UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA RESISTÊNCIA À INSULINA, FUNÇÃO
ENDOTELIAL E NO REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE PACIENTES OBESAS SUBMETIDAS À CIRURGIA
BARIÁTRICA

WAGNER SILVA DANTAS

São Paulo

2019

WAGNER SILVA DANTAS

Efeitos do exercício físico na resistência à insulina, função endotelial e no remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético de pacientes obesas submetidas à cirurgia bariátrica

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte

Orientador: Prof. Dr. Bruno Gualano

São Paulo

2019

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Dantas, Wagner Silva

Efeitos do exercício físico na resistência à insulina, função endotelial e no remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético de pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica

/ Wagner Silva Dantas. – São Paulo :

[s.n.], 2019.

176p.

Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Gualano

1. Exercício físico 2. Obesidade 3. Cirurgia bariátrica
4. Músculo esquelético 5. Insulina (Tratamento) I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: DANTAS, Wagner Silva

Título: Efeitos do exercício físico na resistência à insulina, função endotelial e no remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético de pacientes obesas submetidas à cirurgia bariátrica

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico esta tese à minha esposa (Karila Dantas), filho
(Pedro Henrique Dantas) e filha (Ana Clara Dantas). Com
vocês, pude viver a maior loucura possível a um homem:
SONHAR e PISAR NO INVISÍVEL!*

AGRADECIMENTOS

Essa é parte mais tocante na escrita desta tese. Aprendi cedo a ter um coração grato. Parafraseando Romanos 13:7-9 vos digo que (...) *portanto, dai a cada um o que deveis: a quem tributo, tributo; a quem imposto, imposto; a quem temor, temor; a quem **HONRA**, honra. A ninguém devais coisa alguma, a não ser o amor com que vos amei uns aos outros; porque quem ama aos outros cumpriu a lei*". Nessa árdua jornada, como não se emocionar com os pequenos detalhes, pessoas especiais que cruzam nosso caminho, momentos de risos e choro e profundo aprendizado. Neste momento, tento fazê-los honrados em palavras de gratidão.

A Deus. Agradeço a Ele pela existência. Pela experiência de ser. Pelo detalhe particular. Pelo caos em meio a angústia. Pelo Seu amor em meio ao caos. Pelo Seu favor no dia da minha angústia. Pela ausência de lógica na vida. Sim, por meio dela, pude pisar no desconhecido. E esse desconhecido moldou, molda e moldará o meu caráter. Verdadeiramente, eu não merecia tanto.

Às pacientes desse projeto que, apesar de todas as dificuldades agravadas pelo excesso de peso, doaram-se de maneira ímpar ao projeto. Vocês foram fundamentais para a realização desta tese!

À minha mãe, por ser meu exemplo de dignidade e significado do trabalho ao ser humano. Essa tese teve sua participação como mãe e colaboradora do projeto. Poucos alunos tiveram a sorte na vida de realizarem coletas de dados de seus respectivos trabalhos com a própria mãe (rs)! Felizmente, eu o tive! Eu te amo, mãe!

Ao meu sogro Zaqueu, minha sogra Marta, meu cunhado Kauê e cunhada Amanda. Quantas vezes (foram muitas!) vocês me ajudaram arrumando um lugar quietinho para estudar ou escrever (enquanto rolava um churrasco!). Quantas vezes vocês saíram com meus filhos! Quantas vezes vocês foram nosso refúgio. Quantas, quantas, quantas vezes, quantas vezes e quantas vezes vocês foram por mim. Meu muito obrigado por acreditarem nesse projeto. Vocês são especiais demais!

Ao Willian das Neves que sempre me dignificou com seu exemplo de ser humano. Aprendi e aprendo muito com você Will! Dou honra a ti por ter me honrado em cada momento de trabalho árduo (e não foram poucos). Sempre com seu sorriso no rosto e

sabedoria nas palavras, encantou cada momento de experimento, discussão de ideias e conversas da vida. Muito obrigado pela grande aventura e por aprender contigo. Muito obrigado meu irmão.

Aos grandes irmãos de laboratório: Vitor de Salles Painelli, Guilherme de Carvalho Yamaguchi e Kleiner Márcio de Andrade Nemezio pelos diversos momentos de grande diversão, idas ao McDonald's, papos existenciais e profissionais. Obrigado pelas ligações semanais durante meu período de trabalho nos EUA. Nossas conversas “toscas” eram uma espécie de refrigério para a minha alma. Vocês são exemplos para mim. Muito obrigado meus irmãos.

Aos grandes companheiros e amigos de projeto: Igor Murai, Saulo dos Santos Gil e Carlos Merege pela disponibilidade em ajudar e cooperar para que todos tivéssemos êxito nesse processo. Muito obrigado. Ainda, agradeço também aos mais novos colegas do projeto Bariátrica: Carol, Alisson e Juliana.

Aos grandes homens e mulheres que pude compartilhar a experiência do meu trabalho nestes últimos anos: Fernando Moraes, Lúcia Helena, Luiz Meiches, Rosana Meiches, Ilana Meiches, Bruno Poljokan, Lucas Martins Bastos, Carolina Helou Aoun, Samir Aoun, Helena Aoun, Mario Stransky, Regina Stransky e Vesna Kolmar. Nas palavras de Clarice Lispector, digo-vos: “(...) Saudade é um pouco como fome. Só passa quando se come a presença. Mas as vezes a saudade é tão profunda que a presença é pouco: quer-se absorver a outra pessoa toda. Essa vontade de um ser o outro para uma unificação inteira é um dos sentimentos mais urgentes que se tem na vida”. Em termos literais, vocês propiciaram a realização dessa tese por terem sido um para comigo e minha família. Cuidaram de nós (eu e minha família) como se fosse “uma unificação inteira”. Devo confessar que vocês são capazes de trazer-me as lágrimas mais sinceras do meu coração no momento dessa escrita. Vocês tornaram a minha árdua caminhada muito mais leve e viável. Verdadeiramente, não tenho palavras suficientes para agradecê-los. Levo em meu coração a doce lembrança de cada um de vocês. Portanto, que esse texto seja uma forma de homenagem do mais profundo da minha alma. Vocês são especiais a mim.

Agradeço aos colegas do LIM-17 da FMUSP e LACRE (HCFMUSP): Ana Jéssica, Bryan, Eimear, Luana, Rafa Pires, Ana Paula Hayashi, Tiago Peçanha, Reynaldo Rodrigues, Camilla Pedroso, Bruna Mazzolani, Fabiana Smaria e Gabriel.

Agradeço aos funcionários do LIM-17 e demais laboratórios da Disciplina de Reumatologia da FMUSP: Margarete, Cléo, Elaine, Nicole, Virgínia, Aurora e Dra. Walcy.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Miopatias Inflamatórias: Rafa, Isa, Alê, Léo e Marildinha.

Aos mestres, com carinho, agradeço:

Ao Prof. Dr. Samuel Katsuyuki Shinjo pela impressionante disponibilidade em realizar as inúmeras biópsias musculares desse projeto, disponibilizar seu laboratório para esse trabalho e conversas de incentivo. Nunca esquecerei de suas palavras Dr. Samuel em momentos difíceis. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Santo e Prof. Dr. Roberto de Cleve pela enorme ajuda e contribuição na seleção e exames das pacientes desse estudo.

Thank you so much for Prof. Dr. John P. Kirwan to offer me an intensive translational research training during my PhD internship abroad. Also, thank you all of my lab colleagues (Sandra, Chris, Hanna, Mellisa, Jack, Will and Dr. Gangarao) for help me in the experiments, advice and efforts to make my life easier during this period.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Gualano e Prof. Dr. Hamilton Roschel. Muito obrigado pelas conversas, pelas orientações, pela confiança e pelo incentivo constante na busca por uma carreira científica sólida. Obrigado pelo apoio financeiro e suporte acadêmico durante o projeto (FAPESP 2016/10993-5). Mencionaria a vocês a frase de Isaac Newton que diz: (...) “Se vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”. Muito obrigado por toda ajuda.

Agradeço a EEFE-USP por esses 9 anos de convivência. Em especial, agradeço ao Márcio e Cláudia, funcionários da secretária de pós-graduação dessa escola, pela gentileza e auxílio aos alunos sempre de maneira cordial e atenciosa.

Por último, agradeço ao apoio da FAPESP pela bolsa de doutorado no Brasil (Convênio FAPESP/CAPES 2015/02835-8) e nos EUA (2017/01427-9).

“Digo: o real não está na saída nem na chegada: ele
se dispõe para a gente é no meio da travessia.”

João Guimarães Rosa

“Importante não é ver o que ninguém nunca viu,
mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre
algo que todo o mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

DANTAS, WAGNER SILVA. **Efeitos do exercício físico na resistência à insulina, função endotelial e remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético de pacientes obesas submetidas à cirurgia bariátrica.** 2019. 176f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A cirurgia bariátrica confere proteção cardiometabólica à indivíduos obesos, contribuindo para uma redução do risco de mortalidade. No entanto, a extensão do benefício metabólico pode estar sujeita a mudanças no estilo de vida do paciente após a intervenção cirúrgica. Embora o exercício físico pareça melhorar os efeitos da cirurgia na sensibilidade à insulina, o mecanismo de ação subjacente permanece em grande parte sem explicação. Especula-se que mudanças potenciais na matriz extracelular do músculo esquelético (ECM) poderiam estar associadas à melhora da sensibilidade à insulina induzida pelo exercício físico em pacientes pós-bariátricos. Além disso, não se sabe se os benefícios da cirurgia bariátrica sobre a função endotelial, importante marcador precoce de aterosclerose, são sustentáveis sem alterações no estilo de vida, como a inclusão de exercícios físicos. Dessa forma, foram objetivos do presente estudo, investigar os efeitos do exercício físico sobre a sinalização intracelular envolvida na sensibilidade à insulina e remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético (*Estudo 1*) e sobre a função endotelial da artéria braquial de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica (*Estudo 2*). Sessenta e duas mulheres foram randomizados após a cirurgia bariátrica para um programa de exercícios físicos de 6 meses ou tratamento padrão. No início do estudo, 3 e 9 meses após a cirurgia, a sensibilidade à insulina foi avaliada pelo teste oral de tolerância à glicose (TOTG), análise da função endotelial e amostras de músculo esquelético foram obtidas a partir do vasto lateral. As amostras de músculo esquelético foram submetidas a análises abrangentes, incluindo expressão de genes e proteínas, fenótipo do músculo esquelético, transcriptoma e identificação de novas vias de sinalização celular. O treinamento físico após a cirurgia bariátrica melhorou a sensibilidade à insulina no músculo esquelético. Esta resposta foi mediada por alterações moleculares e fenotípicas na ECM. A cirurgia bariátrica *per se* foi incapaz de solucionar completamente a resistência à insulina e a expansão da ECM no

músculo esquelético. Candidatos relevantes modulados pelo exercício emergiram como alvos terapêuticos para o tratamento da resistência à insulina do músculo esquelético, nomeadamente a via TGFβ1/SMAD 2/3 e seu antagonista folistatina. Em resumo, empregamos uma abordagem “*top-down approach*” para fornecer evidências de que a ECM do músculo esquelético desempenha um papel fundamental nos efeitos sobrepostos da cirurgia bariátrica e do exercício físico sobre a sensibilidade à insulina em mulheres obesas. Além disso, este estudo demonstrou que o treinamento físico evitou a reversão da melhora da função endotelial por meio da melhora do padrão de fluxo sanguíneo e redução de marcadores inflamatórios. Em conclusão, ao revelar um novo mecanismo pelo qual o exercício pode contrabalançar a resistência à insulina em pacientes pós-bariátricos (isto é, atenuar a espessura da ECM) e preservar a função endotelial, este estudo endossa que o exercício físico deve ser adotado como relevante medida terapêutica a fim de garantir os melhores resultados cardiometabólicos em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica.

Palavras-chave: Matriz extracelular, função endotelial, resistência à insulina, obesidade, folistatina, TGFβ1

ABSTRACT

DANTAS, WAGNER SILVA. **Effects of exercise training on insulin resistance, endothelial function and skeletal muscle extracellular matrix remodeling in obese patients undergoing bariatric surgery.** 2019. 176f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Bariatric surgery provides cardiometabolic protection to obese individuals, contributing to a reduction in mortality risk. However, the extent of metabolic benefit may be subject to changes in the patient's lifestyle after surgical intervention. Although exercise seems to improve the effects of surgery on insulin sensitivity, the underlying mechanism of action remains largely unexplained. It is speculated that potential changes in the skeletal muscle extracellular matrix (ECM) could be associated with improved insulin sensitivity induced by physical exercise in post-bariatric patients. In addition, it is not known whether the benefits of bariatric surgery on endothelial function, an important marker of early atherosclerosis, are sustainable without changes in lifestyle, such as the inclusion of physical exercise. Thus, the aims of the present study were to investigate the effects of exercise on intracellular signaling involved in insulin sensitivity and skeletal muscle ECM remodeling (*Study 1*) and the effects of exercise on the brachial artery vasodilator response of patients undergoing bariatric surgery (*Study 2*). Sixty-two women were randomized after bariatric surgery to a 6-month exercise program or standard of treatment. At the beginning of the study, 3 and 9 months after surgery, insulin sensitivity was assessed by the oral glucose tolerance test (OGTT), endothelial function analysis and skeletal muscle samples were obtained from the vastus lateralis. Skeletal muscle samples were subjected to comprehensive analysis, including gene and protein expression, skeletal muscle phenotype, transcriptome and identification of new cell signaling pathways. Exercise training after bariatric surgery improved insulin sensitivity in skeletal muscle. This response was mediated by molecular and phenotypic changes in ECM. Bariatric surgery per se was unable to completely resolve insulin resistance and skeletal muscle ECM expansion. Relevant exercise-modulated candidates emerged as therapeutic targets for the treatment of skeletal muscle insulin resistance, namely the TGF β 1/SMAD 2/3 pathway and its follistatin antagonist. In summary, we employed a "top-down approach" to provide evidence that skeletal muscle ECM plays a key role in the overlapping effects of bariatric surgery and

exercise on insulin sensitivity in obese women. In addition, this study demonstrated that physical training avoided reversal of endothelial function improvement by improving blood flow pattern and reducing inflammatory markers. In conclusion, in revealing a new mechanism by which exercise can counterbalance insulin resistance in post-bariatric patients (i.e., attenuate ECM thickness) and preserve endothelial function, this study endorses that exercise should be adopted as a relevant therapeutic measure in order to guarantee the best cardiometabolic results in patients undergoing bariatric surgery.

Keywords: Extracellular matrix, endothelial function, insulin resistance, obesity, follistatin, TGF β 1

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Representação do processo de captação de glicose no músculo esquelético e os fatores contribuintes de cada etapa.	46
FIGURA 2	Desenho experimental do presente estudo. Grupo controle de mulheres eutróficas e saudáveis (CTRL), cirurgia bariátrica (RYGB), grupo submetido à cirurgia bariátrica e treinamento físico (RYGB + TF).	61
FIGURA 3	Ilustração do procedimento de biópsia muscular por agulha de sucção, conforme descrito previamente pelo nosso grupo (NEVES <i>et al.</i> , 2012). A saber, a sutura não é realizada em nosso método. Figura extraída de TARNOPOLSKY <i>et al.</i> (2011).	65
FIGURA 4	Fluxograma do ESTUDO 1. CTRL: grupo de mulheres eutróficas; ITT: <i>intention-to-treat</i> ; RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica e treinamento físico.	80
FIGURA 5	Teste oral de tolerância à glicose e marcadores de resistência à ação da insulina referente ao ESTUDO 1. Dados expressos em média $\pm$ DP. RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas; ^ indica $p \leq 0,05$ para efeito principal de tempo; * indica $p \leq 0,05$ para comparações entre os grupos no período PÓS9.	86
FIGURA 6	Enriquecimento de vias envolvidas na regulação matriz extracelular (A e B), perfil de genes diferencialmente expressos relacionados a membrana basal e expressão de colágenos (C) e análise de componentes principais (D).	89
FIGURA 7	Imagens representativas e quantificação da marcação de colágeno I (A) e III (B). Dados expressos em média $\pm$ EPM (n = 15 por grupo). Escala da barra = 100 μ m. Imagens representativas da ultraestrutura dos capilares do músculo esquelético por microscopia eletrônica (C). Dados expressos em mediana $\pm$ intervalo interquartil (n = 10 por grupo). As setas	92

pequenas em I-III apontam para os limites internos e externos do aumento da espessura da membrana basal. As setas em IV-VI apontam para os limites internos e externos da redução da espessura da membrana basal. As setas longas no painel 3 denotam um perfil degenerativo do pericito e célula endotelial (“fantasmas”). BM: membrana basal; EC: célula endotelial; SL: sarcolema; PC: pericitos; Col: fibras de colágeno; RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas. Para a análise dos colágenos: ^ indica efeito principal de tempo; * indica para comparações entre os grupos no período PÓS9 ($p \leq 0,05$). Para a análise semiquantitativa dos parâmetros da ultraestrutura do capilar: # indica diferença significativa para ambos os grupos (vs. PRÉ); * indica diferença entre os grupos para o mesmo tempo ($p \leq 0,05$).

- FIGURA 8 Expressão proteica normalizada pela proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e bandas representativas de reguladores da sensibilidade à insulina no músculo esquelético no período PRÉ em comparação ao grupo CTRL. Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas (CTRL). Dados expressos em média $\pm$ EPM (n = 15 por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; * indica $p \leq 0,05$ para comparações com o grupo CTRL. 94
- FIGURA 9 Expressão gênica de reguladores da matriz extracelular e biogênese mitocondrial no período PRÉ em comparação ao grupo CTRL. Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas (CTRL). Dados expressos em média $\pm$ EPM (n = 14 por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas; * indica $p \leq 0,05$ para comparações com o grupo CTRL. 95
- FIGURA 10 Expressão proteica normalizada pela proteína gliceraldeído 3-fosfato 97

desidrogenase (GAPDH) e bandas representativas de reguladores da matriz extracelular no músculo esquelético no período PRÉ em comparação ao grupo CTRL. Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas (CTRL). Dados expressos em média $\pm$ EPM (n = 15 por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; * indica $p \leq 0,05$ para comparações com o grupo CTRL.

- FIGURA 11 Expressão proteica (A-H) normalizada pela proteína gliceraldeído 3- 99
fosfato desidrogenase (GAPDH) e bandas representativas envolvidas na sinalização insulínica no músculo esquelético. Dados expressos em média $\pm$ EPM (n = 15 por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; ^ indica efeito principal de tempo; * indica diferença para comparações entre os grupos no período PÓS9 ($p \leq 0,05$).
- FIGURA 12 Expressão proteica (A-E) normalizada pela proteína beta-actina (β - 100
actina) e bandas representativas do complexo mitocondrial (OXPHOS) no músculo esquelético. Dados expressos em média $\pm$ EPM (n = 15 por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; ^ indica efeito principal de tempo; * indica diferença para comparações entre os grupos no período PÓS9 ($p \leq 0,05$).
- FIGURA 13 Expressão proteica (A-H) e bandas representativas envolvidas no 102
remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético. Dados expressos em média $\pm$ EPM (n = 15 por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; ^ indica efeito principal de tempo; * indica diferença para comparações entre os grupos no período PÓS9 ($p \leq 0,05$).
- FIGURA 14 Fracionamento celular (citosol e núcleo) de amostras de músculo 104
esquelético no período PÓS9. Bandas representativas (A) e avaliação da translocação de β -catenina e SMAD 2/3 (B) do citosol para o núcleo

celular, interação das proteínas SMAD 2/3 total e Akt (Ser 473) por imunoprecipitação (C) e correlações de *Pearson* (D) entre proteínas reguladoras da matriz extracelular e marcadores de sensibilidade à insulina no corpo inteiro (Matsuda Index) e músculo esquelético (mISI). Dados expressos em média $\pm$ EPM (n = 15 por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas. # indica diferença significativa vs. CTRL; * indica diferença significativa vs. RYGB ($p \leq 0,05$).

FIGURA 15	Sinalização insulínica (A-D) e bandas representativas de células musculares (C2C12) tratadas com veículo (1% BSA), TGF β 1 (10 ng/mL), FLST (1.8 μ g/mL) e a combinação de TGF β 1 e FLST, na presença ou não de insulina (100 nM). Os dados são expressos em média $\pm$ EPM e representam a média de três experimentos independentes. # indica $p \leq 0,05$ vs. veículo; \$ indica $p \leq 0,05$ vs. TGF β 1; & indica $p \leq 0,05$ vs. FLST.	106
FIGURA 16	Fluxograma do ESTUDO 2. CTRL: grupo de mulheres eutróficas; ITT: <i>intention-to-treat</i> ; RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica	109
FIGURA 17	Teste oral de tolerância à glicose e marcadores de resistência à ação da insulina do ESTUDO 2. Dados expressos em média $\pm$ DP. RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas; ^ indica $p \leq 0,05$ para efeito principal de tempo; * indica $p \leq 0,05$ para comparações entre os grupos no período PÓS9.	115
FIGURA 18	Perfil sérico de marcadores inflamatórios e anti-inflamatórios no período PRÉ, 3 meses (PÓS3) e 9 meses (PÓS9) após a cirurgia bariátrica. Dados expressos em média $\pm$ DP, RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico. Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas; ^ indica efeito	117

principal de tempo; * indica para comparações entre os grupos no período PÓS9 ($p \leq 0,05$); IL-1 β : interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; IL-4: interleucina 4; IL-10: interleucina 10; PCR: proteína C reativa; TNF- α : fator de necrose tumoral α .

- FIGURA 19 Função endotelial da artéria braquial. Dados expressos em média $\pm$ DP. 119
 RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico. FMD: dilatação mediada pelo fluxo (%); GTN: gliceril trinitrato sublingual; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas; ^ indica efeito principal de tempo; \$ indica $p \leq 0,05$ quando comparado com valores PRÉ (intragrupo); & indica $p \leq 0,05$ quando comparado com valores PÓS3 (intragrupo); * indica $p \leq 0,05$ para comparações entre os grupos no período PÓS9.
- FIGURA 20 Alterações na função endotelial (FMD) (barras) refletiram mudanças na 120
 taxa de estresse de cisalhamento retrógrado, sensibilidade à insulina (AUC insulina) e marcador pró-inflamatório (TNF- α) (linhas).

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1	Classificação da obesidade segundo o IMC e risco de co-morbidades. <i>Fonte: World Health Organization (WHO). Report of a WHO Consultation on Obesity. Obesity, Preventing and Management the Global Epidemic, Geneva, 1997.</i>	33
TABELA 2	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para avaliação da expressão de RNA mensageiro.	70
TABELA 3	Características físicas, composição corporal, aptidão física, marcadores bioquímicos e hemodinâmicos dos grupos experimentais no período PRÉ para os pacientes do ESTUDO 1. Dados em média $\pm$ DP ou número de pacientes (% da amostra). ANG II: angiotensina 2; Ca^{+2} : cálcio; CT: colesterol total; CTRL: grupo de mulheres eutróficas; ECA: enzima conversora da angiotensina; HbA1C: hemoglobina glicada; HDL: lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; RYGB: cirurgia bariátrica; RYGB + ET: cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; TGL: triglicérides; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; VO_{2pico} : consumo pico de oxigênio.	81
TABELA 4	Características físicas, bioquímicas e de aptidão aeróbia dos grupos experimentais antes (PRÉ), três (PÓS3) e nove meses (PÓS9) após a cirurgia bariátrica. Dados em média $\pm$ DP, intervalo de confiança entre os grupos (IC95%) e valor de p para interação grupo x tempo (modelo misto para medidas repetidas). CT: colesterol total; HbA1C: hemoglobina glicada; HDL: lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PCR:	84

proteína C-reativa; TGL: triglicérides; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; VO_{2pico} : consumo pico de oxigênio; # indica $p \leq 0,05$ para o efeito principal de tempo (PRÉ vs PÓS3); \$ indica $p \leq 0,05$ efeito principal de tempo (PRE vs PÓS9); * indica $p \leq 0,05$ para comparações entre os grupos no período PÓS9.

TABELA 5	Características físicas, composição corporal, aptidão física, marcadores bioquímicos e hemodinâmicos dos grupos experimentais no período PRÉ para os pacientes do ESTUDO 2. Dados em média $\pm$ DP ou número de pacientes (% da amostra), ANGII: angiotensina 2; Ca^{+2}: cálcio; CT: colesterol total; CTRL: grupo de mulheres eutróficas; ECA: enzima conversora da angiotensina 2; HbA1c: hemoglobina glicada; HDL: lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; RYGB: cirurgia bariátrica; RYGB + ET: cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; TGL: triglicérides; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; VO_{2pico}: consumo pico de oxigênio.	110

TABELA 6	Características físicas, bioquímicas e de aptidão aeróbia dos grupos experimentais antes (PRÉ), três (PÓS3) e nove meses (PÓS9) após a cirurgia bariátrica referente ao ESTUDO 2. Dados em média $\pm$ DP, intervalo de confiança entre os grupos (IC95%) e valor de p para interação grupo x tempo (modelo misto para medidas repetidas). CT: colesterol total; HbA1C: hemoglobina glicada; HDL: lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PCR: proteína C-reativa; TGL: triglicérides; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; VO_{2pico}: consumo pico de oxigênio; # indica $p \leq 0,05$ para o efeito principal de tempo (PRÉ vs. PÓS3); \$ indica $p \leq 0,05$ efeito principal de tempo (PRE vs. PÓS9); * indica $p \leq 0,05$ para comparações entre os grupos no período PÓS9.	114

LISTA DE QUADROS

Página

QUADRO 1	Resumo das principais mudanças no grupo RYGB e RYGB + ET ao final da intervenção. ↑ indica aumento no grupo RYGB; ↓ indica redução no grupo RYGB; ↔ indica ausência de mudança pela cirurgia bariátrica; ↑ indica aumento no grupo RYGB + ET; ↓ indica redução no grupo RYGB + ET; ↔ indica ausência de mudança pelo treinamento físico.	132

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°	Grau
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
cm	centímetro
cm/s	Centímetro por segundo
D	Diâmetro
EGTA	Ácido egtálico
FBS	Soro fetal bovino
<i>g</i>	Unidade de aceleração não-SI
g	Gramma
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GP1BA	Glicoproteína de plaquetas Ib de cadeia alfa
HCl	Ácido clorídrico
IgG	Imunoglobulina G
IκB	Proteína quinase IκB
M	Molar
mg	Miligrama

mHz	Hertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
MyD88	Molécula adaptadora do fator de diferenciação mieloide 88
Na ₂ EDTA	Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético dihidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NP-40	Nonidet-P40
O ₂ O ₄	Tetróxido de ósmio
PBS	Tampão fosfato salino
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3k	Proteína fosfoinositídeo 3-quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsufonil
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
STAT	Proteína ativadora de transdução de sinal e transcrição
TBS	Tampão salino tamponado com Tris
TBS-t	Tampão salino tamponado com Tris com <i>Tween</i>
V	volts

LISTAS DE ANEXOS

Página

ANEXO 1	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	171
ANEXO 2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	173

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ANEXOS

1. INTRODUÇÃO	31
<i>1.1. Obesidade: Classificação e aspectos epidemiológicos .....</i>	<i>33</i>
<i>1.2. Obesidade, resistência à insulina e risco cardiovascular .....</i>	<i>36</i>
<i>1.3. A cirurgia bariátrica como tratamento da obesidade .....</i>	<i>40</i>
<i>1.4. Efeitos da cirurgia bariátrica na função endotelial .....</i>	<i>42</i>
<i>1.5. Efeitos do treinamento físico na função endotelial .....</i>	<i>44</i>
<i>1.6. Mecanismos de resistência à ação da insulina no músculo esquelético .....</i>	<i>45</i>
<i>1.7. O papel da matriz extracelular do músculo esquelético como possível mecanismo de resistência à ação da insulina .....</i>	<i>51</i>
<i>1.8. Efeitos do exercício físico na resistência à ação da insulina .....</i>	<i>53</i>
2. JUSTIFICATIVA	58
3. OBJETIVOS	59

4.	CASUÍSTICA E MÉTODOS	59
4.1.	<i>Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa .....</i>	59
4.2.	<i>Delineamento experimental e aleatorização .....</i>	59
4.3.	<i>Recrutamento e seleção de voluntários .....</i>	61
4.4.	<i>Treinamento Físico .....</i>	62
4.5.	<i>Teste Ergoespirométrico .....</i>	63
4.6.	<i>Coleta sanguínea .....</i>	64
4.7.	<i>Teste oral de tolerância à glicose .....</i>	64
4.8.	<i>Biópsia muscular por agulhas de sucção (Estudo 1) .....</i>	64
4.9.	<i>Composição corporal .....</i>	66
4.10.	<i>Avaliação do metabolismo lipídico .....</i>	66
4.11.	<i>Avaliação do metabolismo hepático .....</i>	67
4.12.	<i>Avaliação histológica do músculo esquelético (Estudo 1) .....</i>	67
4.13.	<i>Avaliação da ultraestrutura dos capilares do músculo esquelético (Estudo 1) .....</i>	68
4.14.	<i>Sequenciamento de RNAs mensageiros em larga escala do músculo esquelético (RNA-seq) (Estudo 1) .....</i>	68
4.15.	<i>Análise da expressão de RNAs mensageiros do músculo esquelético pela reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) (Estudo 1) .....</i>	69
4.16.	<i>Avaliação da expressão proteica do músculo esquelético por Western Blotting (Estudo 1) .....</i>	70
4.17.	<i>Fracionamento celular (Estudo 1) .....</i>	71
4.18.	<i>Imunoprecipitação (Estudo 1) .....</i>	72
4.19.	<i>Cultura de células musculares C2C12 (Estudo 1) .....</i>	73

4.20.	<i>Avaliação das citocinas séricas pró e/ou anti-inflamatórias (Estudo 2)</i>	74
4.21.	<i>Avaliação da função endotelial da artéria braquial (Estudo 2)</i>	74
5.	EQUIPE E LOCAL DE EXECUÇÃO DO ESTUDO	76
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
7.	RESULTADOS (Estudo 1)	79
7.1.	<i>Participantes</i>	79
7.2.	<i>Aderência ao treinamento físico</i>	82
7.3.	<i>Composição corporal</i>	82
7.4.	<i>Perfil bioquímico</i>	83
7.5.	<i>Condicionamento aeróbio</i>	83
7.6.	<i>Avaliação dos marcadores de resistência à insulina, sensibilidade à insulina e função das células β pancreáticas</i>	85
7.7.	<i>Análise de larga escala dos RNAs mensageiros (RNA-seq) do músculo esquelético</i>	87
7.8.	<i>Análise da expressão de colágeno tipo I e III e da ultraestrutura dos capilares do músculo esquelético</i>	90
7.9.	<i>Análise da expressão de RNAs mensageiros e proteínas do músculo esquelético</i>	93
7.10.	<i>Fracionamento celular e interação proteína-proteína no músculo esquelético</i>	103
7.11.	<i>Cultura de células musculares C2C12</i>	104
8.	RESULTADOS (Estudo 2)	108
8.1.	<i>Participantes</i>	108
8.2.	<i>Aderência ao treinamento físico</i>	112
8.3.	<i>Composição corporal</i>	112

8.4.	<i>Perfil bioquímico .....</i>	112
8.5.	<i>Condicionamento aeróbio .....</i>	113
8.6.	<i>Avaliação dos marcadores de resistência à insulina e sensibilidade à insulina .....</i>	115
8.7.	<i>Perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias .....</i>	116
8.8.	<i>Função endotelial da artéria braquial .....</i>	118
9.	DISCUSSÃO	121
9.1.	<i>A melhora da sensibilidade à insulina no músculo esquelético pela cirurgia bariátrica associada ao exercício físico ocorre por mecanismos moleculares orquestrados do remodelamento da matriz extracelular.....</i>	121
9.2.	<i>A reversão da melhora da função endotelial após a cirurgia bariátrica é atenuada pelo exercício físico .....</i>	127
10.	CONCLUSÕES	132
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
	ANEXOS	171

1. INTRODUÇÃO

Os aspectos evolutivos obrigaram os seres humanos a lidar com longos períodos de privação de energia e de alimentos gerando um grande gasto energético voluntário. Não apenas a restrição alimentar modificou ao longo da evolução do homem. A composição alimentar, tamanho das porções, a quantidade e frequência de ingestão de alimentos foram significativamente alterados ao longo milênio (PIPER & BARTKE, 2008). Consistente com essas informações, WANSINK & WANSINK (2010) demonstraram em um elegante estudo uma relação positiva entre o ano cronológico e a razão entre o tamanho do prato principal e o perímetro cefálico entre diversas imagens de obras de artes, incluindo a Santa Ceia. Portanto, o avanço tecnológico global, menor gasto energético para a provisão de alimentos, produção de alimentos em larga escala, a industrialização e mecanização da agricultura são algumas das justificativas para o aumento significativo da obesidade na medida em que repercute com alteração negativa entre o gasto energético comparado a ingestão calórica (WANSINK & WANSINK, 2010).

A obesidade cursa clinicamente com o ganho de tecido adiposo capaz de acarretar prejuízos à saúde. A epidemia da obesidade tornou-se a doença endocrinológica mais comum do mundo ocidental e um dos problemas de saúde pública mais importante por atingir diferentes populações em diferentes faixas etárias (KOPELMAN, 2000).

Nas últimas décadas, modificações no padrão e comportamento alimentar contribuíram significativamente para o aumento da prevalência da obesidade no mundo. A partir da década de 50, as facilidades trazidas pela urbanização e modernização trouxeram diversos benefícios populacionais como aumento da expectativa de vida e maior disponibilidade de alimentos. Entretanto, as mudanças na dinâmica social advindas da mudança urbanista e evolução tecnológica, também trouxeram um aumento da industrialização dos alimentos combinado a mudanças nos hábitos relacionados ao estilo de vida diário. Especificamente, o aumento do teor de gorduras saturadas, açúcares simples, diminuição do teor de fibras e micronutrientes (vitaminas e minerais) na composição dos alimentos industrializados geraram um fenômeno conhecido com transição nutricional (MONTEIRO *et al.*, 2002).

Essa transição nutricional é influenciada por modificações facilmente notáveis em nossa sociedade: o aumento da participação feminina no mercado de trabalho, alterando o padrão de alimentação caseira e em família, observados há décadas anteriores; o aumento da jornada de trabalho e o excesso de trabalho (sobretudo nas grandes cidades) diminuiu o tempo das refeições e favoreceu a escolha por alimentos rápidos (*fast food*); a rápida adaptação da indústria de alimentos ao novo estilo de vida ao disponibilizar uma enorme variedade de produtos para o preparo rápido e consumo instantâneo, cuja palatabilidade é aceitável. Ademais, o aumento da urbanização acarretou o aumento do transporte automatizado, incremento de tecnologias no ambiente doméstico e diminuição do lazer. A mecanização da indústria também acarretou no trabalhador uma menor exigência de esforço físico. Todas essas em conjunto culminaram para uma drástica redução dos níveis de atividade física. A transição nutricional somada a drástica redução dos níveis de atividade física contribuiu para a epidemia de obesidade vigente em nossa sociedade atual (PEETERS & BACKHOLER, 2017). Portanto, a obesidade é uma doença universal, de proporções epidêmicas, prevalência crescente, alta complexidade clínica e possui diversos fatores implicados em sua etiologia, tais como fatores genéticos, evolutivos, ambientais e comportamentais.

Atualmente, dados epidemiológicos apontam para 500 milhões de indivíduos obesos no mundo e estima-se que em 2025, mais de um bilhão de pessoas terão o índice de massa corporal (IMC) superior a 30 kg/m² (KELLY *et al.*, 2008). Em países com os Estados Unidos da América, a população com obesidade grau III vem crescendo vertiginosamente. Entre os anos de 1986 e 2000, o número de indivíduos com IMC entre 40 a 50 kg/m² apresentou um crescimento de cinco vezes (STURM, 2003). Como consequência deste fenômeno epidemiológico, as prevalências de doenças relacionadas à obesidade, tais como diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), hipertensão arterial (HAS), dislipidemias, doença arterial coronariana (DAC) e alguns tipos de câncer vêm crescendo significativamente, contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade por diversas doenças ligadas a obesidade (KOPELMAN, 2000).

1.1. OBESIDADE: CLASSIFICAÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A relação peso e altura demonstra grande acurácia para a classificação da obesidade, uma vez que ao utilizar padronizações adequadas para a medida, suas mensurações oferecem baixa margem de erro da medida. O IMC é uma fórmula útil e prática na avaliação e classificação da obesidade. Nessa fórmula é realizada a divisão do peso corporal (em quilogramas) pela estatura (em metros) elevada ao quadrado:

$$(\text{IMC} = \text{peso corporal (em quilogramas)} / \text{altura (em metros)}^2)$$

Todavia, essa maneira de classificação da obesidade não torna possível a distinção entre o tecido gorduroso e tecido muscular esquelético, bem como, não fornece informações sobre a distribuição da gordura corporal.

Classificação	IMC (kg/m ²)	Risco de co-morbidades
Baixo peso	≤ 18,5	Baixo
Normal	18,5 – 24,9	Médio
Excesso de peso	≥ 24,9	
Sobrepeso	25,0 – 29,9	Aumentado
Obesidade classe I	30,0 – 34,9	Moderado
Obesidade classe II	35,0 – 39,9	Grave
Obesidade classe III	≥ 40,0	Muito grave

Tabela 1. Classificação da obesidade segundo o IMC e risco de co-morbidades. Fonte: World Health Organization (WHO). Report of a WHO Consultation on Obesity. Obesity, Preventing and Management the Global Epidemic, Geneva, 1997.

A partir da descrição da tabela acima, quanto maior o IMC maior será o risco de acometimento por alguma co-morbidade ligada à obesidade. Portanto, a obesidade é definida pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, usualmente mensurada e classificada através da aferição da altura e peso corporais e cálculo do IMC do indivíduo. Assim, a obesidade pode ser definida como presença de $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$.

A partir da década de 80, a obesidade tornou-se uma epidemia global em diversas faixas etárias da população (ENGELAND *et al.*, 2003), com uma estimativa por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS) da existência de aproximadamente 500 milhões de obesos IMC acima de 30 kg/m^2 (STURM, 2003). De maneira ainda mais alarmante, estima-se que a quantidade de pessoas com obesidade mórbida tenha aumentado em até cinco vezes nos últimos 15 anos (DIMICK & BIRKMEYER, 2014).

FONTAINE *et al.*, (2003) demonstraram que os efeitos deletérios da obesidade poderiam levar à redução na expectativa de vida na ordem de 22% em homens com IMC acima de 45 kg/m^2 . Em outro estudo, pacientes obesos na juventude que foram acompanhados por 55 anos demonstraram um aumento da mortalidade independente da presença da obesidade na fase adulta. Isso sugere que a obesidade cursa com efeitos duradouros nos desfechos ao longo da vida adulta (MUST *et al.*, 1992). Neste sentido, tem sido demonstrado que em países em desenvolvimento, como o Brasil, parte do aumento significativo da prevalência das doenças cardiovasculares pode ser atribuída ao incremento de casos de obesidade (YUSUF *et al.*, 2004).

A relação da obesidade com o aumento da mortalidade está associada com a presença de diversas comorbidades como a HAS, DM2, câncer, doença hepática gordurosa não alcoólica e DAC (MAGLIO *et al.*, 2013; LAVIE *et al.*, 2014; NGUYEN *et al.*, 2014; RODRIGUEZ-GALLEGO *et al.*, 2014; YOUNG *et al.*, 2014). De maneira importante, estudos demonstram que indivíduos obesos apresentam redução da aptidão cardiorrespiratória, representado por diminuição do consumo máximo de oxigênio ($\text{VO}_{2\text{pico}}$), sendo esse um preditor independente de mortalidade por todas as causas e por doenças cardiovasculares (BLAIR *et al.*, 1995; FERREIRA *et al.*, 2003). Entretanto, essa redução do $\text{VO}_{2\text{pico}}$, e consequente aumento da chance de mortalidade, não parece ser dependente do IMC e da adiposidade total (KODAMA *et al.*, 2009). Assim, a alta prevalência de inatividade física indubitavelmente parece explicar, mesmo que parcialmente, o baixo condicionamento cardiorrespiratório em indivíduos obesos, especialmente em obesos mórbidos (GALLAGHER *et al.*, 2005).

Utiliza-se a expressão obesidade mórbida para se definir casos extremos de obesidade, os quais são caracterizados por $\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ou maior que 35 kg/m^2 associados à comorbidades clínicas significativas (Gastrointestinal surgery for severe

obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference, 1991). Trata-se de um problema mundial de saúde pública, apresenta um alto de risco de complicações clínicas, a prevalência aumenta de maneira vertiginosamente, assim, demanda uma abordagem terapêutica efetiva e agressiva na tentativa de diminuição do risco de morte prematura.

Nas últimas três décadas, o IMC aumentou $0,4 \text{ kg/m}^2$ por década no mundo. De acordo com STURM & HATTORI (2013), a prevalência de obesidade grau I e II pode estar estabilizando ou aumentando em taxas menores do que antes de 2005. Entretanto, poucas estimativas de prevalência existem para a obesidade mórbida. Provavelmente, as pesquisas com medidas objetivas não apresentam um tamanho amostral adequado, enquanto as pesquisas que usam o auto-relato do peso corporal e da altura não são precisas. Mesmo com a escassez de dados confiáveis acerca da prevalência de obesidade mórbida, com base no auto-relato do peso corporal e altura, a prevalência de pessoas com IMC acima de 40 kg/m^2 foi quatro vezes maior e IMC acima de 50 kg/m^2 foi cinco vezes maior de acordo com dados coletados entre os anos de 1986 e 2000. Dados coletados entre os anos de 1999 e 2000 demonstraram um aumento da obesidade mórbida da ordem de 4,7% entre adultos americanos em ambos os gêneros (FLEGAL *et al.*, 2002). Assim, a obesidade mórbida não é uma condição patológica rara que afeta uma proporção fixa da população. Ao contrário, a obesidade mórbida faz parte de uma distribuição de IMC na população que parece ter se tornado mais heterogênea, isto é, uma maior proporção de indivíduos se distancia da média, enquanto, a curva de aumento do IMC se desloca à direita (ou seja, aumento do IMC da média populacional).

Portanto, a mudança desproporcional do crescimento da obesidade mórbida nos últimos 10 anos afeta drasticamente os custos financeiros em saúde, tendo em vista os riscos de doença e gravidade das co-morbidades associadas a essa doença. Adicionalmente, os hospitais exigem recursos financeiros adicionais para pacientes com obesidade mórbida, uma vez equipamentos de imagem, mesas cirúrgicas, cadeiras de roda e equipe técnica especializada são necessárias no manejo clínico e cirúrgico desse paciente.

1.2. OBESIDADE, RESISTÊNCIA À AÇÃO DA INSULINA E RISCO CARDIOVASCULAR

A associação entre a obesidade e o risco de doenças cardiovasculares é observada desde meados do século XX. Um clássico artigo publicado por VAGUE (1956) descreveu pela primeira vez que padrões clássicos de distribuição de gordura corporal central estavam associados com o risco de doenças crônicas, incluindo aterosclerose e DM2. Posteriormente, estudos transversais confirmaram tal associação positiva (BOORSMA *et al.*, 2008; POULSEN *et al.*, 2009) independente do gênero (FONTBONNE *et al.*, 1992). Assim, a melhora de marcadores de risco para a doença cardiovascular e piora metabólica é proporcional à redução da gordura central (SMITH & ZACHWIEJA, 1999).

A partir da década de 80, os estudos por tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética permitiram uma melhor caracterização da distribuição da gordura corporal. A obesidade chamada de central caracteriza-se pela expansão de tecido adiposo subcutâneo e intra-abdominal (visceral) e a proporção entre esses compartimentos é variável, associada a um espectro de fenótipos metabólicos entre dois opostos: indivíduos com peso corporal normal, excesso de gordura visceral e metabolicamente semelhantes a indivíduos obesos e indivíduos obesos com pouca gordura visceral e metabolicamente semelhantes a indivíduos eutróficos (FREEDLAND, 2004).

O impacto da obesidade mórbida parece ser ainda pior na relação dos desfechos cardiovasculares. FONTAINE *et al.* (2003) mostraram que os danos causados pela obesidade poderiam levar a uma redução de 22% na expectativa de vida em homens jovens acima de 45 kg/m² por causas cardiovasculares. Adicionalmente, um estudo retrospectivo demonstrou um aumento significativo da mortalidade por problemas cardiovasculares de jovens que foram obesos, independente da presença da obesidade na vida adulta. Assim, a presença da obesidade no início da vida parece gerar feitos duradouros de desfechos cardiovasculares na vida adulta (MUST *et al.*, 1992).

Reaven *et al.* (1988) propuseram que a resistência à insulina seria o fator central de ligação entre o aumento de gordura visceral e maior incidência de doenças cardiovasculares. A resistência à insulina presente na obesidade é capaz de promover a disfunção endotelial aliado à uma inflamação de baixo grau na parede vascular,

principalmente em indivíduos jovens (JOSEPH *et al.*, 2002). Entre os determinantes para as diferentes evoluções das lesões coronarianas inclui-se proteína C reativa (PCR), lipoproteína de baixa densidade (LDL), hipertensão arterial (HAS), tabagismo e DM2 (BOGATY *et al.*, 2001; LIBBY *et al.*, 2009).

A arquitetura da parede vascular é capaz de determinar o transporte e a capacidade de entrega de grandes moléculas, como a insulina (BARRETT *et al.*, 2011). KING & JOHNSON (1985) foram os primeiros a propor que a insulina é capaz de transpor a camada endotelial em um mecanismo mediado via receptor. Posteriormente, esta constatação foi apoiada por estudos *in vivo* demonstrando por meio do clampeamento euglicêmico-hiperinsulinêmico. Através da utilização da insulina radiomarcada foi demonstrado que a mesma se ligava ao endotélio vascular, mas demoraria a ser transportada para o interstício vascular aproximadamente 10 minutos após o início do clampeamento euglicêmico-hiperinsulinêmico (WANG *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que a insulina radiomarcada estava co-localizada ao receptor de insulina e a caveolina-1 na membrana luminal da célula endotelial (WANG *et al.*, 2006).

Portanto, o ambiente vascular também é um importante fator contribuinte para a resistência à ação da insulina. Essa ideia surgiu de estudos com os índios obesos Pima onde foi demonstrado que a resistência à insulina foi inversamente associada à a resposta vasodilatadora mediada pelo fluxo sanguíneo nessa população (LILLIOJA *et al.*, 1987). Inúmeras evidências em humanos demonstram uma íntima relação da resistência à insulina e do DM2 a defeitos na função microvascular e macrovascular (DE BOER *et al.*, 2012). As evidências científicas apontam para um comprometimento vascular (tanto micro como macrovascular) associado à resistência à insulina (KARPE *et al.*, 2002; GOOSSENS *et al.*, 2011).

Aumentos do volume sanguíneo no ambiente vascular levam a um aumento do recrutamento de capilares no músculo esquelético em humanos. Entende-se recrutamento de capilares pelo mecanismo fisiológico de aumento do número de capilares perfundidos em resposta a um estímulo (KESKE *et al.*, 2016). Por exemplo, acredita-se que o aumento do recrutamento de capilares frente a um estímulo fisiológico (ex: insulina) possa melhorar a entrega de glicose pelo aumento da área de superfície para a difusão facilitada (BARRETT *et al.*, 2009). Assim, o aumento do volume

sanguíneo no ambiente vascular bem como o recrutamento de capilares são importantes meios de manutenção da homeostase, uma vez que eles são parte da redistribuição dos nutrientes absorvidos após as refeições e, por conseguinte, desempenham um papel importante na entrega de glicose e ácidos graxos para o músculo esquelético como local de armazenamento. Assim, aumentos da perfusão vascular no músculo esquelético parecem ser importante para a manutenção da homeostase glicêmica e lipídica em longo prazo (WAGENMAKERS *et al.*, 2016). Entretanto, aumentos fisiológicos da insulina no plasma falharam em aumentar o volume sanguíneo no leito vascular do músculo esquelético de indivíduos obesos (CLERK *et al.*, 2006) e em pacientes com DM2 (BARRETT *et al.*, 2009). Isto sugere que a distribuição do fluxo sanguíneo após estímulo capaz de aumentar a secreção de insulina está potencialmente reduzida em indivíduos obesos e resistentes à insulina (BARRETT *et al.*, 2009).

A disfunção endotelial em grandes artérias é paralela ao déficit de recrutamento de capilares que contribui para a diminuição geral da perfusão sanguínea no músculo esquelético (KIM *et al.*, 2008). A ausência de uma distribuição adequada do fluxo sanguíneo para os territórios periféricos representa um alto risco de desenvolvimento de DM2 (ABDUL-GHANI *et al.*, 2007) e doenças cardiovasculares (CERIELLO, 2005). Portanto, a disfunção vascular pode ser o elo comum entre as doenças metabólicas e o aumento do risco cardiovascular presente na história clínica de pacientes obesos. Para a compreensão dessa afirmação, necessita-se a compreensão do mecanismo de sinalização da insulina no endotélio. A ativação da sinalização insulínica no endotélio causa a ativação da proteína conhecida como óxido nítrico endotelial (eNOS) mediada pela proteína quinase B (Akt). A ativação da eNOS promove a síntese de óxido nítrico e, consequente, vasodilatação (DE BOER *et al.*, 2012). Simultaneamente, a insulina é também capaz de ativar a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que uma vez ativada, sinaliza para o aumento da expressão de um importante vasoconstritor chamado endotelina-1. Todavia, em indivíduos saudáveis a via de sinalização insulínica no endotélio predominante é a da eNOS. Em indivíduos obesos, o endotélio é caracterizado pela resistência à insulina na ativação da PI3k. Desta maneira, ocorre uma maior ativação de proteínas MAPK e, consequentemente, uma maior expressão de endotelina-1, resultando em uma maior resposta vasoconstritora nesses pacientes.

Por outro lado, um estudo realizado por APOVIAN *et al.* (2008) demonstraram a importância da obesidade no papel inflamatório e sua relação com o processo aterosclerótico. Para tanto, estudou-se as características da gordura abdominal e a função endotelial em 77 pacientes com IMC de $44 \pm 8 \text{ kg/m}^2$ e circunferência abdominal de $110 \pm 14 \text{ cm}$. Observou-se um aumento do infiltrado de monócitos em 50 pacientes na camada íntima média da artéria braquial. Os demais pacientes não apresentaram características de infiltração de monócitos. Nos indivíduos obesos com maior infiltrado de monócitos, a vasodilatação endotélio-dependente foi significativamente menor comparado com o grupo sem infiltração de monócitos. Uma vez que os monócitos são diferenciados futuramente em macrófagos (célula importante produtora de citocinas inflamatórias), este estudo demonstrou que a obesidade está relacionada ao processo inflamatório subclínico que gera prejuízos a função endotelial e outros marcadores metabólicos.

É bem estabelecido que distúrbios na direção do fluxo sanguíneo diminuem a resposta vasodilatadora dependente do endotélio (GAMBILLARA *et al.*, 2006). Especificamente, na presença da obesidade há um aumento do fluxo sanguíneo de orientação retrógrada e diminuição do fluxo sanguíneo de orientação anterógrada (OSTO *et al.*, 2015). Por consequência, há uma drástica redução da produção da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) e de óxido nítrico (NO), importantes substâncias sinalizadoras da resposta vasodilatadora, em detrimento do aumento de substâncias responsáveis pelo aumento da resposta vasoconstritora do vaso (ex: endotelina-1). Assim, o aumento da taxa de estresse de cisalhamento de maneira oscilatória quanto ao sentido do fluxo sanguíneo (*shear stress* oscilatório) aumenta a disfunção endotelial (JENKINS *et al.*, 2013).

Além disso, JENKINS *et al.* (2013) demonstraram que o aumento do *shear stress* oscilatório provoca o aumento de micropartículas indutoras de apoptose (PECAM-1 e GP1BA) e ativadoras de adesão celular (p-selectinas) (DIGNAT-GEORGE & BOULANGER, 2011). Este trabalho foi o primeiro a demonstrar *in vivo* que distúrbios da direção do fluxo sanguíneo induzem dano ao território endotelial de humanos, uma vez que o aumento das micropartículas endoteliais são marcadores sistêmicos de disfunção e doença do endotélio vascular (JENKINS *et al.*, 2013).

Em pacientes obesos, há uma associação entre a redução da ação da insulina e um atraso no transporte da insulina na parede vascular (LONNROTH *et al.*, 1983; SJOSTRAND *et al.*, 2005), o que foi atribuído a uma menor densidade microvascular no músculo esquelético de sujeitos obesos. Entretanto, é sabido que para a completa metabolização da glicose nos tecidos periféricos, essa molécula necessita migrar do plasma para o interstício e, posteriormente, para o espaço intracelular, sendo então fosforilada pela glicose-6-fosfato (G6P). Esse movimento da molécula de glicose do plasma para o interstício celular é determinado pelo fluxo sanguíneo, recrutamento de capilares e, de maneira importante, a permeabilidade do endotélio à molécula de glicose (WASSERMAN & AYALA, 2005). Portanto, além da rarefação microvascular no músculo esquelético, um aumento da espessura da membrana basal dos capilares pode gerar uma redução da área de superfície disponível para a difusão de glicose no interstício celular o que resultará em uma ação atenuada da insulina para a captação de glicose neste território em pacientes obesos (CLERK *et al.*, 2006; WASSERMAN *et al.*, 2018).

1.3. CIRURGIA BARIÁTRICA COMO TRATAMENTO DA OBESIDADE MÓRBIDA

A proposta do tratamento da obesidade mórbida é restaurar as funções orgânicas e metabólicas afetadas por essa doença. Torna-se importante comentar que o tratamento da obesidade mórbida não está atrelado apenas a redução do peso corporal em si, mas à atenuação das limitações impostas pela obesidade mórbida e melhora das comorbidades, resultando em uma melhora da qualidade de vida do paciente. Além disso, o tratamento da obesidade mórbida deve levar em conta que a causa dessa doença não é resultado da simples falta de força de vontade dos pacientes acometidos. Essa noção difundida na sociedade é simplista e não obedece a nenhuma base científica para tal argumento. Sabe-se que a combinação de fatores genéticos, ambientais, culturais, social e econômico parece ser responsável pelo controle do peso corporal. Obviamente, a explosão na prevalência da obesidade em geral nos últimos 30 anos dever ser atribuída a fatores ambientais e mudanças comportamentais proporcionadas pelo advento da modernidade.

A palavra “bariátrica” origina-se do grego “peso” (CHARATAN, 2000). A indicação cirúrgica obedece (de maneira geral) as regras do $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ou $IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$ com co-morbidades relacionadas à obesidade. Os objetivos cirúrgicos são a redução e manutenção da perda do excesso de peso corporal por meio de um procedimento seguro para melhorar, ou, se possível, resolver as co-morbidades clínicas permitindo um aumento na qualidade e expectativa de vida (GELONEZE *et al.*, 2001). A cirurgia bariátrica é considerada bem-sucedida quando houver perda sustentada de 50% do peso corporal excedente (YALE & WEILER, 1991). O cálculo do peso corporal excedente utilizado na prática médica é feito pela seguinte equação:

$$\text{Peso corporal excedente} = \text{peso inicial} - \text{peso ideal (calculado pelo IMC} = 25 \text{ kg/m}^2)$$

Assim, um paciente com 150 kg de peso corporal, cujo peso ideal é de 80 kg, possui um peso corporal excedente de 70 kg. A perda sustentada do peso corporal de pelo menos 35 kg (50% do peso corporal excedente) neste exemplo, é considerada como um sucesso terapêutico oriundo da cirurgia bariátrica.

A história da cirurgia bariátrica é relativamente recente. O início dos primeiros procedimentos data da década de 50, com o trabalho de KREMEN *et al.* (1954) e na década de 60 com a publicação de PAYNE & DEWIND (1969). Entretanto, neste período o procedimento cirúrgico tornou-se proibido em virtude das complicações hidro-eletrolíticas, diarreia incontrolável e insuficiência hepática (PAYNE *et al.*, 1963). Já a década de 70 caracterizou-se por intenso estudo e atividade na cirurgia bariátrica. Na década de 90, várias publicações científicas marcaram essa época. FOBI & LEE (1994) introduziram a gastroplastia vertical com anel de silicone criando um reservatório gástrico drenado por uma gastrojejunostomia e contendo um anel de silicone restritivo proximal a gastrojejunostomia. FOBI & LEE (1994) também apresentaram uma nova variação da técnica adicionando gastrostomia e anel de silicone radiopaco no estômago excluído para facilitar acesso percutâneo e eventual estudo radiológico ou endoscópico no futuro. A banda gástrica ajustável (BGA) ganhou notoriedade como o uso da laparoscopia nos anos 90 por sua maior facilidade de execução. Apesar de muito utilizada em alguns grupos, teve seus resultados em longo prazo questionados principalmente devido a problemas com o dispositivo implantado e

perda de peso corporal ineficaz ou reganho de peso corporal (BELACHEW *et al.*, 1994; BELACHEW *et al.*, 2002).

As cirurgias digestivas chamadas de “*bariátricas*” representam uma alternativa de tratamento da obesidade, indicadas em casos de obesidade grau III (também conhecida como obesidade mórbida - $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$) e na obesidade grau II associado a outras comorbidades graves (ex: DM2) (BUCHWALD *et al.*, 2004). A cirurgia bariátrica é considerada hoje um dos principais tratamentos para a obesidade quando o tratamento medicamentoso associado à mudança do estilo de vida são ineficientes em promover uma significativa redução do peso corporal associado a uma expressiva melhora de marcadores de saúde (BOND *et al.*, 2009).

A técnica cirúrgica pode ser dividida nas seguintes categorias: restritiva, malabsortiva ou combinada (BUCHWALD *et al.*, 2004). A técnica restritiva reduz o tamanho do estômago, promovendo saciedade com quantidade significativamente menor de alimento aliado a redução do peso corporal. Na técnica malabsortiva, o objetivo é alterar o trajeto do alimento para promover a redução da absorção de nutrientes. A gastroplastia com derivação em Y de Roux (ou *bypass* gástrico - RYGB) é a técnica cirúrgica de redução do estômago mais frequentemente usada graças ao melhor equilíbrio entre a eficácia e os efeitos colaterais (YIP *et al.*, 2013). Esta técnica cirúrgica oferece bons resultados referente à perda de peso e saciedade alimentar. Entretanto, como desvantagens essa técnica requer o uso de suplementos vitamínicos por toda a vida e possibilidade de reganho de peso corporal em longo prazo, especialmente em pacientes sedentários consumidores excessivos de carboidratos (YIP *et al.*, 2013). De maneira geral, a cirurgia é capaz de gerar redução de até 40% do peso corporal em aproximadamente 12 a 16 meses após a intervenção, com melhora significativa de diversas comorbidades associadas à obesidade (BUCHWALD *et al.*, 2009; SCHAUER *et al.*, 2012).

1.4. EFEITOS DA CIRURGIA BARIÁTRICA NA FUNÇÃO ENDOTELIAL

É conhecido que a obesidade pode provocar disfunção endotelial, o qual precede a progressão da doença aterosclerótica (JORIS *et al.*, 2017). A dilatação mediada pelo

fluxo sanguíneo (FMD) é um importante marcador da função endotelial e um forte preditor independente de eventos cardiovasculares. Portanto, a FMD constitui um importante instrumento prognóstico validado, além dos tradicionais fatores de risco cardiovascular (LUPOLI *et al.*, 2016). A cirurgia bariátrica emerge como o tratamento de escolha para o tratamento da obesidade mórbida, uma vez que a cirurgia bariátrica é capaz de promover uma substancial perda de peso corporal e uma abrupta redução dos fatores de risco cardiovascular, reduzindo assim o risco de mortalidade e morbidade cardiovascular (STURM *et al.*, 2009).

Todavia, o efeito da cirurgia bariátrica na função endotelial permanece controverso. De maneira interessante, GOKCE *et al.* (2005) demonstraram que a perda de peso gerada pela cirurgia bariátrica ou tratamento clínico otimizado gera resultados comparáveis na função endotelial dependente do endotélio. Assim, enquanto avaliações de curto prazo mostraram consistentes melhoras na FMD, efeitos menos pronunciados foram observados no longo prazo (ou seja, > 12 meses) (GOKCE *et al.*, 2005; BRETHAUER *et al.*, 2011; SALEH *et al.*, 2012; TSCHONER *et al.*, 2013). Isto sugere que, no curto prazo, a pronunciada perda de peso corporal *per se* pode não ser suficiente para proteger a longo prazo os vasos sanguíneos contra a disfunção endotelial, principalmente quando outros mediadores relacionados à disfunção endotelial não foram completamente resolvidos pela cirurgia bariátrica. Neste sentido, evidências apontam que tanto a resistência à insulina quanto o aumento da inflamação de baixo grau pioram a disfunção endotelial, afetando a biodisponibilidade de óxido nítrico e, predispondo, em última análise a um processo aterosclerótico acelerado (BHAGAT & VALLANCE, 1997; BIASUCCI *et al.*, 1999; RIDKER *et al.*, 2000; KHARBANDA *et al.*, 2002; SCHINZARI *et al.*, 2017; VISWAMBHARAN *et al.*, 2017). Embora a cirurgia bariátrica possa melhorar tanto a resistência à insulina quanto o estado inflamatório de baixo grau (COEN *et al.*, 2015; NETTO *et al.*, 2015), a extensão da melhora desses benefícios pode ser altamente sujeita ao estilo de vida dos pacientes, que é sabidamente um fator positivo para mudança da função vascular (HAMDY *et al.*, 2003; ESPOSITO *et al.*, 2004).

1.5. EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO NA FUNÇÃO ENDOTELIAL

Os primeiros estágios do processo aterosclerótico podem ser detectados através da observação de mudanças fisiológicas ou estruturais do funcionamento das grandes artérias. Nesse cenário, o exercício físico pode exercer proteção vascular por atuar diretamente nos vasos através da exposição repetitiva a estímulos hemodinâmicos (ex: estresse de cisalhamento), que, por sua vez, desencadeiam adaptações funcionais e estruturais à parede vascular (JOYNER & GREEN, 2009; GREEN *et al.*, 2017).

Alguns estudos verificaram que o exercício físico regular pode prevenir a redução da vasodilatação dependente do endotélio ou até recuperar os níveis de vasodilatação em indivíduos sedentários de meia idade (DeSOUZA *et al.*, 2000). Este benefício gerado pelo exercício físico parece ser estendido a pacientes com DM2 (MAIORANA *et al.*, 2001). Ainda, a combinação do treinamento aeróbico e força muscular parece normalizar o percentual de resposta vasodilatadora de indivíduos jovens e obesos em comparação à voluntários que não apresentavam valores de função endotelial característicos à disfunção endotelial, após 8 semanas de treinamento físico combinado (WATTS *et al.*, 2004). Assim, o exercício físico parece promover importantes benefícios na função endotelial devido ao impacto generalizado nas diversas variáveis hemodinâmicas, além de aumentar substancialmente o estresse de cisalhamento na camada endotelial, causando assim, um importante aumento na atividade e expressão de enzimas com a eNOS, culminando no aumento da produção de NO (VANHOUTTE *et al.*, 2009). De maneira interessante, um estudo investigou o efeito de 12 semanas de treinamento aeróbico na resposta vasodilatadora e no nível de crescimento de fatores de crescimento vasculares. Houve um aumento significativo do número de células progenitoras endoteliais circulantes, que se mostrou positivamente relacionado aos valores de FMD e com o aumento da síntese de NO, mostrou a eficácia por parte do exercício físico em melhorar a funcionalidade do endotélio vascular (JOYNER & GREEN, 2009; GREEN *et al.*, 2017).

Apesar dos mecanismos da melhora da função endotelial pelo exercício físico não estarem completamente elucidados, acredita-se que o principal mecanismo de ação do exercício físico na resposta endotelial é pelo aumento da produção de NO através do

aumento da expressão da enzima eNOS (NIEBAUER & COOKE, 1996). É importante ressaltar que o exercício físico melhora a função endotelial de indivíduos obesos e está associado a um risco reduzido de doenças vasculares e eventos cardiovasculares agudos (DeSOUZA *et al.*, 2000; WATTS *et al.*, 2004). Uma vez que a perda de peso corporal gerada pela cirurgia bariátrica *per se* pode não ser suficiente para proteger a longo prazo os vasos sanguíneos contra a disfunção endotelial em pacientes obesos, o exercício físico emerge como uma intervenção terapêutica essencial para sustentar, ou mesmo, potencializar os benefícios cardiovasculares imediatos gerados pela cirurgia bariátrica, muitos dos quais parecem ser transitórios na ausência de mudanças do estilo de vida (MARCON *et al.*, 2017; SACHDEV *et al.*, 2018).

1.6. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À AÇÃO DA INSULINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético representa aproximadamente 40% da massa corporal total e exerce papel primordial no metabolismo da glicose, desempenhando um papel ímpar na captação e armazenamento de glicose (FEBBRAIO *et al.*, 2004). De certo, o músculo esquelético é o principal território de captação de glicose estimulada pela insulina e um defeito na utilização da glicose no músculo esquelético é o principal componente da resistência à ação da insulina (TAM *et al.*, 2014). Para entender a regulação fisiológica integrada da captação de glicose pelo músculo esquelético torna-se importante a compreensão de três passos presentes neste modelo (Figura 1). A entrega da glicose é regulada pela concentração arterial e perfusão no leito muscular. O fluxo sanguíneo muscular é controlado pelo recrutamento de capilares e pelo fluxo sanguíneo muscular total em resposta ao estímulo da insulina (passo I). No interstício muscular, a glicose é transportada através da membrana do sarcolema por proteínas chamadas GLUT4 após a translocação para a membrana celular em resposta a eventos de sinalização intracelular (passo II). A glicose intramiocelular é fosforilada em glicose 6-fosfato que é regulada pela atividade da hexoquinase (passo III). A fosforilação da glicose é o passo terminal da captação de glicose pelo músculo esquelético. Assim, a ação metabólica da insulina no músculo esquelético é limitada pelo seu transporte do compartimento plasmático para o compartimento intersticial (BARRETT *et al.*, 2009).

Figura 1. Representação do processo de captação de glicose no músculo esquelético e os fatores contribuintes de cada etapa.

Com o ganho de peso corporal ocorre diminuição da sensibilidade à insulina e, conseqüentemente, aumento da resistência à ação da insulina. Esse quadro de resistência à ação da insulina gera um mecanismo compensatório clássico de aumento da secreção de insulina pelas células β pancreáticas na tentativa de manter a homeostase glicêmica em valores adequados. Como os tecidos alvos a ação da insulina apresenta diminuição da sensibilidade à ação desse hormônio, ocorre uma produção exagerada desse hormônio caracterizada como resposta hiperinsulinêmica. O aparecimento clínico do DM2 está atrelado a um evento posterior ao surgimento da resistência à ação da insulina. A falência secundária da célula β pancreática é a deficiência em aumentar a secreção de insulina para a manutenção do estado euglicêmico (KAHN, 1994). Assim, anormalidades na ação da insulina em estimular a captação de glicose no músculo esquelético, inibir a produção hepática de glicose e lipólise no tecido adiposo estão presentes em indivíduos com resistência à ação da insulina e antecedem o desenvolvimento do DM2 (KAHN, 1994). Portanto, entender o processo de

desenvolvimento da resistência à ação da insulina torna-se crucial para compressão e desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas e/ou terapêuticas contra o DM2.

Estudos transversais em diferentes populações mostraram que indivíduos com intolerância à glicose apresentam sobrepeso ou obesidade e apresentam níveis de insulina mais elevados quando comparado a indivíduos eutróficos. Portanto, modificações na secreção e sensibilidade à insulina são eventos que precedem a instalação do DM2 (PORTE & KAHN, 2001; SALTIEL & KAHN, 2001; ZIMMET *et al.*, 2001). Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com a preocupação de entender os mais diversos fatores que contribuem para a relação diretamente proporcional da resistência à ação da insulina e desenvolvimento do DM2 na obesidade.

É bem estabelecida a associação entre obesidade, sedentarismo e dieta hipercalórica rica principalmente em ácidos graxos saturados e carboidratos no desenvolvimento da resistência a ação da insulina e DM2 (DIMICK & BIRKMEYER, 2014; GOEDECKE & MICKLESFIELD, 2014; JAKICIC *et al.*, 2014; VELASQUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2014). Pacientes obesos com resistência à ação da insulina demonstram redução na capacidade oxidativa, diminuição da oxidação de ácidos graxos e aumento pronunciado do acúmulo lipídico no músculo esquelético comparado com indivíduos eutróficos (KELLEY *et al.*, 1999; GOODPASTER *et al.*, 2000), levando à piora da resistência à insulina pela produção de metabólitos derivados dos ácidos graxos que prejudicam a sinalização insulínica no músculo esquelético (SZENDROEDI *et al.*, 2014).

Para a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à obesidade, faz-se necessário a caracterização da via molecular de sinalização da insulina e seus efeitos biológicos. A sinalização intracelular da insulina inicia-se após a sua ligação ao receptor específico de membrana, denominado receptor de insulina (IR). Trata-se de uma proteína heterotetramérica com atividade quinase composta por duas subunidades alfa (α) encontrada no meio extracelular e duas subunidades beta (β) encontrada no meio intracelular. A insulina liga-se a porção α do seu receptor e estimula a fosforilação das porções β , que apresenta atividade quinase intrínseca. A partir deste evento, a ativação do IR estimula a fosforilação no resíduo de tirosina de diversos substratos, dentre eles, o substrato do receptor de insulina tipo 1 (IRS-1) e 2 IRS-2. ARAKI *et al.* (1994) demonstraram as funções fisiológicas do IRS-1 e IRS-2 em modelo animal que não

expressavam os genes codificadores das proteínas citadas. Na ausência de expressão do gene codificador da IRS-1, havia a presença de resistência à ação da insulina e retardo do crescimento, mas o animal não se tornava diabético (SALTIEL & KAHN, 2001). Posteriormente, um grupo de pesquisadores criou um modelo animal que não expressava o gene codificador do IRS-2. Nesse fenótipo havia um quadro de hiperglicemia exacerbada associado à disfunção da atividade de secreção das células β pancreáticas. A fosforilação em tirosina do IRS-1 e IRS-2 cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia à Src 2 (SH2), destacando a PI3-k, considerada de extrema importância para o transporte de glicose. A PI3-k tem como alvo as proteínas Akt e isoformas da proteína quinase C (PKC) tipo delta (ζ) e gama (λ). A fosforilação do substrato da proteína Akt (AS160) está envolvida na translocação do GLUT4 para a superfície celular e transporte de glicose (SYLOW *et al.*, 2017).

A contração muscular permite com que o músculo esquelético capte a glicose por via independente da sinalização insulínica. Assim, são distintas as vias que conduzem o sinal intracelular para o transporte de glicose através da insulina e do exercício no músculo esquelético. Entre as proteínas de destaque na captação de glicose induzida pelo exercício está a AMPK (proteína quinase ativada por AMP). A AMPK é uma serina/treonina quinase composta como um heterotrímero de 3 subunidades: uma subunidade catalítica α (63 kDa), duas subunidades regulatórias não-catalíticas β (30 kDa) e uma subunidade γ (38-63 kDa). Ambas as três subunidades são necessárias para a estabilidade e funcionalidade completa do complexo AMPK (SYLOW *et al.*, 2017). Há diversas isoformas para cada uma das três subunidades da proteína em questão, embora no músculo esquelético de humanos as isoformas encontradas são $\alpha 2$, $\beta 2$ e $\gamma 3$ (HOJLUND *et al.*, 2004), que surge como o principal sensor de energia intracelular nos mamíferos (WITCZAK *et al.*, 2008). Essa proteína foi originalmente identificada como o regulador de dois mediadores chaves do metabolismo lipídico: acetil-CoA carboxilase e 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (WITCZAK *et al.*, 2008). A ativação da AMPK é resultado da redução do estado energético dentro da célula. Com o aumento da relação entre AMP: ATP ocorre uma modificação conformacional da AMPK que a deixa mais suscetível a fosforilação. A AMPK fosforilada ativa vias que geram aumentam do ATP, tais como a oxidação de ácidos graxos e, em contrapartida, desativa vias de consumo de ATP (ex: vias de síntese de ácidos graxos). O aumento da atividade da AMPK em

resposta à necessidade de gerar ATP durante o exercício físico promove a translocação do GLUT4, facilitando o transporte de glicose para o músculo esquelético de forma semelhante à insulina (TREEBAK *et al.*, 2006).

Outros fatores estão relacionados com o acometimento da resistência à ação da insulina, incluindo alterações gênicas (MERCADO *et al.*, 2002), aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GONZALEZ *et al.*, 2006), estresse de retículo endoplasmático e inflamação em adipócitos associada ao aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (ROPELLE *et al.*, 2010). A alteração da secreção de citocinas pelos adipócitos pode causar prejuízos em tecidos alvo da ação da insulina como o músculo esquelético e o fígado (HOTAMISLIGIL, 2000; SCHATTENBERG *et al.*, 2006). Diversos estudos apontam para a tríade formada entre obesidade, resistência à insulina e estado inflamatório sub-clínico. A presença de marcadores inflamatórios documentados através da quantificação de citocinas plasmáticas são alvos de estudos da relação entre o sistema imunológico e metabólico.

O fator de necrose tumoral α (TNF- α) foi a primeira molécula a apresentar ligação entre o sistema imunológico e metabólico (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993). Estudos realizados em animais e seres humanos com obesidade demonstraram aumento dos níveis séricos de TNF- α (HORNG & HOTAMISLIGIL, 2011) e também o aumento dos níveis desta citocina tanto no tecido adiposo como no tecido muscular (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995). HOTAMISLIGIL *et al.* (1996) demonstraram que a administração de TNF- α em seres humanos leva a um estado de resistência à ação da insulina decorrente do aumento da fosforilação do IRS-1 em serina na posição 307. Postula-se que duas proteínas quinase possam participar desta ação inibitória: c-Jun NH (2) - terminal serina quinase (JNK) e ikappaB quinase (IKK). A administração de TNF- α em culturas de células levou a um aumento da fosforilação em serina do IRS-1 em paralelo à ativação da JNK e ativação do complexo IKK, sendo esse um dos mecanismos moleculares que o TNF- α leva a um quadro de resistência à ação da insulina (WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005).

Outras citocinas pró-inflamatórias mostraram-se capazes de ativar vias celulares relacionadas à resistência à ação da insulina. A interleucina 1 beta (IL-1 β) é uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes, podendo induzir a inflamação aguda em resposta a infecções ou danos teciduais (MASTERS, 2013). Para que a IL-1 β exerça

atividade biológica é necessário que ela se ligue ao receptor de membrana (IL1R1) e este deve acionar a proteína IL1RAcP para que a cascata de sinalização ocorra (SPULBER & SCHULTZBERG, 2010). Esta interação irá recrutar a molécula adaptadora conhecida como MyD88 que será responsável por acionar duas proteínas: quinase 1 associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK1) e fator 6 associado ao receptor de TNF- α (TRAF6). A ativação dessas três proteínas citadas permite a transdução do sinal até o complexo NF κ B (fator nuclear de ativador do κ B)/I κ B que se deslocarão até o núcleo celular para ativar genes ligados a resposta inflamatória (SPULBER E SCHULTZBERG, 2010). Desta forma estabeleceu-se a relação causal entre a ativação de vias de sinalização inflamatória na obesidade com a gênese da resistência à ação da insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina que possui funções relacionadas a inflamação, resposta imune e hematopoiese. Possui papel de molécula de sinalização entre diferentes células na vigência do controle e coordenação da resposta imunológica a lesão ou infecção, sendo a IL-6 secretada por macrófagos e linfócitos. A sinalização intracelular da IL-6 inicia-se com a ligação à subunidade α do receptor de membrana (IL-6r). Após a ligação IL-6/IL-6r ocorre uma ligação com uma molécula chamada glicoproteína 130 (gp130), então, formando um complexo IL-6/IL-6r/gp130. Após a formação do complexo, a sinalização intracelular é gerada através da via JAK/STAT onde a associação entre IL-6r/gp130 ativa principalmente a proteína conhecida como JAK2 e, após ser fosforilada, ativa o transdutor de sinal e ativador de transcrição conhecido como STAT-3. As proteínas STATs são indutoras de proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS). Especificamente, a SOCS tipo 3 (SOCS3) atua como mediador do feedback negativo na sinalização do IL-6, além de afetar a sinalização insulínica por alterar o resíduo de ativação do substrato do IRS-1 (LEBRUN & VAN OBBERGHEN, 2008).

Vale ressaltar que de acordo com a literatura, o estado inflamatório associado a resistência à ação da insulina está fortemente ligado ao músculo esquelético. Estudos apontam para a infiltração de células inflamatórias no tecido muscular esquelético, geração e secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo próprio tecido muscular (PEDERSEN & FEBBRAIO, 2008) e a presença de diversos componentes da resposta

imunológica inata como os receptores para citocinas do tipo Toll (TLRs) (REYNA *et al.*, 2008).

1.7. O PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR NA RESISTÊNCIA À AÇÃO DA INSULINA

A matriz extracelular é composta por quatro componentes: o colágeno, a elastina, os proteoglicanos e as glicoproteínas estruturais (como a fibronectina e lâminina). O papel biológico mais importante da matriz extracelular é a integração das células nos tecidos, dos tecidos nos órgãos e dos órgãos em todo o organismo (LABAT-ROBERT & ROBERT, 1988). No músculo esquelético, a matriz extracelular tem como função: *I*) suporte estrutural ao músculo esquelético, *II*) controle da chegada de nutrientes e saída de produtos celulares, *III*) veículo de migração celular e *IV*) meio de transporte intercelular.

A matriz extracelular (ECM) é formada de acordo com fatores geneticamente determinados e interfere diretamente na célula regulando seu funcionamento. Consideram a ECM como tendo um papel essencial em múltiplas funções celulares, incluindo regulação da diferenciação, migração, adesão e proliferação celular (PARDO & SELMAN, 1996). Assim, o equilíbrio dinâmico do funcionamento da matriz extracelular é consequência do balanço entre a síntese e a degradação de seus componentes. A ECM é uma estrutura dinâmica que sofre remodelamento durante processos de injúria e reparo. Um processo desequilibrado desse balanço proteico na ECM (conhecido como remodelamento da matriz extracelular) tem sido associado a alguns processos patológicos (WILLIAMS *et al.*, 2015).

Na obesidade, a expressão de proteínas envolvidas no remodelamento da matriz extracelular está aumentada significativamente, ao passo que parece ocorrer uma alteração de proteínas de baixa densidade da matriz extracelular para proteínas de colágeno associado a fibrilas (WILLIAMS *et al.*, 2015). Proteínas de colágeno associado à fibrila são estruturas curtas que ligam as fibrilas de colágeno umas às outras, bem como, a outros componentes da matriz extracelular. Uma primeira hipótese é a matriz extracelular é uma barreira física tanto para a glicose quanto à difusão da insulina. As proteínas se acumulam no espaço intersticial e isso impede uma distribuição adequada de nutrientes e hormônios ao músculo esquelético. Uma segunda

hipótese é que o aumento da matriz extracelular do músculo esquelético compromete o crescimento de novos vasos e da função vascular local. Uma vez que a matriz extracelular está em estreito contato com o endotélio e o fluxo sanguíneo associado ao recrutamento capilar são cruciais para a entrega adequada de glicose e insulina para o músculo esquelético, parece haver uma estreita relação entre a disfunção vascular, densidade microvascular e alteração da matriz extracelular no desenvolvimento da resistência à ação da insulina (WILLIAMS *et al.*, 2015).

Mais recente, o remodelamento da matriz extracelular e mudanças na sinalização das integrinas tem sido proposto como o mais novo mecanismo de resistência à ação da insulina no músculo esquelético (KANG *et al.*, 2013). RICHARDSON *et al.* (2005) foram os primeiros a demonstrarem que a infusão de *Liposyn III*® (uma emulsão de triglicerídeos composta em grande parte por óleo de soja) em sujeitos eutróficos e normoglicêmicos aumentou a expressão de genes relacionados à matriz extracelular. Em modelo animal (KANG *et al.*, 2013) e em humanos (BERRIA *et al.*, 2006), a resistência à ação da insulina parece estar fortemente associada ao aumento de componentes da matriz extracelular no músculo esquelético como colágeno e integrina. As integrinas se ligam a matriz extracelular e ocorre a transdução do sinal através da membrana plasmática para ativação do sinal intracelular. As integrinas sinalizam através de várias proteínas incluindo a proteína quinase de adesão focal (FAK) e proteína quinase acoplada à integrina do tipo 1 (ILK-1). Especula-se que as alterações encontradas na matriz extracelular de indivíduos com resistência à ação da insulina sejam consequência da ativação de uma proteína do grupo das integrinas.

A ILK-1 é capaz de modular a sinalização intracelular através da sua capacidade de recrutar uma proteína quinase ou múltiplas proteínas quinases ao redor do seu complexo proteico conhecido como complexo ILK-PINCH-parvin (LEGATE *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2015). Este complexo funciona como uma plataforma de sinalização das integrinas com o citoesqueleto de actina e diversas vias de sinalização intracelular. O domínio “pseudo” quinase da ILK-1 é um domínio essencial para o recrutamento de proteínas envolvidas na sinalização insulínica tais como a Akt (WILLIAMS *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado que a sinalização intracelular da ILK-1 modula a montagem do citoesqueleto, o que pode ter efeitos tanto a função mitocondrial como na ação insulínica (IRWIN *et al.*, 2003; ZAMURS *et al.*, 2015).

1.8. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA RESISTÊNCIA À AÇÃO DA INSULINA

A obesidade agrava o quadro de resistência à ação da insulina, piorando ainda mais o quadro metabólico e reprodutivo, além de elevar a chance de síndrome metabólica, intolerância à glicose e DM2 (KARAKAS *et al.*, 2010). Sabe-se que o músculo esquelético é o principal território responsável pela captação de glicose mediada pela insulina (O'NEILL, 2013). Defeitos em vias de sinalização insulínica no músculo esquelético podem exacerbar a resistência à ação da insulina intrínseca a obesidade, culminando em resposta atenuada à captação de glicose (SAKAGAMI *et al.*, 2014) como consequência de defeitos na sinalização intracelular. Já são bem documentados os benefícios do exercício físico na melhora do quadro de resistência à ação da insulina, independentemente da redução do peso corporal (COKER *et al.*, 2009).

A diminuição da sensibilidade à insulina na captação de glicose nos tecidos periféricos, principalmente no músculo esquelético, é a anormalidade mais precoce e presumivelmente responsável pela etiologia da resistência à ação da insulina na obesidade. O efeito terapêutico do exercício em pacientes com resistência à ação da insulina foi recomendado para aumentar a utilização de glicose durante e após o exercício, bem como para promoção do aumento da sensibilidade à ação da insulina no músculo esquelético (RICHTER *et al.*, 1982). Em um trabalho clássico, RICHTER *et al.* (1982), observou em ratos que horas após uma sessão de uma sessão de exercício físico, o músculo esquelético exibia um aumento da sensibilidade à insulina para a captação de glicose. Posteriormente, esta observação foi expandida para humanos saudáveis (VIOLLET *et al.*, 2003) e pacientes com resistência à ação da insulina, como obesos (HOJLUND *et al.*, 2004). Assim, o aumento da sensibilidade à insulina no músculo pós-exercício pode ser um fator importante no efeito preventivo sobre o desenvolvimento de DM2 em pacientes obesos (RICHTER *et al.*, 1982). Uma melhor percepção do mecanismo molecular do fenômeno pode, portanto, facilitar o desenvolvimento racional de drogas em um tratamento para os 150 milhões de pacientes com DM2 no mundo.

A capacidade do IRS-1 em ser fosforilado em tirosina após o estímulo da insulina depende da presença de múltiplos sítios de tirosina em localizações estratégicas (SAAD *et al.*, 1992). As funções fisiológicas do IRS-1 foram estabelecidas por meio de camundongos *knockout* para essa proteína. O camundongo que não expressa a proteína IRS-1 apresenta resistência à ação da insulina e restrição do crescimento, mas não é hiperglicêmico (ARAKI *et al.*, 1994). A proteína IRS-1 além de ser fosforilada em tirosina, pode também ser fosforilado no resíduo de serina. O estudo da atividade da IRS-1 no resíduo de serina permite avaliar a resistência à ação da insulina ao nível molecular, uma vez que a fosforilação dessa proteína neste resíduo indica uma redução da transdução do sinal intracelular e, conseqüente, menor ativação da translocação do GLUT4 para a membrana sarcoplasmática (D'ALESSANDRIS *et al.*, 2007). Vários estudos têm demonstrado que a obesidade é um fator causal no aumento da fosforilação do IRS-1 em serina (PAULI *et al.*, 2008). Ademais, o processo inflamatório subclínico é capaz de provocar a fosforilação do IRS-1 no resíduo de serina através da ativação de proteínas quinases como o IKK β e JNK. Uma redução da fosforilação do IKK β permite uma maior migração do NF κ B para o núcleo celular e ativar genes responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias como a IL1- β e o TNF- α (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996).

A ativação da PI3-k é um importante passo para a transdução do sinal intracelular para a translocação do GLUT4 dependente de insulina (SHEPHERD *et al.*, 1998). Essa enzima catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP1), fosfatidilinositol-3,4-difosfato (PIP2) e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Este último produto gerado pela PI3-k regula a proteína PDK1 (proteína quinase dependente de fosfoinosítídeo), uma serina/treonina que fosforila e ativa a proteína quinase B (Akt). Diversos trabalhos demonstram um prejuízo na ativação da PI3-k no tecido muscular esquelético em pacientes obesos com resistência à ação da insulina (VOLLENWEIDER *et al.*, 2002). Apesar da atenuação na ativação dessa proteína em pacientes obesos, a fosforilação da proteína Akt no resíduo de Serina da posição 473 (Akt Ser 473) em resposta ao exercício físico está preservada. Isso demonstra que a insulina e a contração muscular utilizam diferentes sinais intracelulares para a captação de glicose que podem ocorrer de maneira independente a ação da PI3-k (O'GORMAN *et al.*, 2000) e, na ausência de ativação de PI3-k, a contração muscular isoladamente é capaz de ativar a

fosforilação da Akt através da ativação de fatores de crescimento (MUSI & GOODYEAR, 2006).

O exercício físico é um importante efector da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), a qual é estimulada pelo aumento da razão AMP/ATP desempenha um papel crucial na captação de glicose dependente da contração muscular. Por esse motivo, essa proteína quinase é alvo para desenvolvimento de fármacos por servir como estratégia alternativa para o incremento no transporte de glicose no tecido muscular esquelético em pacientes com resistência à ação da insulina (FUJII *et al.*, 2006). A AMPK é uma serina/treonina quinase composta como um heterotrímero de 3 subunidades: uma subunidade catalítica α (63 kDa), duas subunidades regulatórias não-catalíticas β (30 kDa) e uma subunidade γ (38-63 kDa). Ambas as três subunidades são necessárias para a estabilidade e funcionalidade completa do complexo AMPK (WOODS *et al.*, 1996). Há diversas isoformas para cada uma das três subunidades da proteína em questão, embora no músculo esquelético de humanos as isoformas encontradas são $\alpha 2$, $\beta 2$ e $\gamma 3$ (HOJLUND *et al.*, 2004), que surge como o principal sensor de energia intracelular nos mamíferos (WITCZAK *et al.*, 2008). Essa proteína foi originalmente identificada como o regulador de dois mediadores chaves do metabolismo lipídico: acetil-CoA carboxilase e 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (WITCZAK *et al.*, 2008). A ativação da AMPK é resultado da redução do estado energético dentro da célula. Com o aumento da relação entre AMP: ATP ocorre uma modificação conformacional da AMPK que a deixa mais suscetível a fosforilação. A AMPK fosforilada ativa vias que geram aumentam do ATP, tais como a oxidação de ácidos graxos e, em contrapartida, desativa vias de consumo de ATP (ex: vias de síntese de ácidos graxos). O aumento da atividade da AMPK em resposta à necessidade de gerara ATP durante o exercício físico promove a translocação do GLUT4, facilitando o transporte de glicose para o músculo esquelético de forma semelhante à insulina (TREEBAK *et al.*, 2006).

A AS160, considerada com uma proteína-alvo da AMPK, atua como substrato da Akt capaz de reter vesículas intracelulares de GLUT4 (TREEBAK *et al.*, 2006). Quando fosforilada no resíduo de Thr 642 ocorre uma rápida exocitose das vesículas de GLUT4, aumento da expressão de GLUT4 na membrana plasmática e aumento da captação de glicose (KLIP *et al.*, 2014). Já é bem estabelecido que a contração muscular

é capaz de aumentar a fosforilação da AS160 no resíduo de Thr 642 por um mecanismo independente da via PI3-k/Akt (KLIP *et al.*, 2014). Infere-se que o mecanismo seja dependente da ativação da AMPK. (TREEBAK *et al.*, 2006) forneceram evidências de que a proteína AMPK é o principal contribuinte para a regulação da AS160 em resposta a contração muscular. Diversas evidências mostram que a AS160 é capaz de modular a resistência à ação da insulina em diversas doenças metabólicas (SAKAGAMI *et al.*, 2014).

Várias modalidades de exercício físico resultam em uma sensibilidade à ação da insulina melhorada. As intervenções com exercício aeróbico de intensidade moderada observaram reduções na resistência à ação da insulina em obesos com resistência à ação da insulina (MOURIER *et al.*, 1997; MAGKOS *et al.*, 2008). O treinamento de força também tem demonstrado resultados efetivos para o aumento da sensibilidade à ação da insulina. AHMADIZAD *et al.* (2014) demonstraram que um curto período de um programa de treinamento de força foi capaz de diminuir significativamente a resistência à ação da insulina em homens com sobrepeso. Todavia, outros trabalhos têm observado os efeitos combinados do exercício aeróbico e treinamento de força em indivíduos com resistência à ação da insulina. Parece consenso que as melhorias na resistência à ação da insulina são maiores na combinação do treinamento aeróbico e treinamento de força em comparação ao exercício de força isoladamente (KOO *et al.*, 2010). Possivelmente, o maior gasto energético gerado pela combinação das duas modalidades de exercício físico promova um maior gasto energético e, portanto, uma maior captação de glicose por mecanismos dependentes e independentes da ação da insulina quando comparado ao treinamento de força isoladamente (MAGKOS *et al.*, 2008).

A melhoria da sinalização insulínica no músculo esquelético de pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica tem sido bem observada (ALBERS *et al.*, 2015; SEVERINO *et al.*, 2016). Entretanto, boa parte dos estudos demonstrou uma melhora discreta na sensibilidade à insulina no músculo esquelético após a cirurgia bariátrica, mesmo na presença de mudanças na sinalização insulínica neste território (ALBERS *et al.*, 2015; COEN *et al.*, 2015; SEVERINO *et al.*, 2016). Na verdade, ALBERS *et al.* (2015) demonstraram que as melhoras na sensibilidade à insulina após a cirurgia bariátrica estão mais relacionadas a melhora da sinalização insulínica no tecido adiposo do que no tecido muscular esquelético. Assim, o exercício físico emerge como um

importante recurso terapêutico na tentativa de promover o aumento da sensibilidade à ação da insulina no músculo esquelético de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica.

Poucos trabalhos estudaram os efeitos do treinamento físico na resistência à ação da insulina em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. Em um elegante trabalho, COEN *et al.* (2015) demonstraram que a significativa melhora da sensibilidade à ação da insulina no músculo esquelético está relacionada a melhora dos mecanismos de respiração mitocondrial e remodelamento do perfil da cardiolipina (principal glicerofosfolípido encontrado na membrana interna da mitocôndria e possui papel importante na estrutura e função desta organela), mesmo na ausência do aumento do conteúdo mitocondrial no músculo esquelético de pacientes submetidos a um programa de exercícios físicos semi-supervisionado adjuvante à cirurgia bariátrica. Embora esse ensaio clínico randomizado nos forneça importantes informações sobre os mecanismos celulares envolvidos na perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica associada ao exercício físico na obesidade mórbida, o desenho experimental do trabalho supracitado inicia as coletas de dados três meses após a cirurgia bariátrica. Portanto, não foi verificado o efeito isolado da cirurgia bariátrica nas variáveis supracitadas. Além disso, a ingestão alimentar não foi avaliada durante o período de intervenção e o programa de treinamento físico foi acompanhado apenas uma vez por semana por um fisiologista do exercício. As demais sessões da semana o paciente relatava o que ele havia feito. De certo, a ausência de controle das variáveis envolvidas na prescrição do exercício físico pode ter subestimado a melhora da sensibilidade à ação da insulina encontrada neste estudo.

Até o presente momento, nenhum estudo avaliou a relação entre os fatores envolvidos no remodelamento da matriz extracelular com a resistência à ação da insulina no músculo esquelético de pacientes obesos mórbidos submetidos à cirurgia bariátrica e treinamento físico.

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que a matriz extracelular está em contato direto com os capilares presentes no músculo esquelético, especula-se haver uma possível relação entre o remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético e do capilar na piora da

resistência à ação da insulina do músculo esquelético de pacientes obesos mórbidos. A redução do peso corporal (através da cirurgia bariátrica) e o exercício físico são opções de tratamento importantes no manejo clínico da resistência à ação da insulina. No tocante à cirurgia bariátrica, estudos recentes demonstram uma discreta melhora da sensibilidade à insulina no músculo esquelético em pacientes obesos, apesar de uma pronunciada redução do peso corporal (LIMA *et al.*, 2010; KLEIN *et al.*, 2012; COEN *et al.*, 2015). Porém, uma vez que a cirurgia bariátrica é ineficiente em promover uma melhora completa na sensibilidade à insulina no músculo esquelético de pacientes obesos mórbidos, tais fatores tornam-se elementos críticos na piora dos parâmetros clínicos e metabólicos após a cirurgia bariátrica (ZURLO *et al.*, 1990; WEYER *et al.*, 2000; BERGGREN *et al.*, 2008; TOLEDO *et al.*, 2008; STEIG *et al.*, 2011). Além disso, não se sabe se os benefícios da cirurgia bariátrica sobre a função endotelial, importante marcador precoce de aterosclerose, são sustentáveis sem alterações no estilo de vida, como a inclusão de exercícios físicos.

O treinamento físico tem demonstrado resultados encorajadores no que diz respeito ao aumento da sensibilidade à insulina no músculo esquelético (SOLOMON *et al.*, 2010; MALIN *et al.*, 2013; FEALY *et al.*, 2014) e na melhora da função endotelial de pacientes obesos (JOYNER & GREEN, 2009; GREEN *et al.*, 2017). No entanto, não há dados acerca do papel do treinamento físico melhora da resistência à ação da insulina em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, bem como a relação com o remodelamento da matriz extracelular no músculo esquelético em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. Ainda, não é conhecido se o treinamento físico é capaz de sustentar os efeitos metabólicos positivos gerados pela cirurgia bariátrica. Assim, nossa hipótese foi que a melhora completa da resistência à ação da insulina sistêmica está associada com a melhora sustentada da função endotelial e, especificamente, a melhora da resistência à insulina no músculo esquelético pelo treinamento físico está associada a melhora do processo de remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético de pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos do treinamento físico sobre a expressão de genes e proteínas envolvidas na sensibilidade à insulina e remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica (*Estudo 1*).

3.2. Objetivo Específico

Investigar os efeitos do treinamento físico sobre a função endotelial de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica (*Estudo 2, análise interim*).

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em conjunto à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo sob o certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE) 21056813.3.0000.0068 e número do parecer 470085.

4.2. Delineamento Experimental e Aleatorização

Este estudo faz parte de um grande ensaio clínico, controlado e randomizado. Esse estudo está registrado no portal norte-americanos de ensaios aleatorizados *ClinicalTrials* (<http://www.clinicaltrials.gov>) com o número NCT02441361, conforme solicitado pelos jornais de grande impacto na área de saúde e envolve outros três estudos de doutorado, os quais apresentam as seguintes perguntas de pesquisas:

- 1) O treinamento físico é capaz de atenuar a redução de massa óssea em indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica?
- 2) O treinamento físico é capaz de atenuar a atrofia muscular em indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica?
- 3) O treinamento físico é capaz de reverter a resistência à ação da insulina no cérebro em indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica?

Especificamente, neste estudo, pretendemos lançar luz sobre a seguinte questão:

4) *O treinamento físico é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina no músculo esquelético e preservar a melhora da função endotelial de indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica?*

Após triagem e avaliações iniciais, todas as sujeitas foram randomizadas em dois grupos: um grupo que participará de um programa de treinamento físico supervisionado com duração de seis meses (RYGB + TF) ou a um grupo não treinado (RYGB), sem nenhuma prática de exercício físico regular. Após as avaliações iniciais, as pacientes foram submetidas à cirurgia bariátrica pela técnica de derivação gastrointestinal e reconstrução em Y de Roux. Três meses após a cirurgia bariátrica, as pacientes randomizadas para o grupo RYGB + TF iniciarão o programa de treinamento físico. As voluntárias do grupo RYGB foram orientadas a não ingressarem em programas de treinamento físico durante o período do estudo. Entretanto, essas pacientes foram orientadas a aumentarem os níveis de atividade física durante o período do estudo.

No período basal (PRÉ), após a cirurgia bariátrica (PÓS3) e seis meses (PÓS9) após a cirurgia bariátrica, as pacientes realizaram uma avaliação referente ao estudo da resistência à ação da insulina, desfecho primário deste estudo. Além disso, foram submetidas à avaliação da função endotelial e biópsia muscular para determinação da expressão de genes e proteínas relacionados ao remodelamento da matriz extracelular e sensibilidade à insulina.

Ademais, um grupo controle composto por voluntárias saudáveis (CTRL), eutróficas e fisicamente ativas, pareado por sexo aos grupos RYGB + TF e RYGB, foi avaliado apenas no período PRÉ, de modo a produzir valores comparativos para as possíveis modificações observadas com a intervenção. O desenho experimental está ilustrado na figura 2. O *Estudo 2* relata uma análise interim do desfecho secundário função endotelial, obtida de uma subamostra do *Estudo 1*.

Figura 2. Desenho experimental do presente estudo. Grupo controle de mulheres eutróficas e saudáveis (CTRL), cirurgia bariátrica (RYGB), grupo submetido à cirurgia bariátrica e treinamento físico (RYGB + TF).

A aleatorização foi gerada através de um programa *online* (<http://www.randomization.com>) na proporção de 1:1 (um paciente alocado no grupo RYGB e outro paciente alocado no grupo RYGB + TF).

4.3. Recrutamento e Seleção de voluntários

O recrutamento foi realizado no Centro de Referência em Cirurgia Bariátrica e Metabólica do HCFMUSP, sob chefia do Prof. Dr. Marco Aurélio Santo. As candidatas elegíveis para participação no estudo obedeceram aos seguintes critérios de inclusão:

- . mulheres com idade entre 20 a 55 anos;
- . obesidade grau II ($\text{IMC} \geq 35 \text{ kg/m}^2$) e comorbidades associadas;
- . obesidade grau III ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$);
- . não engajadas em programas de treinamento físico por ao menos um ano antes do início do desenho experimental;

- . ausências de acometimentos que poderiam comprometer a participação no estudo, tais como comprometimento articular, neurológico ou cardiovascular que limitem a prática de exercício físico;

Também foi recrutado um grupo de mulheres eutróficas (CTRL) por mídia eletrônica e/ou impressa, com as seguintes características:

- . mulheres com IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m²
- . idade entre 20 a 55 anos;
- . fisicamente ativas.

4.4. *Treinamento Físico*

As sessões de treinamento físico supervisionado ocorreram três vezes por semana, diretamente supervisionadas por um dos profissionais de Educação Física da equipe de pesquisa para assegurar a intensidade e duração do exercício físico. O local de treinamento foi o Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia (LACRE – HCFMUSP).

A sessão teve início com cinco minutos de aquecimento em esteira. Em seguida, iniciou-se o treinamento de força, envolvendo exercícios que contemplam os grandes grupos musculares, com três séries de 8-12 repetições por exercício e intervalo de 60 segundos entre as séries. A sessão de treinamento de força foi composta por 5 exercícios em máquina (*Leg Press 45°*, supino reto, agachamento, puxada frontal, remada sentada, cadeira extensora) e 1 exercício utilizando o peso corporal (flexão plantar). A progressão da carga de cada exercício foi controlada por meio de repetições máximas, sendo que, a partir do momento em que o voluntário estiver apto a realizar um número de repetições maior que 12 repetições, a carga foi incrementada. A duração do treinamento de força foi de aproximadamente 30 minutos.

Para o treinamento aeróbio (realizado em esteira ergométrica), a intensidade foi determinada por meio do teste ergoespirométrico e corresponde ao intervalo de frequência cardíaca entre o limiar aeróbio (La) e o ponto de compensação respiratório (PCR). À medida que houvesse adaptação à carga de treinamento prescrita, as sujeitas

foram incentivadas a aumentar a intensidade, aproximando-a do PCR. O controle de intensidade foi realizado pela frequência cardíaca (FC), com auxílio de frequencímetros da marca Polar® e pela escala BORG de percepção subjetiva de esforço. A duração do treinamento aeróbio foi de 30 minutos até a quarta semana de treinamento físico, a partir da qual ocorre o incremento para 40 minutos por sessão. A partir da oitava semana houve o incremento para 50 minutos de duração do treinamento aeróbio até a décima semana, onde a duração do treinamento aeróbio passou a ser de 60 minutos. Por fim, a sessão de exercício físico era finalizada com 5 minutos de exercícios de flexibilidade (ex: alongamento estático).

De maneira a verificar a aderência presencial das voluntárias as sessões de treinamento físico, as pacientes assinaram uma lista de presença em cada sessão de exercício físico.

4.5.   *Teste ergoespiométrico*

Para a determinação da capacidade aeróbia, as pacientes realizaram um teste ergoespiométrico em esteira rolante (*Centurion 200, Micromed*), seguindo um protocolo em rampa com aumento a cada minuto na carga de trabalho (velocidade e/ou inclinação) até a exaustão. Durante o teste de esforço, o comportamento cardiovascular foi continuamente avaliado através de eletrocardiógrafo, com as 12 derivações simultâneas. A FC e pressão arterial (PA) foram registradas em repouso, ao final de cada minuto do teste de esforço e no 1º, 2º, 4º e 6º minuto de recuperação.

A avaliação da potência aeróbia máxima foi avaliada através da medida direta do consumo de oxigênio no pico do exercício (VO_{2pico}) através de um sistema de sensor que permite a mensuração da ventilação pulmonar (VE) a cada expiração (*Metalyzer modelo III b/ breath- by- breath*). Os limiares metabólicos foram determinados por um único avaliador experiente. Todos os testes foram conduzidos sob a supervisão de um médico.

4.6.   *Coleta Sanguínea*

Após jejum noturno de 12 horas, as pacientes compareceram ao LACRE para coleta de ~15 mL de sangue da veia basílica mediana ou cefálica para as análises de

concentrações de marcadores lipídicos, hepáticos, inflamatórios e de resistência à ação da insulina. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 1000 g, por 15 minutos à 4° C. Exceto para os marcadores inflamatórios, todas as demais análises foram realizadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

4.7. *Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)*

Para avaliação da resistência a ação da insulina, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Foi administrado por via oral 75 g de solução de dextrose (Laborclin®) em 300 ml de água as pacientes, seguidos de coletas de sangue para determinação da glicose e da insulina a serem realizadas antes, 30, 60, 90, 120 minutos após a administração da solução de dextrose. A área total abaixo da curva de insulina e glicose foi calculada por meio do modelo trapezoidal. A partir dos valores de glicemia e insulinemia de jejum, foi calculado o índice *Homeostase Model Assessment* (HOMA-IR) (MATTHEWS *et al.*, 1985). Além disso, foi estimada a sensibilidade à insulina no corpo inteiro (Índice Matsuda), no território muscular e a estimativa de secreção de insulina (DI) através da fórmula proposta por (ABDUL-GHANI *et al.*, 2007). Ademais, foi determinada a hemoglobina glicada (HbA1c) por meio da técnica de cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) em coluna de troca iônica, sistema Variant II (Bio-rad), como marcador do percentual das glicemias médias diárias dos pacientes.

4.8. *Biópsia muscular por agulha de sucção (Estudo 1)*

As biópsias musculares foram realizadas na enfermaria da Disciplina de Reumatologia pelo Prof. Dr. Samuel Katsuyuki Shinjo, do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). As voluntárias foram submetidas à biópsia muscular por agulha de sucção da porção média do músculo vasto lateral da coxa. Esse procedimento foi realizado pela manhã após 8 horas de jejum e 72 – 96 horas após a última sessão de exercício físico e permitiu obter uma amostra de aproximadamente 150 - 200 mg da porção média do músculo vasto lateral da coxa.

As voluntárias foram orientadas a deitar-se em uma maca, mantendo os joelhos estendidos e a musculatura relaxada. O médico responsável fez a assepsia e antisepsia

da perna direita e, em seguida, administrou 3 mL de xilocaína a 2% sem vasoconstrictor para anestesia local. A aplicação do anestésico foi feita com agulhas hipodérmicas descartáveis, de forma subcutânea. Após anestesia local, foi realizada a incisão para a entrada da agulha de biópsia no tecido muscular. Para tanto, foi utilizada lâmina de bisturi nº11, esterilizada, individual e descartável para realizar a incisão de aproximadamente 0.5 cm de extensão. A incisão cortou a pele e a fáscia muscular. A agulha de biópsia, esterilizada e de uso individual, foi então inserida através do orifício gerado pela incisão. Após uma sucção, aplicada na extremidade superior externa da agulha por uma seringa de 120 mL, uma pequena amostra de músculo foi succionada para o interior da agulha e cortada pela sua lâmina interna da agulha.

Após a retirada da agulha, foi aplicada pressão sobre o ponto de incisão para prevenir sangramento. A incisão foi fechada com bandagem esterilizada e coberta com uma pequena atadura para prevenir o seu desprendimento. As voluntárias foram instruídas a manter a bandagem limpa e seca pelo período de 24 horas. A figura 3 ilustra o procedimento.

Figura 3. Ilustração do procedimento de biópsia muscular por agulha de sucção, conforme descrito previamente pelo nosso grupo (NEVES *et al.*, 2012). Note que, a sutura não é realizada em nosso método. Figura extraída de (TARNOPOLSKY *et al.*, 2011).

Imediatamente após a retirada do fragmento, as amostras visíveis de tecido adiposo ou conectivo foram retiradas usando um microscópio de dissecação padrão

(Quimis Q7740SZ, Quimis Equipamentos Científicos, Brasil). Porções de amostras de músculo esquelético foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em -80°C para estudos da expressão de genes, proteínas e estrutura do músculo esquelético. Especificamente, uma porção separada ($\sim 10\text{ mg}$) foi fixada quimicamente e armazenada a 4°C para estudo da ultraestrutura do músculo esquelético por meio da microscopia eletrônica. Outro fragmento de músculo esquelético ($\sim 20\text{ mg}$) foi incorporada em Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Holanda) com fibras musculares orientadas perpendicularmente à superfície horizontal e rapidamente congeladas em isopentano e, em seguida, em nitrogênio líquido.

4.9. Composição corporal

As voluntárias foram pesadas em balança digital. A altura foi determinada na posição em pé, com auxílio de estadiômetro. Essas medidas foram utilizadas para o cálculo do índice de massa corporal (IMC). A composição corporal, incluindo massa magra, massa gorda, porcentagem de gordura, área total do tecido adiposo visceral e quantidade total do tecido adiposo visceral foram avaliadas por meio de absorptiometria por dupla fonte de raios-X (DXA) no Laboratório de Metabolismo Ósseo da FMUSP (LIM-17), usando o equipamento iDXA (GE Lunar Sistemas Médicos, Madison, WI).

4.10. Avaliação do perfil lipídico

Para avaliação do metabolismo lipídico, foram determinadas em amostras de soro as concentrações de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e triglicérides (TG) por métodos enzimáticos colorimétricos.

A partir dessas determinações foi possível inferir a quantidade de VLDL-colesterol e LDL-colesterol de acordo com a equação de FRIEDEWALD *et al.* (1972):

$$(\text{VLDL-colesterol} = \text{TG}/5)$$

$$(\text{LDL-colesterol} = \text{colesterol total} - (\text{HDL-colesterol} + \text{VLDL-colesterol}))$$

4.11. Avaliação do metabolismo hepático

Para avaliação do metabolismo hepático, foram determinadas em amostras de soro as concentrações de aspartato aminotransferase (TGO) e alanina aminotransferase (TGP) por métodos enzimáticos colorimétricos.

4.12. Análise Histológica do Músculo Esquelético (Estudo 1)

Cerca de 20 mg de amostra de músculo esquelético foram cuidadosamente dissecados, livre de sangue e tecido gorduroso visível, rapidamente congelada em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e acrescentado *Tissue-Tek*® para avaliação histológica por imunofluorescência.

Nesta técnica, as secções (7 µm) foram previamente fixadas com metanol por 10 minutos em temperatura ambiente, lavadas e bloqueadas por 60 minutos em tampão contendo PBS, 5% de soro fetal bovino (FBS) 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro de cabra (*goat serum*), diluídos em tampão fosfato salino (PBS). As lâminas foram incubadas com solução contendo os anticorpos primários contra colágeno I e colágeno III em solução PBS com 1,5% de *goat serum* por 12 horas à 4°C. No dia seguinte, após lavagem com 0,05% de Triton X-100 em PBS, os cortes foram incubados por 60 minutos em sala escura com uma solução PBS contendo 1,5% de *goat serum* e anticorpo anti-coelho IgG *Alexa Fluor 488* (1:200, ThermoFisher Scientific®). Após 30 minutos de lavagem em 0,2% de Triton X-100 em PBS, as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando-se glicerol tamponado (60% glicerol, 40% Tris-HCL 0,1M pH 9.3).

A captura de imagens foi realizada em computador acoplado a um microscópio fluorescente (Olympus BX51, Tóquio, Japão) e conectado a um sistema fotográfico (magnificação de 200x). A quantificação da fluorescência foi realizada pelo *software* Image J (NIH, EUA) e expressas em unidades arbitrárias de fluorescência, conforme descrito previamente (BECHARA *et al.*, 2014). Todas as imagens de imunofluorescência foram analisadas por um único pesquisador de maneira cega.

4.13. Avaliação da ultraestrutura dos capilares do músculo esquelético (Estudo 1)

Amostras de músculo esquelético foram fixadas em glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio e potássio (0.15M, pH 7,2) por 60 minutos, seguido de pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% (OsO₄), dissolvido em 0.9% em NaCl por 60 minutos. O material fixado foi marcado em bloco composto de acetato de uranila aquosa por 24 horas. Após esse procedimento, as amostras foram desidratadas em acetona e embebidas em resina araldite. Cortes ultrafinos foram obtidos com uma faca de diamante no ultramicrotomo *Reichert Ultracut UCT*® e coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo. A captura das imagens para microscopia eletrônica de transmissão (JEOL® 1010) acoplado a uma câmera de alta resolução (AMT®) foram realizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP.

As imagens geradas foram analisadas por uma médica patologista de maneira cega. Para cada paciente, 10 imagens foram analisadas e um escore semiquantitativo como previamente descrito (DE ARAUJO *et al.*, 2016). Os parâmetros analisados nos capilares do músculo esqueléticos foram: espessura da membrana basal, lesão de célula endotelial e pericito, presença de fibroblastos e fibras de colágeno. Os achados patológicos foram classificados em um sistema de pontuação de cinco pontos, baseado na gravidade, conforme descrito: 0 = capilar normal, 1 = mudanças de 1 a 25%, 2 = mudanças de 26% a 50%, 3 = mudanças de 51% a 75% e 4 = mudanças de 76% a 100% do tecido examinado.

4.14. Sequenciamento gênico em larga escala do músculo esquelético (RNA-seq) (Estudo 1)

Aproximadamente, 20 mg de tecido muscular esquelético foram homogeneizadas usando o Kinematica Polytron™ PT 1300 (ThermoFisher Scientific®) para a extração do RNA total (6 pacientes por grupo), usando o reagente TRIzol (Invitrogen®) e isolado de acordo com as recomendações do kit *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen®). A concentração total de RNA das amostras foi quantificada por meio do espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA) e o número de integridade do RNA (RIN) foi verificado por eletroferese capilar por meio do Bionalyzer 2100 (Agilent®). A média do RIN foi de 8,1 a 9,0. Para cada amostra, ~200

ng de RNA total foi entregue ao *Genomics Core* da *Pennington Biomedical Research Center* para sequenciamento do RNA mensageiro (RNA-seq).

A análise bioinformática dos RNAs mensageiros do músculo esquelético utilizou várias listas de genes relacionados a matriz extracelular a partir do banco de dados *MSigDB*. A saber, estes conjuntos de genes são originalmente baseados do Projeto *Matrisome*. O projeto *Matrisome* é o resultado da união de diversos cientistas com o objetivo de caracterizar e prever do ponto de vista da bioinformática, o conjunto de genes que codificam o “*matrisome*”, ou seja, o conjunto de genes e proteínas que codificam e regulam a matriz extracelular. Portanto, o projeto *Matrisome* (<http://matrisomeproject.mit.edu>) é uma plataforma de dados, métodos e protocolos que fornece informações e recursos de fácil acesso para pesquisas sobre genes e proteínas relacionadas a matriz extracelular.

4.15. Avaliação da Expressão Gênica do Músculo Esquelético (Estudo 1)

Foram homogeneizados ~20 mg de tecido muscular em 1 mL de Trizol (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75% para eliminação de resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água tratada com DEPC. A concentração das amostras foi quantificada por meio do espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA). Além disso, a integridade e pureza do mRNA foram verificadas através do Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA). O RNA isolado foi armazenado em -80°C até sua utilização.

Para tanto, a transcrição reversa foi realizada utilizando o SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit® (ThermoFisher Scientific, MA, USA) de acordo com orientações do fabricante. A expressão do RNA mensageiro (mRNA) foi avaliada por meio da reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) dos genes *FGF1* (fator de crescimento de fibroblastos tipo 1), *FGF2* (fator de crescimento de fibroblastos tipo 2), *TIMP1* (inibidor da metaloproteinase tipo 1), *MSTN* (miostatina) e *PGC1-α* (do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) e *β2M* (beta-2-microglobulina) utilizando primers específicos conforme descrição da Tabela 2. As sequências foram adquiridas pelo site

www.ncbi.nih.gov/nucleotide e para montagem do mapa gênico da sequência escolhida foi utilizado o *software online Primer 3 Input* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>).

A quantificação da fluorescência foi feita pelo sistema de detecção de sequências ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, USA). Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo dos ciclos (Ct) conforme descrito pelo produtor do sistema. Os valores de delta Ct (DCt) foram calculados para cada amostra e para cada gene de interesse, exceto o Ct do gene normalizador, a saber, beta-2-microglobulina ($\beta 2M$). Os resultados foram expressos em % do PRÉ do respectivo grupo experimental.

Genes	Forward	Reverse	Pares de base (pb)
<i>FGF1</i>	5' – CTGCCTCCAGGGAATTACAA – 3'	5' – TATAAAAGCCCGTCGGTGTC – 3'	215
<i>FGF2</i>	5' – GAGAAGAGCGACCTCACAT – 3'	5' – ACTGCCAGTTCGTTTCAGT – 3'	238
<i>TIMP1</i>	5' – AATTCCGACCTCGTCATCAG – 3'	5' – CTGCAGTTTTCCAGCAATGA – 3'	231
<i>MSTN</i>	5' – GTGGATGGAAAACCCAAATG – 3'	5' – GCCTGGGTTCATGTCAAGTT – 3'	207
<i>PGC1-α</i>	5' – CACCAGCCAACACTCAGCTA – 3'	5' – GTGTGAGGAGGGTCATCGTT – 3'	220
$\beta 2M$	5' – GGTTTACTCACGTCATCCAGC – 3'	5' – ACACGGCAGGCATACTCATA – 3'	178

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para avaliação da expressão de RNA mensageiro.

4.16. Avaliação da Expressão Proteica do Músculo Esquelético (Estudo 1)

Aproximadamente 40 mg de tecido muscular foi pesado e homogeneizado em tampão de lise contendo 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio, 2.5 mM pirofosfato de sódio, 1 mM beta-glicerofosfato, 1 mM ortovanadato de sódio, 1µg/mL leupeptina, 1 mM PMSF e inibidores de protease e fosfatase (1:300, Sigma-Aldrich, USA) para a avaliação da expressão proteica por *Western Blotting*. O homogenato foi centrifugado à 14000 g, 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos *ependorf* de 1.5 mL e a concentração de proteínas foram analisadas por meio do *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, MA, USA) de acordo com orientações do fabricante. Quarenta microgramas de proteína foram diluídos em tampão de amostra (240 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.8% SDS, 200 mM β -mercaptoetanol, 40% glicerol e 0.02% azul de bromofenol), aquecidas a 100°C por 5 minutos e aliqotadas em -80°C. A análise da expressão de proteínas foi realizada pela técnica de *Western Blotting*. Para tanto, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (Mini-Protean®TGX™ Precast protein Gel, Bio-rad, USA) em um aparato para minigel (Mini-Protean® Tetra Cell System, Bio-rad, USA) a 110 V. A transferência para membrana de nitrocelulose

das proteínas separadas no gel de poliacrilamida foi feita realizada a 100 V com duração de 1 hora e 40 minutos. Posteriormente, a ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi minimizada pela incubação com 10 mL de solução bloqueadora (5% BSA em solução tampão Tris e Tween - TBS-T) por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução TBS-T (5 x de 5 minutos) e solução TBS (1 x de 10 minutos). A membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com o anticorpo primário que se liga a proteína de interesse, formando um complexo anticorpo-proteína.

Foram utilizados os anticorpos primários pIRS-1_{Ser307} (Millipore, 1:1000), pIRS-1_{Tyr612} (1:1000, Invitrogen), pAkt_{Ser473} (1:1000, Cell Signaling), pAMPK_{Thr172} (1:1000, Cell Signaling), Glicogênio sintase (GS) (1:1000, Cell Signaling), pAS160_{Thr642} (1:1000, Cell Signaling), GLUT4 (Millipore, 1:750), OXPHOS (1:1000, Abcam), pJNK_{Thr183/Tyr185} (1:1000, Cell Signaling), pGSK-3 α/β _{Ser21/9} (1:1000, Cell Signaling), p β -catenina_{Ser33/37Thr41} (1:1000, Cell Signaling), pSMAD 2_{Ser465/467/3} _{Ser423/425} (1:1000, Cell Signaling), MMP-9 (1:1000, Cell Signaling), ILK-1 (1:1000, Cell Signaling), α -parvin (1:1000, Cell Signaling), Folistatina (1:1000, Abcam), TGF β 1 (1:1000, Genetex), Wnt1 (1:1000, Invitrogen), Rac1 (1:2000, Millipore), Vimentin (1:1000, Cell Signaling), HSC70 (1:1000, Santa Cruz) e GAPDH (1:1000, Cell Signaling).

No dia seguinte, a membrana de nitrocelulose foi novamente lavada com TBS-T (5 x de 5 minutos) e solução TBS (1 x de 10 minutos) e, incubada com anticorpo secundário conjugado a *horseadish peroxidase* (HRP), direcionando a porções espécies-específicas do anticorpo primário. A imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência (Femto®SuperSignal West Chemiluminiscent Substrate, ThermoScientific, USA), posteriormente, visualizadas através do fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE®Healtcare, USA) e quantificadas pelo programa Scion Image®. O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a proteína de estresse térmico de 70 kDa (HSC70) foram utilizados como proteínas normalizadoras.

4.17. Fracionamento celular (Estudo 1)

Para a determinação da translocação celular das proteínas p β -catenina_{Ser33/37Thr41} (1:1000, Cell Signaling) e pSMAD 2_{Ser465/467/3}_{Ser423/425} (1:1000, Cell Signaling), a fração citosólica e nuclear de amostras de músculo esquelético do período PÓS9 foi

processada de acordo com as recomendações do kit *NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit* (ThermoFisher Scientific®). Para tanto, a homogeneização do tecido utilizou o tampão CER-I adicionado de inibidores de protease e fosfatase (1:300, *Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail*, ThermoFisher Scientific®). O homogenato foi agitado durante 30 segundos, incubados por 5 minutos em gelo e novamente agitados durante 15 segundos. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 20.000 *g* por 10 minutos à 4°C. A fração citosólica foi obtida removendo o sobrenadante. No intuito de aumentar a pureza da fração citosólica, o sobrenadante foi novamente submetido a centrifugação a 20.000 *g* por 10 minutos à 4°C. O *pellet* contendo a fração nuclear foi ressuspensão em tampão PBS suplementado com inibidores de protease e fosfatase e centrifugado à 20.000 *g* por 10 minutos a 4°C por 5 vezes, para a retirada completa de material remanescente contendo a fração citosólica. O *pellet* lavado foi ressuspensão em tampão NER (suplementado com inibidores de protease e fosfatase) e agitado por 30 segundos ao longo de 40 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada à 20.000 *g* por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi aliquoteado. Alíquotas de fração citosólica e nuclear foram armazenadas em -80°C para a posterior determinação da concentração de proteínas utilizando o *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, MA, USA) de acordo com orientações do fabricante.

Para a confirmação da eficiência e qualidade do fracionamento celular foi realizado a avaliação da expressão proteica por *Western Blotting* da α -tubulina (marcação citosólica) e histona H3 (marcação nuclear).

4.18. Imunoprecipitação (Estudo 1)

As amostras de músculo esquelético foram homogeneizadas em tampão de lise gelado contendo 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio, 2.5 mM pirofosfato de sódio, 1 mM beta-glicerofosfato, 1 mM ortovanadato de sódio, 1 µg/mL leupeptina, 1 mM PMSF e inibidores de protease e fosfatase (1:300, *Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail*, ThermoFisher Scientific®). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 14.000 *g*. As concentrações de proteína foram determinadas por meio do *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, MA, USA) de acordo com orientações do fabricante. Posteriormente, 100 µg de

proteína foram adicionados à 30 µL do reagente *Protein A/G beads* (Santa Cruz Biotechnology®) e 6 µL do anticorpo anti-SMAD 2/3 (Cell Signaling®) e incubados à 4°C por 12 horas. Um controle negativo composto de 100 µg de proteína adicionado de 2 µL de anticorpo secundário *anti-rabbit* (1:400, ThermoFisher Scientific®). Ao término das 12 horas de incubação, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 2 minutos à 4°C. Após a centrifugação, o *pellet* remanescente foi ressuspensão e purificado por 3 vezes, utilizando o mesmo tampão para a extração de proteínas. Em seguida, 20 µL de tampão Laemli foram adicionadas as proteínas, desnaturadas por aquecimento a 100°C durante 5 minutos e, aplicadas ao 4-20% Novex™ Tris-Glicina Gel (ThermoFisher Scientific®). As proteínas transferidas à membrana de PVDF foram incubadas com o anticorpo primário para Akt Ser 473 (1:400, Cell Signaling®). O reagente de detecção *Veriblot IP* (Abcam®) foi utilizado como anticorpo secundário, permitindo a detecção das bandas relacionadas à proteína alvo, sem problemas de interferência da IgG desnaturada.

4.19. Cultura de células musculares C2C12 (Estudo 1)

Mioblastos C2C12 de camundongos (American Type Culture Collection, Manassas, VA) foram expandidos em garrafas de cultura celular (Corning, 75 cm²) em meio de cultura de crescimento contendo DMEM com alta concentração de glicose (*Dulbecco's-modified Eagle's Medium high glucose – Cleveland Clinic Lerner Research Institute – Cell Culture Core*), 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, Life Technologies), penicilina e estreptomicina (5.000 µ/mL, *Cleveland Clinic Lerner Research Institute – Cell Culture Core*), mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A diferenciação em miotúbulos foi induzida através da troca do meio de cultura de crescimento por um meio de cultura contendo DMEM com alta concentração de glicose, suplementado com 2% de soro equino (Gibco, Life Technologies), penicilina e estreptomicina (5.000 µ/mL, *Cleveland Clinic Lerner Research Institute – Cell Culture Core*), mantidos por 6 dias com troca do meio de diferenciação a cada dia em horários fixos.

No sexto dia de diferenciação, as células foram colocadas em meio de cultura DMEM com baixa concentração de glicose (1 g/L) suplementado com BSA 1% livre de ácidos graxos, previamente ao tratamento com TGF-β1 e follistatina. As células foram

tratadas com meio DMEM com baixa concentração de glicose (1 g/L) suplementado com BSA 1% livre de ácidos graxos adicionados as seguintes condições experimentais: BSA 1%, TGF- β 1 (10 ng/mL), Folistatina (1.8 μ g/mL) e TGF- β + Folistatina, conforme publicações prévias (AKHMETSHINA *et al.*, 2012; ABRIGO *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2017). Para o estudo da sinalização insulínica foi adicionado 100 nM de insulina a cada condição experimental nos 30 minutos finais do tratamento. Ao final do experimento, as células foram lavadas por três vezes em uma solução contendo PBS gelado e ortovanadato de sódio. Após as lavagens, em cada poço foi adicionado 150 μ L de tampão RIPA suplementado com inibidores de fosfatase e protease (1:300, *Halt^{TM} Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail*, ThermoFisher Scientific®) e imediatamente congelada em -80°C. Após 12 horas de congelamento, as placas foram colocadas em agitação à 4°C e, posteriormente, coletadas e centrifugadas por 10 minutos, 12.000 g à 4°C. A leitura de proteína dos lisados foram realizados por meio do *Pierce^{TM} BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, MA, USA) de acordo com orientações do fabricante.

4.20. Avaliação das citocinas pró e anti-inflamatórias (Estudo 2)

Amostras de soro após 12 horas de jejum noturno foram colhidas e imediatamente centrifugadas a 1000 g por 15 minutos à 4°C. Foram determinadas as concentrações de interleucina-1 beta (IL1- β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) através do ensaio imunoabsorção enzimática (ELISA) (Bio-Plex Precision Pro ^{TM} Human Cytokine, Bio-Rad, CA, EUA), de acordo com as determinações do fabricante. Além disso, foram determinadas as concentrações de adiponectina (Cloud-Clone Corp., TX, EUA) e leptina (Millipore, Billerica, EUA) por meio do método ELISA. Para tanto, apenas 11 pacientes por grupo apresentaram amostras de soro em condições adequadas para as análises mencionadas.

4.21. Avaliação da função endotelial da artéria braquial (Estudo 2)

A avaliação da função endotelial foi realizada em uma sala, silenciosa, com temperatura controlada (28°C). Todas as pacientes realizaram as avaliações dentro do mesmo horário (entre oito e 11 horas da manhã). As pacientes foram orientadas a

realizarem um jejum noturno de 8 horas e abster-se do uso de bebidas alcoólicas, bebidas com cafeína e exercício físicos nas 24 horas anteriores à avaliação. Para reduzir o impacto do ciclo menstrual na função vascular (JOYNER & GREEN, 2009), as pacientes que apresentaram ciclos menstruais regulares foram avaliadas durante a fase folicular precoce do ciclo menstrual. Todas as avaliações foram realizadas por um pesquisador experiente e “cego” para a alocação das pacientes nos grupos experimentais e período de intervenção.

A resposta vasodilatadora dependente do endotélio mediada pelo fluxo (FMD) foi realizada de acordo com diretrizes atuais (CORRETTI *et al.*, 2002). Inicialmente, as pacientes foram orientadas a deitarem em uma cama hospitalar, em posição supina, mantendo um repouso de 15 minutos. Após esse período, a pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foram determinadas usando um esfigmomanômetro automatizado (OMRON®, Omron Healthcare, São Paulo, Brasil). As pacientes foram então posicionadas com o braço direito estendido a um ângulo com $\sim 80^\circ$ do tronco e imobilizados com suportes de espuma. Um manguito pneumático de desinsuflação automática (Hokanson®, Bellevue, CA, EUA) foi posicionado no antebraço dos participantes para fornecer estímulo isquêmico. Um transdutor linear (7-12 MHz) acoplado a um aparelho de ultrassom de alta resolução (Sequoia Echocardiography System, versão 6.0, Acuson, Siemens, CA, EUA) foi utilizado para avaliar o diâmetro da artéria braquial no terço distal do membro superior direito. A velocidade do fluxo sanguíneo com Doppler contínuo também foi analisada com um ângulo de 60° de insonação e o calibrador colocado no meio da imagem da artéria. Inicialmente, o diâmetro basal e a velocidade do fluxo sanguíneo foram adquiridos por 1 minuto e, então, o manguito do antebraço foi inflado a ~ 200 mmHg por cinco minutos. As gravações foram retomadas aos 30 segundos antes da deflação do manguito e continuaram por três minutos após sua liberação.

Após um período de 15 minutos de repouso, outro registro de um minuto foi realizado para o diâmetro da artéria braquial e velocidade do fluxo sanguíneo. Em seguida, cinco miligramas de dinitrato de isossorbida sublingual (GTN) (Isordil®, EMS, São Paulo, Brasil) foram administrados nas pacientes. Após a completa dissolução do comprimido, uma nova gravação das imagens foi realizada por cinco minutos.

Todas as variáveis dependentes (diâmetro, fluxo sanguíneo e a estimativa do

estresse de cisalhamento da artéria braquial) foram obtidas através do software de detecção de borda e rastreamento da parede arterial (Cardiovascular Suite, Quipu®, Pisa, Itália). A FMD foi calculada como a porcentagem (%) de elevação do diâmetro da artéria braquial obtido após a liberação do manguito do antebraço em relação ao diâmetro basal. Assim, o tempo até a dilatação máxima foi calculado como o tempo entre a deflação do manguito do antebraço e o diâmetro máximo da artéria braquial. O estresse de cisalhamento anterógrado e retrógrado foi estimado através da fórmula:

$$4 \times BV / D$$

(BV é a velocidade média do sangue e D o diâmetro obtido a partir do registro basal em repouso).

Os componentes anterógrados e retrógrados foram separados considerando-se a média da velocidade do sangue acima e abaixo da escala do ultrassom Doppler (0 cm/s). A resposta vasodilatadora independente do endotélio foi calculada como o aumento percentual no diâmetro braquial após a administração do GTN a partir do diâmetro basal. Os testes foram realizados de acordo com as diretrizes da “*International Brachial Artery Task Force*” (CORRETTI *et al.*, 2002) e por uma avaliadora experiente pertencente a equipe de trabalho.

5. EQUIPE E LOCAL DE EXECUÇÃO DO ESTUDO

O trabalho ocorreu no HCFMUSP, que possui estrutura plena para sua realização. A equipe de pesquisa foi composta pelos médicos assistentes da equipe do Prof. Dr. Marco Aurélio Santo, responsáveis por recrutar, selecionar e acompanhar os voluntários durante o seguimento. O teste ergoespiométrico e o treinamento físico foram realizados no LACRE do HCFMUSP, sob a supervisão da Dra. Ana Lúcia de Sá Pinto. As biópsias musculares foram realizadas na enfermaria da Disciplina de Reumatologia pelo Prof. Dr. Samuel Katsuyuki Shinjo. A análise histológica do músculo esquelético por imunofluorescência foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Walcy Rosolia Teodoro (Laboratório de Matriz Extracelular) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e a análise da ultraestrutura dos capilares do músculo esquelético foi realizada em colaboração com a Profa Dra. Vera Luiza

Capelozzi do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As análises de expressão gênica e proteica foram realizadas no Laboratório de Investigação em Reumatologia (LIM - 17) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O sequenciamento gênico de larga escala (RNA-seq), análise bioinformática, fracionamento celular, imunoprecipitação e os experimentos em cultura de célula muscular C2C12 foram realizados no *Integrative Physiology and Molecular Medicine Laboratory* na Pennington Biomedical Research Center sob a supervisão do Prof. Dr. John Patrick Kirwan.

O aluno Wagner Silva Dantas participou de todas as etapas experimentais, sob supervisão do Prof. Dr. Bruno Gualano (EEFEUSP), que coordena o projeto, conjuntamente ao Prof. Dr. Hamilton Roschel.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi determinado com auxílio do software G-Power (Versão 3.1.9.2, Universidade de Kiel, Alemanha). A análise foi realizada assumindo um poder ($1 - \text{erro } \beta$) de 0,90, erro α de 0,05 e tamanho do efeito (*Hedges's g* = 1,68), a partir de um estudo prévio que examinou os efeitos do treinamento físico na sensibilidade à insulina no músculo esquelético em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica (COEN *et al.*, 2015). O número amostral total retornado pelo software foi de 40 sujeitos. A fim de minimizar efeitos de uma possível perda amostral, em geral observada em estudos com indivíduos obesos, elevaremos o número amostral em 50%, totalizando 60 sujeitos, os quais serão designados a cada grupo experimental, conforme descrição prévia. Da mesma maneira, no *Estudo 2* foi realizado o tamanho da amostra a partir do estudo de (PUGH *et al.*, 2014). O tamanho total da amostra foi determinado em 20 pacientes. Com o intuito de atenuar possível perda de voluntários, aumentamos em 50% (isto é, uma subamostra total de 30 pacientes).

O *Mixed Model* (SAS® 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) para análises de medidas repetidas foi empregado para cada variável dependente com grupo (RYGB e RYGB + ET) e tempo (PRÉ, PÓS3 e PÓS9) como fator fixo e sujeitos como fator aleatório. No caso de significância dos valores de F, será realizado um teste *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Todas as análises foram conduzidas de acordo com o princípio da intenção de tratamento. Para as medidas não repetidas foi utilizado a

análise de *ANOVA one-way*. As características basais foram comparadas entre os dois grupos experimentais usando o teste *t* de *Student* ou teste exato de Fisher. As associações foram calculadas pelo coeficiente de correlação de Pearson. Todos os dados serão expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP) ou erro padrão (EP), estimativa da diferença média entre os grupos (EMD), intervalos de confiança de 95% (95% IC) e tamanho do efeito (ES). Os dados foram analisados a abordagem de intenção de tratamento (ITT). O nível de significância adotado para rejeitar a hipótese nula será de $p \leq 0,05$.

7. RESULTADOS (*Estudo 1*)

7.1. *Participantes*

Para o ESTUDO 1, as pacientes foram recrutadas e selecionadas no período de setembro de 2015 a julho de 2017. Duzentos e onze pacientes foram triadas e 149 pacientes foram excluídas por não atender os critérios de inclusão previamente determinados ou não aceitaram participar do estudo. Portanto, 62 pacientes que atingiram os critérios de inclusão e aceitaram a participação no estudo foram randomizadas em um dos grupos experimentais. Adicionalmente, 16 mulheres eutróficas foram recrutadas e avaliadas no período PRÉ.

Durante o seguimento, 10 pacientes do grupo RYGB desistiram do estudo (8 pacientes desistiram da cirurgia bariátrica e 2 pacientes desistiram por motivos pessoais), enquanto 9 pacientes do grupo RYGB + ET desistiram do estudo (8 pacientes desistiram da cirurgia bariátrica e 1 paciente desistiu por motivos pessoais) e uma paciente teve o diagnóstico de câncer de tireoide e foi excluída. As demais pacientes randomizadas cumpriram todo o protocolo experimental. A figura 4 ilustra o fluxograma do estudo.

A tabela 3 apresenta as características demográficas, educacionais, socioeconômicas e farmacológicas dos grupos experimentais no período PRÉ e do grupo CTRL. Nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais foi observada para as características demográficas, educacionais, socioeconômicas e farmacológicas no período PRÉ ($p > 0,05$). Ademais, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos (RYGB vs RYGB + ET) para as variáveis relacionadas a composição corporal (peso corporal, percentual de gordura corporal, massa de gordura, massa magra e tecido adiposo visceral), parâmetros bioquímicos (CT, HDL, LDL, VLDL, TG, TGO, TGP, PCR, peptídeo C, HbA1c, leptina e adiponectina), aptidão física ($VO_{2\text{pico}}$) e parâmetros hemodinâmicos (PAS e PAD) no período PRÉ ($p > 0,05$).

Figura 4. Fluxograma do ESTUDO 1. CTRL: grupo de mulheres eutróficas; ITT: *intention-to-treat*; RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica e treinamento.

	RYGB (n = 31)	RYGB + ET (n = 31)	P valor (RYGB vs. RYGB + ET)	CTRL (n = 16)
	PRÉ	PRÉ		PRÉ
. Demográficos				
Idade (anos)	42 ± 7	39 ± 7	0,28	38 ± 7
Doença arterial coronariana	0 (0)	0 (0)	0,99	0 (0)
Fumantes	2 (6,4)	2 (6,4)	0,63	0 (0)
Diabetes Mellitus Tipo 2	5 (16,1)	3 (9,6)	0,67	0 (0)
Hipertensão	20 (64,5)	22 (70,9)	0,82	0 (0)
Formação educacional				
. Ensino fundamental I ou II	9 (29,0)	10 (32,2)	0,78	0 (0)
. Ensino médio	18 (58,0)	17 (54,8)	0,81	1 (6,3)
. Ensino superior	4 (13,0)	4 (13,0)	0,99	15 (93,7)
Condição socioeconômica				
. Baixa	22 (71,0)	23 (74,2)	0,90	2 (12,6)
. Média	9 (29,0)	8 (25,8)	0,82	7 (43,7)
. Alta	0 (0)	0 (0)	0,99	7 (43,7)
. Medicamentos				
β-bloqueadores	2 (6,4)	2 (6,4)	0,99	0 (0)
Metformina	3 (9,6)	3 (9,6)	0,99	0 (0)
Insulina	2 (6,4)	1 (3,2)	0,34	0 (0)
Inibidores da ECA	5 (16,1)	5 (16,1)	0,99	0 (0)
Inibidores dos canais de Ca ⁺²	1 (3,2)	1 (3,2)	0,99	0 (0)
Antagonista do receptor de ANG II	5 (16,1)	3 (9,6)	0,29	0 (0)
Diuréticos	7 (22,5)	9 (29,0)	0,63	0 (0)
. Composição corporal				
Peso corporal (kg)	124,9 ± 8,5	130,0 ± 22,2	0,39	62,2 ± 6,5
IMC (kg/m ²)	47,3 ± 8,5	50,2 ± 7,2	0,36	23,2 ± 2,7
Massa de gordura (%)	51,3 ± 4,9	52,2 ± 4,4	0,38	28,6 ± 7,1
Massa de gordura (kg)	60,9 ± 12,6	66,0 ± 14,1	0,67	17,9 ± 5,5
Massa magra (kg)	57,0 ± 7,2	57,2 ± 7,4	0,35	42,0 ± 6,5
Gordura visceral (kg)	2,3 ± 0,8	2,2 ± 0,6	0,71	0,2 ± 0,2
. Aptidão física				
VO ₂ pico (L/min)	1,9 ± 0,3	2,0 ± 0,3	0,71	2,0 ± 0,5
VO ₂ pico (mL/kg/min)	15,6 ± 2,8	15,7 ± 2,6	0,47	33,3 ± 7,6
. Marcadores bioquímicos				
HDL (mg/dL)	40,5 ± 9,4	46,2 ± 11,7	0,17	71,1 ± 16,6
LDL (mg/dL)	106,7 ± 30,7	106,4 ± 34,2	0,66	85,6 ± 28,4
VLDL (mg/dL)	27,0 ± 11,6	25,7 ± 15,4	0,72	15,0 ± 6,1
TGL (mg/dL)	129,6 ± 48,5	128,7 ± 77,5	0,96	75,1 ± 30,6
CT (mg/dL)	129,6 ± 48,5	128,7 ± 77,5	0,60	75,1 ± 30,6

Peptídeo C (ng/mL)	4,5 ± 2,2	3,9 ± 1,3	0,18	1,7 ± 0,5
HbA1c (%)	6,6 ± 2,1	6,4 ± 1,2	0,15	5,2 ± 0,2
TGO (U/L)	20,6 ± 9,1	19,4 ± 11,0	0,88	19,4 ± 5,6
TGP (U/L)	23,9 ± 12,5	20,3 ± 11,7	0,30	18,6 ± 3,8
. Parâmetros hemodinâmicos				
PAS (mmHg)	125,0 ± 14,0	132,0 ± 12,0	0,60	118,0 ± 5,0
PAD (mmHg)	78,0 ± 8,0	85,0 ± 12,0	0,57	74,0 ± 6,0

Tabela 3. Características físicas, composição corporal, aptidão física, marcadores bioquímicos e hemodinâmicos dos grupos experimentais no período PRÉ para os pacientes do ESTUDO 1. Dados em média ± DP ou número de pacientes (% da amostra). ANG II: angiotensina 2; Ca⁺²: cálcio; CT: colesterol total; CTRL: grupo de mulheres eutróficas; ECA: enzima conversora da angiotensina; HbA1C: hemoglobina glicada; HDL: lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; RYGB: cirurgia bariátrica; RYGB + ET: cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; TGL: triglicérides; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; VO_{2pico}: consumo pico de oxigênio.

7.2. Aderência ao treinamento físico

A aderência do grupo RYGB + ET ao programa de treinamento físico foi de 81,5% ± 13,1%. Nenhum evento adverso decorrente do programa de treinamento físico foi observado neste estudo.

7.3. Composição corporal

A Tabela 4 ilustra em detalhes os resultados de composição corporal ao longo do período do ESTUDO 1. Ambos os grupos (RYGB e RYGB + ET) demonstraram uma significativa redução do peso corporal, IMC, percentual de gordura corporal e tecido adiposo visceral no período PÓS3 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$ para todas as variáveis). Da mesma forma, os valores de peso corporal, IMC e percentual de gordura demonstraram reduções significantes no período PÓS9 quando comparado com o PRÉ (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$ para todas as variáveis) ou PÓS3 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$ para todas as variáveis). Todavia, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em nenhum dos períodos avaliados em nenhuma das variáveis (*ex*: peso corporal, IMC, percentual de gordura) ($p > 0,05$).

Ambos os grupos demonstraram uma redução significativa na massa de gordura e massa magra, ambos expressos em quilogramas, no PÓS3 em comparação ao PRÉ (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$). Similarmente, tanto a massa de gordura quanto a massa magra apresentaram uma redução significativa em ambos os grupos experimentais no período PÓS9 quando comparado com o período PÓS3 (efeito principal de tempo $p < 0,0001$) e PRÉ

(efeito principal de tempo: $p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos experimentais em nenhum dos períodos avaliados tanto para a massa de gordura quanto para a massa magra ($p > 0,05$).

7.4. Perfil bioquímico

A tabela 4 demonstra os parâmetros relacionados ao perfil lipídico ao longo do período de intervenção referente o ESTUDO 1. Ambos os grupos experimentais demonstraram reduções significantes nas concentrações sanguíneas de CT, LDL, VLDL e TG no período PÓS3 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$). Similarmente, ambos os grupos demonstraram um aumento significativo nas concentrações de HDL no tempo PÓS9 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$) e PÓS3 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$) em comparação ao PRÉ. Não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais para os marcadores relacionados ao perfil lipídico ao longo do estudo ($p > 0,05$). As concentrações de TGO e TGP não mostraram nenhuma mudança ao longo da intervenção ou interação estatisticamente significativa em nenhum tempo analisado ($P > 0,05$) no ESTUDO 1. Ainda, para a análise da HbA1c e peptídeo C neste estudo, ambos os grupos experimentais demonstraram reduções significantes desses marcadores no período PÓS3 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$) e PÓS9 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$) em relação ao período PRÉ.

7.5. Condicionamento aeróbio

A Tabela 4 ilustra em detalhes os resultados do condicionamento aeróbio referente ao ESTUDO 1. Para a aptidão aeróbia, ambos os grupos apresentaram uma melhora significativa no $VO_{2\text{pico}}$ no período PÓS9 comparado com o período PÓS3 (efeito principal de tempo: $p = 0,0002$) e comparado ao período PRÉ (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$). Todavia, nenhuma interação *grupo x tempo* significativa foi observada em nenhum dos tempos analisados ($p > 0,05$).

	RYGB (n = 31)			RYGB + ET (n = 31)			Diferença (IC95%) após intervenção (PÓS9)	P valor Grupo*Tempo
	PRÉ	PÓS3	PÓS9	PRÉ	PÓS3	PÓS9		
Peso corporal (kg) ^{#, \$}	124,9 ± 22,4	96,0 ± 12,8	82,3 ± 12,7	130,0 ± 22,4	104,9 ± 8,4	89,5 ± 14,8	-0,30 (-15,42 a 14,82)	0,26
IMC (kg/m ²) ^{#, \$}	47,5 ± 8,4	37,1 ± 5,8	31,8 ± 5,4	50,2 ± 7,2	40,9 ± 6,8	34,2 ± 5,4	1,36 (-5,52 a 2,80)	0,15
Massa de gordura (%) ^{#, \$}	51,5 ± 4,8	45,9 ± 7,1	37,7 ± 7,6	52,2 ± 4,4	47,8 ± 4,7	38,4 ± 6,2	-0,10 (-3,58 a 3,37)	0,46
Massa de gordura (kg) ^{#, \$}	64,3 ± 15,5	44,6 ± 5,4	33,3 ± 11,9	64,7 ± 13,3	49,0 ± 12,8	33,4 ± 8,8	1,57 (-8,87 a 12,01)	0,70
Massa magra (kg) ^{#, \$}	57,0 ± 7,0	49,1 ± 5,4	46,9 ± 4,7	57,2 ± 7,4	51,4 ± 7,5	51,0 ± 7,0	-3,19 (-7,17 a 0,78)	0,01
TAV (kg) ^{#, \$}	2,3 ± 0,8	1,2 ± 0,4	0,8 ± 0,3	2,2 ± 0,6	1,4 ± 0,3	0,8 ± 0,3	1,40 (-2,17 a 4,98)	0,55
HDL (mg/dL) ^{\$}	40,5 ± 9,4	42,0 ± 9,2	49,6 ± 12,1	46,2 ± 11,7	44,4 ± 11,7	57,4 ± 13,3	-7,63 (-13,87 a -1,39)	0,05
LDL (mg/dL) ^{#, \$}	106,7 ± 30,7	96,3 ± 24,1	82,4 ± 30,5	110,3 ± 29,4	91,5 ± 33,7	75,2 ± 19,2	7,54 (-8,94 a 24,03)	0,26
VLDL (mg/dL) ^{\$}	27,0 ± 11,6	21,9 ± 6,7	19,1 ± 6,7	25,7 ± 15,4	23,6 ± 14,8	14,7 ± 3,6	4,51 (-2,19 a 11,22)	0,17
TGL (mg/dL) ^{#, \$}	129,6 ± 48,5	110,4 ± 34,7	97,7 ± 41,7	128,7 ± 77,5	101,5 ± 47,2	75,3 ± 24,8	14,52 (-15,61 a 44,65)	0,63
CT (mg/dL) ^{#, \$}	173,4 ± 35,2	159,6 ± 27,6	151,7 ± 36,9	178,2 ± 33,0	157,0 ± 35,2	147,8 ± 23,1	3,36 (-15,15 a 21,88)	0,45
TGO (U/L)	20,6 ± 9,1	26,9 ± 18,7	22,0 ± 11,1	19,4 ± 11,0	24,1 ± 11,4	17,3 ± 5,2	5,20 (-0,6 a 11,20)	0,37
TGP (U/L)	23,9 ± 12,5	20,0 ± 7,9	19,3 ± 7,7	20,3 ± 11,7	24,0 ± 13,1	16,5 ± 5,6	3,20 (-2,4 a 8,90)	0,23
Peptídeo C (ng/mL) ^{#, \$}	4,5 ± 2,2	2,8 ± 1,1	2,6 ± 0,6	3,9 ± 1,3	2,6 ± 0,7	1,8 ± 0,4	0,71 (-0,06 a 1,49)	0,27
HbA1c (%) ^{#, \$}	6,6 ± 2,1	5,4 ± 0,4	5,4 ± 0,3	6,4 ± 1,2	5,3 ± 0,4	5,2 ± 0,3	0,18 (-0,45 a 0,83)	0,91
VO _{2pico} (L/min) ^{#, \$}	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,3	1,7 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,9 ± 0,4	-0,20 (-1,1 a 0,7)	0,31
VO _{2pico} (mL/kg/min) ^{#, \$}	15,6 ± 2,3	18,4 ± 3,5	20,3 ± 3,6	15,7 ± 2,6	17,6 ± 2,9	22,0 ± 5,0	-1,8 (-3,6 a 0,04)	0,17

Tabela 4. Características físicas, bioquímicas e de aptidão aeróbia dos grupos experimentais antes (PRÉ), três (PÓS3) e nove meses (PÓS9) após a cirurgia bariátrica. Dados em média ± DP, intervalo de confiança entre os grupos (IC95%) e valor de *p* para interação grupo x tempo (modelo misto para medidas repetidas). CT: colesterol total; HbA1C: hemoglobina glicada; HDL: lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PCR: proteína C-reativa; TGL: triglicérides; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; VO_{2pico}: consumo pico de oxigênio; # indica *p* ≤ 0,05 para o efeito principal de tempo (PRÉ vs. PÓS3); \$ indica *p* ≤ 0,05 efeito principal de tempo (PRE vs. PÓS9); * indica *p* ≤ 0,05 para comparações entre os grupos no período PÓS9.

7.6. *Avaliação dos marcadores de resistência à insulina, sensibilidade à insulina e função das células β pancreáticas*

A Figura 5 apresenta os resultados da resposta glicêmica e insulinêmica no TOTG ao longo do ESTUDO 1. Uma redução na AUC da glicose (Painel D) após a cirurgia bariátrica (PÓS3) (efeito principal de tempo, $p < 0,0001$) e ao final do período de seguimento (PÓS9) (efeito principal de tempo, $p < 0,0001$) foi observada. Para a AUC da insulina (Painel C), ambos os grupos demonstraram uma redução significativa no período PÓS3 comparado ao PRÉ (ambos $p < 0,0001$). Além disso, o grupo RYGB + ET mostrou uma diminuição significativa na AUC da insulina no período PÓS9 quando comparado aos valores PRÉ ($p < 0,0001$) e PÓS3 ($p < 0,0001$), indicando uma redução da resposta hiperinsulinêmica em resposta à sobrecarga de glicose. Todavia, o grupo RYGB apresentou um significativo aumento da AUC da insulina no período PÓS9 apenas quando comparado ao período PÓS3 ($p = 0,0403$), demonstrando um aumento significativo da resposta hiperinsulinêmica à sobrecarga de glicose.

A figura 5 ilustra os marcadores de avaliação da resistência e sensibilidade à insulina e função da célula β pancreática. Uma redução do HOMA-IR (Painel H) foi observada após a cirurgia (PÓS3) (efeito principal de tempo, $p < 0,0001$) e ao final do período de estudo (PÓS9) (efeito principal de tempo, $p < 0,0001$). Em relação sensibilidade à ação da insulina do corpo inteiro (*Matsuda index*) (Painel E), maiores valores foram observados após a cirurgia bariátrica (PÓS3) tanto no grupo RYGB ($p < 0,0001$) quanto no RYGB + ET ($p < 0,0001$). Já no período PÓS9, o grupo RYGB mostrou valores maiores de sensibilidade a insulina quando comparado com os valores PRÉ ($p = 0,0052$), porém nenhuma diferença foi observada em comparação ao período PÓS3 ($p > 0,05$). Já o grupo RYGB + ET apresentou aumentos significantes no PÓS9 quando comparado ao PRÉ e PÓS3 (ambos $p < 0,0001$). Quando os grupos foram comparados ao final do período de intervenção (PÓS9), o grupo RYGB + ET apresentou uma maior sensibilidade a insulina (indicada por um maior valor no *Matsuda index*) em comparação ao grupo RYGB ($p < 0,0001$). A estimativa da sensibilidade à insulina no território muscular (mISI) (Painel F) um aumento significativo no período PÓS3 (efeito principal de tempo, $p < 0,0001$). No entanto, o grupo RYGB + ET apresentou um aumento significativo neste parâmetro no período PÓS9 em comparação com o PRÉ e PÓS3 (ambos $p < 0,0001$). Adicionalmente, uma diferença significativa entre os grupos

experimentais foi encontrada no período PÓS9 ($p < 0,0001$). A função da célula β pancreática (estimada através do *Disposition index*) (Painel G) apresentou uma melhora significativa no período PÓS3 tanto no grupo RYGB ($p = 0,0479$) quanto no grupo RYGB + ET ($p = 0,0472$). Ao final do período de intervenção (PÓS9), o grupo RYGB + ET apresentou uma melhor função das células β pancreática quando comparado com o PRÉ ($p < 0,0001$) e PÓS3 ($p = 0,0597$). Importante, o grupo RYGB + ET apresentou uma significativamente maior da função da célula β pancreática em comparação ao grupo RYGB no período PÓS9 ($p = 0,0005$).

Figura 5. Teste oral de tolerância à glicose e marcadores de resistência à ação da insulina referente ao ESTUDO 1. Dados expressos em média $\pm$ DP. RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao

treinamento físico; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas; ^ indica $p \leq 0,05$ para efeito principal de tempo; * indica $p \leq 0,05$ para comparações entre os grupos no período PÓS9.

7.7. Análise de larga escala dos RNAs mensageiros (RNA-seq) do músculo esquelético

Para a análise de vias de sinalização, o enriquecimento de vias de regulação gênica dos dados de análise de larga escala dos RNAs mensageiros do músculo esquelético revelou que 9 vias de regulação da matriz extracelular foram diferencialmente entre os momentos e grupos estudados. (Figura 6, Painel A). Ademais, o enriquecimento de vias de regulação gênica revelou que o grupo RYGB + ET aumentou a expressão de genes relacionados a via de regulação da fosforilação oxidativa e cadeia de transporte de elétrons (Escore de enriquecimento normalizado (NES) de 3,51 e 4,16-*fold change*, respectivamente, FDR < 0,2) em comparação ao grupo RYGB no período PÓS9 (NES: 1,67 e 1,73-*fold change*, respectivamente, FDR < 0,2). Duas importantes vias de regulação da matriz extracelular do músculo esquelético, a saber, a via da *Wnt/β-catenina* e do *TGF-β1* mostraram-se diferencialmente reguladas neste estudo. O grupo RYGB + ET demonstrou uma maior redução de genes relacionados ao enriquecimento das vias *Wnt/β-catenina* e do *TGF-β1* (NES: -1,67 e -1,73-*fold change*, respectivamente, FDR < 0,2) em comparação ao grupo RYGB no período PÓS9 (Figura 6, Painel B).

Para análise dos genes diferencialmente expressos, o grupo RYGB + ET apresentou extensas alterações em resposta ao programa de treinamento físico (comparação PRÉ vs. PÓS9) em genes relacionados à regulação da matriz extracelular (Figura 6, Painel B). Na comparação intragrupo (PRÉ vs. PÓS9), o grupo RYGB + ET apresentou o seguinte perfil de mudança da expressão de genes reguladores da matriz extracelular: *TGFβR2* (*fold change* = -0,38), *TGFβR1* (*fold change* = -0,01), *FLST* (*fold change* = 0,77), *VIM* (*fold change* = -0,34), *COL3A1* (*fold change* = -0,94), *COL1A1* (*fold change* = -0,53), *MSTN* (*fold change* = -0,48) e *TIMP1* (*fold change* = -0,36). O grupo RYGB apresentou o seguinte perfil de mudança da expressão de genes reguladores da matriz extracelular na comparação intragrupo (PRÉ vs. PÓS9): *TGFβR2* (*fold change* = 0,08), *TGFβR1* (*fold change* = 0,12), *FLST* (*fold change* = -0,29), *VIM* (*fold change* = 0,34), *COL3A1* (*fold change* = -0,78), *COL1A1* (*fold change* = -0,24), *MSTN* (*fold change* = -0,06) e *TIMP1* (*fold change* = -0,23).

A figura 6 (Painel C) demonstra o enriquecimento de vias reguladoras da matriz extracelular usando o projeto *Matrisome* como base de dados para busca de lista de genes em larga escala previamente publicados. A análise bioinformática demonstrou uma maior redução de genes relacionados a membrana basal (NABA_MEMBRANA_BASAL) no grupo RYGB + ET na comparação intragrupo (PÓS9-PRÉ). Ainda, o grupo RYGB + ET apresentou uma redução maior dos genes relacionados a membrana basal (NABA_MEMBRANA_BASAL) comparado ao grupo RYGB no período PÓS9. De maneira semelhante, a análise bioinformática demonstrou uma maior redução de genes relacionados ao colágeno (NABA_COLÁGENO) na comparação intragrupo (PÓS9-PRÉ) em favor do grupo RYGB + ET. Com a premissa de reconhecimento do padrão da expressão dos genes ao final da intervenção foi realizada a análise de componentes principais (PCA). De maneira interessante, a análise do PCA demonstrou que o grupo RYGB + ET apresentou um perfil de expressão gênica semelhante ao grupo CTRL no período PÓS9. Essa semelhança não foi observada no grupo RYGB comparado ao grupo CTRL para o mesmo período (Figura 6, Painel E).

Figura 6. Enriquecimento de vias envolvidas na regulação matriz extracelular (A e B), perfil de genes diferencialmente expressos relacionados a membrana basal e expressão de colágenos (C), e análise de componentes principais (D).

7.8. Análise da expressão de colágeno tipo I e III e da ultraestrutura dos capilares do músculo esquelético

A figura 7 ilustra as marcações para os colágenos tipo I e III (Painel A) por imunofluorescência no músculo esquelético. A cirurgia bariátrica reduziu significativamente o colágeno tipo I no período PÓS3 (efeito principal de tempo: $p = 0,0003$) e no período PÓS9 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$). Para o colágeno tipo III, a cirurgia bariátrica também reduziu significativamente a marcação para essa proteína no período PÓS3 (efeito principal de tempo: $p = 0,0110$) e no período PÓS9 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$). Todavia, o grupo RYGB + ET apresentou uma redução significativamente maior para o colágeno tipo I ($p = 0,0009$) e colágeno tipo III ($p < 0,0001$) em comparação ao grupo RYGB no período PÓS9 (Painel B e C).

A figura 7 (Painel D) demonstra a avaliação da ultraestrutura dos capilares do músculo esquelético por microscopia eletrônica. A ultraestrutura dos capilares do músculo esquelético de voluntárias eutróficas (CTRL) demonstrou o lúmen capilar envolvido com células endoteliais e uma borda contínua de membrana basal, que se fundiu abruptamente com o endomísio frouxo (um derivado da fáscia muscular). A membrana basal pericapilar exibiu uma camada homogênea de material amorfo. Os pericitos estavam localizados dentro da membrana basal; os fibroblastos estavam localizados exclusivamente no endomísio, portanto, desprovidos de cobertura por parte da membrana basal (Painel VII).

Em contraste, a análise da ultraestrutura da matriz extracelular do capilar do músculo esquelético do grupo RYGB demonstrou uma proeminente espessura da membrana basal, perda abrupta do espaço endomisial, redução significativa do lúmen capilar, atrofia do sarcolema, presença de fibroblastos ativados e perceptíveis fibras de colágeno. É possível notar um perfil degenerativo dos pericitos e células endoteliais (conhecido como “fantasmas”) dentro da camada da membrana basal, delineada pela membrana plasmática e não possuiu diferenciação intracelular evidente (Painel I-III).

Todavia, a espessura da membrana basal no grupo RYGB + ET no período PÓS9 foi completamente revertida para os limites visualizados no fenótipo do grupo CTRL, assim como o espaço endomisial e o lúmen capilar. Além disso, em comparação ao período PRÉ, o grupo RYGB + ET no período PÓS9 demonstrou um perfil diferenciado de pericitos e células endoteliais; o sarcolema trófico demonstrou melhora evidente, com um reparo significativo do

espaço endomisial. O lúmen capilar apresentou aspecto normal, fibroblastos localizados no endomísio do músculo esquelético e fibras de colágeno esparsas (Painel VI).

Importante ressaltar que a análise semiquantitativa do perfil dos capilares no músculo esquelético (Painel E-H) coincide com a caracterização descritiva da ultraestrutura para cada grupo, indicando que o exercício físico após a cirurgia bariátrica foi capaz de reverter a espessura da membrana basal do capilar do músculo esquelético de maneira à se aproximar com as características do fenótipo visualizado no grupo CTRL.

Figura 7. Imagens representativas e quantificação da marcação de colágeno I (A) e III (B). Dados expressos em média $\pm$ EPM (n = 15 por grupo). Escala da barra = 100 μ m. Imagens representativas da ultraestrutura dos capilares do músculo esquelético por microscopia eletrônica (C). Dados expressos em mediana $\pm$ intervalo interquartil (n = 10 por grupo). As setas pequenas em I-III apontam para os limites internos e externos do aumento da espessura da membrana basal. As setas em IV-VI apontam para os limites internos e externos da redução da espessura da membrana basal. As setas longas no painel 3 denotam um perfil degenerativo do pericito e célula endotelial (“fantasmas”). BM: membrana basal; EC: célula endotelial; SL: sarcolema; PC: pericitos; Col: fibras de colágeno; RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas. Para a análise dos colágenos: ^ indica efeito principal de tempo; * indica para comparações entre os grupos no período PÓS9 ($p \leq 0,05$). Para a análise semiquantitativa dos parâmetros da ultraestrutura do capilar: # indica diferença significativa para ambos os grupos (vs. PRÉ); * indica diferença entre os grupos para o mesmo tempo ($p \leq 0,05$).

7.9. Análise da expressão de RNAs mensageiros e proteínas do músculo esquelético

A figura 8 demonstra a expressão de proteínas relacionadas a sinalização insulínica no músculo esquelético dos grupos experimentais em comparação ao grupo CTRL no período PRÉ. A fosforilação do IRS-1 no resíduo de serina na posição 307 (IRS-1 Ser 307) foi significativamente maior nos grupos RYGB ($p = 0,0035$) e RYGB + ET ($p = 0,0223$) na comparação com o grupo CTRL no período PRÉ. Em contrapartida, a fosforilação do IRS-1 no resíduo de tirosina na posição 612 (IRS-1 Tyr 612) foi significativamente menor nos grupos RYGB ($p < 0,0001$) e RYGB + ET ($p = 0,0002$) na comparação com o grupo CTRL no período PRÉ. A fosforilação da Akt na posição 473 (Akt Ser 473) e da AMPK no resíduo de treonina na posição 172 (AMPK Thr 172) estão atenuadas nos grupos RYGB ($p < 0,0001$ e $p = 0,0174$, respectivamente) e RYGB + ET ($p < 0,0001$ e $p = 0,0207$, respectivamente) em comparação ao grupo CTRL. Ainda, a fosforilação da AS160 no resíduo de treonina na posição 642 e o GLUT4 foram significativamente menores nos grupos RYGB ($p < 0,0001$ e $p = 0,0083$, respectivamente) e RYGB + ET ($p < 0,0001$ e $p = 0,0053$, respectivamente) comparado ao grupo CTRL. Relacionado ao processo inflamatório subclínico, uma conhecida e importante proteína capaz de aumentar a fosforilação do IRS-1 no resíduo de serina (posição 307) é a atividade da proteína JNK nos resíduos de treonina (posição 183) e tirosina (posição 185). A fosforilação dessa proteína foi significativamente maior para os grupos RYGB ($p = 0,0401$) e RYGB + ET ($p = 0,0314$) na comparação com o grupo CTRL. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para a comparação dos grupos RYGB ($p = 0,4867$) e RYGB + ET

($p = 0,5429$) com o grupo CTRL para a expressão proteica do conteúdo total da proteína glicogênio sintase (GS). Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos RYGB e RYGB + ET no período PRÉ para as proteínas relacionadas a sinalização insulínica ($p > 0,05$).

Figura 8. Expressão proteica normalizada pela proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e bandas representativas de reguladores da sensibilidade à insulina no músculo esquelético no período PRÉ em comparação ao grupo CTRL. Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas (CTRL). Dados expressos em média $\pm$ EPM ($n = 15$ por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; * indica $p \leq 0,05$ para comparações com o grupo CTRL.

Em consonância com o fenótipo da matriz extracelular do músculo esquelético, a figura 9 apresenta a expressão de genes relacionados ao remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético nos grupos experimentais em comparação ao grupo CTRL no período PRÉ. Os grupos RYGB ($p = 0,0141$) e RYGB + ET ($p = 0,0256$) demonstraram um aumento significativo da expressão gênica do *FGF1* em comparação ao grupo CTRL no período PRÉ. Todavia, a expressão gênica do *FGF2* foi significativamente menor nos grupos RYGB ($p =$

0,0057) e RYGB + ET ($p = 0,0184$) (vs. CTRL) no período PRÉ. Os genes *TIMP1* e *MSTN* foram significativamente maiores nos grupos RYGB ($p = 0,0178$ e $p = 0,0016$) e RYGB + ET ($p = 0,0060$ e $p = 0,0135$) (vs. CTRL) no período PRÉ. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para a comparação dos grupos RYGB ($p = 0,9025$) e RYGB + ET ($p = 0,8597$) com o grupo CTRL para a expressão gênica da *PGC-1 α* no período PRÉ. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos RYGB e RYGB + ET no período PRÉ para os genes relacionados ao remodelamento da matriz extracelular e biogênese mitocondrial ($p > 0,05$).

Figura 9. Expressão gênica de reguladores da matriz extracelular e biogênese mitocondrial no período PRÉ em comparação ao grupo CTRL. Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas (CTRL). Dados expressos em média $\pm$ EPM ($n = 14$ por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas; * indica $p \leq 0,05$ para comparações com o grupo CTRL.

A figura 10 apresenta a expressão de proteínas que participam da sinalização intracelular das vias da Wnt/ β -catenina e TGF β . Inicialmente, realizamos a validação da expressão proteica dos alvos proteicos oriundos dos resultados do *RNA-seq* por meio da técnica de *Western Blotting*, usando a comparação dos grupos experimentais (RYGB e RYGB + ET) com o grupo CTRL no período PRÉ. De fato, diversas proteínas reguladoras das vias da Wnt/ β -catenina e TGF β 1 mostraram alteradas no período PRÉ. Além disso, outras proteínas que participam da regulação da matriz extracelular também estavam alteradas em decorrência da obesidade mórbida. A expressão proteica do conteúdo total da MMP-9 e da

ILK-1 foram significativamente menores nos grupos RYGB ($p < 0,0001$ e $p = 0,0083$, respectivamente) e RYGB + ET ($p < 0,0001$ e $p = 0,0053$) em comparação ao grupo CTRL. A expressão proteica da vimentina foi significativamente maior nos grupos RYGB ($p = 0,0094$) e RYGB + ET ($p = 0,0054$) em comparação ao grupo CTRL. Não houve nenhuma diferença significativa para o conteúdo total de α -Parvin ($p > 0,05$). Para a via de sinalização da Wnt/ β -catenina, a expressão do conteúdo total da Wnt1 e Rac1 foram significativamente maiores nos grupos RYGB ($p < 0,0001$ e $p = 0,0440$, respectivamente) e RYGB + ET ($p < 0,0001$ e $p = 0,0334$, respectivamente) em comparação ao grupo CTRL. Ainda, a fosforilação das proteínas GSK3- β (Ser 21/9) e β -catenina (Ser 33/37 Thr 41) foram significativamente maiores nos grupos RYGB ($p = 0,0056$ e $p = 0,0020$, respectivamente) e RYGB + ET ($p = 0,0089$ e $p = 0,0016$, respectivamente) em comparação ao grupo CTRL. Relacionado a via do receptor do TGF- β 1, a expressão proteica do conteúdo total de TGF- β 1 e a fosforilação da SMAD 2/3 (Ser 465/467 Ser 423/425) foram significativamente maiores nos grupos RYGB ($p = 0,0315$ e $p = 0,0114$, respectivamente) e RYGB + ET ($p = 0,0273$ e $p = 0,0285$, respectivamente) em comparação ao grupo CTRL no período PRÉ. Nenhuma diferença foi encontrada para o conteúdo total de FLST na comparação entre os grupos experimentais com o grupo CTRL ($p > 0,05$).

Figura 10. Expressão proteica normalizada pela proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e bandas representativas de reguladores da matriz extracelular no músculo esquelético no período PRÉ em comparação ao grupo CTRL. Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas (CTRL). Dados expressos em média $\pm$ EPM ($n = 15$ por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; * indica $p \leq 0,05$ para comparações com o grupo CTRL.

Ao longo do período de intervenção (figura 11), a cirurgia bariátrica diminuiu significativamente (efeito principal de tempo, $p < 0,0001$ no PÓS3 e $p < 0,0001$ no PÓS9) a fosforilação do IRS-1 (Ser 307) (Painel A). De maneira inversa, a cirurgia bariátrica aumentou significativamente (efeito principal de tempo, $p = 0,2305$ no PÓS3 e $p < 0,0001$ no PÓS9) a fosforilação do IRS-1 (Tyr 612) (Painel B). O exercício físico não alterou a

fosforilação do IRS-1 em nenhum dos resíduos estudados ($p > 0,05$). A fosforilação da Akt (Ser 473) e AMPK (Thr 172) aumentou após a cirurgia bariátrica apenas no período PÓS9 (Painel C e D, $p < 0,0001$ para ambos). De maneira semelhante, a fosforilação da AS160 (Thr 642) (Painel E) aumentou significativamente após a cirurgia bariátrica ($p < 0,0001$ no PÓS3 e $p < 0,0001$ no PÓS9. No período PÓS9, o grupo RYGB + ET apresentou um aumento da fosforilação da AS160 (Thr 642) significativamente maior ($p < 0,0001$) que o grupo RYGB. Para o conteúdo total de GLUT4 (Painel F), apenas o grupo RYGB + ET no período PÓS9 ($p < 0,0001$) apresentou um aumento significativo desta proteína. O grupo RYGB não apresentou nenhuma mudança ao longo da intervenção da expressão do conteúdo total de GLUT4 ($p > 0,05$). A expressão do conteúdo total de GS (efeito principal de tempo, $p = 0,4901$ no PÓS3 e $p < 0,0001$ no PÓS9, Painel G) e a fosforilação da JNK (Thr 183/Tyr 185) (efeito principal de tempo, $p = 0,0106$ no PÓS3 e $p < 0,0001$ no PÓS9, Painel H) foram significativamente diminuídas após a cirurgia bariátrica, sem nenhum efeito do exercício físico sobre essas proteínas ($p > 0,05$).

Uma vez que o enriquecimento de vias regulatórias oriundo dos resultados do *RNA-seq* demonstrou que o grupo RYGB + ET aumentou a expressão de genes relacionados a via de regulação da fosforilação oxidativa e cadeia de transporte de elétrons, avaliamos a expressão proteica do complexo mitocondrial (OXPHOS) ao longo da intervenção (Figura 12, Painel A-E). O experimento validatório demonstrou que a cirurgia bariátrica isolada ou combinada a um programa de treinamento físico não alterou a expressão proteica da OXPHOS ($p > 0,05$).

Figura 11. Expressão proteica (A-H) normalizada pela proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e bandas representativas envolvidas na sinalização insulínica no músculo esquelético. Dados expressos em média $\pm$ EPM ($n = 15$ por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; ^ indica efeito principal de tempo; * indica diferença para comparações entre os grupos no período PÓS9 ($p \leq 0,05$).

Figura 12. Expressão proteica (A-E) normalizada pela proteína beta-actina (β -actina) e bandas representativas do complexo mitocondrial (OXPHOS) no músculo esquelético. Dados expressos em média $\pm$ EPM ($n = 15$ por grupo). **RYGB:** grupo cirurgia bariátrica; **RYGB + ET:** grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; ^ indica efeito principal de tempo; * indica diferença para comparações entre os grupos no período PÓS9 ($p \leq 0,05$).

Ao longo do período de intervenção (figura 13), a cirurgia bariátrica aumentou a expressão gênica do *FGF1* e *FGF2* (efeito principal de tempo, $p < 0,0001$ e $p = 0,0008$ no PÓS3 e $p < 0,0001$ e $p = 0,0005$ no PÓS9, respectivamente), sem nenhuma influência do exercício físico ($p > 0,05$, Painel A e B). Em relação a expressão proteica do conteúdo total de vimentina (Painel C), a cirurgia aumentou significativamente a expressão dessa proteína ($p = 0,0199$ no PÓS3 e $p = 0,5107$ no PÓS9), enquanto o grupo RYGB + ET reduziu significativamente o conteúdo total no período PÓS9 ($p = 0,0350$ vs. RYGB). A expressão gênica do *TIMP1* (Painel D) foi diminuída significativamente com a cirurgia bariátrica (efeito principal de tempo, $p < 0,0001$ no PÓS3 e $p < 0,0001$ no PÓS9), sem nenhum efeito aditivo do exercício físico ($p > 0,05$). A cirurgia bariátrica aumentou a expressão proteica da MMP-9 ($p = 0,0019$ no PÓS3 e $p < 0,0001$ no PÓS9, Painel E). Além disso, o exercício físico combinado à cirurgia bariátrica aumentou significativamente a expressão de MMP-9 no

período PÓS9 ($p = 0,0032$ vs. RYGB). Uma tendência de diferença significativa foi encontrada para o conteúdo total de ILK-1 em favor do grupo RYGB + ET no PÓS9 ($p = 0,0766$ vs. RYGB, Painei F). A cirurgia bariátrica foi capaz de aumentar o conteúdo total da proteína α -parvin (efeito principal de tempo, $p = 0,0635$ no PÓS3 e $p < 0,0001$ no PÓS9). Porém, o exercício físico não alterou o conteúdo total dessa proteína ($p > 0,05$, Painei G). Tanto a expressão proteica do conteúdo total da Wnt1 como a Rac1 (Painei H e I) foram diminuídas significativamente após a cirurgia bariátrica (efeito principal de tempo, $p = 0,6685$ e $p = 0,9219$ no PÓS3 e $p < 0,0001$ $p = 0,0229$ no PÓS9, respectivamente).

A atividade das proteínas GSK3- β (Ser 21/9) e β -catenina (Ser 33/37 Thr 41) (Painei J e K) aumentou significativamente no período PÓS3 ($p = 0,0502$ e $p = 0,0062$, respectivamente) e diminuiu significativamente no período PÓS9 ($p < 0,0001$ e $p = 0,0001$, respectivamente). Nenhum efeito do exercício físico foi observado para a atividade dessas proteínas ($p > 0,05$). A expressão do conteúdo total de TGF- β 1 (Painei L) foi significativamente aumentada após a cirurgia bariátrica ($p = 0,0004$). O grupo RYGB + ET apresentou uma expressão do conteúdo total de TGF- β 1 significativamente menor ($p < 0,0001$) comparado ao grupo RYGB. Curiosamente, o conteúdo total de FLST, clássica proteína antagonista ao TGF- β 1, refletiu um comportamento inverso ao TGF- β 1; a cirurgia bariátrica diminuiu significativamente a expressão de FLST ($p = 0,0053$ no PÓS3 e $p = 0,9109$ no PÓS9), enquanto apenas o grupo RYGB + ET apresentou um aumento significativo desta proteína ($p = 0,0055$, Painei M). A expressão gênica da *MSTN* (Painei N) foi significativamente reduzida pela cirurgia bariátrica ($p < 0,0001$ no PÓS3 e $p < 0,0001$ no PÓS9). Entretanto, o grupo RYGB + ET apresentou uma redução significativamente maior no período PÓS9 ($p = 0,0012$ vs. RYGB). Em consonância, a fosforilação da SMAD 2/3 (Ser 465/467 Ser 423/425) foi exclusivamente reduzida no grupo RYGB + ET ($p = 0,0059$, Painei O).

Figura 13. Expressão proteica (A-H) e bandas representativas envolvidas no remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético. Dados expressos em média $\pm$ EPM (n = 15 por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; ^ indica efeito principal de tempo; * indica diferença para comparações entre os grupos no período PÓS9 ($p \leq 0,05$).

7.10. Fracionamento celular e interação proteína-proteína do músculo esquelético

A figura 14 apresenta os resultados da análise da expressão proteica no compartimento citosólico e nuclear para as proteínas β -catenina (Ser 33/37 Thr 41) e SMAD 2/3 (Ser 465/467 Ser 423/425). Embora o exercício físico não tenha alterado o conteúdo do extrato total de proteínas envolvidas na sinalização da via da Wnt, o fracionamento celular demonstrou que o grupo RYGB + ET apresentou uma translocação significativamente menor da β -catenina (Ser 33/37 Thr 41) para o compartimento nuclear comparado ao grupo RYGB ($p = 0,0546$) no período PÓS9 e comparado ao grupo CTRL ($p = 0,0370$) (Painel B). Nessa mesma linha, o grupo RYGB + ET demonstrou uma translocação do citosol para o núcleo significativamente menor que o grupo RYGB (Painel B, $p = 0,0081$) para a SMAD 2/3 (Ser 465/467 Ser 423/425). Entretanto, no período PÓS9 o grupo RYGB apresentou uma translocação significativamente maior comparado ao grupo CTRL ($p = 0,0122$).

O conteúdo total de SMAD 2/3 mostrou ser capaz de inibir a fosforilação da Akt (Ser 473) no grupo RYGB (Painel C), uma resposta que foi inibida no grupo RYGB + ET. De relevância, foram encontradas correlações significativas entre a expressão do TGF β 1 e SMAD 2/3 (Ser 465/467 Ser 423/425) com mISI e o *Matsuda Index* no final da intervenção (PÓS9) (Painel D), corroborando a noção de que o aumento da sinalização TGF β 1-SMAD 2/3 (Ser 465/467 Ser 423/425) foi implicada nos efeitos combinados do exercício físico e cirurgia bariátrica sobre a sensibilidade à insulina no músculo esquelético e no corpo inteiro.

Figura 14. Fracionamento celular (citossol e núcleo) de amostras de músculo esquelético no período PÓS9. Bandas representativas (A) e avaliação da translocação de β-catenina e SMAD 2/3 (B) do citossol para o núcleo celular, interação das proteínas SMAD 2/3 total e Akt (Ser 473) por imunoprecipitação (C) e correlações de Pearson (D) entre proteínas reguladoras da matriz extracelular e marcadores de sensibilidade à insulina no corpo inteiro (Matsuda Index) e músculo esquelético (mISI). Dados expressos em média ± EPM (n = 15 por grupo). RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas. # indica diferença significativa vs. CTRL; * indica diferença significativa vs. RYGB ($p \leq 0,05$).

7.11. Cultura de células musculares C2C12

A figura 15 mostra os resultados do estudo da sinalização intracelular entre o TGFβ1-SMAD 2/3 (Ser 465/467 Ser 423/425) e sinalização insulínica em cultura de miotúbulos C2C12. Para esse fim, as células C2C12 foram tratadas com TGFβ1, folistatina (FLST, antagonista de TGFβ1), e a combinação de ambos, na presença ou não de insulina. Conforme esperado, as células tratadas com TGFβ1 apresentaram maior fosforilação da SMAD 2/3 (Ser

465/467 Ser 423/425) em comparação com o veículo e FLST (Painel A, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Além disso, a FLST atenuou o efeito do tratamento com TGF β 1 na fosforilação da SMAD 2/3 (Ser 465/467 Ser 423/425) (Painel A, $p < 0,0001$ vs. TGF β 1). O TGF β 1 prejudicou a fosforilação da Akt (Ser 473) (Painel B, $p < 0,0001$ vs. veículo), enquanto o tratamento com FLST combinado ou não com TGF β 1 restaurou a fosforilação da Akt (Ser 473) (Painel B, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Um padrão semelhante foi observado para o substrato da Akt de 160 kDa (AS160), uma importante proteína na regulação da translocação do GLUT4 para o sarcolema. O tratamento com TGF β 1 reduziu a fosforilação da AS160 (Thr 642) (Painel C, $p < 0,05$ vs. todos os outros) e o tratamento com FLST impediu a redução da fosforilação da AS160 (Thr 642) em comparação ao tratamento com TGF β 1 (Painel C, $p = 0,0092$ para FLST e $p = 0,0014$ para TGF β 1 + FLST). Importante, o tratamento com TGF β 1 reduziu o conteúdo total de GLUT4 em comparação com o veículo (Painel D, $p < 0,0001$), sendo revertida pelo tratamento com FLST (Painel D, $p < 0,0001$ vs. TGF β 1).

Figura 15. Sinalização insulínica (A-D) e bandas representativas de células musculares (C2C12) tratadas com veículo (1% BSA), TGF β 1 (10 ng/mL), FLST (1.8 μ g/mL) e a combinação de TGF β 1 e FLST, na presença ou não de insulina (100 nM). Os dados são expressos em média $\pm$ EPM e representam a média de três experimentos independentes. # indica $p \leq 0,05$ vs. veículo; \$ indica $p \leq 0,05$ vs. TGF β 1; & indica $p \leq 0,05$ vs. FLST.

8. RESULTADOS (*Estudo 2*)

8.1. *Participantes*

Para o ESTUDO 2 (Figura 16), uma subamostra de pacientes do ESTUDO 1, composta de 30 voluntárias foi utilizada. Durante o seguimento, 2 pacientes do grupo RYGB desistiram do estudo (1 paciente desistiu da cirurgia bariátrica e 1 paciente desistiu por motivos pessoais), enquanto para o grupo RYGB + ET não houve nenhuma desistência durante esse estudo. Adicionalmente, as pacientes não usaram qualquer terapia medicamentosa no período PÓS9, exceto para uma paciente do grupo RYGB + ET que ainda manteve o uso de metformina. Para este estudo, 10 mulheres eutróficas foram incluídas e avaliadas no período PRÉ.

A tabela 6 apresenta as características demográficas, educacionais, socioeconômicas e farmacológicas dos grupos experimentais no período PRÉ e do grupo CTRL para o ESTUDO 2. Nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais foi observada para as características demográficas, educacionais, socioeconômicas e farmacológicas no período PRÉ ($p > 0,05$). Ademais, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos (RYGB vs. RYGB + ET) para as variáveis relacionadas a composição corporal (peso corporal, percentual de gordura corporal, massa de gordura, massa magra e tecido adiposo visceral), parâmetros bioquímicos (CT, HDL, LDL, VLDL, TG, TGO, TGP, PCR, peptídeo C e HbA1c), aptidão física (VO_{2pico}) e parâmetros hemodinâmicos (PAS e PAD) no período PRÉ ($p > 0,05$).

Figura 16. Fluxograma do ESTUDO 2. CTRL: grupo de mulheres eutróficas; ITT: *intention-to-treat*; RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica e treinamento físico.

	RYGB (n = 15)	RYGB + ET (n = 15)	P valor (RYGB vs. RYGB + ET)	CTRL (n = 10)
	PRÉ	PRÉ		PRÉ
. Demográficos				
Idade (anos)	38 ± 7	37 ± 4	0,96	36 ± 10
Doença arterial coronariana	0 (0)	0 (0)	0,99	0 (0)
Fumantes	2 (13,3)	2 (13,3)	0,63	0 (0)
Diabetes Mellitus Tipo 2	4 (26,6)	3 (20)	0,67	0 (0)
Hipertensão	9 (60,0)	9 (60,0)	0,82	0 (0)
Formação educacional				
. Ensino fundamental I ou II	1 (6,6)	3 (20)	0,78	1 (10)
. Ensino médio	10 (66,6)	8 (53,3)	0,81	0 (0)
. Ensino superior	4 (26,6)	4 (26,6)	0,99	9 (90)
Condição socioeconômica				
. Baixa	12 (80)	11 (73,3)	0,90	2 (20)
. Média	3 (20)	4 (26,6)	0,82	4 (40)
. Alta	0 (0)	0 (0)	0,99	4 (40)
. Medicações				
β-Bloqueadores	0 (0)	2 (13,3)	0,16	0 (0)
Metformina	3 (23,0)	3 (20)	0,92	0 (0)
Insulina	0 (0)	1 (6,6)	0,34	0 (0)
Inibidores da ECA	1 (7,6)	1 (6,6)	0,96	0 (0)
Inibidores dos canais de Ca ⁺²	1 (7,6)	1 (6,6)	0,96	0 (0)
Antagonista do receptor de ANG II	3 (23,0)	5 (33,0)	0,29	0 (0)
Diuréticos	3 (23,0)	2 (13,3)	0,63	0 (0)
. Composição corporal				
Peso corporal (kg)	122,1 ± 14,7	130,0 ± 18,9	0,22	62,3 ± 9,3
IMC (kg/m ²)	44,6 ± 6,3	49,8 ± 5,3		23,3 ± 2,5
Massa de gordura (%)	50,5 ± 4,5	52,5 ± 4,3	0,21	27,2 ± 6,1
Massa de gordura (kg)	60,8 ± 12,2	63,2 ± 13,3	0,62	16,8 ± 5,7
Massa magra (kg)	55,9 ± 4,0	58,6 ± 8,6	0,28	41,6 ± 5,2
Gordura visceral (kg)	1,9 ± 0,5	1,6 ± 0,8	0,14	0,08 ± 0,1
. Aptidão física				
VO ₂ pico (L/min)	1,9 ± 0,3	2,1 ± 0,3	0,15	2,2 ± 0,5
VO ₂ pico (mL/kg/min)	16,7 ± 2,4	16,2 ± 2,3	0,53	36,5 ± 6,7
. Marcadores bioquímicos				
HDL (mg/dL)	40,7 ± 8,2	45,3 ± 10,6	0,20	73,1 ± 14,5
LDL (mg/dL)	98,9 ± 26,5	105,9 ± 31,6	0,53	83,8 ± 22,4
VLDL (mg/dL)	25,3 ± 8,5	23,5 ± 11,8	0,64	17,1 ± 6,5
TGL (mg/dL)	122,4 ± 47,5	117,5 ± 59,2	0,80	85,3 ± 33,0
CT (mg/dL)	164,2 ± 31,8	179,9 ± 35,9	0,82	174,0 ± 30,6
Peptídeo C (ng/mL)	4,1 ± 1,6	3,6 ± 1,0	0,77	1,5 ± 0,3

HbA1C (%)	6,2 ± 1,5	6,2 ± 1,2	0,97	5,2 ± 0,2
TGO (U/L)	20,4 ± 10,7	19,6 ± 11,5	0,96	20,5 ± 6,3
TGP (U/L)	24,6 ± 10,7	19,2 ± 6,7	0,90	19,1 ± 5,9
. Parâmetros hemodinâmicos				
PAS (mmHg)	125,0 ± 14,0	132,0 ± 12,0	0,60	118,0 ± 5,0
PAD (mmHg)	78,0 ± 8,0	85,0 ± 12,0	0,57	74,0 ± 6,0

Tabela 5. Características físicas, composição corporal, aptidão física, marcadores bioquímicos e hemodinâmicos dos grupos experimentais no período PRÉ para os pacientes do ESTUDO 2. Dados em média ± DP ou número de pacientes (% da amostra), ANGII: angiotensina 2; Ca⁺²: cálcio; CT: colesterol total; CTRL: grupo de mulheres eutróficas; ECA: enzima conversora da angiotensina 2; HbA1c: hemoglobina glicada; HDL: lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; RYGB: cirurgia bariátrica; RYGB + ET: cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; TGL: triglicérides; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; VO_{2pico}: consumo pico de oxigênio.

8.2. *Aderência ao treinamento físico*

A aderência do grupo RYGB + ET ao programa de treinamento físico foi de $84,0 \pm 12,0\%$. Nenhum evento adverso decorrente do programa de treinamento físico foi observado neste estudo.

8.3. *Composição corporal*

A Tabela 7 ilustra em detalhes os resultados de composição corporal ao longo do período do ESTUDO 2. De maneira similar, ambos os grupos (RYGB e RYGB + ET) demonstraram uma significativa redução do peso corporal, IMC, percentual de gordura corporal e tecido adiposo visceral no período PÓS3 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$ para todas as variáveis). Da mesma forma, os valores de peso corporal, IMC e percentual de gordura demonstraram reduções significantes no período PÓS9 quando comparado com o PRÉ (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$ para todas as variáveis) ou PÓS3 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$ para todas as variáveis). Todavia, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em nenhum dos períodos avaliados em nenhuma das variáveis (*ex*: peso corporal, IMC, percentual de gordura) ($p > 0,05$).

Ambos os grupos demonstraram uma redução significativa na massa de gordura e massa magra, ambos expressos em quilogramas, no PÓS3 em comparação ao PRÉ (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$). Similarmente, tanto a massa de gordura quanto a massa magra apresentaram uma redução significativa em ambos os grupos experimentais no período PÓS9 quando comparado com o período PÓS3 (efeito principal de tempo $p < 0,0001$) e PRÉ (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos experimentais em nenhum dos períodos avaliados tanto para a massa de gordura quanto para a massa magra ($p > 0,05$).

8.4. *Perfil bioquímico*

Para o ESTUDO 2, a tabela 7 demonstra os parâmetros relacionados ao perfil lipídico ao longo do período de intervenção. Os grupos RYGB e RYGB + ET demonstraram reduções significantes nas concentrações sanguíneas de CT, LDL, VLDL e TG no período PÓS3 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$). Do mesmo modo, ambos os grupos demonstraram um aumento significativo nas concentrações de HDL no tempo PÓS9 (efeito principal de tempo: p

$< 0,0001$) e PÓS3 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$) em comparação ao PRÉ. Não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais para os marcadores relacionados ao perfil lipídico ao longo do estudo ($p > 0,05$). Para o metabolismo hepático, as concentrações de TGO e TGP não mostraram nenhuma mudança ao longo da intervenção ou interação estatisticamente significativa em nenhum tempo analisado ($P > 0,05$). Outrossim, para a análise da HbA1c e peptídeo C neste estudo, ambos os grupos experimentais demonstraram reduções significantes desses marcadores no período PÓS3 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$) e PÓS9 (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$) em relação ao período PRÉ.

8.5. Condicionamento aeróbio

Referente ao ESTUDO 2, a tabela 7 ilustra em detalhes os resultados do condicionamento aeróbio e força muscular. Para a aptidão aeróbia, ambos os grupos apresentaram uma melhora significativa no $VO_{2\text{pico}}$ no período PÓS9 comparado com o período PÓS3 (efeito principal de tempo: $p = 0,0001$) e comparado ao período PRÉ (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$). Nenhuma interação *grupo x tempo* significativa foi observada em nenhum dos tempos analisados ($p > 0,05$).

	RYGB (n = 15)			RYGB + ET (n = 15)			Diferença (IC95%) após intervenção (PÓS9)	P valor Grupo*Tempo
	PRÉ	PÓS3	PÓS9	PRÉ	PÓS3	PÓS9		
Peso corporal (kg) ^{#, \$}	122,1 ± 14,7	97,5 ± 11,2	82,6 ± 12,9	130,0 ± 18,9	105,8 ± 16,9	87,4 ± 14,1	5,96 (-4,67 a 6,60)	0,92
IMC (kg/m ²) ^{#, \$}	44,6 ± 6,3	36,2 ± 5,6	30,8 ± 5,5	49,8 ± 5,3	40,3 ± 4,5	33,2 ± 3,3	2,65 (-0,86 a 6,16)	0,59
Massa de gordura (%) ^{#, \$}	50,5 ± 4,5	45,0 ± 6,3	37,0 ± 8,2	52,5 ± 4,3	48,3 ± 4,6	37,3 ± 5,8	-3,74 (-4,54 a 12,04)	0,71
Massa de gordura (kg) ^{#, \$}	60,8 ± 12,2	44,1 ± 11,8	30,9 ± 10,7	63,2 ± 13,3	50,8 ± 11,5	34,2 ± 10,0	-3,74 (-4,54 a 12,04)	0,70
Massa magra (kg) ^{#, \$}	55,9 ± 4,0	49,6 ± 4,4	47,7 ± 4,6	58,6 ± 8,6	50,6 ± 9,0	47,7 ± 11,7	1,48 (-3,49 a 6,45)	0,88
TAV (kg) ^{#, \$}	1,9 ± 0,5	1,1 ± 0,3	0,7 ± 0,2	1,6 ± 0,8	1,0 ± 0,4	0,6 ± 0,2	0,06 (-0,39 a 0,27)	0,21
HDL (mg/dL) ^{\$}	40,7 ± 8,2	43,2 ± 8,0	50,3 ± 9,7	45,3 ± 10,6	40,0 ± 6,3	55,6 ± 10,5	4,27 (1,31 a 9,86)	0,05
LDL (mg/dL) ^{#, \$}	98,9 ± 26,5	98,4 ± 28,9	77,0 ± 29,6	105,9 ± 31,6	94,5 ± 33,6	75,5 ± 18,3	-0,65 (-18,86 a 17,54)	0,62
VLDL (mg/dL) ^{\$}	25,3 ± 8,5	20,0 ± 4,3	17,4 ± 6,8	23,5 ± 11,8	24,3 ± 17,4	13,8 ± 3,4	-3,99 (-11,77 a 3,78)	0,29
TGL (mg/dL) ^{#, \$}	122,4 ± 47,5	100,4 ± 21,5	86,7 ± 34,9	117,5 ± 59,2	95,4 ± 43,9	72,4 ± 24,0	-18,72 (-47,65 a 10,20)	0,73
CT (mg/dL) ^{#, \$}	164,2 ± 31,8	160,4 ± 29,5	145,0 ± 33,2	179,9 ± 35,9	154,9 ± 34,4	144,2 ± 21,6	3,36 (-15,15 a 21,88)	0,45
TGO (U/L)	20,4 ± 10,7	29,6 ± 20,9	22,9 ± 13,7	19,9 ± 11,5	23,1 ± 11,3	17,8 ± 5,8	5,20 (-0,6 a 11,20)	0,37
TGP (U/L)	24,6 ± 14,1	20,0 ± 9,5	17,9 ± 5,7	19,2 ± 6,7	21,1 ± 9,8	18,1 ± 6,6	3,20 (-2,4 a 8,90)	0,23
Peptídeo C (ng/mL) ^{#, \$}	4,1 ± 1,6	2,7 ± 1,1	2,5 ± 0,6	3,6 ± 1,0	2,8 ± 0,8	1,7 ± 0,4	0,88 (0,15 a 1,62)	0,15
HbA1c (%) ^{#, \$}	6,2 ± 1,5	5,4 ± 0,4	5,4 ± 0,3	6,2 ± 1,2	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,4	-0,17 (-0,82 a 0,48)	0,93
VO _{2pico} (L/min) ^{#, \$}	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,8 ± 0,3	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,4	1,9 ± 0,4	0,19 (-0,01 a 0,41)	0,67
VO _{2pico} (mL/kg/min) ^{#, \$}	16,7 ± 2,4	19,3 ± 3,2	21,4 ± 3,6	16,2 ± 2,3	17,8 ± 2,4	22,9 ± 3,5	1,43 (-0,63 a 3,5)	0,12

Tabela 6. Características físicas, bioquímicas e de aptidão aeróbia dos grupos experimentais antes (PRÉ), três (PÓS3) e nove meses (PÓS9) após a cirurgia bariátrica referente ao ESTUDO 2. Dados em média ± DP, intervalo de confiança entre os grupos (IC95%) e valor de *p* para interação grupo x tempo (modelo misto para medidas repetidas). CT: colesterol total; HbA1C: hemoglobina glicada; HDL: lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PCR: proteína C-reativa; TGL: triglicérides; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; VO_{2pico}: consumo pico de oxigênio; # indica *p* ≤ 0,05 para o efeito principal de tempo (PRÉ vs. PÓS3); \$ indica *p* ≤ 0,05 efeito principal de tempo (PRE vs. PÓS9); * indica *p* ≤ 0,05 para comparações entre os grupos no período PÓS9.

8.6. Avaliação dos marcadores de resistência à insulina e sensibilidade à insulina

A figura 17 apresenta os dados referente as curvas de glicose e insulina durante o TOTG referente ao ESTUDO 2. A AUC de insulina (Painel C) foi significativamente reduzida no período PÓS3 (efeito principal de tempo, $p = 0,0007$ vs. PRÉ). Uma diferença significativa entre os grupos experimentais foi encontrada no período PÓS9 em favor ao grupo RYGB + ET ($p = 0,0067$). A AUC de glicose (Painel D) também foi significativamente menor no PÓS9 quando comparado com o período PRÉ (efeito principal de tempo, $p = 0,0004$). De maneira semelhante, o HOMA-IR (Painel E) foi significativamente menor no período PÓS3 (efeito principal de tempo, $p < 0,0001$) e no PÓS9 (efeito principal de tempo, $p < 0,0001$). A cirurgia bariátrica melhorou significativamente a sensibilidade à insulina no corpo inteiro avaliado pelo *Matsuda index* (efeito principal de tempo, $p < 0,0001$) (Painel F). De maneira importante, uma diferença significativa entre os grupos foi encontrada o período PÓS9 em favor do grupo RYGB + ET ($p < 0,0001$).

Figura 17. Teste oral de tolerância à glicose e marcadores de resistência à ação da insulina do ESTUDO 2. Dados expressos em média $\pm$ DP. RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas; ^ indica $p \leq 0,05$ para efeito principal de tempo; * indica $p \leq 0,05$ para comparações entre os grupos no período PÓS9.

8.7. *Perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias*

A figura 18 apresenta as concentrações séricas das citocinas pró e anti-inflamatórias ao longo do ESTUDO 2. Em ambos os grupos (RYGB e RYGB + ET) foi observado uma redução na IL1- β e TNF- α (Painel A e C) no período PÓS3 ($p = 0,0003$ e $p = 0,0283$, respectivamente). Quando comparado o período PÓS3 com o PÓS9, enquanto no grupo RYGB + ET foi observado valores reduzidos de TNF- α ($p < 0,0044$), nenhuma mudança significativa foi observada no grupo RYGB ($p > 0,05$). Por fim, o grupo RYGB + ET apresentou valores significativamente menores de IL1- β e TNF- α no período PÓS9 em comparação com o período PRÉ (ambos $p < 0,0001$) e o grupo RYGB no mesmo período ($p = 0,0010$).

Nenhuma interação significativa foi observada para as concentrações de IL-6, PCR e leptina ($p > 0,05$) (Painel B, D e E). No entanto, quando os grupos foram analisados em conjunto (efeito principal de tempo), observou-se uma redução significativa nas concentrações de IL-6 e leptina após a cirurgia bariátrica (IL-6: $p = 0,0003$; leptina: $p < 0,0001$) e uma redução nas concentrações de PCR e leptina quando comparado o período PÓS9 com o PÓS3 (PCR: $p = 0,0001$; leptina: $p = 0,0049$). Por fim, as concentrações de IL-6, PCR e leptina mostram-se reduzidas após o período de seguimento (PÓS9) quando comparado aos valores basais (PRÉ) (todos $p < 0,0001$).

Para as concentrações de IL-4 (Painel F), nenhuma diferença significativa foi observada após a cirurgia bariátrica (PÓS3) ($p > 0,05$). Entretanto, o grupo RYGB + ET apresentou maiores concentrações de IL-4 no período PÓS9 quando comparado com o período PÓS3 ($p = 0,0021$) e PRÉ ($p = 0,0003$). Importaneamente, quando comparado os grupos após o período de seguimento (PÓS9), o grupo RYGB + ET mostrou maiores concentrações de IL-4 em comparação ao grupo RYGB ($p = 0,0051$).

Nenhuma interação significativa foi observada para as concentrações de IL-10 ($p > 0,05$) (Painel G). Contudo, um aumento nas concentrações de IL-10 ao longo do seguimento foi observado quando os grupos foram analisados em conjunto (efeito principal de tempo:

PRÉ vs. PÓS3, $p = 0,0006$; PÓS3 vs. PÓS9, $p < 0,0001$). Nenhuma diferença significativa foi observada para a adiponectina (Painel H), independentemente do grupo e tempo analisado ($p > 0,05$).

Figura 18. Perfil sérico de marcadores inflamatórios e anti-inflamatórios no período PRÉ, 3 meses (PÓS3) e 9 meses (PÓS9) após a cirurgia bariátrica. Dados expressos em média $\pm$ DP, RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico. Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas; ^ indica efeito principal de tempo; * indica para comparações entre os grupos no período PÓS9 ($p \leq 0,05$); IL-1 β : interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; IL-4: interleucina 4; IL-10: interleucina 10; PCR: proteína C reativa; TNF- α : fator de necrose tumoral α .

8.8. Avaliação da função endotelial da artéria braquial

A figura 19 apresenta os resultados do estudo da função endotelial da artéria braquial ao longo da intervenção. A FMD (Painel A) apresentou uma melhora significativa no período PÓS3 em comparação ao PRÉ tanto no grupo RYGB ($p = 0,0017$) quanto no grupo RYGB + ET ($p = 0,0061$). Ao final do período de seguimento (PÓS9), os valores de FMD retornaram aos valores basais (PRÉ) no grupo RYGB ($p = 0,9900$), enquanto no grupo RYGB + ET maiores valores de FMD foram observados em comparação aos valores observados no PRÉ ($p < 0,0001$). Quando os grupos foram comparados ao final do período de seguimento (PÓS9), uma maior FMD foi observada no grupo RYGB + ET em comparação ao grupo RYGB ($p < 0,0001$).

Na avaliação da vasodilatação independente do endotélio (GTN) (Painel D), apenas o grupo RYGB + ET demonstrou aumento significativo na GTN após a cirurgia bariátrica (PÓS3) ($p = 0,0003$). Entretanto, o grupo RYGB + ET apresentou uma redução significativa da GTN quando comparado o período PÓS9 com o PÓS3 ($p < 0,0001$). Em adição, menores valores de GTN foram observados no período PÓS9 quando comparado com o grupo RYGB no mesmo momento ($p = 0,0476$). A relação entre a vasodilatação dependente e independente do endotélio (FMD/GTN) (Painel E) apresentou um aumento significativo no período PÓS3 somente no grupo RYGB ($p = 0,0520$). No período PÓS9, o grupo RYGB + ET apresentou maiores valores da FMD/GTN em comparação ao período PRÉ ($p < 0,0001$), PÓS3 ($p < 0,0001$) e o grupo RYGB no mesmo momento (PÓS9) ($p = 0,0013$).

O estresse de cisalhamento anterógrado (Painel F) não apresentou diferenças significantes ao longo do estudo ($p > 0,05$). O estresse de cisalhamento retrógrado (Painel G) apresentou uma redução significativa no grupo RYGB + ET após a cirurgia (PÓS3) ($p = 0,0193$). Já no grupo RYGB + ET um aumento significativo no PÓS9 foi observado quando comparado com o período PRÉ ($p = 0,0075$). Por fim, uma significativa diferença entre os grupos no período PÓS9 foi verificada ($p < 0,0001$).

Figura 19. Função endotelial da artéria braquial. Dados expressos em média $\pm$ DP. RYGB: grupo cirurgia bariátrica; RYGB + ET: grupo cirurgia bariátrica combinado ao treinamento físico. FMD: dilatação mediada pelo fluxo (%); GTN: gliceril trinitrato sublingual; Linha pontilhada: grupo controle de mulheres eutróficas; ^ indica efeito principal de tempo; \$ indica $p \leq 0,05$ quando comparado com valores PRÉ (intragrupo); & indica $p \leq 0,05$ quando comparado com valores PÓS3 (intragrupo); * indica $p \leq 0,05$ para comparações entre os grupos no período PÓS9.

A figura 20 apresenta o resumo dos achados relacionados a melhora da resposta vasodilatadora após a cirurgia bariátrica e treinamento físico.

Figura 20. Alterações na função endotelial (FMD) (barras) refletiram mudanças na taxa de estresse de cisalhamento retrógrado, sensibilidade à insulina (AUC insulina) e marcador pró-inflamatório (TNF- α) (linhas).

9. DISCUSSÃO

9.1. *A melhora da sensibilidade à insulina no músculo esquelético pela cirurgia bariátrica associada ao treinamento físico ocorre por mecanismos moleculares orquestrados no remodelamento da matriz extracelular (Estudo 1)*

O ESTUDO 1 fornece evidências convincentes de que o remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético desempenha um importante papel na restauração da sensibilidade à insulina do músculo esquelético de mulheres obesas submetidas à cirurgia bariátrica e treinamento físico. Diversos níveis de evidência confirmaram uma robusta mudança do remodelamento da matriz extracelular do músculo esquelético em direção semelhante ao observado no fenótipo do grupo CTRL. Coletivamente, essas observações revelaram que a via TGFβ1/SMAD 2/3 pode contribuir significativamente para a resistência à insulina, prejudicando a expressão, atividade e interação entre proteínas-chaves para a regulação intracelular da sensibilidade à insulina e captação de glicose no músculo esquelético. Importante ressaltar, que a via TGFβ1/SMAD 2/3 foi amplamente atenuada pela combinação entre cirurgia bariátrica e exercício físico pela ação da folistatina (FLST), importante proteína antagonista a ação do TGFβ1, apoiando seu potencial terapêutico e com importantes efeitos diretos sobre o aumento da sensibilidade à insulina (HANSEN *et al.*, 2011; HANSEN *et al.*, 2016; HANSEN *et al.*, 2016; HOFFMANN & WEIGERT, 2017). Portanto, ao revelar esse novo mecanismo pelo qual o exercício físico pode neutralizar a resistência à insulina no músculo esquelético, este estudo endossa a relevância da prescrição de exercícios físicos para garantir os melhores resultados metabólicos para os pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica.

Os primeiros trabalhos a demonstrarem que o treinamento físico pode aumentar ainda mais os efeitos da cirurgia bariátrica na sensibilidade à insulina, relacionaram essa melhora com a redução de subespécies de produtos do metabolismo lipídico e consequente melhoria da função mitocondrial (COEN *et al.*, 2015; COEN *et al.*, 2015). No presente estudo, avançamos esse conhecimento mostrando que o exercício físico pode promover uma extensa regulação de proteínas envolvidas na sinalização insulínica, como uma robusta ativação da Akt (Ser 473), AMPK (Thr 172) e aumento do conteúdo total de GLUT4, uma vez que são importantes proteínas na sinalização para captação de glicose no músculo esquelético (SYLOW *et al.*, 2017). Interessante notar que, na ausência de exercício físico, as melhorias na sensibilidade à

insulina trazidas pela cirurgia bariátrica foram progressivamente diminuídas, o que pode ser parcialmente explicado pela expressão atenuada das proteínas acima mencionadas.

Entende-se por fibrose muscular, o acúmulo crônico anormal e insolúvel de proteínas constituintes da ECM que interfere na funcionalidade do músculo esquelético. Assim, o excesso de depósito de proteínas da ECM compromete o funcionamento e arquitetura do músculo esquelético, interferindo assim no funcionamento deste território (LIEBER & WARD, 2013). Basicamente, a fibrose muscular é causada por citocinas inflamatórias e membros da superfamília do fator de crescimento transformador β tipo 1 (TGF β 1) (WALTON *et al.*, 2017). Muitos desses ligantes são expressos por células inflamatórias infiltrantes, que migram para o tecido danificado. De interesse, o TGF β 1 não só promove o aumento da sinalização para o depósito da ECM, mas também a própria proteína TGF β 1 é capaz de se concentrar na ECM, acelerando assim a resposta pró-fibrótica (WALTON *et al.*, 2017). A formação do complexo receptor-TGF β 1, potencializa a cascata de fosforilação envolvendo fatores de transcrição do tipo SMAD 2/3. Sabidamente, a ativação do complexo TGF β 1-SMAD 2/3 regula a expressão de vários genes e proteínas com padrões pró-fibróticos, incluindo diversos tipos de colágenos, integrinas e MMP-9 (WALTON *et al.*, 2017). Ainda em uma perspectiva mecanicista, o TGF β 1 promove a fibrose no músculo esquelético por estimular a diferenciação de fibroblastos quiescentes em miofibroblastos secretores de proteínas da ECM (LIJNEN *et al.*, 2003). Fibroblastos no músculo esquelético em circunstâncias de estresse metabólico e mecânico se diferenciam em uma linhagem pró-miofibroblástica, que na presença do TGF β 1, tornam-se miofibroblastos completamente diferenciados (GABBIANI, 2003). Notavelmente, o TGF β 1 impulsiona a produção de vimentina e alfa actina de músculo liso (α -SMA), sendo que ambas conferem aos miofibroblastos a capacidade contrátil (AGLEY *et al.*, 2013; WALTON *et al.*, 2017). Assim, essas células representam os fibroblastos ativados, com alta capacidade de produção de proteínas constituintes da ECM. Ao aumentar a expressão de TGF β 1, os miofibroblastos ativos depositam uma quantidade excessiva de proteínas envolvidas na estrutura da ECM, comprometendo a arquitetura do tecido afetado, além de atuar como célula capaz de sinalizar para o aumento da resposta quimiotática, ou seja, atrair para o tecido fibrótico células com perfil inflamatório como os macrófagos (AGLEY *et al.*, 2013; WALTON *et al.*, 2017).

É conhecido que a comunicação entre órgãos é essencial para a manutenção da homeostase fisiológica. Uma forma de manter a comunicação entre os órgãos é a manutenção adequada dos sinais moleculares através da circulação. Antes dos sinais moleculares exercerem uma atividade biológica, eles devem ser entregues apropriadamente aos tecidos-alvo através da microcirculação (WASSERMAN *et al.*, 2018; WILLIAMS *et al.*, 2018). No músculo esquelético, o endotélio dos capilares é responsável pela regulação do acesso de macromoléculas circulantes neste tecido e, portanto, sua capacidade de efetuar atividade biológica (WILLIAMS *et al.*, 2018). Um hormônio cuja atividade é controlada pelo endotélio dos capilares no músculo esquelético é a insulina (BARRETT *et al.*, 2011; MEIJER *et al.*, 2016). Uma vez que a capacidade da insulina em estimular a captação de glicose no músculo esquelético é dependente da taxa em que a insulina atravessa o endotélio capilar (YANG *et al.*, 1989) e a entrega de insulina no músculo esquelético está prejudicada em quadros de resistência à insulina (KUBOTA *et al.*, 2011; BROUSSARD *et al.*, 2016), torna-se importante o estudo da ultraestrutura da membrana basal e endotelial dos capilares do músculo esquelético neste estudo.

De fato, estudos experimentais e clínicos mostraram que a expansão da ECM pode resultar em defeitos da interação célula-célula e célula-ECM, o que neste contexto poderia dificultar fisicamente a distribuição de insulina aos miócitos (WILLIAMS *et al.*, 2018). Além disso, a expansão do colágeno da ECM pode contribuir para a resistência à insulina pelo aumento de proteínas que podem inibir a sinalização insulínica no músculo esquelético (ex: TGF β 1) (YADAV *et al.*, 2011; BOHM *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2016). Trabalhos prévios demonstram que o exercício físico foi capaz de atenuar a expansão da ECM em pacientes com DM2 e HAS (GLIEMANN *et al.*, 2015; MORTENSEN *et al.*, 2019). No entanto, ao nosso conhecimento nenhum estudo abordou esse efeito em pacientes obesos após a cirurgia bariátrica. Nesse estudo, demonstramos uma robusta mudança do fenótipo da ECM do músculo esquelético no grupo RYGB + ET, caracterizada por uma diminuição substancial na marcação para os colágenos I e III, sendo essa resposta apenas parcial no grupo RYGB. Outrossim, o grupo RYGB + ET demonstrou uma significativa redução da espessura da membrana basal dos capilares do músculo esquelético.

As mudanças do fenótipo da ECM no músculo esquelético levaram-nos a explorar as vias moleculares associadas ao remodelamento da ECM no músculo esquelético usando

padrões não-direcionais e direcionais. De maneira não-direcional, os dados gerados pelo *RNA-seq* (tanto a lista de genes como a análise bioinformática de enriquecimento de vias regulatórias) nortearam possíveis vias de sinalização e proteínas-alvos que poderiam ser validados a fim de explicar a possível conexão entre o remodelamento da matriz extracelular e a melhora da sensibilidade à insulina no músculo esquelético. De fato, diversas proteínas reguladoras das vias da Wnt/ β -catenina e TGF β 1 mostraram alteradas no período PRÉ. Ademais, outras proteínas que participam da regulação da matriz extracelular também estavam alteradas em decorrência da obesidade mórbida. Adicionalmente, a análise de enriquecimento de vias regulatórias usando a base de dados *Matrisome* para busca de lista de genes em larga escala demonstrou uma maior redução de genes relacionados ao colágeno (NABA_COLÁGENO) na comparação intragrupo (PÓS9-PRÉ) em favor do grupo RYGB + ET. Dentre os colágenos diferencialmente expressos, optamos pela validação do colágeno 1 (gene *COL1A1*) e 3 (gene *COL3A1*) por serem os mais abundantes no músculo esquelético de humanos (GILLIES & LIEBER, 2011; LIEBER & WARD, 2013; MAHDY, 2019).

Para algumas vias de sinalização, o exercício físico pareceu agir de maneira sinérgica à cirurgia bariátrica, induzindo uma resposta benéfica; no entanto, para outras vias de sinalização, apenas o exercício físico foi capaz de promover um efeito favorável. O primeiro caso é ilustrado pelo padrão de expressão do gene *TIMP1*, que foi igualmente reduzida entre os grupos experimentais. No entanto, a expressão proteica da MMP-9, que é inibida pela TIMP1, foi grandemente expressa no grupo RYGB + ET. Uma vez que a MMP-9 tem como função a degradação da ECM (GLIEMANN *et al.*, 2015), os resultados supracitados sugerem que apesar da redução da inibição da degradação da ECM pela cirurgia bariátrica, o aumento significativo da expressão da MMP-9 no grupo RYGB + ET sugere uma maior ativação em direção à degradação da ECM. Na mesma linha, embora a análise bioinformática de enriquecimento de vias regulatórias do *RNA-seq* tenha demonstrado uma menor ativação da sinalização da via da Wnt, o conteúdo total da Rac1 e a fosforilação da β -catenina e GSK-3 α/β foram suprimidas de maneira semelhante nos grupos RYGB e RYGB + ET. No entanto, o efeito aditivo do exercício físico à cirurgia bariátrica foi evidenciado pela menor translocação da β -catenina para o núcleo, o que resulta em uma capacidade reduzida para transcrição de genes relacionados a síntese de ECM (RAJASEKARAN *et al.*, 2017; HORII *et al.*, 2018). Embora a ativação da Rac1 e subsequente aumento da fosforilação da β -catenina sejam os principais mecanismos de controle da localização nuclear da β -catenina durante a sinalização

canônica da via da Wnt (WU *et al.*, 2008), novos estudos são necessários na tentativa de desvendar outras proteínas que possam participar da redução da translocação da β -catenina ao núcleo celular do músculo esquelético de pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica e treinamento físico. Por outro lado, a expressão da vimentina (AGLEY *et al.*, 2013; WALTON *et al.*, 2017), um importante marcador de atividade e diferenciação de fibroblastos, foi reduzida apenas no grupo RYGB + ET. Em conjunto, esses achados sugerem que a cirurgia bariátrica resulta em uma redução parcial do remodelamento da ECM, o que parece ser mais intensificada pela adição do exercício físico.

Outro interessante achado foi o robusto efeito do exercício físico na via TGF β 1-SMAD 2/3, que tem sido considerada a proteína pró-fibrogênica mais potente em estimular a expansão da ECM (HINZ, 2015). Em outro trabalho, o TGF β 1 e seus genes-alvo mostraram prever a incapacidade de aumento da sensibilidade à insulina após o treinamento físico em indivíduos com alto risco de DM2 (BOHM *et al.*, 2016), sugerindo que essa via é um alvo relevante para a redução da resistência à insulina através da modulação da ECM. O grupo RYGB apresentou um aumento significativo da expressão proteica de TGF β 1, quanto o grupo RYGB + ET produziu uma resposta na direção oposta. Corroborando esses dados, a expressão e translocação de um importante efetor da proteína TGF β 1, a fosforilação da SMAD 2/3 foi significativamente menor no extrato total de proteínas do grupo RYGB + ET além de uma menor translocação para o núcleo celular desta proteína. Em adição, uma vez que a SMAD 2/3 (Ser 465/467 Ser 423/425) é capaz de inibir a sinalização insulínica no músculo esquelético por meio do bloqueio direto da proteína Akt (Ser 473), realizamos um experimento para o estudo da interação entre essas proteínas (imunoprecipitação). De fato, a SMAD 2/3 (Ser 465/467 Ser 423/425) mostrou ser capaz de inibir a fosforilação da Akt (Ser 473) no grupo RYGB (Painel C), uma resposta que foi inibida no grupo RYGB + ET. No geral, esses achados demonstraram o significado da via TGF β 1-SMAD 2/3 no efeito benéfico do exercício físico sobre a sensibilidade à insulina de pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica.

Um importante antagonista do TGF β 1 é a folistatina, que tem recebido crescente atenção devido aos seus potenciais efeitos terapêuticos sobre a perda de massa muscular (SEPULVEDA *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017) e, mais recentemente, a sensibilidade à ação da insulina no músculo esquelético (BARBE *et al.*, 2015; BRANDT *et al.*, 2015; HAN *et al.*,

2019). Neste estudo, o exercício físico foi capaz de regular positivamente a expressão proteica de folistatina, enquanto a cirurgia bariátrica não produziu o mesmo efeito. Os experimentos *in vitro* confirmaram que a via TGF β 1-SMAD 2/3 exerce efeitos deletérios sobre a sinalização da insulina no músculo esquelético, que é completamente restaurada pela folistatina. A folistatina é uma proteína glicosilada plasmática, o qual é membro da superfamília das proteínas TGF β , capaz de antagonizar os efeitos do TGF β 1 e da miostatina (HANSEN *et al.*, 2011). Trabalhos prévios mostraram que o exercício físico é um estímulo importante para a secreção de folistatina (HANSEN *et al.*, 2011; HANSEN *et al.*, 2016), embora a liberação de folistatina em resposta ao exercício físico parece estar prejudicada em indivíduos com DM2 (HANSEN *et al.*, 2016). O aumento da razão glucagon/insulina parece ser o principal mecanismo de controle da secreção de folistatina em resposta ao exercício físico, ou seja, a indução da secreção de folistatina em resposta ao exercício físico parece depender de um aumento da secreção de glucagon e redução da secreção de insulina (HANSEN *et al.*, 2016). Entretanto, mudanças na relação glucagon/insulina representam apenas 50% do estímulo regulatório de secreção de folistatina em resposta ao exercício físico. Quando a folistatina aumenta em resposta ao exercício físico, as duas curvas produzidas seguem um padrão cinético semelhante, mas a secreção de folistatina é induzida em magnitudes diferentes entre aos dois experimentos (combinado ou não ao clampeamento da produção de insulina e glucagon pelo pâncreas). Isso indica que a fase inicial da secreção de folistatina em resposta ao exercício físico parece ser regulada por outros mecanismos ainda desconhecidos, embora a fase tardia de secreção da folistatina em resposta ao exercício físico parece ser controlada pela razão glucagon/insulina (HANSEN *et al.*, 2016). Assim, para a secreção de folistatina pelo exercício físico, deve existir outro mecanismo regulador ainda desconhecido independente das alterações da proporção de glucagon/insulina. Portanto, a folistatina emerge como um potencial candidato capaz de ser secretada em resposta ao exercício físico (chamada *exerkine*) com ação direta na regulação da sensibilidade à ação da insulina no músculo esquelético.

9.2. A reversão da melhora da função endotelial após a cirurgia bariátrica é atenuada pelo treinamento físico (Estudo 2)

É conhecido que a obesidade pode provocar disfunção endotelial, o qual tal disfunção precede a progressão da doença aterosclerótica (JORIS *et al.*, 2017). A dilatação mediada pelo fluxo sanguíneo (FMD) é um importante marcador da função endotelial e um forte preditor independente de eventos cardiovasculares. Portanto, a FMD constitui um importante instrumento prognóstico validado, além dos tradicionais fatores de risco cardiovascular (LUPOLI *et al.*, 2016). A cirurgia bariátrica emerge como o tratamento de escolha para o tratamento da obesidade mórbida, uma vez que a cirurgia bariátrica é capaz de promover uma substancial perda de peso corporal e uma abrupta redução dos fatores de risco cardiovascular, reduzindo assim o risco de mortalidade e morbidade cardiovascular (STURM *et al.*, 2009).

Todavia, o efeito da cirurgia bariátrica na função endotelial permanece controverso. Enquanto avaliações de curto prazo mostraram consistentes melhoras na FMD, efeitos menos pronunciados foram observados no longo prazo (ou seja, > 12 meses) (STURM, 2003; GOKCE *et al.*, 2005; BRETHAUER *et al.*, 2011; SALEH *et al.*, 2012). Isto sugere que, no curto prazo, a pronunciada perda de peso corporal *per se* pode não ser suficiente para proteger a longo prazo os vasos sanguíneos contra a disfunção endotelial, principalmente quando outros mediadores relacionados à disfunção endotelial não foram completamente resolvidos pela cirurgia bariátrica. Neste sentido, evidências apontam que tanto a resistência à insulina quanto o aumento da inflamação de baixo grau pioram a disfunção endotelial, afetando a biodisponibilidade de óxido nítrico e, predispondo, em última análise a um processo aterosclerótico acelerado (BHAGAT & VALLANCE, 1997; BIASUCCI *et al.*, 1999; RIDKER *et al.*, 2000; KHARBANDA *et al.*, 2002; SCHINZARI *et al.*, 2017; VISWAMBHARAN *et al.*, 2017). Embora a cirurgia bariátrica possa melhorar tanto a resistência à insulina quanto o estado inflamatório de baixo grau (COEN *et al.*, 2015; NETTO *et al.*, 2015), a extensão da melhora desses benefícios pode ser altamente sujeita ao estilo de vida dos pacientes, que é sabidamente um fator positivo para mudança da função vascular (HAMDY *et al.*, 2003; ESPOSITO *et al.*, 2004).

Nesse cenário, o exercício físico pode exercer proteção vascular por atuar diretamente nos vasos através da exposição repetitiva a estímulos hemodinâmicos (ex: estresse de cisalhamento), que, por sua vez, desencadeiam adaptações funcionais e estruturais à parede

vascular (JOYNER & GREEN, 2009; GREEN *et al.*, 2017). É importante ressaltar que o exercício físico melhora a função endotelial de indivíduos obesos e está associado a um risco reduzido de doenças vasculares e eventos cardiovasculares agudos (DESOUZA *et al.*, 2000; WATTS *et al.*, 2004; VINET *et al.*, 2011; PUGH *et al.*, 2014). Se é fato esse efeito cardioprotetor pode ser aplicado a pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, o exercício físico emerge como uma intervenção terapêutica essencial para sustentar, ou mesmo, potencializar os benefícios cardiovasculares imediatos gerados pela cirurgia bariátrica, muitos dos quais parecem ser transitórios na ausência de mudanças do estilo de vida (MARCON *et al.*, 2017; SACHDEV *et al.*, 2018).

Assim, o ESTUDO 2 teve o objetivo de investigar o papel do treinamento físico na função endotelial e potenciais mediadores em pacientes com obesidade submetidos à cirurgia bariátrica. Nossa hipótese *a priori* foi que a RYGB melhoraria a função endotelial em conjunto com a melhora do estado metabólico e inflamatório. Entretanto, apenas o grupo RYGB + ET seria capaz de manter os benefícios vasculares e metabólicos gerados pela cirurgia bariátrica.

De acordo com nossa hipótese, o exercício físico desempenhou um papel fundamental na prevenção da piora dos efeitos benéficos da cirurgia bariátrica sobre a função endotelial de pacientes obesos. Curiosamente, as mudanças da função endotelial do grupo RYGB + ET (assim como a mudança no grupo RYGB) foram espelhadas por alterações nos marcadores inflamatórios, sensibilidade à ação da insulina e o padrão do estresse de cisalhamento, de maneira independente a mudanças na composição corporal e adiposidade, evidenciando um importante papel cardioprotetor induzido pelo exercício físico de maneira orquestrada. Portanto, a preservação da melhora da função endotelial após a cirurgia bariátrica por meio do exercício físico endossa o valor terapêutico emergente desta intervenção em indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica.

Outros trabalhos demonstraram a melhora da função endotelial após a cirurgia bariátrica, embora a consistência das respostas seja controversa, especialmente quando avaliada no contexto de benefício sustentado a longo prazo. TSCHONER *et al.* (2013) demonstraram que pacientes submetidos a cirurgia bariátrica tiveram um aumento de 3,8% da FMD após 18 meses da realização do procedimento cirúrgico. Entretanto, a avaliação de 5 anos após a cirurgia revelou um declínio de 1,4%, sugerindo que os efeitos benéficos da

cirurgia bariátrica sobre a função endotelial não são duráveis. Os dados desse estudo corroboram o achado prévio. De fato, apesar do efeito sustentável da cirurgia bariátrica em importante desfechos relacionados à saúde como perda acentuada de peso e gordura corporal, a abordagem cirúrgica da obesidade *per se* parece não ser suficientemente robusta para solucionar alguns fatores de risco cardiometabólico (MARCON *et al.*, 2017; SACHDEV *et al.*, 2018).

Apoiando essa suposição, enquanto os pacientes do grupo RYGB tenderam a uma rápida deterioração da função vascular, os pacientes do grupo RYGB + ET tiveram uma significativa retenção dos benefícios em curto prazo gerados pela cirurgia bariátrica. Esses respectivos achados contrastam com os achados de STOLBERG *et al.* (2018) que não observaram nenhum efeito do exercício físico em biomarcadores séricos associados à disfunção endotelial. Todavia, o estudo da função endotelial por meio da FMD não foi realizado. Além disso, a baixa adesão ao programa de exercício físico (< 60% dos pacientes compareceram a > 50% das sessões de exercício físico) pode ter limitado as conclusões do estudo. Em nosso estudo, a melhora da função vascular por meio do exercício físico pode ser exclusivamente atribuída a melhora da dilatação dependente do endotélio avaliado pela FMD (portanto, por vias derivadas do óxido nítrico), ao invés de alterações em mecanismos independentes do endotélio (avaliados pela dilatação mediada pela ingestão de dinitrato de isossorbida sublingual). Sabidamente, o óxido nítrico é produzido por complexos mecanismos de mecanotransdução induzida pelo estresse de cisalhamento (GREEN *et al.*, 2017). O estresse de cisalhamento é um estímulo fraco para disparar a mecanotransdução, de modo que a percepção de diferentes padrões de estresse de cisalhamento parece desempenhar um papel importante na resposta vasodilatadora (GREEN *et al.*, 2017). Nesse sentido, no presente estudo o exercício físico foi capaz de atenuar o estresse de cisalhamento de orientação retrógrada. Um padrão exagerado de estresse de cisalhamento de orientação retrógrada produz efeitos vasculares prejudiciais e está associada à redução da expressão da enzima óxido nítrico sintase (eNOS), disfunção endotelial e lesão aterosclerótica avançada em modelos experimentais (GREEN *et al.*, 2017). Portanto, as mudanças benéficas do padrão de estresse de cisalhamento podem explicar parcialmente as melhoras induzidas pelo exercício físico na função endotelial evidenciadas por este estudo.

Alternativamente, é possível especular que o exercício físico promoveu melhoras na função endotelial em indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica, por melhorar alguns mediadores relacionados à função endotelial como a inflamação e resistência à insulina. Atualmente, há evidências convincentes de que o exercício físico melhora o estado inflamatório, diminuindo o balanço pró-inflamatório/anti-inflamatório em diversas doenças crônicas (MOTTA-MEJIA *et al.*, 2017; HOJMAN *et al.*, 2018). Estes dados atuais estendem-se aos pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica e são suportados pelas reduções observadas nas concentrações séricas de TNF- α e IL1- β , em conjunto com aumentos de IL-4 e IL-10. Coletivamente, os dados sugerem um papel anti-inflamatório em favor do grupo RYGB + ET e isso poderia explicar parcialmente a melhora da função endotelial. Os mecanismos pelos quais o exercício físico modula a resposta inflamatória ainda não são claros, mas podem envolver: (i) uma diminuição da gordura visceral (TCHERNOF & DESPRES, 2013), (ii) diminuição da expressão de receptores *toll-like* em monócitos e macrófagos, com subsequente diminuição na produção de citocinas inflamatórias (GLEESON *et al.*, 2006), (iii) um aumento transitório da IL-6 pelo músculo esquelético, que é seguido por uma liberação de citocinas anti-inflamatórias (PEDERSEN & FEBBRAIO, 2008). Embora a gordura visceral foi semelhante entre os grupos experimentais desse estudo, os outros mecanismos potenciais remanescentes merecem estudos futuros abordando essas considerações.

Também, o exercício físico pode ter influenciado a função endotelial ao melhorar a resistência à insulina. Sabidamente, a insulina plasmática elevada está associada à diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (KASHYAP *et al.*, 2008; EL ASSAR *et al.*, 2016), fenótipos de disfunção vascular na circulação coronariana e periférica (TAKASE *et al.*, 2006) e aumento de eventos cardiovasculares em indivíduos obesos (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2017). Foi anteriormente demonstrado que um programa de exercício físico de intensidade moderada semi-supervisionado de 6 meses promoveu uma pequena melhora (porém significativa) na sensibilidade à insulina. Tal melhora foi atribuída a mudanças nos lipídios intramiocelulares, mas não a mudanças na massa corporal ou adiposidade (COEN *et al.*, 2015). No atual estudo, o efeito benéfico do exercício físico na resistência à insulina foi ainda mais pronunciado, principalmente por reduções nas concentrações de insulina frente ao desafio com glicose. De fato, o exercício físico foi sobreposto a cirurgia bariátrica de tal modo que alguns indicadores de sensibilidade à insulina (ex: *Matsuda Index*) se aproximaram de

valores do grupo CTRL, enquanto um claro comprometimento da sensibilidade à insulina foi observado na ausência de exercício físico após 9 meses da realização da cirurgia bariátrica. É possível que a natureza supervisionada e relativamente intensiva do programa de treinamento físico possa explicar as maiores melhorias na sensibilidade à insulina observadas no presente estudo, em comparação com os trabalhos relatados anteriormente (COEN *et al.*, 2015; STOLBERG *et al.*, 2018).

Vale ressaltar que os benefícios do treinamento físico na função endotelial ocorreram apesar de alterações semelhantes em alguns fatores de risco cardiometabólico para ambos os grupos, como PA, perfil lipídico, peso corporal, adiposidade e consumo pico de oxigênio. Esses dados fornecem novas evidências para o conceito emergente da “lacuna do fator de risco”, segundo o qual o impacto do benefício do exercício físico sobre o risco cardiovascular excede em mais de 50% o esperado de mudanças apenas em fatores clássicos do risco cardiovascular. O presente estudo amplia essa noção demonstrando que essa “lacuna do fator de risco” pode ser parcialmente preenchida pela melhora da função endotelial, que agora surge como resultado altamente desejável que se estende além das melhorias nos fatores de risco tradicionais para a doença cardiovascular para os pacientes envolvidos em um programa de exercício físico após à cirurgia bariátrica.

10. CONCLUSÕES

O Quadro 1 demonstra o resumo das principais mudanças após à cirurgia bariátrica combinada ou não à um programa de exercícios físicos no período PÓS9.

VÁRIAVEL		RYGB	RYGB + ET
COMPOSIÇÃO CORPORAL	Peso corporal	↓	↔
	Massa de gordura	↓	↔
	Massa magra	↓	↔
	Gordura visceral	↓	↔
RESISTÊNCIA INSULÍNICA	HOMA - IR	↓	↔
	Matsuda Index	↑	↑↑
	mISI	↔	↑
FUNÇÃO ENDOTELIAL	FMD	↓	↑
	Taxa de estresse de cisalhamento anterógrado	↔	↔
	Taxa de estresse de cisalhamento retrógrado	↑	↓
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	IL-1 β	↑	↓
	IL-6	↓	↔
	TNF- α	↑	↓

CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS	IL-4	↔	↑
	IL-10	↑	↔
MATRIZ EXTRACELULAR (Fenótipo)	Colágeno I	↓	↓↓
	Colágeno III	↓	↓↓
	Espessura da membrana basal	↓	↓↓
MATRIZ EXTRACELULAR (Expressão gênica)	<i>TIMP1</i>	↓	↔
	<i>MSTN</i>	↓	↓↓
MATRIZ EXTRACELULAR (Expressão proteica)	Vimentina	↑	↓
	MMP-9	↑	↑↑
	pGSK-3 α/β	↓	↔
	p β -catenina	↓	↔
	TGF β 1	↑	↓
	pSMAD 2/3	↑	↓
	Folistatina	↔	↑

MATRIZ EXTRACELULAR (Translocação para o núcleo)	p β -catenina	↓	↓↓
	pSMAD 2/3	↑	↓
RESISTÊNCIA INSULÍNICA (Expressão proteica)	pAkt	↑	↑↑
	pAMPK	↑	↑↑
	pAS160	↑	↑↑
	GLUT4	↔	↑

Quadro 1. Resumo das principais mudanças no grupo RYGB e RYGB + ET ao final da intervenção.
 ↑ indica aumento no grupo RYGB; ↓ indica redução no grupo RYGB; ↔ indica ausência de mudança pela cirurgia bariátrica; ↑ indica efeito aditivo (aumento) do treinamento físico à cirurgia bariátrica; ↓ indica efeito aditivo (redução) do treinamento físico à cirurgia bariátrica; ↔ indica ausência de mudança pelo treinamento físico combinado à cirurgia bariátrica.

Os resultados do presente estudo demonstram que:

1) Treinamento físico após a cirurgia bariátrica restaura a sensibilidade à insulina no músculo esquelético, que é mediada por mudanças moleculares e fenotípicas notáveis na ECM. No entanto, a cirurgia bariátrica foi capaz de promover apenas uma resolução parcial da resistência à insulina e diminuição da ECM no músculo esquelético, sugerindo que as melhorias nos resultados metabólicos trazidos pela cirurgia bariátrica podem ser progressivamente diminuídas na ausência do exercício físico. Do ponto de vista mecânico, os candidatos relevantes modulados pelo exercício físico emergem como alvos terapêuticos para o tratamento da resistência à insulina do músculo esquelético, em particular a via do TGF β 1-SMAD 2/3 e seu antagonista FLST.

2) Treinamento físico aumenta e sustenta os benefícios da cirurgia bariátrica na função endotelial e perfil da inflamação de baixo grau. Considerando que a disfunção endotelial é um reconhecido marcador precoce de processo aterosclerótico, é razoável afirmar

que o exercício físico oferece um importante papel cardioprotetor em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, que é independente de alterações no peso e gordura corporal.

Como aplicação clínica dos presentes achados, consideramos relevante que o treinamento físico seja adotado, como medida terapêutica, para garantir os melhores resultados cardiometabólicos em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-GHANI, M. A. et al. Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test. **Diabetes Care**, v. 30, n. 1, p. 89-94, Jan 2007. ISSN 0149-5992 (Print)0149-5992. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/dc06-1519> >.

ABRIGO, J. et al. Transforming growth factor type beta (TGF-beta) requires reactive oxygen species to induce skeletal muscle atrophy. **Cell Signal**, v. 28, n. 5, p. 366-376, May 2016. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.01.010> >.

AGLEY, C. C. et al. Human skeletal muscle fibroblasts, but not myogenic cells, readily undergo adipogenic differentiation. **J Cell Sci**, v. 126, n. Pt 24, p. 5610-25, Dec 15 2013. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.132563> >.

AHMADIZAD, S. et al. Effects of short-term nonperiodized, linear periodized and daily undulating periodized resistance training on plasma adiponectin, leptin and insulin resistance. **Clin Biochem**, v. 47, n. 6, p. 417-22, Apr 2014. ISSN 0009-9120. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.12.019> >.

AKHMETSHINA, A. et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis. **Nat Commun**, v. 3, p. 735, Mar 13 2012. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1734> >.

ALBERS, P. H. et al. Enhanced insulin signaling in human skeletal muscle and adipose tissue following gastric bypass surgery. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 309, n. 5, p. R510-24, Sep 2015. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00228.2014> >.

APOVIAN, C. M. et al. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 9, p. 1654-9, Sep 2008. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.108.170316> >.

ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186-90, Nov 10 1994. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/372186a0> >.

BARBE, C. et al. Role of IGF-I in follistatin-induced skeletal muscle hypertrophy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 309, n. 6, p. E557-67, Sep 15 2015. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00098.2015> >.

BARRETT, E. J. et al. The vascular actions of insulin control its delivery to muscle and regulate the rate-limiting step in skeletal muscle insulin action. **Diabetologia**, v. 52, n. 5, p. 752-64, May 2009. ISSN 0012-186x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-009-1313-z> >.

_____. Insulin regulates its own delivery to skeletal muscle by feed-forward actions on the vasculature. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 2, p. E252-63, Aug 2011. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00186.2011> >.

BECHARA, L. R. et al. NADPH oxidase hyperactivity induces plantaris atrophy in heart failure rats. **Int J Cardiol**, v. 175, n. 3, p. 499-507, Aug 20 2014. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.06.046> >.

BELACHEW, M.; BELVA, P. H.; DESAIVE, C. Long-term results of laparoscopic adjustable gastric banding for the treatment of morbid obesity. **Obes Surg**, v. 12, n. 4, p. 564-8, Aug 2002. ISSN 0960-8923 (Print)0960-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1381/096089202762252352> >.

BELACHEW, M. et al. Laparoscopic adjustable silicone gastric banding in the treatment of morbid obesity. A preliminary report. **Surg Endosc**, v. 8, n. 11, p. 1354-6, Nov 1994. ISSN 0930-2794 (Print)0930-2794. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BERGGREN, J. R. et al. Skeletal muscle lipid oxidation and obesity: influence of weight loss and exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 4, p. E726-32, Apr 2008. ISSN 0193-1849 (Print) 0193-1849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18252891> >.

BERRIA, R. et al. Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 3, p. E560-5, Mar 2006. ISSN 0193-1849 (Print)0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00202.2005> >.

BHAGAT, K.; VALLANCE, P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. **Circulation**, v. 96, n. 9, p. 3042-7, Nov 4 1997. ISSN 0009-7322 (Print)0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BIASUCCI, L. M. et al. Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. **Circulation**, v. 99, n. 16, p. 2079-84, Apr 27 1999. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BLAIR, S. N. et al. Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. **JAMA**, v. 273, n. 14, p. 1093-8, Apr 12 1995. ISSN 0098-7484 (Print) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7707596> >.

BOGATY, P. et al. Randomized trial of a noninvasive strategy to reduce hospital stay for patients with low-risk myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v. 37, n. 5, p. 1289-96, Apr 2001. ISSN 0735-1097 (Print)0735-1097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BOHM, A. et al. TGF-beta Contributes to Impaired Exercise Response by Suppression of Mitochondrial Key Regulators in Skeletal Muscle. **Diabetes**, v. 65, n. 10, p. 2849-61, Oct 2016. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/db15-1723> >.

BOND, D. S. et al. Becoming physically active after bariatric surgery is associated with improved weight loss and health-related quality of life. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 1, p. 78-83, Jan 2009. ISSN 1930-7381 (Print) 1930-7381 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997679> >.

BOORSMA, W. et al. Body composition, insulin sensitivity, and cardiovascular disease profile in healthy Europeans. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 12, p. 2696-701, Dec 2008. ISSN 1930-7381 (Print)1930-7381. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2008.433> >.

BRANDT, C. et al. Over-expression of Follistatin-like 3 attenuates fat accumulation and improves insulin sensitivity in mice. **Metabolism**, v. 64, n. 2, p. 283-95, Feb 2015. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.007> >.

BRETHAUER, S. A. et al. Early effects of gastric bypass on endothelial function, inflammation, and cardiovascular risk in obese patients. **Surg Endosc**, v. 25, n. 8, p. 2650-9, Aug 2011. ISSN 0930-2794. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00464-011-1620-6> >.

BROUSSARD, J. L. et al. Insulin access to skeletal muscle is impaired during the early stages of diet-induced obesity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 24, n. 9, p. 1922-8, Sep 2016. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/oby.21562> >.

BUCHWALD, H. et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v. 292, n. 14, p. 1724-37, Oct 13 2004. ISSN 1538-3598 (Electronic) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479938> >.

_____. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. **Am J Med**, v. 122, n. 3, p. 248-256 e5, Mar 2009. ISSN 1555-7162 (Electronic) 0002-9343 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19272486> >.

CERIELLO, A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 1-7, Jan 2005. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHARATAN, F. Obesity surgery grows in popularity in the US. **Bmj**, v. 321, n. 7267, p. 980, Oct 21 2000. ISSN 0959-8138 (Print)0959-8138. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHEN, J. L. et al. Specific targeting of TGF-beta family ligands demonstrates distinct roles in the regulation of muscle mass in health and disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 26, p. E5266-e5275, Jun 27 2017. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1620013114> >.

CLERK, L. H. et al. Obesity blunts insulin-mediated microvascular recruitment in human forearm muscle. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1436-42, May 2006. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

COEN, P. M. et al. Exercise and Weight Loss Improve Muscle Mitochondrial Respiration, Lipid Partitioning, and Insulin Sensitivity After Gastric Bypass Surgery. **Diabetes**, v. 64, n. 11, p. 3737-50, Nov 2015. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/db15-0809> >.

_____. Clinical trial demonstrates exercise following bariatric surgery improves insulin sensitivity. **J Clin Invest**, v. 125, n. 1, p. 248-57, Jan 2015. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci78016> >.

COKER, R. H. et al. The impact of exercise training compared to caloric restriction on hepatic and peripheral insulin resistance in obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 11, p. 4258-66, Nov 2009. ISSN 0021-972x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2008-2033> >.

CORRETTI, M. C. et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. **J Am Coll Cardiol**, v. 39, n. 2, p. 257-65, Jan 16 2002. ISSN 0735-1097 (Print)0735-1097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

D'ALESSANDRIS, C. et al. C-reactive protein induces phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser 612 in L6 myocytes, thereby impairing the insulin signalling pathway that promotes glucose transport. **Diabetologia**, v. 50, n. 4, p. 840-9, Apr 2007. ISSN 0012-186X (Print)0012-186x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-006-0522-y> >.

DE ARAUJO, C. C. et al. Regular and moderate aerobic training before allergic asthma induction reduces lung inflammation and remodeling. **Scand J Med Sci Sports**, v. 26, n. 11, p. 1360-1372, Nov 2016. ISSN 0905-7188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/sms.12614> >.

DE BOER, M. P. et al. Microvascular dysfunction: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. **Microcirculation**, v. 19, n. 1, p. 5-18, Jan 2012. ISSN 1549-8719 (Electronic) 1073-9688 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21883642> >.

DESOUZA, C. A. et al. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. **Circulation**, v. 102, n. 12, p. 1351-7, Sep 19 2000. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DIGNAT-GEORGE, F.; BOULANGER, C. M. The many faces of endothelial microparticles. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 1, p. 27-33, Jan 2011. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.110.218123> >.

DIMICK, J. B.; BIRKMEYER, N. J. Rethinking eligibility criteria for bariatric surgery. **JAMA**, v. 312, n. 9, p. 953-4, Sep 3 2014. ISSN 1538-3598 (Electronic) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182104> >.

EL ASSAR, M. et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) elevation and arginase up-regulation contribute to endothelial dysfunction related to insulin resistance in rats and morbidly obese humans. **J Physiol**, v. 594, n. 11, p. 3045-60, Jun 1 2016. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jp271836> >.

ENGELAND, A. et al. Body mass index in adolescence in relation to total mortality: 32-year follow-up of 227,000 Norwegian boys and girls. **Am J Epidemiol**, v. 157, n. 6, p. 517-23, Mar 15 2003. ISSN 0002-9262 (Print) 0002-9262 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12631541> >.

ESPOSITO, K. et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. **Jama**, v. 292, n. 12, p. 1440-6, Sep 22 2004. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/jama.292.12.1440> >.

FEALY, C. E. et al. Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. **J Appl Physiol**

(1985), v. 117, n. 3, p. 239-45, Aug 1 2014. ISSN 0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/japplphysiol.01064.2013> >.

FEBBRAIO, M. A. et al. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. **Diabetes**, v. 53, n. 7, p. 1643-8, Jul 2004. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FERREIRA, I. et al. Longitudinal changes in .VO2max: associations with carotid IMT and arterial stiffness. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, n. 10, p. 1670-8, Oct 2003. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14523303> >.

FLEGAL, K. M. et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. **Jama**, v. 288, n. 14, p. 1723-7, Oct 9 2002. ISSN 0098-7484 (Print)0098-7484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FOBI, M. A.; LEE, H. SILASTIC ring vertical banded gastric bypass for the treatment of obesity: two years of follow-up in 84 patients [corrected]. **J Natl Med Assoc**, v. 86, n. 2, p. 125-8, Feb 1994. ISSN 0027-9684 (Print)0027-9684. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FONTAINE, K. R. et al. Years of life lost due to obesity. **JAMA**, v. 289, n. 2, p. 187-93, Jan 2003. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517229> >.

FONTBONNE, A. et al. Body fat distribution and coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes mellitus: the Paris Prospective Study, 15-year follow-up. **Diabetologia**, v. 35, n. 5, p. 464-8, May 1992. ISSN 0012-186X (Print)0012-186x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FREEDLAND, E. S. Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. **Nutr Metab (Lond)**, v. 1, n. 1, p. 12, Nov 5 2004. ISSN 1743-7075 (Print)1743-7075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-1-12> >.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, Jun 1972. ISSN 0009-9147 (Print)0009-9147. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FUJII, N.; JESSEN, N.; GOODYEAR, L. J. AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 5, p. E867-77, Nov 2006. ISSN 0193-1849 (Print)0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00207.2006> >.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J Pathol**, v. 200, n. 4, p. 500-3, Jul 2003. ISSN 0022-3417 (Print)0022-3417. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/path.1427> >.

GALLAGHER, M. J. et al. Comparative impact of morbid obesity vs heart failure on cardiorespiratory fitness. **Chest**, v. 127, n. 6, p. 2197-203, Jun 2005. ISSN 0012-3692 (Print) 0012-3692 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947337> >.

GAMBILLARA, V. et al. Plaque-prone hemodynamics impair endothelial function in pig carotid arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 6, p. H2320-8, Jun 2006. ISSN 0363-6135 (Print)0363-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00486.2005> >.

Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference. **Am J Clin Nutr**, v. 55, n. 2, p. 615S-619S, 1991. ISSN 1062-0362 (Print) 1062-0362 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1760489> >.

GELONEZE, B. et al. The insulin tolerance test in morbidly obese patients undergoing bariatric surgery. **Obes Res**, v. 9, n. 12, p. 763-9, Dec 2001. ISSN 1071-7323 (Print)1071-7323. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2001.105> >.

GILLIES, A. R.; LIEBER, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 3, p. 318-31, Sep 2011. ISSN 0148-639x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/mus.22094> >.

GLEESON, M.; MCFARLIN, B.; FLYNN, M. Exercise and Toll-like receptors. **Exerc Immunol Rev**, v. 12, p. 34-53, 2006. ISSN 1077-5552 (Print)1077-5552. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GLIEMANN, L. et al. Capillary growth, ultrastructure remodelling and exercise training in skeletal muscle of essential hypertensive patients. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 214, n. 2, p. 210-20, Jun 2015. ISSN 1748-1708. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/apha.12501> >.

GOEDECKE, J. H.; MICKLESFIELD, L. K. The effect of exercise on obesity, body fat distribution and risk for type 2 diabetes. **Med Sport Sci**, v. 60, p. 82-93, 2014. ISSN 1662-2812 (Electronic) 0076-6070 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25226803> >.

GOKCE, N. et al. Effect of medical and surgical weight loss on endothelial vasomotor function in obese patients. **Am J Cardiol**, v. 95, n. 2, p. 266-8, Jan 15 2005. ISSN 0002-9149 (Print)0002-9149. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.09.016> >.

GONZALEZ, F. et al. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 1, p. 336-40, Jan 2006. ISSN 0021-972X (Print)0021-972x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2005-1696> >.

GOODPASTER, B. H. et al. Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. **Metabolism**, v. 49, n. 4, p. 467-72, Apr 2000. ISSN 0026-0495 (Print) 0026-0495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10778870> >.

GOOSSENS, G. H. et al. Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. **Circulation**, v. 124, n. 1, p. 67-76, Jul 5 2011. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21670228> >.

GREEN, D. J. et al. Vascular Adaptation to Exercise in Humans: Role of Hemodynamic Stimuli. **Physiol Rev**, v. 97, n. 2, p. 495-528, Apr 2017. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00014.2016> >.

HAMDY, O. et al. Lifestyle modification improves endothelial function in obese subjects with the insulin resistance syndrome. **Diabetes Care**, v. 26, n. 7, p. 2119-25, Jul 2003. ISSN 0149-5992 (Print)0149-5992. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HAN, X. et al. Mechanisms involved in follistatin-induced increased insulin action in skeletal muscle. **BioRxiv (preprint)**. Mar 5, 2019. Disponível em: doi: <http://dx.doi.org/10.1101/568097>.

HANSEN, J. et al. Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine. **Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 164-71, Jan 2011. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-0868> >.

HANSEN, J. S. et al. Exercise-Induced Secretion of FGF21 and Follistatin Are Blocked by Pancreatic Clamp and Impaired in Type 2 Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 101, n. 7, p. 2816-25, Jul 2016. ISSN 0021-972x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2016-1681> >.

_____. Circulating Follistatin Is Liver-Derived and Regulated by the Glucagon-to-Insulin Ratio. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 101, n. 2, p. 550-60, Feb 2016. ISSN 0021-972x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2015-3668> >.

HINZ, B. The extracellular matrix and transforming growth factor-beta1: Tale of a strained relationship. **Matrix Biol**, v. 47, p. 54-65, Sep 2015. ISSN 0945-053x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.006> >.

HOFFMANN, C.; WEIGERT, C. Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: The Role of Myokines in Exercise Adaptations. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 7, n. 11, Nov 1 2017. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a029793> >.

HOJLUND, K. et al. AMPK activity and isoform protein expression are similar in muscle of obese subjects with and without type 2 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 286, n. 2, p. E239-44, Feb 2004. ISSN 0193-1849 (Print)0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00326.2003> >.

HOJMAN, P. et al. Molecular Mechanisms Linking Exercise to Cancer Prevention and Treatment. **Cell Metab**, v. 27, n. 1, p. 10-21, Jan 9 2018. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.015> >.

HORII, N. et al. Resistance training prevents muscle fibrosis and atrophy via down-regulation of C1q-induced Wnt signaling in senescent mice. **Faseb j**, v. 32, n. 7, p. 3547-3559, Jul 2018. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1096/fj.201700772RRR> >.

HORNG, T.; HOTAMISLIGIL, G. S. Linking the inflammasome to obesity-related disease. In: (Ed.). **Nat Med**. United States, v.17, 2011. p.164-5. ISBN 1546-170X (Electronic)1078-8956 (Linking).

HOTAMISLIGIL, G. S. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24 Suppl 4, p. S23-7, Nov 2000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 95, n. 5, p. 2409-15, May 1995. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci117936> >.

_____. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665-8, Feb 2 1996. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan 1 1993. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

IRWIN, W. A. et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. **Nat Genet**, v. 35, n. 4, p. 367-71, Dec 2003. ISSN 1061-4036 (Print)1061-4036. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ng1270> >.

JAKICIC, J. M. et al. Objective physical activity and weight loss in adults: the step-up randomized clinical trial. **Obesity (Silver Spring)**, v. 22, n. 11, p. 2284-92, Nov 2014. ISSN 1930-739X (Electronic) 1930-7381 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25376395> >.

JENKINS, N. T. et al. Disturbed blood flow acutely induces activation and apoptosis of the human vascular endothelium. **Hypertension**, v. 61, n. 3, p. 615-21, Mar 2013. ISSN 0194-911x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.111.00561> >.

JORIS, P. J. et al. Diet-induced weight loss improves not only cardiometabolic risk markers but also markers of vascular function: a randomized controlled trial in abdominally obese men. **Am J Clin Nutr**, v. 105, n. 1, p. 23-31, Jan 2017. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.116.143552> >.

JOSEPH, L. J. et al. Body fat distribution and flow-mediated endothelium-dependent vasodilation in older men. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 26, n. 5, p. 663-9, May 2002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijo.0801972> >.

JOYNER, M. J.; GREEN, D. J. Exercise protects the cardiovascular system: effects beyond traditional risk factors. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 23, p. 5551-8, Dec 1 2009. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2009.179432> >.

KAHN, C. R. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. **Diabetes**, v. 43, n. 8, p. 1066-84, Aug 1994. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KANG, L. et al. Hyaluronan accumulates with high-fat feeding and contributes to insulin resistance. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 1888-96, Jun 2013. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/db12-1502> >.

KARAKAS, S. E.; KIM, K.; DULEBA, A. J. Determinants of impaired fasting glucose versus glucose intolerance in polycystic ovary syndrome. **Diabetes Care**, v. 33, n. 4, p. 887-93, Apr 2010. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/dc09-1525> >.

KARPE, F. et al. Impaired postprandial adipose tissue blood flow response is related to aspects of insulin sensitivity. **Diabetes**, v. 51, n. 8, p. 2467-73, Aug 2002. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145159> >.

KASHYAP, S. R. et al. Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 31, n. 1, p. 134-9, Jan 2008. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/dc07-1198> >.

KELLEY, D. E. et al. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. **Am J Physiol**, v. 277, n. 6 Pt 1, p. E1130-41, Dec 1999. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600804> >.

KELLY, T. et al. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, n. 9, p. 1431-7, Sep 2008. ISSN 1476-5497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18607383> >.

KESKE, M. A. et al. Muscle microvascular blood flow responses in insulin resistance and ageing. **J Physiol**, v. 594, n. 8, p. 2223-31, Apr 15 2016. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283549> >.

KHARBANDA, R. K. et al. Prevention of inflammation-induced endothelial dysfunction: a novel vasculo-protective action of aspirin. **Circulation**, v. 105, n. 22, p. 2600-4, Jun 4 2002. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KIM, F. et al. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 11, p. 1982-8, Nov 2008. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.108.169722> >.

KING, G. L.; JOHNSON, S. M. Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. **Science**, v. 227, n. 4694, p. 1583-6, Mar 29 1985. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KLEIN, S. et al. Moderate effect of duodenal-jejunal bypass surgery on glucose homeostasis in patients with type 2 diabetes. **Obesity (Silver Spring)**, v. 20, n. 6, p. 1266-72, Jun 2012. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2011.377> >.

KLIP, A. et al. Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 306, n. 10, p. C879-86, May 15 2014. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00069.2014> >.

KODAMA, S. et al. Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis. **JAMA**, v. 301, n. 19, p. 2024-35, May 20 2009. ISSN 1538-3598 (Electronic) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19454641 >.

KOO, B. K. et al. The effects of total energy expenditure from all levels of physical activity vs. physical activity energy expenditure from moderate-to-vigorous activity on visceral fat and insulin sensitivity in obese Type 2 diabetic women. **Diabet Med**, v. 27, n. 9, p. 1088-92, Sep 2010. ISSN 0742-3071. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.03045.x> >.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-43, Apr 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766250> >.

KREMEN, A. J.; LINNER, J. H.; NELSON, C. H. An experimental evaluation of the nutritional importance of proximal and distal small intestine. **Ann Surg**, v. 140, n. 3, p. 439-48, Sep 1954. ISSN 0003-4932 (Print)0003-4932. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KUBOTA, T. et al. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. **Cell Metab**, v. 13, n. 3, p. 294-307, Mar 2 2011. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.018> >.

LABAT-ROBERT, J.; ROBERT, L. Aging of the extracellular matrix and its pathology. **Exp Gerontol**, v. 23, n. 1, p. 5-18, 1988. ISSN 0531-5565 (Print)0531-5565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LAVIE, C. J. et al. Obesity and cardiovascular diseases: implications regarding fitness, fatness, and severity in the obesity paradox. **J Am Coll Cardiol**, v. 63, n. 14, p. 1345-54, Apr 15 2014. ISSN 1558-3597 (Electronic) 0735-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530666> >.

LEBRUN, P.; VAN OBBERGHEN, E. SOCS proteins causing trouble in insulin action. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 192, n. 1, p. 29-36, Jan 2008. ISSN 1748-1708. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01782.x> >.

LEE, H. J. et al. Kalirin, a GEF for Rac1, plays an important role in FSTL-1-mediated glucose uptake in skeletal muscle cells. **Cell Signal**, v. 29, p. 150-157, Jan 2017. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.10.013> >.

LEGATE, K. R. et al. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 1, p. 20-31, Jan 2006. ISSN 1471-0072 (Print)1471-0072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1789> >.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 23, p. 2129-38, Dec 1 2009. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.009> >.

LIEBER, R. L.; WARD, S. R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 305, n. 3, p. C241-52, Aug 1 2013. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00173.2013> >.

LIJNEN, P. et al. Transforming growth factor-beta 1 promotes contraction of collagen gel by cardiac fibroblasts through their differentiation into myofibroblasts. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 25, n. 2, p. 79-86, Mar 2003. ISSN 0379-0355 (Print)0379-0355. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LILLIOJA, S. et al. In vivo insulin action is familial characteristic in nondiabetic Pima Indians. **Diabetes**, v. 36, n. 11, p. 1329-35, Nov 1987. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIMA, M. M. et al. Acute effect of roux-en-y gastric bypass on whole-body insulin sensitivity: a study with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 8, p. 3871-5, Aug 2010. ISSN 0021-972x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2010-0085> >.

LIND, L.; LARSSON, A.; TEERLINK, T. L-Arginine is related to endothelium-dependent vasodilation in resistance and conduit arteries in divergent ways-The Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. **Atherosclerosis**, v. 203, n. 2, p. 544-9, Apr 2009. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.07.016> >.

LONNROTH, P. et al. Insulin binding and responsiveness in fat cells from patients with reduced glucose tolerance and type II diabetes. **Diabetes**, v. 32, n. 8, p. 748-54, Aug 1983. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LUO, T. et al. AMPK Activation by Metformin Suppresses Abnormal Extracellular Matrix Remodeling in Adipose Tissue and Ameliorates Insulin Resistance in Obesity. **Diabetes**, v. 65, n. 8, p. 2295-310, Aug 2016. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/db15-1122> >.

LUPOLI, R. et al. Effects of bariatric surgery on markers of subclinical atherosclerosis and endothelial function: a meta-analysis of literature studies. **Int J Obes (Lond)**, v. 40, n. 3, p. 395-402, Mar 2016. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2015.187> >.

MAGKOS, F. et al. Improved insulin sensitivity after a single bout of exercise is curvilinearly related to exercise energy expenditure. **Clin Sci (Lond)**, v. 114, n. 1, p. 59-64, Jan 2008. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1042/cs20070134> >.

MAGLIO, C. et al. The IRS1 rs2943641 variant and risk of future cancer among morbidly obese individuals. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 4, p. E785-9, Apr 2013. ISSN 1945-7197 (Electronic) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23418314> >.

MAHDY, M. A. A. Skeletal muscle fibrosis: an overview. **Cell Tissue Res**, v. 375, n. 3, p. 575-588, Mar 2019. ISSN 0302-766x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-018-2955-2> >.

MAIORANA, A. et al. The effect of combined aerobic and resistance exercise training on vascular function in type 2 diabetes. **J Am Coll Cardiol**, v. 38, n. 3, p. 860-6, Sep 2001. ISSN 0735-1097 (Print)0735-1097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MALIN, S. K. et al. Fetuin-A is linked to improved glucose tolerance after short-term exercise training in nonalcoholic fatty liver disease. **J Appl Physiol (1985)**, v. 115, n. 7, p. 988-94, Oct 1 2013. ISSN 0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00237.2013> >.

MARCON, E. R. et al. What Is the Best Treatment before Bariatric Surgery? Exercise, Exercise and Group Therapy, or Conventional Waiting: a Randomized Controlled Trial. **Obes Surg**, v. 27, n. 3, p. 763-773, Mar 2017. ISSN 0960-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11695-016-2365-z> >.

MASTERS, S. L. Specific inflammasomes in complex diseases. **Clin Immunol**, v. 147, n. 3, p. 223-8, Jun 2013. ISSN 1521-6616. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2012.12.006> >.

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, n. 7, p. 412-9, Jul 1985. ISSN 0012-186X (Print) 0012-186X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3899825> >.

MEIJER, R. I. et al. Pathways for insulin access to the brain: the role of the microvascular endothelial cell. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 311, n. 5, p. H1132-h1138, Nov 1 2016. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00081.2016> >.

MERCADO, M. M. et al. Genetics of insulin resistance. **Curr Diab Rep**, v. 2, n. 1, p. 83-95, Feb 2002. ISSN 1534-4827 (Print)1534-4827. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MONTEIRO, C. A.; CONDE, W. L.; POPKIN, B. M. Is obesity replacing or adding to undernutrition? Evidence from different social classes in Brazil. **Public Health Nutr**, v. 5, n. 1A, p. 105-12, Feb 2002. ISSN 1368-9800. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12027272> >.

MORTENSEN, S. P. et al. The effect of two exercise modalities on skeletal muscle capillary ultrastructure in individuals with type 2 diabetes. **Scand J Med Sci Sports**, v. 29, n. 3, p. 360-368, Mar 2019. ISSN 0905-7188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/sms.13348> >.

MOTTA-MEJIA, C. et al. Placental Vesicles Carry Active Endothelial Nitric Oxide Synthase and Their Activity is Reduced in Preeclampsia. **Hypertension**, v. 70, n. 2, p. 372-381, Aug 2017. ISSN 0194-911x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.117.09321> >.

MOURIER, A. et al. Mobilization of visceral adipose tissue related to the improvement in insulin sensitivity in response to physical training in NIDDM. Effects of branched-chain amino acid supplements. **Diabetes Care**, v. 20, n. 3, p. 385-91, Mar 1997. ISSN 0149-5992 (Print)0149-5992. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MUSI, N.; GOODYEAR, L. J. Insulin resistance and improvements in signal transduction. **Endocrine**, v. 29, n. 1, p. 73-80, Feb 2006. ISSN 1355-008X (Print)1355-008x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1385/endo:29:1:73> >.

MUST, A. et al. Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. A follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935. **N Engl J Med**, v. 327, n. 19, p. 1350-5, Nov 5

1992. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1406836> >.

NETTO, B. D. et al. Roux-en-Y gastric bypass decreases pro-inflammatory and thrombotic biomarkers in individuals with extreme obesity. **Obes Surg**, v. 25, n. 6, p. 1010-8, Jun 2015. ISSN 0960-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11695-014-1484-7> >.

NEVES, M., JR. et al. Incidence of adverse events associated with percutaneous muscular biopsy among healthy and diseased subjects. **Scand J Med Sci Sports**, v. 22, n. 2, p. 175-8, Apr 2012. ISSN 0905-7188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0838.2010.01264.x> >.

NGUYEN, N. Q. et al. Accelerated intestinal glucose absorption in morbidly obese humans - relationship to glucose transporters, incretin hormones and glycaemia. **J Clin Endocrinol Metab**, p. jc20143144, Nov 25 2014. ISSN 1945-7197 (Electronic) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25423571> >.

NIEBAUER, J.; COOKE, J. P. Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. **J Am Coll Cardiol**, v. 28, n. 7, p. 1652-60, Dec 1996. ISSN 0735-1097 (Print) 0735-1097. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0735-1097\(96\)00393-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0735-1097(96)00393-2) >.

O'GORMAN, D. J. et al. Insulin and exercise differentially regulate PI3-kinase and glycogen synthase in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 89, n. 4, p. 1412-9, Oct 2000. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/jappl.2000.89.4.1412> >.

O'NEILL, H. M. AMPK and Exercise: Glucose Uptake and Insulin Sensitivity. **Diabetes Metab J**, v. 37, n. 1, p. 1-21, Feb 2013. ISSN 2233-6079 (Print) 2233-6079. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4093/dmj.2013.37.1.1> >.

OSTO, E. et al. Rapid and body weight-independent improvement of endothelial and high-density lipoprotein function after Roux-en-Y gastric bypass: role of glucagon-like peptide-1. **Circulation**, v. 131, n. 10, p. 871-81, Mar 10 2015. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.114.011791> >.

PARDO, A.; SELMAN, M. Matrix metalloproteinases and lung injury. **Braz J Med Biol Res**, v. 29, n. 9, p. 1109-15, Sep 1996. ISSN 0100-879X (Print)0100-879x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PAULI, J. R. et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **J Physiol**, v. 586, n. 2, p. 659-71, Jan 15 2008. ISSN 0022-3751 (Print)0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142414> >.

PAYNE, J. H.; DEWIND, L. T. Surgical treatment of obesity. **Am J Surg**, v. 118, n. 2, p. 141-7, Aug 1969. ISSN 0002-9610 (Print)0002-9610. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PAYNE, J. H.; DEWIND, L. T.; COMMONS, R. R. METABOLIC OBSERVATIONS IN PATIENTS WITH JEJUNOCOLIC SHUNTS. **Am J Surg**, v. 106, p. 273-89, Aug 1963. ISSN 0002-9610 (Print)0002-9610. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1379-406, Oct 2008. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.90100.2007> >.

PEETERS, A.; BACKHOLER, K. How to influence the obesity landscape using health policies. **Int J Obes (Lond)**, v. 41, n. 6, p. 835-839, Jun 2017. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2017.24> >.

PIPER, M. D.; BARTKE, A. Diet and aging. **Cell Metab**, v. 8, n. 2, p. 99-104, Aug 2008. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18680711> >.

PORTE, D., JR.; KAHN, S. E. beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. **Diabetes**, v. 50 Suppl 1, p. S160-3, Feb 2001. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

POU, K. M. et al. Patterns of abdominal fat distribution: the Framingham Heart Study. **Diabetes Care**, v. 32, n. 3, p. 481-5, Mar 2009. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/dc08-1359> >.

PUGH, C. J. et al. Exercise training reverses endothelial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 307, n. 9, p. H1298-306, Nov 1 2014. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00306.2014> >.

RAJASEKARAN, M. R. et al. Age-related external anal sphincter muscle dysfunction and fibrosis: possible role of Wnt/beta-catenin signaling pathways. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 313, n. 6, p. G581-g588, Dec 1 2017. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00209.2017> >.

REAVEN, G. Insulin resistance and coronary heart disease in nondiabetic individuals. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 8, p. 1754-9, Aug 2012. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22815340> >.

REYNA, S. M. et al. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. **Diabetes**, v. 57, n. 10, p. 2595-602, Oct 2008. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/db08-0038> >.

RICHARDSON, D. K. et al. Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 280, n. 11, p. 10290-7, Mar 18 2005. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M408985200> >.

RICHTER, E. A. et al. Muscle glucose metabolism following exercise in the rat: increased sensitivity to insulin. **J Clin Invest**, v. 69, n. 4, p. 785-93, Apr 1982. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RIDKER, P. M. et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **N Engl J Med**, v. 342, n. 12, p. 836-43, Mar 23 2000. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm200003233421202> >.

RODRIGUEZ-GALLEGO, E. et al. Mapping of the circulating metabolome reveals alpha-ketoglutarate as a predictor of morbid obesity-associated non-alcoholic fatty liver disease. **Int J Obes (Lond)**, Mar 28 2014. ISSN 1476-5497 (Electronic) 0307-0565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24675715> >.

ROPELLE, E. R. et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. **PLoS Biol**, v. 8, n. 8, Aug 24 2010. ISSN 1544-9173. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000465> >.

SAAD, M. J. et al. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 90, n. 5, p. 1839-49, Nov 1992. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci116060> >.

SACHDEV, P. et al. Intra-gastric balloon as an adjunct to lifestyle programme in severely obese adolescents: impact on biomedical outcomes and skeletal health. **Int J Obes (Lond)**, v.

42, n. 1, p. 115-118, Jan 2018. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2017.215> >.

SAKAGAMI, H. et al. Loss of HIF-1alpha impairs GLUT4 translocation and glucose uptake by the skeletal muscle cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 306, n. 9, p. E1065-76, May 1 2014. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00597.2012> >.

SALEH, M. H. et al. Improvement of atherosclerotic markers in non-diabetic patients after bariatric surgery. **Obes Surg**, v. 22, n. 11, p. 1701-7, Nov 2012. ISSN 0960-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11695-012-0706-0> >.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec 13 2001. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/414799a> >.

SCHATTENBERG, J. M. et al. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. **Hepatology**, v. 43, n. 1, p. 163-72, Jan 2006. ISSN 0270-9139 (Print)0270-9139. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20999> >.

SCHAUER, P. R. et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. **N Engl J Med**, v. 366, n. 17, p. 1567-76, Apr 26 2012. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449319> >.

SCHINZARI, F. et al. Beneficial Effects of Apelin on Vascular Function in Patients With Central Obesity. **Hypertension**, v. 69, n. 5, p. 942-949, May 2017. ISSN 0194-911x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.116.08916> >.

SEPULVEDA, P. V. et al. Evaluation of follistatin as a therapeutic in models of skeletal muscle atrophy associated with denervation and tenotomy. **Sci Rep**, v. 5, p. 17535, Dec 11 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/srep17535> >.

SEVERINO, A. et al. Early effect of Roux-en-Y gastric bypass on insulin sensitivity and signaling. **Surg Obes Relat Dis**, v. 12, n. 1, p. 42-7, Jan 2016. ISSN 1550-7289. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.soard.2015.06.005> >.

SHEPHERD, P. R.; WITHERS, D. J.; SIDDLE, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. **Biochem J**, v. 333 (Pt 3), p. 471-90, Aug 1 1998. ISSN 0264-6021 (Print)0264-6021. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SJOSTRAND, M. et al. Delayed transcapillary delivery of insulin to muscle interstitial fluid after oral glucose load in obese subjects. In: (Ed.). **Diabetes**. United States, v.54, 2005. p.2266. ISBN 0012-1797 (Print)0012-1797 (Linking).

SMITH, S. R.; ZACHWIEJA, J. J. Visceral adipose tissue: a critical review of intervention strategies. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 23, n. 4, p. 329-35, Apr 1999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SOLOMON, T. P. et al. A low-glycemic index diet combined with exercise reduces insulin resistance, postprandial hyperinsulinemia, and glucose-dependent insulintropic polypeptide responses in obese, prediabetic humans. **Am J Clin Nutr**, v. 92, n. 6, p. 1359-68, Dec 2010. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2010.29771> >.

SPULBER, S.; SCHULTZBERG, M. Connection between inflammatory processes and transmitter function-Modulatory effects of interleukin-1. **Prog Neurobiol**, v. 90, n. 2, p. 256-62, Feb 9 2010. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.10.015> >.

STEIG, A. J. et al. Exercise reduces appetite and traffics excess nutrients away from energetically efficient pathways of lipid deposition during the early stages of weight regain. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 301, n. 3, p. R656-67, Sep 2011. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21715696> >.

STOLBERG, C. R. et al. Effects of gastric bypass surgery followed by supervised physical training on inflammation and endothelial function: A randomized controlled trial. **Atherosclerosis**, v. 273, p. 37-44, Jun 2018. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.002> >.

STURM, R. Increases in clinically severe obesity in the United States, 1986-2000. **Arch Intern Med**, v. 163, n. 18, p. 2146-8, Oct 2003. ISSN 0003-9926. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557211> >.

STURM, R.; HATTORI, A. Morbid obesity rates continue to rise rapidly in the United States. **Int J Obes (Lond)**, v. 37, n. 6, p. 889-91, Jun 2013. ISSN 1476-5497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986681> >.

STURM, W. et al. Effect of bariatric surgery on both functional and structural measures of premature atherosclerosis. **Eur Heart J**, v. 30, n. 16, p. 2038-43, Aug 2009. ISSN 0195-668x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehp211> >.

SYLOW, L. et al. Exercise-stimulated glucose uptake - regulation and implications for glycaemic control. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 3, p. 133-148, Mar 2017. ISSN 1759-5029. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2016.162> >.

SZENDROEDI, J. et al. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 26, p. 9597-602,

Jul 1 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24979806> >.

TAKASE, B. et al. Beneficial effects of nifedipine on vasodilator response to acetylcholine in coronary and brachial arteries in the patients with coronary artery disease. **Int J Cardiol**, v. 113, n. 3, p. 305-10, Nov 18 2006. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.10.031> >.

TAM, C. S. et al. Weight gain reveals dramatic increases in skeletal muscle extracellular matrix remodeling. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 5, p. 1749-57, May 2014. ISSN 0021-972x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2013-4381> >.

TARNOPOLSKY, M. A. et al. Suction-modified Bergstrom muscle biopsy technique: experience with 13,500 procedures. **Muscle Nerve**, v. 43, n. 5, p. 717-25, May 2011. ISSN 0148-639x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/mus.21945> >.

TCHERNOF, A.; DESPRES, J. P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 359-404, Jan 2013. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00033.2011> >.

TOLEDO, F. G. et al. Mitochondrial capacity in skeletal muscle is not stimulated by weight loss despite increases in insulin action and decreases in intramyocellular lipid content. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 987-94, Apr 2008. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18252894> >.

TREEBAK, J. T. et al. AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. **Diabetes**, v. 55, n. 7, p. 2051-8, Jul 2006. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/db06-0175> >.

TSCHONER, A. et al. Long-term effects of weight loss after bariatric surgery on functional and structural markers of atherosclerosis. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 10, p. 1960-5, Oct 2013. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/oby.20357> >.

VAGUE, J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. **Am J Clin Nutr**, v. 4, n. 1, p. 20-34, Jan-Feb 1956. ISSN 0002-9165 (Print)0002-9165. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/4.1.20> >.

VAN DER HEIJDEN, D. J. et al. Body Mass Index Is Associated With Microvascular Endothelial Dysfunction in Patients With Treated Metabolic Risk Factors and Suspected Coronary Artery Disease. **J Am Heart Assoc**, v. 6, n. 9, Sep 14 2017. ISSN 2047-9980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/jaha.117.006082> >.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 196, n. 2, p. 193-222, Jun 2009. ISSN 1748-1708. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x> >.

VELASQUEZ-RODRIGUEZ, C. M. et al. Abdominal obesity and low physical activity are associated with insulin resistance in overweight adolescents: a cross-sectional study. **BMC Pediatr**, v. 14, p. 258, 2014. ISSN 1471-2431 (Electronic) 1471-2431 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25301371> >.

VINET, A. et al. Vascular reactivity at rest and during exercise in middle-aged obese men: effects of short-term, low-intensity, exercise training. **Int J Obes (Lond)**, v. 35, n. 6, p. 820-8, Jun 2011. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2010.206> >.

VIOLLET, B. et al. The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. **J Clin Invest**, v. 111, n. 1, p. 91-8, Jan 2003. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci16567> >.

VISWAMBHARAN, H. et al. Selective Enhancement of Insulin Sensitivity in the Endothelium In Vivo Reveals a Novel Proatherosclerotic Signaling Loop. **Circ Res**, v. 120, n. 5, p. 784-798, Mar 3 2017. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.116.309678> >.

VOLLENWEIDER, P.; MENARD, B.; NICOD, P. Insulin resistance, defective insulin receptor substrate 2-associated phosphatidylinositol-3' kinase activation, and impaired atypical protein kinase C (zeta/lambda) activation in myotubes from obese patients with impaired glucose tolerance. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1052-9, Apr 2002. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WAGENMAKERS, A. J. et al. Increased muscle blood supply and transendothelial nutrient and insulin transport induced by food intake and exercise: effect of obesity and ageing. **J Physiol**, v. 594, n. 8, p. 2207-22, Apr 15 2016. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284513> >.

WALTON, K. L.; JOHNSON, K. E.; HARRISON, C. A. Targeting TGF-beta Mediated SMAD Signaling for the Prevention of Fibrosis. **Front Pharmacol**, v. 8, p. 461, 2017. ISSN 1663-9812 (Print)1663-9812. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2017.00461> >.

WANG, H. et al. The vascular endothelial cell mediates insulin transport into skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 2, p. E323-32, Aug 2006. ISSN 0193-1849 (Print)0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00047.2006> >.

WANSINK, B.; WANSINK, C. S. The largest Last Supper: depictions of food portions and plate size increased over the millennium. **Int J Obes (Lond)**, v. 34, n. 5, p. 943-4, May 2010. ISSN 1476-5497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20308996> >.

WASSERMAN, D. H.; AYALA, J. E. Interaction of physiological mechanisms in control of muscle glucose uptake. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 32, n. 4, p. 319-23, Apr 2005. ISSN

0305-1870 (Print)0305-1870. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04191.x> >.

WASSERMAN, D. H.; WANG, T. J.; BROWN, N. J. The Vasculature in Prediabetes. **Circ Res**, v. 122, n. 8, p. 1135-1150, Apr 13 2018. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.118.311912> >.

WATTS, K. et al. Exercise training normalizes vascular dysfunction and improves central adiposity in obese adolescents. **J Am Coll Cardiol**, v. 43, n. 10, p. 1823-7, May 19 2004. ISSN 0735-1097 (Print)0735-1097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2004.01.032> >.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest**, v. 115, n. 5, p. 1111-9, May 2005. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci25102> >.

WEYER, C. et al. Energy expenditure, fat oxidation, and body weight regulation: a study of metabolic adaptation to long-term weight change. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 3, p. 1087-94, Mar 2000. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720044> >.

WILLIAMS, A. S.; KANG, L.; WASSERMAN, D. H. The extracellular matrix and insulin resistance. **Trends Endocrinol Metab**, v. 26, n. 7, p. 357-66, Jul 2015. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2015.05.006> >.

WILLIAMS, I. M. et al. Insulin exits skeletal muscle capillaries by fluid-phase transport. **J Clin Invest**, v. 128, n. 2, p. 699-714, Feb 1 2018. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci94053> >.

WITCZAK, C. A.; SHAROFF, C. G.; GOODYEAR, L. J. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 23, p. 3737-55, Nov 2008. ISSN 1420-682x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8244-6> >.

WOODS, A. et al. Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro. **J Biol Chem**, v. 271, n. 17, p. 10282-90, Apr 26 1996. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WU, X. et al. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. **Cell**, v. 133, n. 2, p. 340-53, Apr 18 2008. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.052> >.

YADAV, H. et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF-beta/Smad3 signaling. **Cell Metab**, v. 14, n. 1, p. 67-79, Jul 6 2011. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.013> >.

YALE, C. E.; WEILER, S. J. Weight control after vertical banded gastroplasty for morbid obesity. **Am J Surg**, v. 162, n. 1, p. 13-8, Jul 1991. ISSN 0002-9610 (Print)0002-9610. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YANG, Y. J. et al. Insulin transport across capillaries is rate limiting for insulin action in dogs. **J Clin Invest**, v. 84, n. 5, p. 1620-8, Nov 1989. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci114339> >.

YIP, S.; PLANK, L. D.; MURPHY, R. Gastric bypass and sleeve gastrectomy for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of outcomes. **Obes Surg**, v. 23, n. 12, p. 1994-2003, Dec 2013. ISSN 1708-0428 (Electronic) 0960-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23955521> >.

YOUNG, M. T. et al. One-year outcomes of laparoscopic sleeve gastrectomy versus laparoscopic adjustable gastric banding for the treatment of morbid obesity. **Am Surg**, v. 80, n. 10, p. 1049-53, Oct 2014. ISSN 1555-9823 (Electronic) 0003-1348 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25264658> >.

YUSUF, S.; VAZ, M.; PAIS, P. Tackling the challenge of cardiovascular disease burden in developing countries. **Am Heart J**, v. 148, n. 1, p. 1-4, Jul 2004. ISSN 1097-6744 (Electronic) 0002-8703 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215784> >.

ZAMURS, L. K. et al. Aberrant mitochondria in a Bethlem myopathy patient with a homozygous amino acid substitution that destabilizes the collagen VI alpha2(VI) chain. **J Biol Chem**, v. 290, n. 7, p. 4272-81, Feb 13 2015. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.632208> >.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-7, Dec 13 2001. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/414782a> >.

ZURLO, F. et al. Low ratio of fat to carbohydrate oxidation as predictor of weight gain: study of 24-h RQ. **Am J Physiol**, v. 259, n. 5 Pt 1, p. E650-7, Nov 1990. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2240203> >.

ANEXO 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: EFEITOS DE UM PROGRAMA DE EXERCÍCIOS FÍSICOS EM INDIVÍDUOS OBESOS SUBMETIDOS À CIRURGIA BARIÁTRICA.
Pesquisador Responsável: Bruno Gualano **Versão:** 03
Pesquisador Executante: Fabiana Braga Benatti **CAAE:** 21056813.3.0000.0068
Co-autores: Hamilton Roschel, Rosa Maria Pereira, Roberto de Cleva, Marco Aurélio Santo
Instituição: HCFMUSP
Departamento: CLÍNICA MÉDICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP - EMENDA

Registro on-line: 11272

Número do Parecer: 1.333.336

Data da Relatoria: 01/07/2015

Apresentação do Projeto: O projeto de pesquisa intitulado "Efeitos de um programa de exercícios físicos em indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica", propõe-se a avaliar e discutir as seguintes questões sobre os efeitos de um programa de se um programa de exercícios físicos em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica: 1. Realizar um estudo clínico controlado e randomizado, de caráter longitudinal, avaliando os efeitos do treinamento físico sobre o tecido ósseo em indivíduos submetidos a cirurgia bariátrica e seu possível papel preventivo na deterioração desse tecido queda da taxa metabólica de repouso, além de melhorar a capacidade física, a função autonômica e a qualidade de vida em sujeitos submetidos à cirurgia bariátrica. 2. Avaliar a modulação do perfil inflamatório em indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica e o possível papel anti-inflamatório do exercício físico. 3. Avaliar o papel do treinamento físico na melhora da resistência a ação da insulina em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, bem como a relação com a oxidação completa de lipídios no músculo esquelético nestes pacientes. Do ponto de vista metodológico, o desenho da pesquisa está alinhado aos objetivos propostos e parecem adequados.

Objetivo da Pesquisa: Este projeto de pesquisa propõe-se a avaliar os efeitos de um programa de treinamento físico sobre a composição corporal, capacidade física, massa óssea, gasto energético, fatores de risco cardiometabólicos e qualidade de vida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Dentre as avaliações realizadas pelos pacientes neste projeto, a que apresenta algum risco para os pacientes é a Biópsia Muscular. No entanto ela está cercada de procedimentos que visam diminuir o desconforto da sua realização, como a realização de anestesia local. Os benefícios para a ciência relacionam-se à avaliação dos efeitos do programa de exercícios físicos na massa magra da taxa metabólica de repouso, capacidade física, função autonômica e a qualidade de vida destes pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O presente projeto apresenta metodologia adequada aos objetivos propostos e responde questões relevantes para a avaliação dos efeitos de programas de treinamento pós cirurgia bariátrica em pacientes obesos. Seu delineamento experimental também propõe-se a aplicar metodologia de acordo com o protocolo de CONSORT, visando minimizar vieses experimentais, observados em estudos anteriores de outros autores. Na análise da Emenda ao Projeto, foram solicitadas as seguintes alterações: inclusão de novos pesquisadores, de um novo co-responsável, de novos questionários (Bariatric Analysis and Reporting Outcome (BAROS); Inventário de Depressão e Ansiedade de Beck; Impact of Weight on Quality of Life – lite (IWQOL-LITE)), de novos procedimentos (análise da microarquitetura óssea e análise de elemento finito da região da tíbia e rádio distal do

---

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

membro não-dominante, utilizando o aparelho HR-pQCT (XtremeCT, Sanco Mecial, Suíça), análise dos seguintes marcadores ósseos de remodelação óssea no plasma/soro: telopeptídeo carboxi-terminal do colágeno tipo I (CTX), propeptídeo N-terminal do pro-colágeno tipo 1 (P1NP) e osteocalcina, análise dos seguintes marcadores pró e anti-inflamatórios: proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), antagonista do receptor da interleucina – 1 (IL-1Ra), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), proteína-C reativa (PCR), leptina e adiponectina, análise da resistência à insulina, utilizando o teste oral de tolerância à glicose (TOTG), análise de ácido graxo livre (AGL), análise do tecido muscular esquelético, utilizando a técnica de biópsia muscular por agulha de sucção. Todas estas alterações são pertinentes ao tema estudado e os dados obtidos permitirão novas análises e inferências sobre o tema estudado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aborda de forma correta todo o roteiro sugerido pela CAPPESQ, com linguagem clara e acessível aos sujeitos da pesquisa.

Recomendações: Não há recomendações sugeridas para o PROJETO e TCLE

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: As alterações propostas no projeto de pesquisa são pertinentes e os dados obtidos permitirão novas análises e inferências sobre o tema estudado.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 03 de julho de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO 2. Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO:
.....

BAIRRO: ..... CIDADE
.....

CEP:..... TELEFONE: ..... DDD ..... (.....)
.....

2.RESPONSÁVEL ..... LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Efeitos de um programa de exercícios físicos em indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica.

PESQUISADOR: Prof. Dr. Bruno Gualano

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Reumatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO **X**

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 9 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

A cirurgia bariátrica, a qual você irá fazer, pode levar à perda muito rápida e importante de músculo e osso do seu corpo. A prática de exercícios físicos pode atenuar essa perda, sendo importante para a manutenção da sua saúde. Dessa forma, o objetivo desse estudo é verificar os efeitos de um programa de exercícios físicos em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros.

Primeiramente, gostaríamos de convidá-la a participar deste estudo.

Caso você aceite o convite, você realizará alguns exames que estão descritos abaixo, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Após estes exames, você poderá ser sorteada em um destes dois grupos: 1) grupo treinado (treinamento físico será realizado 3 vezes por semana, com duração de aproximadamente 1 hora por sessão, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) ou 2) Placebo (sem treinamento físico).

Três (3) meses e nove (9) meses após a cirurgia (i.e., 6 meses após o início do programa de exercícios físicos pelo grupo TR – treinado), os exames realizados antes da cirurgia serão repetidos em ambos os grupos.

Abaixo estão descritos os exames que serão feitos por você.

- Teste na esteira – você terá que correr na esteira até o seu esforço máximo para sabermos o quanto você consegue correr. Durante as 16 semanas do estudo o seu exercício será bem menos intenso. Esse teste é utilizado de forma rotineira no hospital. Neste mesmo exame, antes de iniciá-lo, você deverá ficar deitada na maca por 30 minutos, para avaliarmos sua taxa metabólica de repouso, ou seja, o quanto você gasta de energia para manter seu organismo funcionando em repouso.

- Testes de função muscular: você terá que fazer 2 testes de função muscular. O primeiro envolverá movimentos de sentar e levantar por 30 s. No segundo, você partirá da posição sentada e terá que percorrer uma ida e volta num percurso de 3 m.

- “Teste do açúcar”, conhecido como curva glicêmica. Esse procedimento pode causar desconforto por conta do líquido que é muito doce. Esse exame é realizado para sabermos se você tem uma utilização ruim do açúcar. O “teste do açúcar” terá duração aproximada de 4 horas, será realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e será supervisionado por médicos. Nesse teste, você tomará, pela boca, 75 gramas de açúcar com 300 ml de água.

- Realização de uma punção no músculo da coxa (biópsia muscular por agulha de sucção) que será feita na enfermaria da Disciplina de Reumatologia. Nessa etapa, avaliaremos como é utilizado o açúcar no seu músculo

com o intuito de descobrir possíveis falhas no funcionamento. Você será orientada a deitar-se em uma maca, com os joelhos dobrados e a músculo da coxa relaxado. O médico fará uma “limpeza” do local e, em seguida, te dará um remédio para prevenir dor no local da punção do músculo. Vale à pena lembrar que essa técnica tem sido muito utilizada pelo nosso grupo e outros grupos de todo o mundo, com uma baixíssima taxa de problemas após o procedimento. Você poderá sentir um desconforto leve como dor ou inchaço.

- Avaliação da composição corporal, ou seja, do quanto você tem de gordura, músculo e de osso. Este exame será realizada em um equipamento chamado DXA, o qual consiste em uma máquina que “escaneia” seu corpo, sem nenhum risco.

- Avaliação da estrutura óssea (microarquitetura óssea): neste exame será feito algumas “fotos” do seu osso da perna que mostrará a chance que você tem quebrar os seus ossos. Esse exame não oferece nenhum risco à sua saúde.

- Aplicação de questionários: você precisará responder algumas perguntas específicas que ajudarão a determinar se os exercícios ajudaram a melhorar a sua qualidade de vida e o seu cansaço.

- Todos os procedimentos descritos acima não fazem parte de sua rotina de acompanhamento no hospital e, portanto, são considerados experimentais.

- Os pacientes que forem sorteados no grupo que fará exercícios físicos, participarão por 24 semanas, três vezes por semana, de um programa de exercícios físicos cuidadosamente planejados, com supervisão do professor de Educação Física do Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia (LACRE) e acompanhamento do médico assistente da Disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados.

Os seguintes exames já fazem parte da sua rotina:

- Coleta de sangue, que será feita em jejum de 12 horas para determinar as concentrações de fatores inflamatórios, sensibilidade à insulina (que reflete o metabolismo do açúcar no seu sangue), e perfil lipídico (reflete como está o metabolismo de gorduras no seu sangue).

- Biópsia muscular por agulha de sucção: O médico fará uma “limpeza” do local e, em seguida, te dará um remédio (anestesia local) para prevenir dor no local da punção do músculo.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

Se você tiver medo de agulhas, você poderá sentir certo desconforto durante a coleta de sangue, que poderá causar um leve desconforto no local da picada, mas deve desaparecer em um dia. Na biópsia muscular, você poderá sentir um desconforto leve como dor ou inchaço.

5 – Benefícios para o participante

Programas de exercícios físicos supervisionados por profissionais experientes.

6 – Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Bruno Gualano, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – 4º andar – LACRE – Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Telefone: 2661-8022.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

7 – Você tem a liberdade de desistir ou interromper sua colaboração e deixar de participar deste estudo no momento em que desejar sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

8 – Os resultados obtidos serão analisados em conjunto com outros pacientes e mantidos em sigilo. Serão divulgados apenas em publicações científicas, sem a menção dos seus dados pessoais. Caso deseje, poderá pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final da pesquisa.

9 – Você não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10 – Se os procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo lhe causarem algum mal-estar ou desconforto, você terá direito a tratamento médico no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

11 – Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Efeitos de um programa de exercícios físicos em indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica.”

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal   Data ____/____/____

Assinatura da testemunha   Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo   Data ____/____/____