 METs - Caminhar devagar (4km/h) sobre uma superfície plana um ou dois quarteirões (carregando ou não objetos com menos de 10 kg). Realizar trabalhos leves/moderados: lavar carro, lavar janelas, limpar garagem, varrer o chão, carregar criança pequena de aproximadamente 7 kg (esforço leve).

4 METs - Executar trabalhos leves no quintal (por exemplo: juntar e ensacar grama ou folhas de árvore). Varrer garagem, calçada ou fora de casa. Cuidar de idoso ou adulto incapacitado (ex.: ajudar a dar banho). Andar de bicicleta para trabalho ou lazer (< 16 km/h).

5 METs - Dançar socialmente (rápido). Caminhar, terreno plano, superfície firme, ritmo bem rápido (6,5 km/h). Caminhar carregando um peso entre 0,5 e 7 kg em subidas (ex.: pacote de arroz de 5 kg).

6 METs - Fazer faxina. Nadar, em lago, oceano ou rio. Caminhar (7 km/h) em terreno plano, superfície fi rme, ritmo extremamente rápido. Mudar móveis pesados de lugar (arrastar).

7 METs - Subir ladeira a pé. Futebol casual. Correr (7,5 km/h) ou nadar, em velocidade lenta, esforço leve a moderado. Carregar compras escada acima. Carregar um peso de aproximadamente 30 kg (uma criança).

8 METs - Correr 8 km/h, moderadamente, em superfícies planas (7,5 $min.km^{-1}$), subir escadas rapidamente. Carregar compras e pesos moderados (7 a 18 kg) subindo escadas.

9 METs - Andar de bicicleta em velocidade moderada. Correr 8,3 km/h (7,1 min. km^{-1}). Subir morros com peso de 20 kg.

10 METs - Nadar em ritmo acelerado, esforço vigoroso. Subir uma ladeira de bicicleta. Correr a 10 km por hora (6,2 min. km-1). Futebol competitivo. Carregar peso entre 22 e 34 kg em subidas.

11 METs - Andar de bicicleta em ritmo acelerado e contínuo. Correr 11 km/h (5,3 min. km-1) ou correr no campo (terreno irregular com subida). Nadar estilo crawl, velocidade rápida (70 m/min), com esforço vigoroso. Carregar uma carga pesada (ou seja, uma criança) subindo até 2 lances de escada.

12 METs - Correr em ritmo acelerado e contínuo (em superfície plana 2 km em tempo < 10 minutos ou 12 km/h). Ciclismo estacionário (250 W), esforço muito vigoroso. Carregar peso superior a 34 kg em subida.

13 METs - Realizar qualquer atividade competitiva, incluindo aquelas que envolvam correr a toda velocidade (muito rápido) e de forma intermitente. Correr a aproximadamente 13 km/h (4,6 min.km-1). Correr ou remar competitivamente, corridas de bicicleta.