

**JEFFERSON COMIN JONCO AQUINO JÚNIOR**

**Efeitos do treinamento físico aeróbio concomitante a  
restrição calórica no perfil de miocinas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas  
da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título  
de Doutor em Ciências.

São Paulo

2021

**JEFFERSON COMIN JONCO AQUINO JÚNIOR**

**Efeitos do treinamento físico aeróbio concomitante a  
restrição calórica no perfil de miocinas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas  
da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título  
de Doutor em Ciências

Área de Concentração:  
Biologia de Sistemas

Orientador:  
Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto

Versão original.

São Paulo  
2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Aquino Júnior, Jefferson Comin Jonco  
Efeitos do treinamento físico aeróbio concomitante  
a restrição calórica no perfil de miocinas /  
Jefferson Comin Jonco Aquino Júnior; orientador  
José Cesar Rosa Neto. -- São Paulo, 2021.  
89 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Exercício Físico. 2. Restrição Calórica. 3.  
Citocinas. 4. Exercinas. 5. Exercício aeróbico. I.  
Rosa Neto, José Cesar , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**                      (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do treinamento físico aeróbio concomitante a restrição calórica no perfil de miocinas", protocolada sob o CEUA nº 7011080218, sob a responsabilidade de **José Cesar Rosa Neto** e equipe; Jefferson Comin Jonco Aquino Júnior - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 19/03/2018.

We certify that the proposal "Effects of aerobic physical training concomitant with caloric restriction on myocin profile", utilizing 48 isogenic mice (48 males), protocol number CEUA 7011080218, under the responsibility of **José Cesar Rosa Neto** and team; Jefferson Comin Jonco Aquino Júnior - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 03/19/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **36 meses**

Depto/Setor: **Biologia Celular E do Desenvolvimento**

Origem: **Biotério Central FMUSP**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **7 a 8 semanas**

Linhagem: **CS7**

**N amostral:** **48**

São Paulo, 14 de maio de 2019



Prof. Dra. Luciane Valéria Sita  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Coroni  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

**Dedico este trabalho a minha família que me apoiou de maneira incondicional, em especial a minha esposa e melhor amiga Ana Roberta Almeida Comin que sempre esteve ao meu lado e que faz parte de todos os meus planos.**

# Agradecimentos

Agradeço aos animais utilizados ao longo do projeto que de maneira involuntária cederam a vida em prol do conhecimento científico e para a consolidação do trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto, o Zeca, por me conceder a oportunidade da realização de um sonho e pela prontidão em me ajudar a compreender e interpretar o mundo científico com um olhar mais refinado e conciso.

Aos meus amigos de laboratório, pelo apoio e pela ajuda ao longo da caminhada. Muito obrigado Edson Boquinha, Tiego, Xande, Loreana, Helena, Lu e Carol.

A minha esposa, Ana Roberta Almeida Comin, que sempre esteve ao meu lado fomentando os meus sonhos e planos, além de me servir de alicerce durante os períodos de aflição, e que em todos os momentos me impulsionou para que eu tivesse força e motivação para seguir em frente.

A minha mãe, Maristela Comin, que transpôs inúmeras barreiras para que eu pudesse me tornar a pessoa que sou hoje. Aos meus irmãos Rodrigo e Alessandra.

Aos meus sogros, Roberta, Chicão e avó Didita, obrigado por todo o apoio.

As pessoas que conheci ao longo da vida acadêmica, na condição de professor ou de colega de trabalho, mas que com o transcorrer do tempo se tornaram verdadeiros amigos e amigas, e que por muitas vezes me despertaram a vontade de querer saber sempre mais.

Ao esporte que me serve como filosofia de vida.

# Resumo

AQUINO-JÚNIOR, J.C.J **Efeitos do treinamento físico aeróbico concomitante a restrição calórica no perfil de miocinas**. 2021 [Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2021.

Atualmente, as pessoas buscam a prática regular de exercícios e hábitos alimentares saudáveis. Contudo, a motivação para a adoção desse estilo de vida costuma ocorrer por fatores estéticos, o que colabora para o desenvolvimento de distúrbios alimentares. O exercício físico é capaz de fazer com que os diferentes tecidos do corpo secretem uma gama de moléculas, chamadas coletivamente de exercinas. Em contrapartida, grande parte dessas pessoas adota a restrição calórica de 20 até 40% do consumo energético habitual. O presente estudo investigou a possível influência desta conduta nutricional sob as exercinas em um modelo experimental eutrófico submetido ao exercício. Foram utilizados 48 Camundongos C57Bl/6, machos, com 7 semanas, 18-22 gramas, e divididos em 4 grupos (n=12): Controle (C), sem restrição calórica e sedentário; Grupo Exercício (EX), submetido ao treinamento físico, e sem restrição calórica; Grupo Restrição Calórica (CR), submetido ao protocolo de restrição calórica e sedentário; Grupo Exercício e Restrição Calórica (EX + CR), submetido a ambos os protocolos. Através dos dados obtidos, pode-se constatar que o exercício físico e a restrição calórica somados ou não, são capazes de proporcionar alterações nas exercinas. A utilização dos dois protocolos somados não foi capaz de proporcionar benefícios relativos ao metabolismo da glicose, ao passo que o treinamento físico feito de maneira isolada conseguiu proporcionar modificações na utilização desse substrato energético durante o repouso. Através dos achados, pudemos concluir que o exercício físico aumentou IL-10 no tecido adiposo subcutâneo, MCP 1 e IL 6 no músculo estriado esquelético. A restrição calórica aumentou IL  $\omega$ -1 $\beta$ , IL 1ra e MCP 1 no tecido adiposo. Quando ambas estratégias são adotadas em conjunto há um aumento MCP-1 no tecido adiposo e hepático, IL-6 no tecido adiposo, além de TNF $\alpha$  no tecido adiposo e no músculo.

**Palavras-chave:** Treinamento físico, Citocinas, Restrição calórica, Exercina.

## Abstract

AQUINO-JÚNIOR, J.C.J Effects of aerobic exercise training concomitant with caloric restriction on the myokine profile. 2021 [Phd Tesis (System Biology Program)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2021.

Currently, people seek regular exercise and healthy eating habits. However, the motivation for adopting this lifestyle is usually due to aesthetic factors, which contributes to the development of eating disorders. Physical exercise can promote causing different tissues in the body to secrete a range of molecules, collectively called exercins. On the other hand, most of these people adopt caloric restriction of 20 to 40% of their usual energy consumption. The present study investigated the possible influence of this nutritional behavior on exercise in a eutrophic experimental model submitted to exercise. Forty-eight male C57Bl/6 mice, aged 7 weeks, 18-22 grams, were used and divided into 4 groups (n=12): Control (C), without caloric restriction and sedentary; Exercise Group (EX), submitted to physical training, and without caloric restriction; Calorie Restriction Group (CR), submitted to the caloric restriction and sedentary protocol; Exercise and Caloric Restriction Group (EX + CR), submitted to both protocols. Through the data obtained, it can be seen that physical exercise and caloric restriction, added or not, are able of providing changes in exercise. The use of the two protocols together was not able to provide benefits related to glucose metabolism, while physical training alone was able to provide modifications in the use of the energetic substrate during rest. Through the findings, we could conclude that physical exercise increased IL-10 in subcutaneous adipose tissue, MCP-1 and IL-6 in muscle. Calorie restriction increased IL-1 $\beta$ , IL-1ra and MCP-1 in adipose tissue. When both strategies are adopted together, there is an increase in MCP-1 in adipose tissue and liver, IL-6 in adipose tissue, and TNF $\alpha$  in adipose tissue and muscle.

**Keywords:** Physical training, Cytokines, Calorie restriction, Exercine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O mal da inatividade física .....	19
Figura 2 - Distribuição de tecido adiposo branco. ....	21
Figura 3 - Hipótese da inatividade física como desencadeador de Doenças Crônicas Não Transmissíveis.....	22
Figura 4 - Componentes do gasto energético diário.....	32
Figura 5 - Esquematização da restrição calórica influenciando a qualidade de vida e longevidade.....	36
Figura 6 - Diferentes vias de ativação da IL-6.....	40
Figura 7 - Vias de sinalização da IL-6. ....	40
Figura 8 - Sinalização do TNF $\alpha$ via TNFR1 e TNFR2. ....	43
Figura 9 - Efeitos intracelulares da IL-10.....	46
Figura 10 - Produção de miocinas pelo músculo estriado esquelético.....	48
Figura 11 - Distribuição dos grupos experimentais .....	52
Figura 12 - Linha do tempo do projeto .....	53
Figura 13 - Variação de massa corporal dos camundongos.....	58
Figura 14 - Índice de adiposidade e musculatura.....	59
Figura 15 - Massa hepática total e relativa.....	60
Figura 16 - Glicose, ácidos graxos não esterificados e colesterol sérico.....	60
Figura 17 - Teste de sensibilidade à insulina e taxa de decaimento da glicemia. ....	61
Figura 18 - Citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo subcutâneo.....	62
Figura 19 - Citocinas anti-inflamatórias no tecido adiposo branco.....	63
Figura 20 - Expressão gênica no tecido adiposo subcutâneo. ....	64
Figura 21 - Citocinas pró-inflamatórias no músculo estriado esquelético.....	66
Figura 22 - Citocinas anti-inflamatórias no músculo estriado esquelético .....	66
Figura 23 - Citocinas pró-inflamatórias no fígado.....	67
Figura 24 - Citocina anti-inflamatória no fígado.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
AKT	Proteína Quinase B
AMPC	Monofosfato cíclica de Adenosina
AMPK	Adenosine Monophosphate Kinase
AP1	A protein 1
ATGL	Lipase de Triacilglicerol do Adipócito
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Grupo controle
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
cFLIP	Cellular FLICE-like inhibitory protein
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CP	Creatina fosfato
CPT1	Cartinitina Palmitoiltransferase
CR	Caloric Restriction (Restrição calórica)
CR	Grupo restrição calórica
DAMP	Danos associados a padrões moleculares
DNCT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
EDL	Extensor longo dos dedos
EDL	Músculo extensor longo dos dedos
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EX	Grupo exercício
EX+CR	Grupo exercício e restrição calórica
FABP	Proteína de Ligação de Ácido Graxo
FADD	FAS Associated Via Death Domain
FADH <sub>2</sub>	Dinucleótido de Flavina e Adenina
FAS	Fatty Acid Synthase
FAT/CD36	Translocase de Ácido Graxo
FoxO	Transcriptional Activity of the Forkhead
GLUT	Transportador de glicose
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GMPc	Monofosfato cíclico de Guanosina
Gp130	Glicoproteína 130

GSH	Glutathiona
HbA1c	Hemoglobina glicada
HFD	High Fat Diet
IF	Jejum intermitente
IFN $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulinas
IGF-1	Insulin like Growth Factor-1
IGF-1R	Receptor de Insulin like Growth Factor-1
IKK	Quinase IKB
IL	Interleucina
IRS	Receptor do Substrato de Insulina
JAK	Janus Kinase
JNK	Jun N-terminal Kinase
KITT	Taxa de decaimento da glicemia
LHS	Lipase Hormônio Sensível
LPL	Lipase Lipoproteica
MAPK	Proteino Quinase ativada por mitógeno
MAPL	Mitochondrial-anchored protein ligase
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MEKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
mTOR	Mammalian Target of
MyD88	Myeloid Differentiation Protein
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina
NEMO	NF-kappa-B essential modulator
NF-Kb	Nuclear factor kappa B
NRF2	Fator nuclear eritroide 2
oxLDL	Oxidated Low Density Lipoprotein
PAMP	Patógenos associados a padrões moleculares
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE3B	Fosfodiesterase 3B
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PKA	Proteína Quinase A

PKB	Proteína Quinase B
PKG	Proteína Quinase G
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
RIP	Receptor-interacting protein
ROS	Reactive Oxygen Species
S6K	Ribossomal Protein S6 Kinase
SIGIRR	Single IG and TIR Domain Containing
sIL-6R	Receptor solúvel de Interleucina 6
SIRT	Sirtuína
SOCS3	Suppressor of cytokine signanlling 3
STAT3	Signal Transducers and activator of transcription
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TNFR	Receptor Do Fator de Necrose Tumoral
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TOR	Target of Rapamycin
TRADD	Tumor necrosis fator receptor associated death domain
TRAF	Tumor necrosis fator receptor associated Family
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VO <sub>2</sub> máx	Volume de oxigênio máximo

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 Estilo de vida sedentário <i>versus</i> fisicamente ativo .....	17
1.2 Padrões alimentares .....	26
1.3 Estratégias nutricionais e influência biológica .....	31
1.4 Citocinas .....	37
1.4.1 Interleucina 1 .....	37
1.4.2 Interleucina 6 .....	39
1.4.3 Proteína 1 Quimioatraente de Monocitos (MCP-1) .....	41
1.4.4 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ ) .....	42
1.4.5 Interleucina 10 .....	44
1.4.6 Antagonista do Receptor de Interleucina 1 (IL-1ra) .....	46
1.5 O exercício físico como fator estimulante para a secreção de moléculas ....	47
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
2.1 Objetivo geral .....	51
2.2 Objetivos específicos .....	51
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
3.1 Animais e grupos experimentais .....	52
3.2 Delineamento do experimento .....	53
3.3 Protocolo de Restrição Calórica .....	53
3.4 Protocolo de treinamento aeróbio .....	54
3.5 Eutanásia dos Animais .....	54
3.7 Teste de sensibilidade à insulina .....	54
3.8 Extração de tecidos .....	55
3.10 Homogeneização dos tecidos .....	55
3.11 Avaliação quantitativa de proteínas .....	55
3.12 Determinação da expressão gênica .....	55
3.13 Análise estatística .....	56
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
4.1 Análise da composição corporal e variáveis metabólicas .....	57
1.6 4.2 Análise do tecido adiposo .....	61
4.3 Análise do músculo estriado esquelético .....	65
4.3 Análise do fígado .....	66
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS*</b> .....	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O sedentarismo é um importante fator de risco para o desenvolvimento da obesidade, e de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), evidentemente, também influencia na qualidade de vida durante o envelhecimento, e até na redução da expectativa de vida. A prática regular de exercícios tem sido recomendada, e utilizada não só visando o aumento da longevidade, mas o tratamento de doenças (1, 2)

Não se deve considerar apenas a diminuição da atividade física como fator único e isolado para o desenvolvimento do sobrepeso e obesidade. De maneira geral, os fatores que podem influenciar o balanço energético positivo crônico e subsequentemente causar a obesidade podem estar relacionados com quatro variáveis básicas, sendo elas o consumo energético, o metabolismo e o gasto energético, e por fim, a atividade física (3).

Fatores individuais como características socioculturais, conhecimento, hábitos alimentares, qualidade do sono, entre outros, podem influenciar o consumo energético/alimentar. Ao que concerne o metabolismo e o gasto energético, podemos citar o envelhecimento, variáveis relacionadas ao gênero, fatores genéticos e epigenéticos, microbiota e até mesmo medicamentos. Por fim, se tratando da diminuição da atividade física e sedentarismo, os fatores socioculturais também estão presentes, além barreiras emocionais, fadiga crônica, baixo nível de aptidão física, dores musculares, etc (2, 3)

Em outras palavras, o estilo de vida moderno costuma ser um dos culpados para o atual cenário pandêmico de obesidade e até mesmo de DCNT's (1).

Analisando a carga global de indivíduos com sobrepeso e obesidade em 2005, bem como a velocidade de crescimento dessas populações ao longo dos anos e em todo o mundo, além dos desafios implícitos (ex. saúde pública, fatores econômicos e ambientais), caso nada seja feito, há uma expectativa de que para 2030 cerca de 57,8% da população mundial seja obesa (4).

Se por um lado temos uma preocupação com o crescimento das populações com sobrepeso e obesidade, e que tal problemática gera esforços para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas com embasamento científico, seja através do estímulo da prática regular de exercícios físicos, abordagens nutricionais, cirúrgicas e farmacológicas; há o outro lado da moeda, pois sabemos de

uma crescente preocupação de outra parcela da população em aderir a práticas nada convencionais, tidas como “saudáveis”, mas que não são, e que visam a perda de peso a qualquer custo, além do ganho de massa muscular (5, 6)

São várias as motivações, mas principalmente estéticas, que fazem com que uma pessoa tida como saudável, ou seja, que se encontra em estado de eutrofia, acabe aderindo à abordagens nutricionais e de treinamento que foram pesquisadas e/ou desenvolvidas para indivíduos que realmente necessitam emagrecer.

A obsessão pelo corpo perfeito tem sido associada com características estéticas e de aceitação social, fazendo com que as pessoas adotem um “estilo de vida” que visa a busca pelo corpo perfeito, composto basicamente por um baixo percentual de gordura, ignorando as recomendações de saúde para o gênero, idade e fatores pessoais; além de uma massa muscular pronunciadamente hipertrofiada (5, 7).

Essas pessoas que até então eram tidas como saudáveis levando em consideração a massa corporal para a estatura, e que são classificadas como eutróficas, muitas vezes acabam adotando estratégias nutricionais de maneira arbitrária e sem fundamento visando a diminuição da massa corporal total, redução dos percentuais de gordura e aumento da massa muscular. Lembrando que essas estratégias costumam ser adotadas sem a real indicação para seu quadro, tal fato colabora para o desenvolvimento de uma série de desordens alimentares e comportamentos que colocam em risco a integridade da saúde (5, 8, 9).

As desordens alimentares têm aumentado de maneira rápida, especialmente entre mulheres jovens, por volta dos 20 anos. Esses comportamentos costumam ter em sua natureza motivações estéticas. Um fator significativo para o desenvolvimento dessas condições são os padrões impostos pelas mídias sociais, onde os ideais de beleza costumam ser irreais (5).

Do ponto de vista populacional e levando em consideração as desordens alimentares, temos que 16% das pessoas do público de risco costumam apresentar alimentação excessiva, 20% têm hábitos purgativos (indução de vômitos) e outros 61% costumam fazer restrição alimentar sem orientação profissional (5).

Segundo Homan (2010), dois principais ideais de beleza existem, o primeiro deles seria o de pessoas com o porte atlético, ou seja com a musculatura desenvolvida e com hábitos que poderiam ser classificados como compulsórios por exercícios físicos. O segundo, seria o ideal de corpo magro, tendo por objetivo a redução da

massa corporal a qualquer custo, sem levar em consideração a integridade dos tecidos orgânicos e da saúde (8).

### **1.1 Estilo de vida sedentário *versus* fisicamente ativo**

O corpo humano foi feito para se movimentar, no passado, os nossos ancestrais tinham que se mover para caçar, coletar frutas e cultivar alimentos.(10) Estima-se que o gasto energético de coletores e caçadores durante as suas respectivas atividades e que viviam na era paleolítica, fosse em torno de 1000 até 1500 calorias durante 3 até 4 horas de atividades físicas vigorosas(10, 11).

Entretanto, desde a revolução industrial, tem sido comum e constante a diminuição da atividade física rotineira, uma vez que muitos dos trabalhos que antes eram feitos manualmente, agora são executados por máquinas. É estimado que na década de 60, pelo menos metade dos trabalhos da indústria privada precisavam de atividades físicas de intensidade moderada, ao passo que atualmente menos de 20% tem o mesmo requerimento

O estilo de vida moderno e o desenvolvimento de novas tecnologias, somado a sistemas de transporte dependentes de motores e máquinas colaboram para a diminuição na demanda de atividades físicas que possuem custo energético, tanto na rotina de trabalho das pessoas quanto nas atividades domésticas.(10)

Se formos analisar a etimologia da palavra “sedentário”, chegamos ao termo “*sedere*” que em Latim significa “sentado”. Em termos práticos, podemos definir o sedentarismo por comportamentos caracterizados pelo mínimo de movimentos e pelo baixo custo energético. É bem estabelecida a relação entre o comportamento sedentário e consequências deletérias a saúde, havendo um baixo gasto energético, comumente causado por condições em que as pessoas passam muito tempo sentadas em sua rotina diária. Dentro desse contexto, as taxas de equivalentes metabólicos (MET) podem ser utilizadas para exemplificar o baixo gasto energético, por exemplo, uma corrida é capaz de gastar cerca de 8 METs, ao passo que uma caminhada com uma passada moderada pode gastar por volta de 3 até 4 METs, já o comportamento sedentário é geralmente definido por condições em que o gasto é menor do 1,5 METs (12).

Os METs são múltiplos equivalentes à energia suficiente para uma pessoa se manter em repouso, a sua representação na literatura se dá pelo consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>) de aproximadamente 3,5 ml/kg/min. (12)

Quando mencionamos que a corrida gasta cerca de 8 METs, isso quer dizer que esse exercício implica em um gasto calórico oito vezes maior que o que vigora em repouso.

O sedentarismo é um tipo de doença, de causa social, que pode ser influenciado por interações entre as pessoas, como por exemplo as decorrentes dos relacionamentos entre familiares, amigos, entre outros. Essas interações são tão importantes que se uma pessoa aumentar a sua massa corporal total em um período, há cerca de 171% de chances de seus amigos aumentarem a sua massa corporal total (13)

Levando em consideração a importância dos hábitos e estilo de vida, mais precisamente das consequências causadas pelo sedentarismo e a inatividade física, sugere-se o conceito de “diseasome of physical inactivity”, ou em outras palavras, o mal causado pela inatividade física, onde o sedentarismo seria um ponto gatilho capaz de desencadear uma série de mudanças biológicas que corroboram para o desenvolvimento de uma ampla gama de doenças, como por exemplo a Diabetes Mellitus do Tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer de cólon, câncer de mama pós-menopausa, demência e depressão.(13)

Em contrapartida, a prática regular de exercícios físicos tem sido associada com inúmeros benefícios a saúde física e mental de homens e mulheres, nas mais diferentes faixas etárias e condições. As taxas de mortalidade costumam diminuir em populações que fazem exercícios físicos regularmente, dessa forma é correto afirmarmos que o estilo de vida fisicamente ativo colabora para a diminuição no risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, infartos, diabetes e das múltiplas formas de câncer.

Adicionalmente, o estilo de vida fisicamente ativo é capaz de colaborar para a diminuição da pressão arterial, melhorar o perfil de lipoproteínas e diminuir as quantidades de proteína C reativa (marcador de inflamação), aumentar a sensibilidade a insulina, e controlar a massa corporal. (11)

Recomenda-se com que adultos saudáveis pratiquem ao menos 150 minutos de exercícios de intensidade moderada por semana, ou 75 minutos de exercício intenso no mesmo período. Para benefícios adicionais, pode-se recomendar 300 minutos de exercícios de intensidade moderada ou 150 minutos de alta intensidade. Outro ponto importante a ser considerado, é a correta e constante avaliação do nível de aptidão física de cada indivíduo (14).

A intensidade do exercício pode ser definida de diferentes formas, a depender do tipo de exercício que está sendo praticado ou até mesmo da disponibilidade de instrumentos capazes de coletar dados fidedignos dos praticantes. Os exercícios de resistência ou aeróbicos, como também são conhecidos, têm por característica a contração rítmica de grandes grupos musculares por longos períodos. Em contrapartida, os exercícios resistidos costumam ser conhecidos como exercícios de força, e habitualmente empregam em sua prática a utilização de pesos, anilhas, halteres e elásticos (15).

Como mencionado a definição da intensidade pode ser determinada de diferentes formas, no caso dos exercícios de resistência pode-se mensurar a taxa de batimentos cardíacos, escala subjetiva de esforço, ou até mesmo do gasto energético através dos METs. Se tratando do exercício resistido, é comum a utilização de uma repetição máxima (14).

As diferentes modalidades esportivas e tipos de exercícios físicos são capazes de atuar promovendo um estresse fisiológico ao organismo, fazendo com que os tecidos se adaptem a carga de trabalho imposta. Podemos exemplificar os exercícios de força que comumente proporcionam aumento da força muscular em razão da hipertrofia deste tecido ou até mesmo em decorrência de adaptações neuromusculares. Por outro lado, os exercícios de resistência costumam ser associados a adaptações cardiovasculares e musculoesqueléticas que aumentam a capacidade de trabalho físico, além de adaptações relacionadas a biogênese mitocondrial, densidade capilar, e na habilidade de transporte de oxigênio para a geração de energia (15)

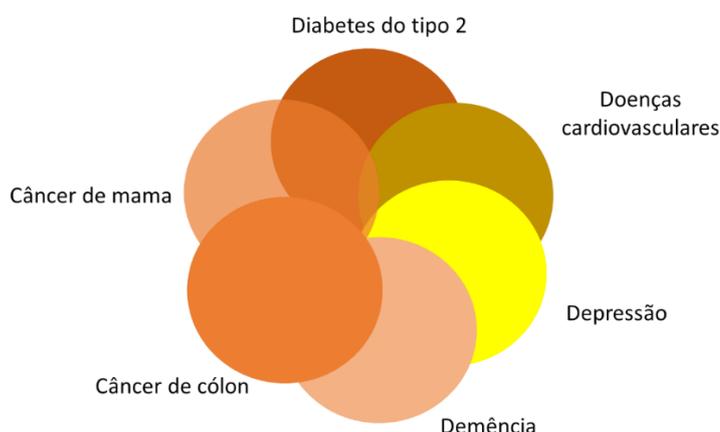


Figura 1 - O mal da inatividade física .

O mal da inatividade física sendo capaz de causar diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, depressão, demência, câncer de cólon e câncer de mama em mulheres pós-menopausa. Adaptado de B. Pedersen 2009

Uma das consequências mais proeminentes do sedentarismo é o aumento da massa corporal e do percentual de gordura, que se dá em razão do consumo energético aumentado em relação ao gasto de calorías. No passado, os indivíduos que fossem capazes de estocar o excesso de energia nos raros momentos de fartura poderiam ter mais chances de sobreviver durante momentos de escassez (16)

Historicamente o tecido adiposo tem sido dividido em tecido adiposo branco e marrom, havendo diferenças funcionais entre eles. Se tratando do tecido adiposo marrom, sabe-se da sua relevância para mamíferos neonatos e até mesmo para animais que hibernam, pois esse tipo de tecido é capaz de atuar na geração de calor.(17-19)

O tecido adiposo branco é um importante reservatório energético, sendo capaz de estocar o excesso de energia consumida através da alimentação na forma de triacilglicerol. Entretanto, acreditava-se que a função deste tecido se limitava ao armazenamento de energia, contudo, atualmente, é sabido sobre a sua capacidade de secretar uma ampla gama de proteínas e peptídios com as mais variadas funções endócrinas (20)

O tecido adiposo branco estoca o excesso de energia proveniente da dieta na forma de triacilglicerol no interior das células adiposas (adipócitos), estando amplamente distribuído por várias regiões do corpo (18).

Se tratando da composição corporal de indivíduos saudáveis e tidos como magros, o tecido adiposo costuma compreender cerca de 10 a 20% da massa corporal total, podendo haver diferenças entre gênero e idade. Já no caso de indivíduos obesos essa quantidade pode aumentar para mais de 40% até 70% da massa corporal total.(17, 18)

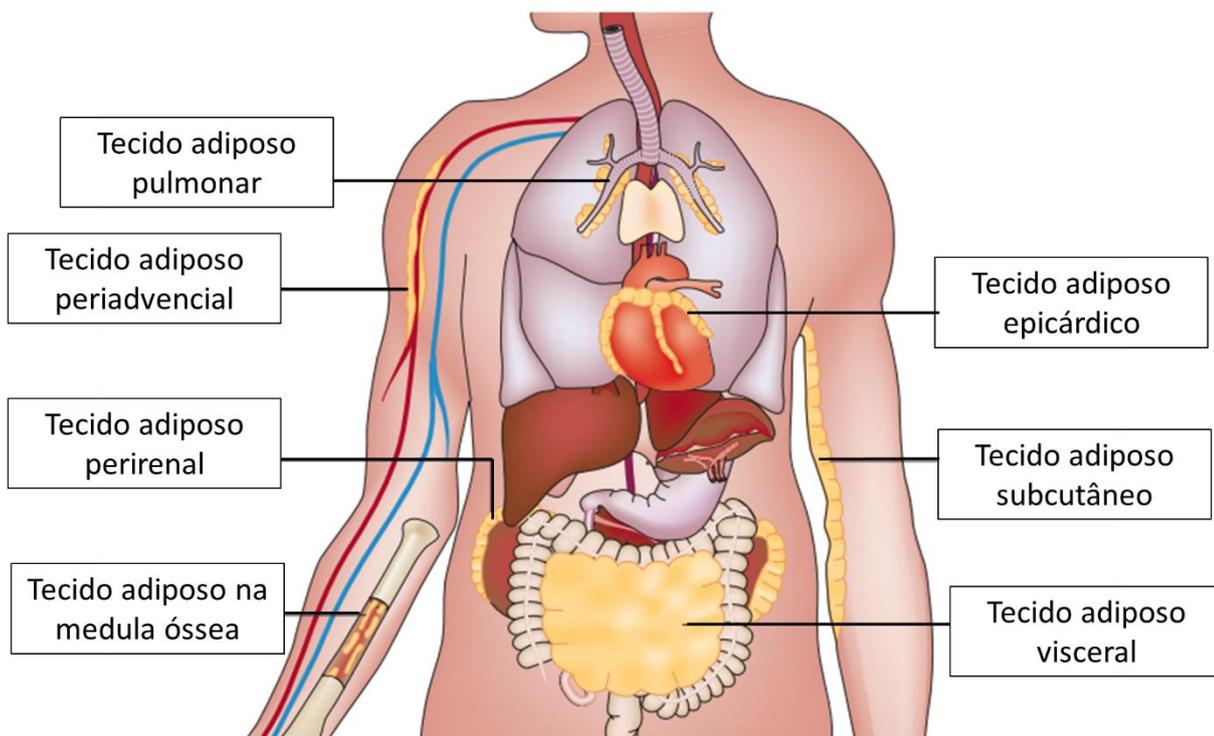


Figura 2 - Distribuição de tecido adiposo branco.

O tecido adiposo branco é principalmente encontrado na região subcutânea e visceral. Sob condições de obesidade, esse tecido se expande por todo o corpo. Entre os lugares mais comuns para o acúmulo temos o coração, os rins, e a adventícia das vias sanguíneas. Adaptado de N.Ouchi, J. Parker, J. Lugus e K. Walsh 2011

Os adipócitos do tecido adiposo branco são caracterizados por possuírem uma grande gotícula de gordura (unilocular) em seu interior, e seu funcionamento como reservatório energético é bastante eficiente. Considerando que cada grama de lipídio é capaz de fornecer 9 calorias, ao passo que carboidratos e proteínas fornecerem apenas 4 calorias por grama. O fato de o excesso de energia ser estocado na forma de triacilglicerol confere a esse tecido uma grande densidade energética. O mecanismo de armazenamento energético nessas células é bastante eficiente, sendo que a liberação de energia por parte desse tecido ocorre em condições específicas, como ao longo do exercício físico ou até mesmo em ocasiões em que há a diminuição na oferta de calorias através da alimentação (11, 21-23).

O aumento do tecido adiposo subcutâneo tem pouca ou nenhuma relação no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DNCT), inclusive esse tecido é capaz de atuar na proteção contra essas condições. Em contrapartida, há fortes evidências de que o aumento do tecido adiposo visceral e até mesmo no fígado podem colaborar para o surgimento ou agravamento de DCNT's (18)

Sabemos que a inatividade física ou sedentarismo colaboram para o aumento da adiposidade abdominal, sobretudo aumento da gordura visceral, essa condição implica na mobilização de células do sistema imune e a consequente infiltração de macrófagos. Como resultado, há uma inflamação crônica de baixo grau que leva a resistência à insulina, aterosclerose, neuro degeneração e crescimento tumoral; todas essas condições desencadeiam doenças como a diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares, depressão, demência, câncer de cólon e de mama. (13).

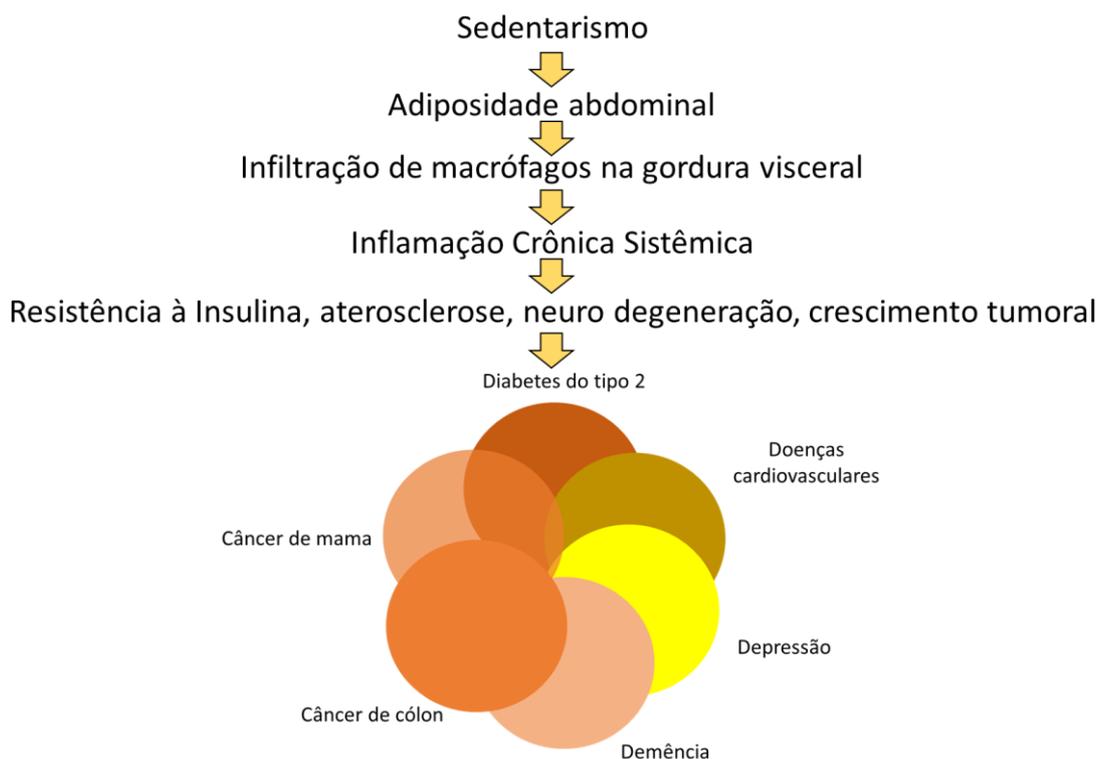


Figura 3 - Hipótese da inatividade física como desencadeador de Doenças Crônicas Não Transmissíveis.

A inatividade física e o sedentarismo levam ao acúmulo de gordura visceral e consequentemente a ativação e aumento da inflamação, que promove a resistência à insulina, aterosclerose, neuro degeneração, crescimento tumoral. Adaptado de B. Pedersen 2009

Se por um lado temos que o sedentarismo colabora para o aumento da adiposidade, diminuição da qualidade de vida e saúde, por outro lado temos que o exercício físico pode atuar contra esses fatores.

Como mencionado, os adipócitos estocam o excesso de energia na forma de triacilgliceróis dentro de uma gotícula lipídica unilocular composta por um núcleo de triacilglicerol circundado por fosfolipídios e proteínas associadas, tais como proteínas estruturais e coativadores.

O processo de lipólise, ou quebra de gordura, consiste na hidrólise destas moléculas que passam sequencialmente de triacilglicerol para diacilglicerol, monoacilglicerol, e por fim, ácidos graxos e glicerol. Ao submetemos o corpo a situações desafiadoras para a homeostase energética, como por exemplo o exercício físico ou períodos longos sem a ingestão de alimentos (jejum), os ácidos graxos são liberados pelo tecido adiposo, transportados pela corrente sanguínea e por fim oxidados nos tecidos (24, 25)

Durante o exercício de intensidade moderada a lipólise no tecido adiposo aumenta de duas a três vezes nos primeiros 30 minutos acima das taxas de repouso e continua a aumentar progressivamente com a duração do exercício, atingindo até cinco vezes a taxa de repouso depois de 4 horas de exercício (25)

Há diferentes reguladores hormonais na lipólise, tanto os que são capazes de atuar na ativação ou de inibir a quebra de lipídios. Observe na tabela 1 um resumo desses componentes.

<b>Ativadores</b>	<b>Efeito do exercício</b>	<b>Receptor</b>	<b>Sinalização</b>
<b>Adrenalina</b>	↑	$\beta_{1/2/3}$ – Receptores adrenérgicos	Adenilato ciclase → AMPc → PKA
<b>Noradrenalina</b>	↑	$\alpha$ – Receptores adrenérgicos	Inibição de Adenilato Ciclase
<b>Glucagon</b>	↑	Receptores acoplados a proteínas G	Adenilato ciclase → AMPc → PKA
<b>Cortisol</b>	↑	Receptores de glicocorticóides	Inibição da sinalização de insulina
<b>Peptídeos natriuréticos</b>	↑	Receptores natriuréticos (A/B)	Guanilato ciclase → GMPc → PKG
<b>Inibidores</b>			
<b>Insulina</b>	↓	Receptor de insulina	IRS → PI3-K → PKB → PDE-3B
<b>Adenosina</b>	↓	Receptores de adenosina (A1) ativando proteínas G	Diminuição de AMPc
<b>Ácidos graxos</b>	↑		Mobilização e oxidação

Tabela 1 - Reguladores da lipólise.

Legenda: ↑ aumento do efeito promovido pelo exercício; ↓ diminuição do efeito promovido pelo exercício; → molécula induz efeito; AMPc – Adenosina Monofosfato cíclica; PKA – Proteína quinase A; GMPc – Guanosina Monofosfato cíclica; PKG – Proteína quinase G; IRS – Substrato do receptor

de insulina; PI3-K – Fosfatidilinositol-3-quinase; PKB – Proteína quinase B (Akt); PDE-3B – Fosfodiesterase 3; Adaptado de T. Tsiloulis, M. Watt 2015

Sabemos que a mobilização de triacilglicerol é regulada pela liberação de hormônios e posterior ativação de enzimas lipolíticas. Uma enzima extremamente importante para a lipólise é a Lipase Hormônio Sensível (LHS), uma proteína capaz de atuar em todos os processos de hidrólise dos triacilgliceróis do tecido adiposo. Contudo, atualmente, sabe-se que a sua principal atuação se dá na conversão do diacilglicerol em monoacilglicerol, sendo importante a ativação de uma outra enzima, denominada Lipase de Triacilglicerol do Adipócito (ATGL) que apresenta uma alta especificidade na hidrólise do triacilglicerol e baixa atuação nos diacilglicerol e monoacilglicerol (24-26)

Uma outra proteína importante para a lipólise é a perilipina, pois atua na regulação da lipólise basal e pode ser estimulada pela ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Por se abundante na superfície das gotículas de gordura, na ausência de estímulos ela atua como uma barreira para as lipases, mantendo baixa a taxa de lipólise basal. Em contrapartida, na presença de estímulos a perilipina sofre fosforilação, o que muda a sua conformação, havendo um conseqüente aumento na lipólise. Uma outra informação importante é que a perilipina pode facilitar a translocação de LHS, favorecendo ainda mais o processo de lipólise. (27)

Durante o exercício físico, os ácidos graxos oriundos da lipólise são transportados para o músculo estriado esquelético, sendo que a acil-translocase de ácido graxo (FAT/CD36) facilita o transporte dos ácidos graxos de cadeia longa para o sarcolema, em conjunto com a proteínas de ligação de ácidos graxos (FABP) e a carnitina palmitoilstranferase (CPT1), através da membrana mitocondrial. Os ácidos graxos que entram na célula muscular são oxidados via  $\beta$ -oxidação na matriz mitocondrial.(26)

Cada passagem do ácido graxo pela  $\beta$ -oxidação utiliza dois carbonos para a obtenção de Acetil Coenzima A (Acetil-CoA), além da geração de  $\text{NADH}+\text{H}^+$  e  $\text{FADH}_2$ . Posteriormente, as moléculas Acetil-CoA são oxidadas no ciclo tricarbóxico, fornecendo uma molécula de Adenosina Trifosfato (ATP), 3  $\text{NADH}+\text{H}^+$  e 1  $\text{FADH}_2$  e  $\text{CO}_2$ . As coenzimas  $\text{NADH}+\text{H}^+$  e  $\text{FADH}_2$  são utilizadas na cadeia de transporte de elétrons para a geração de moléculas de ATP (26).

Se por um lado temos que o exercício físico é capaz de estimular a liberação de diferentes hormônios que por consequência induzem a lipólise, por outro temos que a liberação de insulina no período pós prandial é capaz de atuar na captação de glicose pelos tecidos e inclusive estimular a re-esterificação de ácidos graxos no interior dos adipócitos (28)

A liberação de insulina ocorre em razão de uma retroalimentação humoral, na qual as células  $\beta$ -pancreáticas a secretam para a corrente sanguínea. Esse hormônio é capaz de atuar suprimindo os efeitos da LHS. (28, 29)

A insulina é um hormônio anabólico, capaz de influenciar diferentes atividades intracelulares, o funcionamento deste hormônio proteico é dependente da sua ligação em receptores específicos na membrana de células alvo. O receptor da insulina é composto pela combinação de quatro subunidades que se mantêm unidas por meio de ligações de dissulfeto, sendo duas subunidades alfa que ficam voltados para o meio extracelular, e outras duas subunidades beta que penetram através da membrana, projetando-se no citoplasma celular (30)

Podemos compreender a insulina como um facilitador para a captação de glicose, uma vez que é pequena a captação deste substrato energético pelas células na ausência dela. Para o seu funcionamento, a insulina irá se acoplar as subunidades alfa do lado externo das células, e então as subunidades beta que se localizam no interior da célula serão autofosforiladas. Essa autofosforilação das subunidades beta ativam uma tirosinaquinase, que por sua vez causará a fosforilação de diversas outras enzimas intracelulares, entre eles um grupo chamado de substratos do receptor de insulina (IRS), Há três tipos de IRS, podendo estar espalhados nos diferentes tecidos do corpo, eles podem ser o IRS-1, IRS-2, IRS3.(30)

A consequente fosforilação de IRS ativa a família das proteínas de quinases ativadas por mitógenos (MAPK), além da Proteína Quinase B via Fosfatidilinositol 3 Quinase (PI3K). (31)

A ativação de PI3K induz a translocação de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4), síntese de glicogênio e até mesmo de proteínas via Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), além da inibição de agentes pró-apoptóticos. (19, 28, 32)

Mais precisamente nos adipócitos, a insulina é capaz de promover a captação de ácidos graxos livres, através do intermédio das Lipases Lipoproteicas (LPL). Os ácidos graxos são captados tanto por difusão pelo gradiente de concentração, quanto por transportadores. Ao mesmo tempo que temos uma maior captação de ácidos

graxos e glicose, há uma maior disponibilidade de glicerol-3 fosfato, além do mais a insulina é capaz de estimular diretamente enzimas lipogênicas como por exemplo a Acil coenzima A. (19, 28, 32)

Como resultado há uma re-esterificação de ácidos graxos e consequente formação de triacilgliceróis no interior dos adipócitos. (32)

Adicionalmente à atividade da LPL, sugere-se que o comportamento sedentário afeta o metabolismo de carboidratos no tecido muscular através de modificações nos transportadores de glicose (GLUT), sendo eles independentes de insulina, como por exemplo o transportador de glicose 1 (GLUT1), ou até mesmo os dependentes, como o GLUT4 no músculo estriado esquelético durante momentos de repouso (12).

## **1.2 Padrões alimentares**

O convívio social é capaz de influenciar os padrões alimentares das pessoas ao redor do mundo, tanto na escolha da quantidade, quanto na qualidade dos alimentos. É possível observar a existência de algumas normas de consumo alimentares de ordem social, que são compreendidas por padrões de consumo tidos como apropriados, levando em consideração as quantidades de alimentos e a especificidade das escolhas alimentares por membros de determinados grupos sociais. Esses grupos podem ser diferenciados em razão da sua nacionalidade, classe social, relação interpessoal (familiares ou amigos), entre outros (33).

Para elucidar melhor esses padrões alimentares, podemos exemplificar povos ao redor do mundo que consomem insetos dentro da sua rotina de alimentação diária, sendo que esse mesmo padrão alimentar não costuma ser aceito por outra parcela da população mundial (33)

Uma alimentação saudável deve ser capaz de subsidiar as necessidades energéticas diárias, seja para o desenvolvimento das atividades rotineiras (trabalho, lazer, estudos, etc...) ou para o crescimento e desenvolvimento dos tecidos orgânicos (crianças, adolescentes, gestantes, entre outros). É importante considerar que há a necessidade da correta distribuição de nutrientes em razão do gênero e faixa etária de cada indivíduo, levando em conta os macronutrientes como carboidratos, proteínas e lipídios; além dos micronutrientes, vitaminas e minerais (34, 35)

Os carboidratos constituem a principal fonte energética da alimentação, sendo encontrados de forma abundante em grãos, frutas, legumes e vegetais. Em razão da grande oferta de alimentos que temos hoje e em decorrência dos processos

relacionados a indústria alimentícia, é comum encontrarmos alimentos com grãos processados, o que resulta em produtos com um menor teor de micronutrientes e fibras, ao passo que os grãos inteiros apresentam um valor nutricional maior (34).

O consumo de frutas e vegetais frescos constituem uma fonte essencial de fitoquímicos, como por exemplo, polifenóis, fitoesteróis, carotenóides, esses componentes são bioativos capazes de conferir inúmeros benefícios a saúde. (34)

As proteínas dietéticas fornecem energia, bem como aminoácidos essenciais (corpo não produz). Esse tipo de nutriente pode ser encontrado em alimentos de origem animal (carnes, laticínio, peixes e ovos), além dos de origem vegetal (legumes, produtos da soja, grãos, nozes e sementes) (34).

Se tratando das gorduras dietéticas, esses nutrientes são capazes de fornecer uma grande quantidade de energia em relação ao volume ingerido (9Kcal/g). Contudo, esses nutrientes possuem diferentes funções no organismo, podendo atuar na absorção de vitaminas lipossolúveis, na composição das membranas celulares ou até mesmo na síntese de hormônios esteroidais. Em relação ao consumo dietético, podemos dividir os lipídios em 4 categorias: gorduras monoinsaturadas, poliinsaturadas, saturadas e trans.(34)

De maneira geral, as gorduras insaturadas são encontradas em alimentos como peixes, óleos e derivados de plantas, nozes e sementes. Já as trans podem ser obtidas em alimentos processados a partir de óleos vegetais, ou até mesmo em pequenas quantidades de produtos de origem animal).(34)

O consumo de gorduras insaturadas, como por exemplo o ômega 3, tem sido associado a inúmeros benefícios a saúde, como por exemplo a cardioproteção, prevenção do declínio cognitivo, redução da inflamação, melhora da resistência sistêmica à insulina, entre outros.(34)

Sabe-se que os padrões de consumo alimentar também são suscetíveis a rotina diária das pessoas, que por muitas vezes preferem a praticidade ofertada por alimentos industrializados, processados e ultra processados do que os “in natura”. Adicionalmente, é crescente o consumo de produtos congelados, lanches, refrigerantes, entre outros. O grande problema é que a maior parte desses alimentos possuem uma grande densidade energética e uma pequena oferta de vitaminas e minerais (2-4, 36).

Todo esse contexto contribui para o aumento da massa corporal, uma vez que a ingestão de alimentos ricos em calorias tem por consequência o armazenamento do

excesso de energia em diferentes tecidos, mais comumente associado ao tecido adiposo o que colabora para o desenvolvimento do sobrepeso e obesidade (37).

Sabemos que se as populações com sobrepeso e obesidade continuarem a crescer na mesma velocidade que no passado, é plausível que em 2030 cerca de 57,8% da população mundial seja classificada acima do peso(4).

Entretanto, ao que concerne os padrões dietéticos, há outro lado da moeda, o relacionado a distúrbios alimentares que são caracterizados por desordens psíquicas em razão do consumo anormal de alimentos.

A forma de manifestação desses distúrbios ocorre de diferentes maneiras, mas invariavelmente colocam a saúde em risco. Tanto homens quando mulheres são susceptíveis ao desenvolvimento de distúrbios alimentares causados por motivações estéticas, por exemplo, homens costumam desenvolver distúrbios em razão do desenvolvimento de massa muscular, ao passo que as mulheres buscam a redução da massa corporal e emagrecimento. Todos os distúrbios alimentares ameaçam a integridade da saúde física e psicológica(6, 8, 33, 38-40).

Entre os tipos de distúrbios alimentares, pode-se listar ao menos seis que costumam ser os mais frequentes, entre eles a anorexia nervosa, a bulimia nervosa e o transtorno alimentar periódico; inclui-se também distúrbios da infância, como o transtorno de ingestão alimentar restritiva evitativa, o transtorno de ruminação e a alotriofagia(38).

Se tratando dos transtornos alimentares da infância, a ingestão alimentar restritiva evitativa é caracterizada por persistentes perturbações alimentares que diminuem o aporte nutricional e energético. Esse tipo de condição pode acarretar prejuízos físicos e emocionais, pois envolvem a perda de massa corporal e a constante dificuldade no ganho, o que por consequência compromete o crescimento e desenvolvimento da criança. No caso da ruminação essa desordem envolve a regurgitação da comida depois da criança se alimentar, em razão de náuseas, por causas involuntárias ou até mesmo por repulsa (nojo) ao alimento. Por fim, a alitrofia implica no consumo de componentes sem valor nutricional, como por exemplo argila, terra, objetos, entre outros. (38)

No caso dos distúrbios alimentares observados em adultos e adolescentes, muitos deles têm motivações estéticas e o desejo de possuir o corpo ideal tido como “perfeito” imposto por padrões midiáticos, onde as mulheres costumam ser exageradamente magras e os homens com músculos proeminentes. (39)

A anorexia nervosa é um transtorno mental grave, caracterizado por um medo intenso do ganho de massa corporal com uma concomitante imagem corporal deturpada, o que motiva a pessoa a uma restrição alimentar severa somado a comportamentos de perda de peso, como por exemplo a purgação e a prática excessiva de exercícios físicos. Além do mais, a pessoa com anorexia apresenta prejuízos de ordem cognitiva e emocional. Entre as complicações fisiológicas é de se esperar com que todos os órgãos e tecidos sofram com a privação de nutrientes e perda de massa corporal acentuada em decorrência da eminente desnutrição. (6, 33, 38-40)

Todos os sistemas do corpo são afetados pela privação de nutrientes da anorexia nervosa, mas entre os sintomas gastrointestinais, sabe-se que eles costumam ser particularmente comuns e incômodos, entre eles há um trânsito gastrointestinal prolongado (esvaziamento gástrico retardado, motilidade antral alterada, atrofia gástrica, mobilidade intestinal diminuída) e constipação. Se tratando do sistema cardiovascular é comum a hipotensão, bradicardia, arritmias e cardiomiopatia (38-40). Como é de se esperar o sistema endócrino, metabólico e hematológico costumam passar por condições de hipoglicemia, hipocalcemia, hiponatremia, hipotermia, comprometimento da função tireoidiana, hipercortisolemia, amenorreia, atraso na puberdade, crescimento interrompido, osteoporose, anemia, leucopenia e trombocitopenia. (33, 40)

A anorexia nervosa é capaz de proporcionar neuropatia periférica, perda de volume e atrofia cerebral, além de prejuízos no sistema esquelético (osteopenia), oral (cáries), renais (cálculos e lesão renal aguda), insuficiência hepática, e reprodutivos (amenorreia, infertilidade, bebê com baixa massa ao nascer) (33, 40)

Já se tratando da bulimia nervosa, ela ocorre em situações de massa corporal normal ou elevada (se a massa corporal for menor que o limite, então costuma-se diagnosticar com anorexia nervosa). A bulimia nervosa tem por característica episódios recorrentes de compulsão alimentar, no caso a pessoa come grandes quantidades de alimentos e depois induz a purgação. Entre os comportamentos compensatórios após um episódio de compulsão alimentar, o vômito autoinduzido costuma ser o mais comum, mas há também a utilização de medicamentos laxativos e diuréticos, além de períodos de jejum e exercícios extremos. Normalmente, esses comportamentos são motivados por uma autoavaliação negativa relacionada com a massa e forma corporal, além da aparência física. (38)

Alguns dos achados físicos observados na pessoa com bulimia nervosa são semelhantes aos de pessoas com anorexia, mas geralmente menos graves, entre eles podemos encontrar problemas específicos relacionados aos métodos purgativos, como por exemplos, arritmias, insuficiência cardíaca (morte súbita), problemas metabólicos relacionados com distúrbios eletrolíticos ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ), acidose metabólica causada pelo uso de laxantes ou alcalose em decorrência da indução de vômitos. Entre os sintomas gastrointestinais há a constipação, esteatorreia, úlceras gástricas e duodenais, pancreatite, erosões esofágicas e gástricas ou perfuração (causados pela utilização de objetos para indução do vômito).(38)

Um outro tipo de distúrbio alimentar bastante comum entre homens e mulheres fisicamente ativos é a dismorfia muscular, ou também conhecida como vigorexia. As pessoas acometidas por essa condição costumam referir insatisfação com o volume e definição de seus músculos, e se definem como pequenos e fracos, independente da sua composição corporal (41)

Um ponto interessante ao comparar a vigorexia com a anorexia, é justamente que no primeiro caso as pessoas almejam parecer maiores, com massa muscular desenvolvida e proeminente, ao passo que na anorexia, os indivíduos acreditam sempre estarem fora dos padrões em relação ao tamanho do seu corpo, e buscam ficarem menores e mais magras. Uma outra diferença entre os distúrbios, é que na anorexia o comportamento patológico relacionado a alimentação é primário, no qual as pessoas não sentem fome ou evitam ao máximo se alimentarem. Já se tratando da vigorexia, o fator “alimentação” costuma ser secundário, com motivações relacionadas a redução da gordura corporal (41)

É comum com que pessoas com vigorexia se autopreescrevam modificações dietéticas, que por muitas vezes não possuem embasamento científico ou orientação por parte de diretrizes nutricionais. Dessa forma, não é raro encontrar pessoas que utilizem estratégias que aumentem deliberadamente o consumo energético através de dietas hipercalóricas, ou façam restrições alimentares. Há modificações dietéticas que visam a redução no consumo de certos nutrientes (ex. carboidratos) e aumento na ingestão de outros (ex. proteínas)(41).

Se tratando de pessoas fisicamente ativas, como costumam ser os indivíduos com vigorexia, essas estratégias nutricionais quando adotadas de maneira deliberada e sem a correta indicação, podem atuar de maneira a prejudicar as adaptações fisiológicas proporcionadas pelo exercício físico, justamente por não haver nutrientes

o suficiente para embasá-las, ou até mesmo colocar em risco a saúde e integridade física de seus adeptos.(41, 42)

Se por um lado temos que o crescimento do sobrepeso e da obesidade vem crescendo cada vez mais ao redor do mundo (36), por outro há o desenvolvimento dos distúrbios alimentares que também representam um problema de saúde pública de ordem global e que se agravam com o transcorrer dos anos(43).

### **1.3 Estratégias nutricionais e influência biológica**

O gasto energético diário é determinado por algumas variáveis que levam em consideração a composição corporal do indivíduo, além de características relacionadas ao ambiente ao qual ele está inserido(44, 45). Basicamente, o consumo energético deve ser o suficiente para manter as funções vitais do organismo em repouso, correspondendo, portanto, a taxa metabólica basal que representa cerca de 55 até 75% das necessidades enérgicas diárias. O requerimento energético deve subsidiar a manutenção da massa corporal total, sendo suscetível a variações na composição corporal, uma vez que indivíduos com uma maior massa livre de gordura costumam ter um requerimento maior do que os seus pares com uma menor massa livre de gordura (44).

Entretanto, variáveis relacionadas ao ambiente também podem influenciar as necessidades energéticas diárias, entre elas podemos citar a temperatura ambiental, uma vez que temperaturas mais baixas podem exigir mais do organismo para que ocorra a manutenção da temperatura corporal (44).

Características relacionadas a digestão e metabolização dos nutrientes também influenciam no gasto energético, e correspondem de 7 até 15% das necessidades calóricas diárias. A essa variável conferimos o nome de “efeito térmico dos alimentos”, por exemplo, as proteínas consumidas pela dieta possuem um efeito térmico maior em comparação a outros nutrientes, sendo assim é plausível com que elas consigam influenciar o requerimento energético diário (44).

Por fim, há o fator “atividade física”, uma variável que costuma influenciar de 15 até 30% a necessidade energética (44).

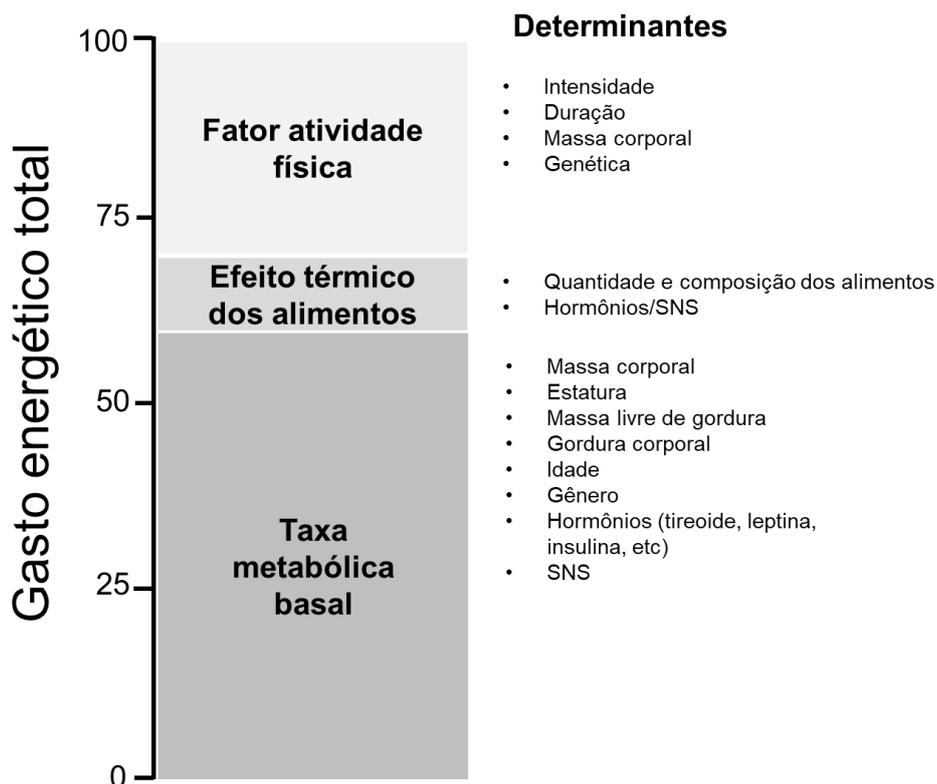


Figura 4 - Componentes do gasto energético diário.

Componentes do gasto energético diário e seus determinantes. SNS sistema nervoso simpático. Adaptado de M. J. Soares 2018

Temos que para a manutenção da massa corporal, independentemente da idade, gênero e outras variáveis, há a necessidade de equilibrar o consumo energético com a energia total dispendida, sendo que qualquer desequilíbrio nessa equação pode resultar em um superavit calórico e conseqüente ganho de massa corporal; ou de maneira reversa, em um déficit calórico proporcionando o emagrecimento(44).

Em resumo, o gasto energético total é a somatória da taxa metabólica basal, do efeito térmico dos alimentos e da energia requerida para as atividades físicas(22, 35, 42, 44, 45).

Desde o nascimento e o desenvolvimento da criança até chegar na vida adulta, o requerimento calórico é determinado pelo crescimento e pelas necessidades de manutenção corporal. O incremento do consumo energético ao longo da vida corresponde a uma fração que vai de 20% do primeiro ano de vida até aproximadamente 35% do consumo energético diário aos 18 anos (45)

O aumento do requerimento energético decorrente da atividade física é igual ao gasto energético total dividido pela gasto energético de repouso (45).

<b>Estilo de vida</b>	<b>Taxa do gasto energético</b>
<b>Sedentário ou atividades leves</b>	1,4 até 1,69
<b>Ativo ou atividades moderadas</b>	1,70 até 1.99
<b>Vigorosa</b>	2 até 2,4

Tabela 2 - Classificação da taxa do gasto energético como múltiplos do gasto energético basal em relação ao estilo de vida.

Adaptado de M. J. Soares 2018

Se tratando da distribuição de macronutrientes, de maneira geral, o consumo de proteínas deve corresponder a cerca de 10 até 15% do consumo energético diário, as gorduras de 30 até 35%, e o restante deve ser preenchido com carboidratos, geralmente 55 até 65% (45).

Há diferentes formulas para calcular o consumo energético diário, com equações de regressão que são utilizadas em populações específicas, como por exemplo Cunningham (46) e Harris-Benedict (47).

Uma forma prática de proporcionar alterações na massa e na composição corporal é reduzir de forma periodizada o consumo energético em aproximadamente 250 até 500 Kcal/dia das necessidades diárias, e manter ou aumentar um pouco o gasto energético através do exercício físico. Esse tipo de estratégia costuma ser bastante eficiente e proporcionar alterações corporais em aproximadamente 3 até 6 semanas de adoção. Em algumas situações pode ser interessante incrementar o gasto energético com o exercício aeróbio de intensidade moderada (35)

Por outro lado, há diferentes estratégias nutricionais que visam proporcionar modificações corporais e garantir uma fácil adesão por parte de seus adeptos.

Ao que concerne a adoção de estratégias nutricionais, podemos enfatizar o jejum intermitente e suas variações, como por exemplo: o *Time Restricted Feeding* ou alimentação por restrição de tempo, a qual considera horários ou refeições específicas para que seus adeptos façam as refeições; o jejum de dias alternados, que preconiza o jejum durante 24 horas, seguido de alimentação nas próximas 24 horas e assim por diante; o jejum de dias completos, no qual o individuo fica de um até dois dias por semana em jejum. Há outras abordagens populares como as dietas com baixo teor de carboidratos (até 40% do consumo energético total ou de 50 até 150 gramas por dia); há a dieta cetogênica que tem por característica ter até aproximadamente 50 gramas de carboidratos por dia ou até 10% do consumo

energético total; dietas hiperproteicas, aumentando para pelo menos 25% a quantidade de proteínas consumidas por dia, quando o normal seria cerca de 15% apenas (22).

Alguns trabalhos têm investigado o jejum intermitente ou “intermitent fasting” (IF) como uma possível intervenção nutricional capaz de ser utilizada como método terapêutico na redução de massa corporal (22, 48, 49), no tratamento de doenças, e capaz de promover um aumento da expectativa e qualidade de vida (48-50).

Adeptos de diferentes religiões utilizam períodos de jejum dentro do seu calendário, como os muçulmanos, que permanecem em jejum do amanhecer até o anoitecer, por aproximadamente três semanas, correspondente ao mês do Ramadan. Em outros casos, como cristãos, judeus, budistas, e hindus, o jejum ocorre durante determinados períodos do calendário, havendo dias de jejum intercalados por dias em que é possível se alimentar (50). O Ramadan pode ser validado como um modelo prolongado de IF, uma vez que, por motivos religiosos, indivíduos se submetem a restrições na ingestão de alimentos e de líquidos por 12 horas todos os dias, por quase um mês. Ao comparar indivíduos adeptos a tal prática, durante o Ramadan, observa-se uma diminuição de interleucinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), e até mesmo de granulócitos, linfócitos e monócitos, quando comparados aos mesmos indivíduos antes do Ramadan. Não obstante, deve-se ressaltar que após um mês o término da prática, tais marcadores retornam ao seu estado inicial, com exceção da IL 6 que permanece diminuída. Dessa forma, tais resultados corroboram para um possível e provável efeito anti-inflamatório promovido pela adesão ao IF (50).

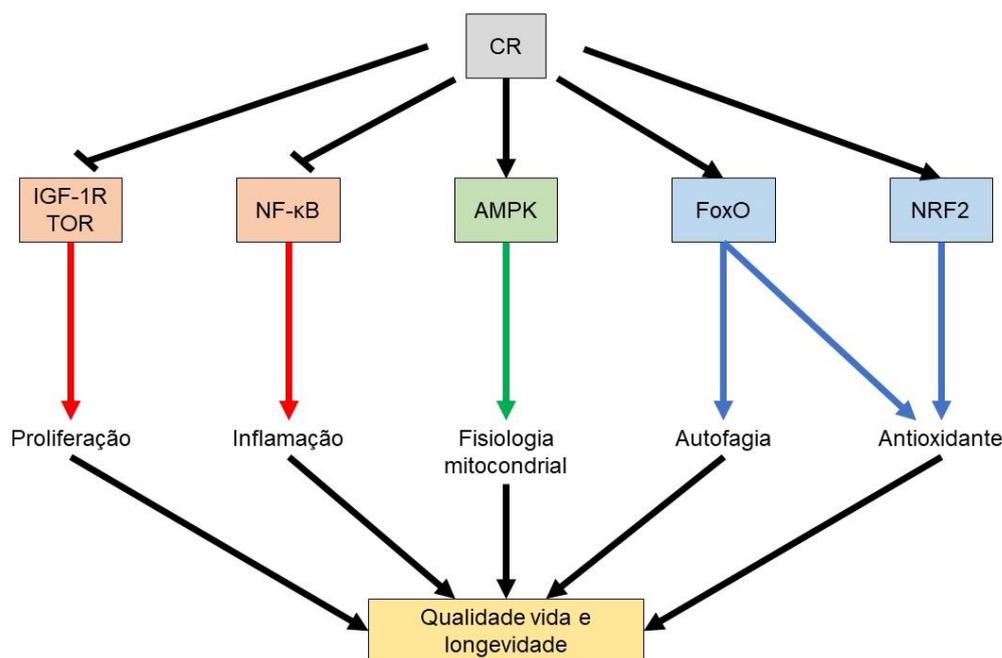
Um estudo conduzido com 100 participantes, de ambos os gêneros, meia idade, e divididos em três grupos, sendo eles: grupo controle, que foi apenas acompanhado ao longo da pesquisa; grupo jejum intermitente, que fez um protocolo em que consumia 25% das necessidades diárias intercalado por dias com 125%; e um grupo restrição calórica, que consumia cerca de 75% das necessidades. Os pesquisadores acompanharam os indivíduos ao longo de um ano, sendo que os primeiros seis meses serviram para as intervenções propostas, já o segundo semestre teve por objetivo acompanhar os resultados obtidos através dos protocolos experimentais e avaliar até um possível ganho de massa corporal e das demais variáveis analisadas. Os pesquisadores constataram uma certa dificuldade dos voluntários em aderir ao protocolo de jejum intermitente, de maneira que no dia em

que as pessoas deveriam consumir 125% da quantidade energética, elas comiam menos. Em contrapartida, nos dias em que a ingestão alimentar deveria ser de 25% os indivíduos comiam mais do que o indicado. O mesmo não foi observado no grupo submetido a restrição calórica, sendo que a maior parte conseguiu aderir a proposta nutricional sem maiores dificuldades. Sendo assim, os pesquisadores concluíram haver uma certa dificuldade dos participantes em aderir ao protocolo de jejum intermitente. Ao que concerne as variáveis fisiológicas e até mesmo ao emagrecimento, os resultados foram bastante semelhantes e dessa forma os pesquisadores concluíram de que o jejum intermitente não aparenta ser uma estratégia nutricional mais eficiente do que a restrição calórica para o emagrecimento. Adicionalmente, o ganho de massa corporal observado ao longo do segundo semestre do experimento foi basicamente igual (51)

Como introduzido, são várias as modificações dietéticas, contudo, uma das mais pesquisadas no meio científico e de fácil adoção por parte dos profissionais da área da saúde é a restrição calórica ou "*Caloric Restriction*" (CR).

As diversas estratégias de restrição calórica preconizam uma redução de cerca de 20 até 40% do consumo diário habitual de calorias, onde a CR é capaz não só de aumentar a expectativa de vida de seres humanos, e modelos experimentais, mas também promover outros benefícios que contribuem para uma melhora na qualidade de vida, como melhoras na função cardiovascular e regulação glicêmica (52-54). Tais efeitos são sustentados pela crença de que a CR pode atuar contra efeitos deletérios causados pela inflamação (54).

Acredita-se que a CR seja capaz não só de atuar na redução de massa corporal através do déficit calórico promovido, mas também de exercer influências na síntese de hormônios e citocinas. É possível encontrarmos na literatura, resultados que indicam que os animais que receberam a CR tiveram uma redução de massa corporal quando comparados com os animais controle, ressaltando que ambos os grupos receberam o mesmo tipo de ração. Os mesmos resultados se repetem no percentual de gordura. A insulina, a leptina, o fator de crescimento análogo a insulina (IGF-1) dos camundongos do grupo CR apresentaram valores reduzidos quando comparados com o controle, contudo, os níveis de Adiponectina do grupo submetido ao CR estiveram elevados quando comparados com grupo controle (54).



**Figura 5** - Esquemática da restrição calórica influenciando a qualidade de vida e longevidade.

A restrição calórica produz uma série de efeitos pleiotrópicos capazes de influenciar múltiplas vias metabólicas, gerando benefícios para todo o organismo. Entre os efeitos há a modulação da atividade mitocondrial e diminuição do estresse oxidativo através da indução de sistemas antioxidantes, além da modulação da taxa de peroxidação das membranas celulares. As alterações mitocondriais são reguladas pela inibição do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) e do alvo de rapamicina (TOR), além de influenciar a quinase dependente de adenosina monofosfato (AMPK) e proteínas da família das sirtuínas. A atividade FoxO é regulado por esses sistemas e envolvido na biogênese mitocondrial e no metabolismo oxidativo. Adaptado de G. López-Lluch e P. Navaz 2016

Evidentemente a CR é capaz de promover um desbalanço no metabolismo energético, o que faz com que diversas vias celulares se adaptem a realidade do déficit calórico, e dessa forma interajam entre si, tendo como objetivo retomar o equilíbrio metabólico. As vias que sofrem influência da CR são as associadas a fatores de crescimento, entre eles, o IGF-1, a via Mammalian Target of Rapamycin (mTOR). Além do mais, a CR é capaz de influenciar a ativação da Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), que dessa forma consegue atuar no controle da homeostase energética das células. Todas as adaptações envolvidas durante a CR estão ligadas com a ativação de sistemas que além de atuarem na eficiência metabólica, também são capazes de influenciar na proteção contra danos celulares (54, 55).

Sabe-se que a CR é capaz de reduzir os níveis de IGF-1, insulina e glicose no plasma, (54). A ativação da cascata dependente de IGF-1 está relacionada com a ativação da mTOR e da Quinase 6 ribossomal (S6K), inibindo a “transcriptional activity of the forkhead box transcription factors (FoxO). Estes achados estão relacionados

com o aumento da expectativa de vida, e leva em consideração estas alterações promovidas pela CR. Deve-se ressaltar ainda que, a FoxO está envolvida na resposta de genes a diversos fatores estressores (56)

A manutenção da biogênese mitocondrial promovida pela CR é capaz de exercer influência sobre a resistência muscular contra a inflamação, é postulado ainda que, a adesão a CR também é capaz de influenciar na diminuição da inflamação associada ao envelhecimento, e exerce função na resistência à insulina. A CR acaba modulando a atividade da glutathione (GSH), NF-Kb, SIRT1 (sirtuína 1), “peroxisome proliferator-activated receptors” (PPARs) e FoxOs, além de atuar via SIRTs (sirtuínas). Dentro da família das SIRTs existem sete tipos diferentes, onde a CR é capaz de aumentar a SIRT1 no fígado, tecido adiposo, cérebro e rins (56).

Em estudo realizado, a CR foi capaz de melhorar o metabolismo lipídico e a inflamação do fígado, e tecido adiposo. Foram utilizados camundongos machos divididos em três grupos: o HFD, alimentado com dieta hiperlipídica livre; o controle, com dieta padrão livre, e a partir deste grupo controle, ocorreu uma subdivisão para um novo grupo (CR) que recebeu uma restrição calórica de 15% durante 16 semanas. Dessa forma, os valores relativos da expressão de mRNA de MCP1 estiveram diminuídas no grupo CR quando comparado aos demais, bem como de TNF $\alpha$ , já para os valores de IL-6 e SOCS3 os valores estiveram aumentados no grupo CR, valores esses referentes ao material coletado do fígado. Para as amostras do tecido adiposo, o grupo HFD apresentou valores maiores de MCP-1, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , e SOCS3 quando comparado aos demais. Há também resultados que evidenciam benefícios da adesão a CR na redução do acúmulo de gordura no fígado, e na baixa secreção de fentuna-A. Adicionalmente, acredita-se que a CR foi capaz de atenuar a expressão de citocinas inflamatórias no tecido adiposo, resultando em um efeito anti-inflamatório associado a maiores níveis de adiponectina circulante (57).

## **1.4 Citocinas**

### **1.4.1 Interleucina 1**

A IL-1 $\beta$  é a mais potente citocina pró-inflamatória, sendo crucial para respostas imunes de defesa a infecções e doenças, a secreção de IL-1 $\beta$  pode ocorrer em resposta a vários patógenos associados a padrões moleculares (PAMP's) além de danos associados a padrões moleculares (DAMP's) que são moléculas liberadas em

decorrência de morte celular. Como resultado da secreção da IL-1 $\beta$  e sua concomitante ligação a seus respectivos receptores, há o favorecimento ao aumento da inflamação (58).

A IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são sintetizadas como proteínas precursoras e então clivadas proteoliticamente. A diferença entre elas se dá em razão da IL-1 $\alpha$  ser uma proteína completa e já biologicamente ativa. Tanto a IL-1 $\alpha$  quanto a IL-1  $\beta$  costumam ser secretadas rapidamente no começo de uma resposta inflamatória, induzindo uma inflamação local e eventualmente uma sistêmica (59)

Embora seja uma citocina liberada por uma variedade de células, a secreção de IL-1 $\beta$  costuma ser mais investigada quando secretada por células do sistema imune inato, tais como monócitos e macrófagos. Ainda se tratando da sua secreção, a pro-IL-1 $\beta$  é dependente da atuação da caspase 1, via a ativação de inflamassoma. Por exemplo, a infecção de macrófagos por parte de bactérias como a *Salmonella typhimurium* ou até mesmo *Pseudomonas aeruginosa* induz a secreção de IL-1 $\beta$  via ativação do inflamassoma NLRC4 (58)

Os inflamassomas estruturalmente consistem em receptores NOD (NLR) como no caso do NLRP1, NLRP3 e NLRC4 (58)

Como mencionado, a liberação de IL 1 $\beta$  ocorre em resposta à DAMP's e PAMP's, sendo que a presença de Adenosina Trifosfato no meio extracelular é capaz de ativar receptores purinérgicos do tipo P2X7 o que induz a ativação de caspases 1 e concomitante secreção de IL-1 $\beta$ . Além do mais, a presença de toxinas derivadas de *Staphylococcus aureus* ou até mesmo componentes como cristais de sílica e sais de alumínio conseguem ativar o inflamassoma NLRP3 e resultar na liberação de IL-1 $\beta$ .(58)

Depois de ocorrida a secreção das IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , as proteínas se ligam em receptores específicos (IL-1R1), pertencentes a superfamília dos receptores do tipo Toll. Após a ativação há a comunicação de sinais via MyD88, o que resulta na ativação de prostaglandinas e transcrição do fator NF $\kappa$ B.(60)

Sabe-se que a atuação de IL-1 $\beta$  em conjunto com as citocinas IL-6, IL-23, e TGF-  $\beta$  implicam na ativação da resposta inflamatória Th 17, um importante fator para a defesa contra patógenos extracelulares e contra o desenvolvimento de doenças autoimunes, como a psoríase a artrite reumatoide (59, 60)

### 1.4.2 Interleucina 6

A IL-6 é um membro da família das citocinas pró-inflamatórias, e induz a expressão de uma variedade de proteínas relacionadas à inflamação aguda, além de desempenhar um papel importante na proliferação e diferenciação das células (61).

São várias as células que são capazes de secretar IL-6, entre as principais deve-se ressaltar os monócitos e macrófagos, entretanto, linfócitos T e B, além de hepatócitos, células endoteliais, queratinócitos, adipócitos e células tumorais também podem secretar essa proteína antes ou depois de serem estimuladas.(61)

O efeito da IL-6 é pleiotropico e pode influenciar a resposta imune e processos fisiológicos, como a produção de proteínas de fase aguda, inflamação, respostas imunes específicas, hematopoiese, apoptose, diferencial e metabolismo celular. Além do mais, a produção de IL-6 durante condições inflamatórias e infecções é induzida via o estímulo das células em resposta a IL-1 e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF $\alpha$ )(61, 62).

A sinalização de IL-6 é mediada pela formação de um complexo proteico, através da participação de receptores transmembrana de IL 6 (mIL-6R) ou com formas solúveis do receptor de IL-6 (sIL-6R) em conjunto com a subunidade transdutora de sinal gp130. Dessa forma, os eventos celulares proporcionados por essa interleucina podem ocorrer de três maneiras distintas, se ligando a mIL-6R (clássico), a sIL-6R (transapresentação), ou em razão da união de IL-6R em combinação com gp130. O controle da sinalização de IL-6 costuma ocorrer pela indução de moléculas supressoras após a ativação de citocinas(61).

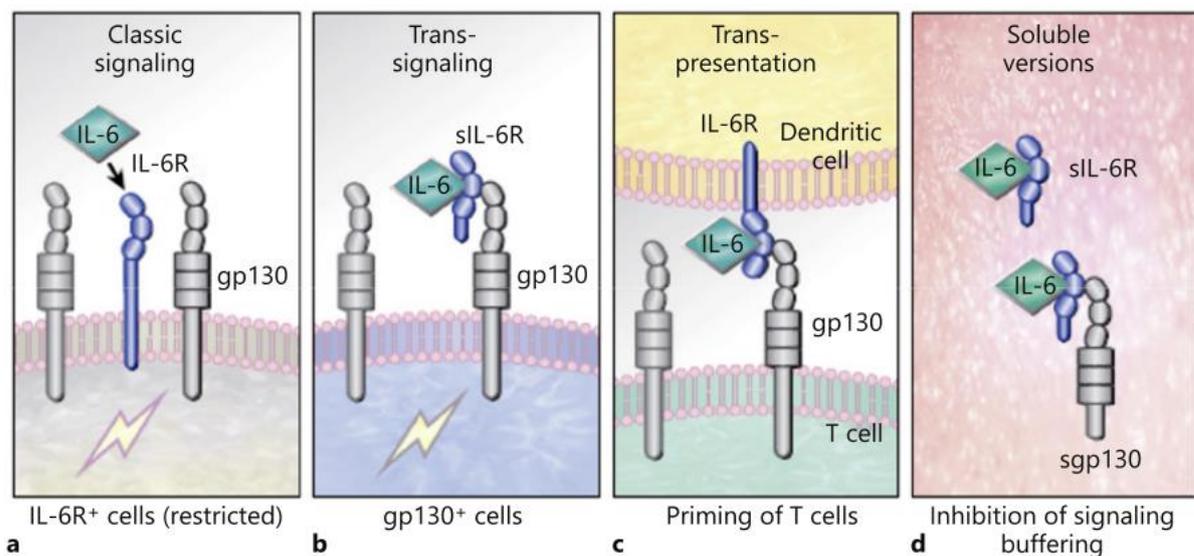


Figura 6 - Diferentes vias de ativação da IL-6.

Diferentes vias de ativação da IL-6 a) Sinalização clássica, restrita a alguns tipos celulares e conduzida após a ligação da IL-6 no receptor mIL-6R e a formação do complexo gp130 b) Trans sinalização conduzida pela IL-6 e todas as células que expressam gp130. Enquanto a estimulação clássica promove respostas anti-inflamatórias, a indução por trans-sinalização proporciona o desenvolvimento de respostas pró-inflamatórias c) Trans apresentação mediada pela interação do complexo transmembrânico de IL-6/IL-6R de células dendríticas d) forma solúvel de IL-6T e gp130 se ligando a IL-6 e ao complexo IL-6/IL-6R para bloquear a sinalização de IL-6. Fonte: Uciechowski P. e Dempke W. 2020.

Embora a IL-6 seja amplamente associada ao estímulo à inflamação, sabe-se que essa é a primeira citocina a ser liberada pelo músculo estriado esquelético em resposta a contração muscular decorrente da prática esportiva, sendo capaz de influenciar a mobilização de substratos energéticos como a liberação de glicose pelo fígado via glicogenólise e gliconeogênese (63) e até mesmo na quebra de lipídios no tecido adiposo, através da lipólise (64).

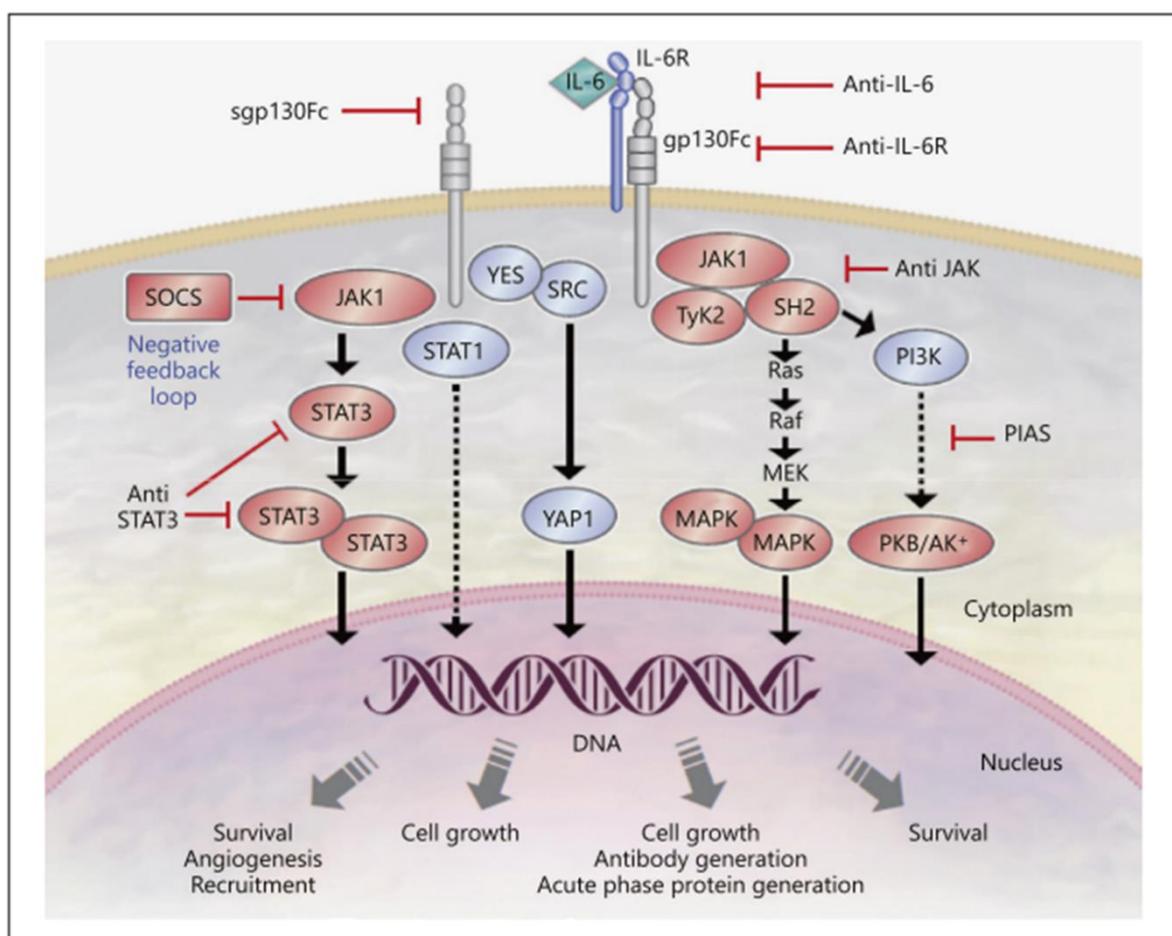


Figura 7 - Vias de sinalização da IL-6.

Três diferentes vias de sinalização da interleucina 6 (IL-6). A IL-6 pode se ligar a mIL-6R (sinalização clássica) ou a IL-6R (sinalização trans) ou ao complexo IL-6/IL-6R representado por células dendríticas e células T (apresentação trans). A sinalização clássica é inibida por anticorpos contra IL-6 e IL-6R. Os anticorpos contra IL-6, IL-6R e gp130 bloqueiam a trans-sinalização. A trans-apresentação só pode ser inibida por anticorpos contra IL-6R. Todos os três modos de sinalização resultam na homodimerização

da subunidade do receptor de transdução de sinal gp130, subsequentemente ativando as cascatas de sinalização intracelular JAK, STAT3, MAPK e PI3K. JAK1 é capaz de fosforilar resíduos de tirosina dentro da porção intracelular de gp130 e os quatro resíduos de tirosina carboxi-terminais 767, 814, 905 e 915 que servem como ponto de ancoragem intracelular para STAT3. Uma vez fosforilada, a STAT3 forma homodímeros e atua como fator de transcrição no núcleo. Há o início de ativação das vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK, além de uma retroalimentação negativa de SOCS3 que leva a inibição da sinalização. Legenda: mAbs, anticorpos monoclonais; sIL-6R, receptor solúvel de IL-6; mL-6R, receptor transmembrana de IL-6; JAK, Janus kinases, SH2, homólogo de SRC2; SHC, proteína contendo o domínio homólogo de colágeno SH2; SHP, tirosina fosfatase contendo domínio SH2; SOCS, supressores da sinalização de citocinas; MAPK, proteína quinase ativada por mitogeno; PI3K, fosfatidilinositol-3 quinase; PkB proteína quinase B; STAT, transdutor de sinalização e ativador de transcrição. Fonte: Uciechowski P. e Dempke W. 2020

#### 1.4.3 Proteína 1 Quimioatraente de Monócitos (MCP-1)

As quimiocinas são pequenas proteínas ligadas a heparina que constituem uma família de peptídeos semelhantes as citocinas, cuja maior função é a de regular o tráfego celular. Esses compostos podem ser classificados em quatro subfamílias, baseados no número e na localização dos seus resíduos de cisteína, sendo denominadas CXC, CC, CX<sub>3</sub>C e C. A Proteína 1 Quimioatraente de Monócitos (MCP1), também conhecida como CCL2, é um membro da família CC, composta por 76 aminoácidos cujo gene se localiza no cromossomo 17. Ainda se tratando da MCP1, ela é capaz de exercer uma importante quimioatração de monócitos, sendo produzida por diferentes células, como: monócitos, macrófagos, células endoteliais, células do músculo liso, fibroblastos, células epiteliais e mesenquimais, astrocitos e células da microglia (65)

Sabe-se que uma fração considerável de monócitos circulantes é capaz de migrar para os tecidos, diferenciando-se em macrófagos. Em contrapartida, as células dendríticas imaturas do tecido são capazes de irem para a circulação linfática, onde amadurecem e passam a apresentar antígenos para os linfócitos T(66)

A MCP-1 é um mediador chave na quimiotaxia dos monócitos e diferenciação de linfócitos, com um papel fundamental na patogênese de várias doenças, pois sob essas condições é capaz de regular o recrutamento dos monócitos e ativação de subpopulações de linfócitos. É comum ver essa atuação da MCP-1 em doenças cardiovasculares, aterosclerose, vasculopatias relacionadas a esclerose múltipla.(65)

De maneira paradoxal a MCP-1 é capaz de atuar na progressão de tumores, proporcionando a proliferação celular e angiogênese, ou até mesmo inibir a metástase ativando respostas imunes antitumorais.

Os maiores indutores da expressão de MCP-1 incluem citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-4, TNF $\alpha$ , Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), fatores de crescimento, fator de estímulo a formação de colônias de macrófagos (M-CSF), fatores de estímulo a formação de colônias de granulócitos (GM-CSF), fatores de crescimento endotelial (VEGF), lipopolisacarídeos, espécies reativas de oxigênio (ROS), lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDLs), entre outros.(67)

A interação da MCP-1 com seu respectivo receptor (CCR2) é crucial para os quadros de inflamação de maneira geral, fazendo com que ocorra a ativação do sistema imune inato com o concomitante recrutamento de monócitos para a região inflamada. (65, 66)

De maneira mais específica, ao analisarmos os processos fisiológicos que permeiam o tecido adiposo, sabemos que juntamente à hipertrofia dos adipócitos em função do aumento do consumo energético total, um fator preditivo para o desenvolvimento da obesidade e sobrepeso, observa-se que essas células passam a secretar proteínas quimioatraentes de monócitos ou MCP1. A secreção de MCP1 pelos adipócitos implica no aumento de monócitos e conseqüentemente de macrófagos no tecido adiposo de indivíduos obesos. Esse infiltrado de macrófagos é capaz de aumentar a secreção de uma variedade de outras proteínas que promovem uma resposta inflamatória local, que por conseqüência são capazes de influenciar a expressão gênica das células adiposas, como resultado, teríamos um aumento da resistência à insulina de maneira sistêmica (68)

#### 1.4.4 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ )

O fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória secretada por células do sistema imune, além de mastócitos, células endoteliais, cardíacas, neurônios, adipócitos e fibroblastos (69)

Em indivíduos saudáveis, o TNF $\alpha$  é praticamente indetectável, mas em condições de inflamação e infecção os seus níveis aumentam tanto na circulação quanto nos tecidos. Os efeitos biológicos dessas citocinas se manifestam através da ligação do TNF $\alpha$  com receptores TNFR1 e TNFR2, cuja regulação ocorre por diferentes tipos de células sob condições normais ou de doenças (69)

No caso dos TNFR1, eles costumam ser associados com respostas inflamatórias causadas por dano tecidual; Esses receptores são encontrados predominantemente no Complexo de Golgi das células, como se fosse um

reservatório, sendo expostos na superfície celular apenas quando há a necessidade. Já se tratando dos TNFR2, esse tipo de receptor se faz presente em células de linhagem hematopoiética e estão altamente relacionados com a isquemia e com a resposta inflamatória ao dano tecidual (70)

Ao se ligar a receptores TNFR1, o  $\text{TNF}\alpha$  é capaz de induzir a apoptose celular por dois caminhos distintos, o primeiro é pelo domínio de morte associado ao TNFR1 (TRADD), e o segundo pelo domínio rápido de morte associada (FADD). Já se tratando da interação com TNFR2, a sinalização envolve a mobilização e transcrição de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  para a promoção da transcrição de genes relacionados com a sobrevivência celular (69, 70).

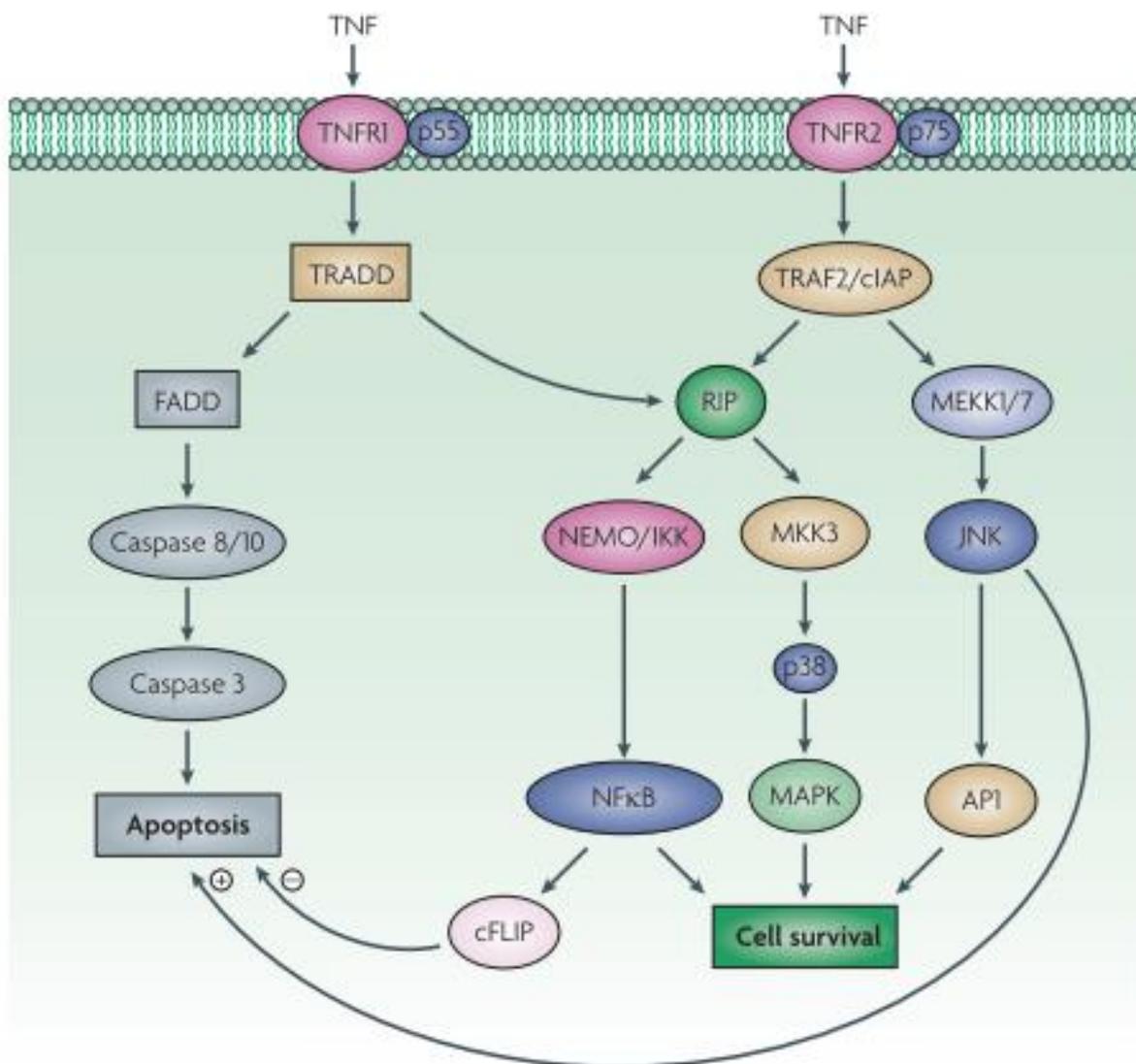


Figura 8 - Sinalização do  $\text{TNF}\alpha$  via TNFR1 e TNFR2.

O fator de necrose tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ) se liga ao receptor 1 de TNF (TNFR1) ou aos receptores 2 de TNF (TNFR2) para ativar duas sinalizações de eventos opostas. Em geral, a sinalização de TNFR1 é compreendida como um ponto gatilho na cascata de sinalização capaz de induzir a apoptose. Esses

efeitos dependem do tipo de célula em questão, do estado de ativação e do ciclo celular. Em contrapartida, a sinalização exclusivamente ocorrida via TNFR2, especialmente em linfócitos T ativados, induz a sobrevivência e proliferação celular. Legenda: AP1, proteína de ativação 1; cFLIP, proteína inibitória do tipo FLICE; cIAP, proteína de celular de inibição a apoptose; FADD, domínio rápido de morte associada; IKK, inibidor da quinase  $\kappa$ B; JNK, quinase da junção N terminal; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; MEKK, quinase quinase quinase ativada por mitógeno; MEKK3, proteína quinase quinase 3 ativada por mitógeno duplamente específico; NEMO, modulador essencial do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B); RIP, proteína interagindo com receptor; TRADD, domínio rápido de morte associada (FADD); TRAF, fator associado com receptor TNF.

O TNF $\alpha$  é um peptídeo capaz de influenciar o estado de inflamação do tecido adiposo, além de colaborar com a resistência a insulina em obesos. Essa molécula pode ser expressa por adipócitos maduros, células estromais e macrófagos, sendo que os seus níveis costumam ser maiores no tecido adiposo subcutâneo (71).

Um experimento conduzido com camundongos parcialmente ou totalmente deficientes em TNF $\alpha$  comparados com um modelo experimental selvagem, sob uma dieta normal em calorias, que comparou a adiposidade, sensibilidade a insulina e níveis de glicose e triglicérides circulantes, demonstrou que os animais transgênicos apresentam uma melhor tolerância a glicose. Interessantemente, as respostas as variações de glicemia dos camundongos com a mutação que foram submetidos ao consumo de uma dieta hiperlipídica foi semelhante a de camundongos normais (72)

#### 1.4.5 Interleucina 10

Há três famílias compostas pela interleucina 10 (IL-10), com nove membros no total. A primeira família, que conta com a participação apenas da IL-10 possui uma função extremamente importante nas respostas imunes inatas e adaptativas, sendo capaz de proporcionar uma imunossupressão em caso de lesão tecidual em que há um excesso e uma descontrolada resposta inflamatória direcionada. Se tratando do segundo grupo, composto pela subfamília da IL-20, em que há a participação da IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26; essas proteínas atuam nas células que compõem o tecido epitelial, além de células estromais que atuam nos mecanismos de defesa e controle da invasão de patógenos extracelulares. Por fim, o último grupo, composto pelas IL-28A, IL-28B, IL-29; costumam ser classificadas como interferons por compartilharem semelhanças biológicas e de sinalização, esse grupo também atua em células epiteliais (73).

A síntese de IL-10 foi previamente descrita em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, contudo, atualmente sabemos que essa interleucina pode ser sintetizada por linfócitos T CD8<sup>+</sup>,

linfócitos B, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos, além de células não hematopoiéticas, como por exemplo células epiteliais (73)

Como mencionado anteriormente, a IL-10 é extremamente importante no controle da inflamação, atuando de maneira a regular a resposta inflamatória e evitar excessos que desencadeiem danos teciduais desnecessários e até mesmo prevenindo inflamações crônicas (73)

A IL-10 é capaz de inibir a produção de interferon gama ( $IFN\gamma$ ) e IL-2, proporcionando assim uma imunossupressão, além do mais, consegue atuar no tecido epitelial sendo capaz de prevenir respostas imunes exacerbadas contra antígenos (74, 75)

Se tratando dos mecanismos de sinalização, os efeitos da IL 10 ocorrem através de receptores heterotetrâmicos de IL-10 (IL 10R), que consistem em duas cadeias alfa de receptores de IL-10 ligadas e dois acessórios de transdução beta pertencentes a família de receptores de interferons. As cadeias alfa de IL-10R são altamente expressas em macrófagos e células dendríticas, sendo que as cadeias IL-10R $\beta$  costumam estar presentes em todos os tipos de células (74-76)

Mecanicamente, a IL-10 é capaz de inibir a função das células apresentadoras de antígeno, como os macrófagos e células dendríticas, através da diminuição da maturação dessa células, além de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ . Os efeitos da IL-10 são mediados pela via Janus kinase 1 (JAK1)/Tyk2/STAT3 (73, 75, 76)

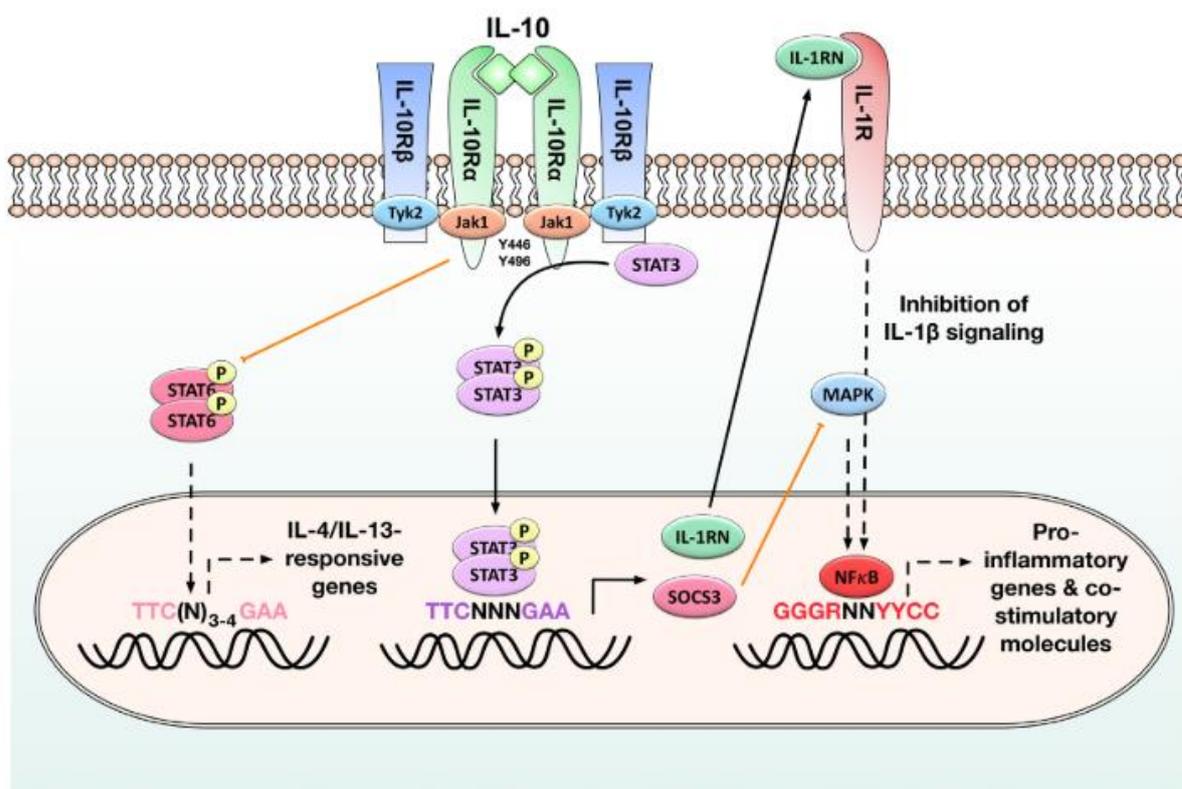


Figura 9 - Efeitos intracelulares da IL-10.

Sinalização imunomodulatória em células apresentadoras de antígeno (APCs) induzida pela ligação da interleucina-10 (IL-10) ao receptor de IL-10. A ativação da via IL-10 / Janus quinase 1 (JAK1) / tirosina quinase 2 (Tyk2) / transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) em APCs resulta na fosforilação de STAT3 pelo receptor de interleucina 10 (IL-10R) complexo e a translocação subsequente de homodímeros STAT3 para o núcleo. Os homodímeros de STAT3 se ligam a elementos de ligação a STAT e conduzem a expressão de genes responsivos a STAT-3, como o supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS-3) e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RN): SOCS-3 inibe eficientemente o mitógeno ativação da proteína quinase ativada (MAPK), translocação de NFκB para o núcleo e a subsequente indução da expressão do gene pró-inflamatório, enquanto a proteína IL-1RN suprime a sinalização pró-inflamatória normalmente iniciada pela ligação de IL-1β ao seu receptor. A ativação de STAT3 também inibe a ativação de STAT6 e, portanto, a expressão de genes responsivos a IL-4 / IL-13. Por esses eventos, a IL-10 reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, fator de necrose tumoral alfa) e diminui a expressão do complexo principal de histocompatibilidade II e moléculas coestimulatórias (CD80, CD83, CD86) em APCs. Setas pretas: ativação das vias de sinalização indicadas, setas laranja: inibição das vias de sinalização indicadas, setas pretas tracejadas: vias normalmente induzidas pelas moléculas indicadas que são inibidas na presença de ativação de STAT3. Para obter informações mais detalhadas, consulte a seção "IL-10 é uma citocina importante que limita as respostas imunológicas excessivas". Fonte: Schulke, S. 2018

#### 1.4.6 Antagonista do Receptor de Interleucina 1 (IL-1ra)

Sabe-se da existência de muitos inibidores de interleucina 1, incluindo o receptor antagonista de IL-1 (IL 1ra), IL-1R tipo II (IL-1RII), SIGIRR (molécula relacionado a Ig IL-1R, também conhecida como TIR8).(59, 77)

A IL-1ra foi a primeira citocina descrita com a função de atuar como um antagonista de receptor, de maneira a competir pela ligação da IL-1 com seus

respectivos receptores celulares. A IL-1ra pode ser sintetizada de quatro diferentes isoformas por intermédio de diferentes exons. Uma das isoformas da IL-1ra é solúvel (sIL-1ra), e portanto, secretada pela célula. Já as demais permanecem no meio intracelular, e só são liberadas em circunstâncias em que a célula morre, são elas a icIL-1ra1, icIL-1ra2, icIL-1ra3 (77)

### **1.5O exercício físico como fator estimulante para a secreção de moléculas**

Como mencionado anteriormente, o sedentarismo é um dos maiores problemas de saúde pública do século XXI, estando diretamente relacionado com o desenvolvimento de diversas DCNTs, sendo assim, é capaz de comprometer a qualidade de vida de pessoas em diferentes populações (78).

A prática regular de atividade física, tem sido relacionado com a otimização do metabolismo aeróbico na conservação de energia, resultando em adaptações benéficas capazes de diminuir as chances de desenvolver DCNTs (11, 79). Em relação aos possíveis benefícios do exercício físico na intolerância à glicose, uma meta-análise realizada com 4191 artigos acerca do assunto, indica que o exercício aeróbico, resistido, ou ambos combinados, esteve associado com uma redução da hemoglobina A (1c) (HbA(1c)) em pacientes com diabetes tipo 2 (79).

O músculo estriado esquelético compreende cerca de 40% da massa corporal total de um indivíduo adulto saudável, sendo que, esse tecido juntamente com o tecido cardíaco é responsável por aproximadamente 30% do consumo da energia em repouso, e 100% do aumento do gasto energético durante a atividade física (80).

Sabe-se que o músculo estriado esquelético é composto por fibras heterogêneas, podendo ser divididas em fibras de contração lenta e rápida, que se diferenciam na composição de proteínas contráteis e capacidade oxidativa. No caso das fibras de contração lenta, estas são mais resistentes a fadiga, apresentam alta capacidade oxidativa, e uma facilidade para a utilização de ácidos graxos como substrato para a obtenção de ATP. Ao passo que as fibras de contração rápida são altamente fadigáveis, com alta força de contração, baixa capacidade oxidativa, e dessa forma, a maior parte do ATP obtido ocorre pela via glicolítica (81).

As células do músculo estriado esquelético secretam uma vasta gama de proteínas, chamadas coletivamente de miocinas, capazes de desempenhar função autocrina, parácrina ou endócrina. As repetidas contrações realizadas durante a atividade física são estimulantes para que ocorra a síntese destas proteínas pelo

músculo estriado esquelético. É importante ressaltar que, as miocinas sintetizadas e influenciadas pelo exercício físico, são capazes de atuar na comunicação entre o músculo esquelético, o tecido adiposo, fígado e pâncreas (11, 81, 82).

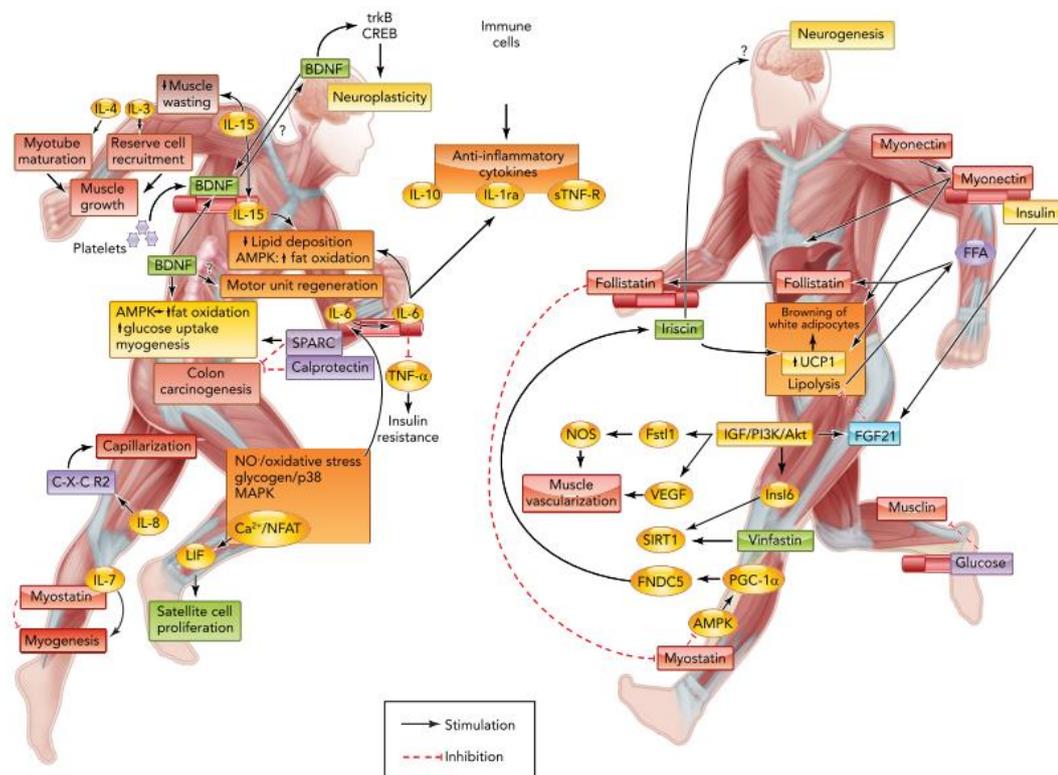


Figura 10 - Produção de miocinas pelo músculo estriado esquelético.

O estímulo mecânico decorrente das contrações musculares e alterações metabólicas decorrentes da atividade física promovem a liberação de uma gama de proteínas e peptídeos com efeitos pleiotrópicos, por se tratarem de moléculas derivadas do músculo estriado esquelético, atribuímos o nome de miocinas. Fonte: Fiuza-Luces, C., 2013.

Contudo, durante o exercício físico, há um ajuste metabólico em diversos tecidos sob estresse, assim vários órgãos e tipos celulares alteram a capacidade de secretar produtos com capacidade pleiotropica. Sabemos que durante uma única sessão de treinamento (sessão aguda) ou durante o treinamento crônico, não apenas o músculo estriado esquelético é capaz de secretar produtos capazes de intermediar a comunicação entre as células, mas sim outros vários tecidos que porventura também estejam sendo impactados pelo exercício físico, como por exemplo o tecido adiposo, hepático, imunológico, entre outros. O termo “exercinas” propõe uma nomenclatura mais abrangente e dessa forma faz referência ao conjunto de peptídeos e ácidos nucleicos secretados através de vesículas pelos vários tecidos do corpo, cuja

característica em comum é ter o exercício físico como agente estimulador para tal secreção (83).

Sabe-se que a IL 6 pode ser sintetizada não somente por células do músculo esquelético, mas também por adipócitos e células imunológicas, e que embora a IL 6 apresente características anti-inflamatórias, essas só são manifestadas quando esta citocina é expressa pelo músculo, pois, quando produzidas pelas células imunológicas, como por exemplo macrófagos, ela é capaz de atuar em vias pró-inflamatórias. Basicamente, o que irá determinar a atuação desta proteína é o ambiente ao qual ela está submetida (82, 84).

As repetidas contrações musculares durante o exercício físico estimulam a síntese de IL-6. Dessa forma, tanto em fibras do tipo I, quanto do tipo II e células satélites são capazes de sintetizá-la, sendo que o exercício intenso, como por exemplo a corrida em atletas treinados ou caminhada para a população geral, são fatores estimulantes para a sua produção. Estes exercícios possuem em comum a característica de promover o trabalho de grandes grupamentos musculares, e não resultam em microlesões. A IL-6 pode estar relacionada com o aumento da intensidade e duração do exercício, sendo que seus níveis plasmáticos aumentam durante a atividade física (32). Essas características são seguidas de um aumento da IL 1 "*receptor antagonist*" (IL-1ra), e IL-10 (84). Adicionalmente, a IL-6 no músculo estriado esquelético, é suscetível a possíveis variações do glicogênio (85). Embora a IL 6 possa apresentar características anti-inflamatórias, estas só são manifestadas quando esta citocina é expressa pelo músculo, pois, no caso de sua síntese por células imunológicas, principalmente por macrófagos, ela é capaz de atuar em vias pró-inflamatórias. Sendo assim, como mencionado anteriormente, o que determina a atividade desta proteína é o ambiente ao qual ela está submetida (84).

É sugerido que a IL-15, outro tipo de miocina, atua de maneira anabólica no tecido muscular estriado esquelético, mas também é responsável por estabelecer uma interação entre o tecido muscular e o adiposo, de forma a controlar a deposição de ácidos graxos no tecido adiposo e fígado (20).

Logo, como era de se esperar muito se tem discutido acerca da capacidade endócrina do músculo estriado esquelético sendo capaz de influenciar diferentes órgãos e tecidos e conferir benefícios na prevenção e no tratamento de diferentes doenças. Contudo, ainda não se sabe se a restrição calórica comumente adotada por

grande parte dos adeptos das pessoas fisicamente ativas e de entusiastas dos esportes é capaz de influenciar na produção de exercinas em detrimento do treinamento físico aeróbico.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar as influências da restrição calórica no perfil de exercinas produzidas durante o treinamento físico aeróbio em um modelo experimental, verificando possíveis variações no perfil de miocinas anti-inflamatórias.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar se a restrição calórica é capaz de influenciar no perfil de miocinas secretadas em decorrência do exercício físico

Investigar essa abordagem nutricional como uma possível intervenção que aja em sinergismo com o exercício físico aeróbico para a promoção de uma resposta anti-inflamatória.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e grupos experimentais

Os animais foram obtidos da Universidade de São Paulo e mantidos em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12h escuro) e temperatura (22°C - 25°C) no biotério de experimentação da universidade no Instituto de Ciências Biomédicas I (ICB-I).

Foram utilizados 48 Camundongos C57Bl/6, machos, com 7 semanas de idade, pesando entre 18-22 gramas. Estes animais foram divididos em 4 grupos, como demonstrado na Figura 3, sendo eles: Grupo Controle (C), não submetido a restrição calórica, nem ao treinamento físico aeróbico (n=12); Grupo Exercício (EX), submetido ao protocolo de treinamento físico aeróbico, e sem restrição calórica (n=12); Grupo Restrição Calórica (CR), submetido apenas ao protocolo de restrição calórica, e não submetido ao treinamento físico aeróbico (n=12); Grupo Exercício e Restrição Calórica (EX + CR), submetido tanto ao protocolo de treinamento físico aeróbico, quanto a restrição calórica (n=12).

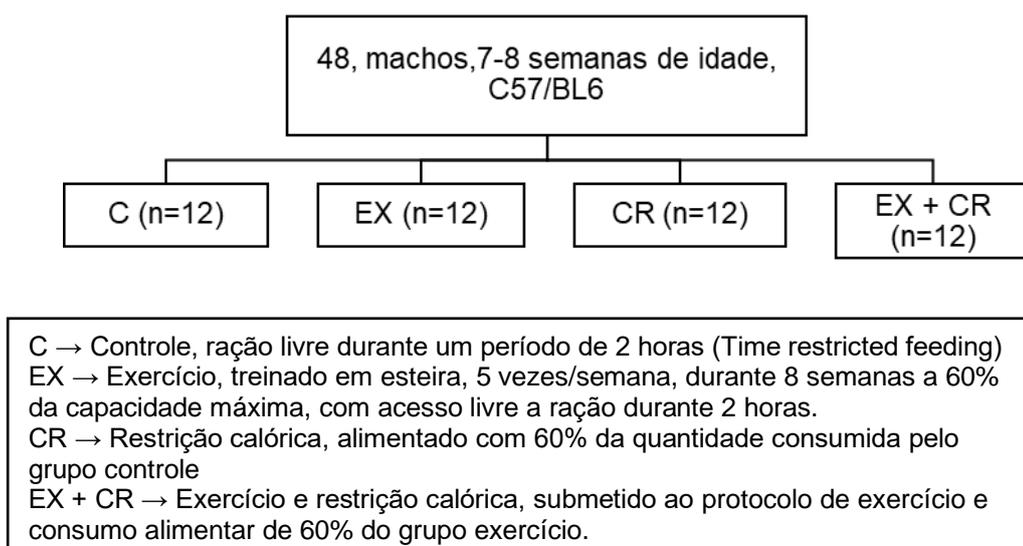


Figura 11 - Distribuição dos grupos experimentais

### 3.2 Delineamento do experimento

A proposta consistiu em submeter camundongos C57/BL6 ao treinamento físico aeróbico, e/ou a uma dieta calórica restritiva, e verificar a influência da restrição calórica na expressão de proteínas no músculo estriado esquelético e tecido adiposo.

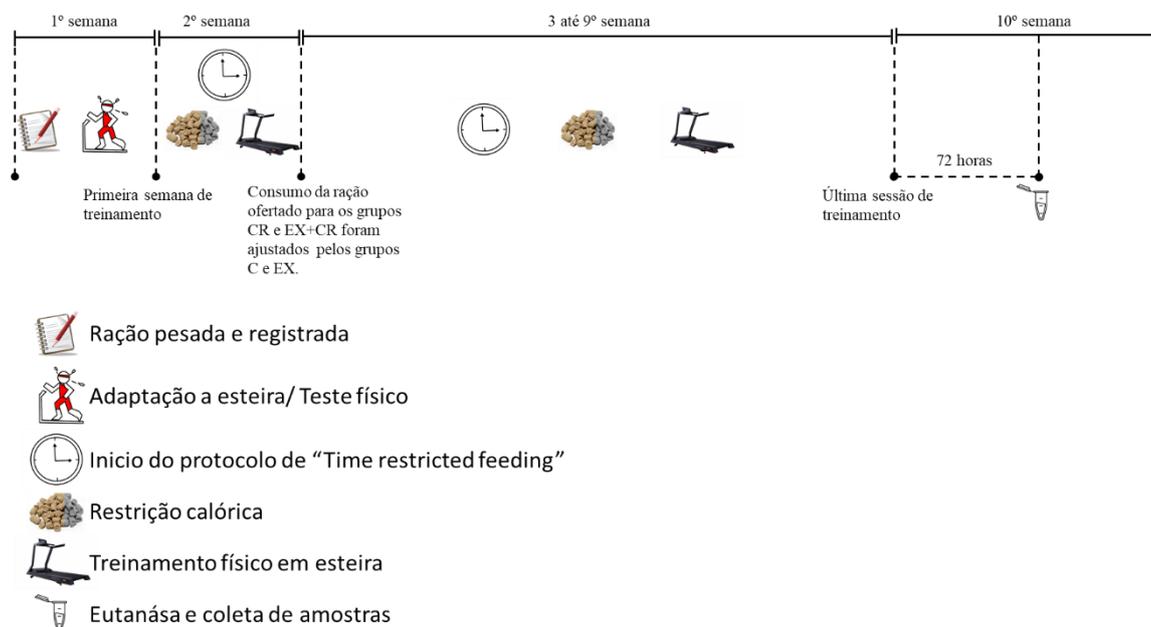


Figura 12 - Linha do tempo do projeto

### 3.3 Protocolo de Restrição Calórica

Visando contornar o possível problema de que os camundongos submetidos ao protocolo de restrição calórica consumiriam toda a ração em menos de 24 horas, ao passo que os grupos que não eram submetidos a esse protocolo teriam a oferta de ração livre, ou seja, a ração ficaria disponível para eles por tempo indeterminado, e que os diferentes tempos de jejum pudessem influenciar variáveis fisiológicas ou fazer com que os alguns animais fossem submetidos ao treinamento físico em jejum, ao passo que os demais não, o trabalho adotou um protocolo de *Time Restricted Feeding*. Dessa forma todos os camundongos, inclusive os do grupo controle, foram submetidos a um protocolo de alimentação restrita por tempo, sendo que os grupos experimentais tinham 2 horas para consumirem a ração ofertada naquele período.

Os registros do consumo alimentar dos camundongos iniciaram na semana 1 do projeto, sendo ofertada sem restrições uma dieta capaz de suprir às necessidades preconizadas na AIN-93M (86), essas semanas iniciais serviram para que se obtivesse dados relativos ao consumo médio de ração dos camundongos. Na segunda

semana, todos os animais iniciaram o protocolo de “Time Restricted Feeding”. Esse protocolo consiste na oferta de ração AIN-93M durante um período de 2 horas por dia, sendo que as quantidades poderiam variar em função do grupo experimental, ou seja, os grupos C e EX tiveram livre acesso a ração, ao passo que os grupos CR e EX+CR consumiram quantidades pré-determinadas.

Ao longo da segunda semana de experimento, os grupos CR e EX+CR tiveram acesso a 60% das respectivas quantidades consumidas ao longo da primeira semana.

A partir da terceira semana do experimento, as quantidades ofertadas aos grupos CR e EX+CR foram de 60% do consumo registrado nos grupos C e EX respectivamente.

### **3.4 Protocolo de treinamento aeróbio**

Os grupos EX e EX+CR foram submetidos ao treinamento aeróbio em esteira ergométrica para camundongos com uma frequência de 5 dias por semana, durante 7 semanas. Na semana antecedente ao início do protocolo de treinamento, os animais foram adaptados à esteira, e submetidos ao teste físico, que serviu para determinar a velocidade de treinamento dos camundongos. O treinamento consistiu em 5 minutos iniciais de aquecimento, e 5 minutos finais de resfriamento, com cinquenta minutos de treinamento aeróbico de intensidade moderada, correspondendo a velocidade de 60% a média alcançada pelos grupos no teste físico.

### **3.5 Eutanásia dos Animais**

Houve a eutanásia 72 horas após o último dia de treinamento, via decapitação. As amostras de sangue foram coletadas, centrifugadas a 10000 G a 4°C por 5 minutos, o soro foi retirado, armazenado em tubos e acondicionado a -80°C.

### **3.7 Teste de sensibilidade à insulina**

Todos os animais foram submetidos ao teste de resistência à insulina no final do projeto. Desta forma, os animais permaneceram em jejum por 6 horas (6:00 até 12:00), com acesso livre a água. A glicemia dos camundongos foi aferida com o auxílio de um glicosímetro digital (Accu-Check Active), sendo essa coleta denominada o momento zero. Em seguida, ocorreu a administração de insulina regular humana (0,75 U/kg) via intraperitoneal. A partir dessa administração, a glicemia dos camundongos foi aferida em intervalos de 5 minutos, desde o momento inicial até 30 minutos após a

administração da insulina. As amostras foram obtidas no ponto distal da cauda dos animais. Os resultados obtidos foram empregados para o cálculo da taxa de decaimento da glicemia (KITT) e expressos em percentual para a avaliação da velocidade de decaimento após a injeção (%/min).

### **3.8 Extração de tecidos**

Os tecidos adiposos (mesentérico, retroperitoneal e subcutâneo) foram extraídos de todos os animais, bem como os músculos sóleo, gastrocnêmio e músculo extensor longo dos dedos (EDL). Todas as amostras obtidas foram armazenadas e divididas em duas alíquotas por tecido.

### **3.10 Homogeneização dos tecidos**

As amostras dos tecidos obtidos foram homogeneizadas em tampão RIPA (0,625% de Nonidet P-40, 0,625% de desoxicolato de sódio, fosfato de sódio 6,25mM, e 1mM de ácido tetra-acético de etilenodiamina a pH 7,4) contendo 10 ug/ml do cocktail com inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 14000G durante 30 min à 4° C, o sobrenadante retirado, e a avaliação da concentração de proteína foi determinada utilizando o ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Califórnia).

### **3.11 Avaliação quantitativa de proteínas**

Foram mensurados os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP1, TNF $\alpha$ , IL-17, IL-1ra e IL-10, no tecido adiposo, músculo estriado esquelético (gastrocnêmio) e fígado por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) seguindo as orientações do fabricante (DuoSet ELISA ® R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

### **3.12 Determinação da expressão gênica**

No tecido adiposo, foram verificados os genes envolvidos na inflamação MCP1, TNF $\alpha$  e NF- $\kappa$ B). Os tecidos foram homogeneizados em reagente TRIZOL para extração do RNA total (87). O RNA foi quantificado por leitura em espectrofotômetro a 260 nm (A260 nm = 1 corresponde a 44  $\mu$ g/mL) e o grau de pureza determinado pela razão 260/280 nm (razão igual a 2 indica alto grau de pureza). O cDNA foi sintetizado a partir de 2 $\mu$ g do RNA total extraído utilizando a transcriptase reversa. A expressão gênica foi quantificada por PCR em tempo real, utilizando o aparelho ROTOR GENE 3000 da Corbett Research (Mortlake, NSW, Austrália) e SYBER Green

como marcador fluorescente. A quantificação da expressão dos genes foi realizada usando o método da Ct comparativa (Ct = threshold cycle; número de ciclo no qual o produto do PCR atinge um limiar de detecção), tendo a expressão da HRTP1 como padrão interno.

**Tabela 3 Sequência de primers sense e antisense utilizados no qRT-PCR.**

Gene	Primer Sense (5' – 3')	Primer Anti-Sense (3' – 5')
HPRT1	CCCTGGTTAAGCAGTACAGCCCC	AGTCTGGCCTGTATCCAACACTTCG
MCP-1	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT	TAAAAACCTGGACGGAACCAAA
TNF $\alpha$	TCTACTGAACTTCGGGGTGA	GATCTGAGTGTGAGGGTCTGG
NF-kB	CCAAGTGGCAGGTATTTGAC	GCTGCTTCATGTCCCCTTG

### 3.13 Análise estatística

Os dados foram analisados através do software SigmaStat 3.1 (Califórnia, EUA). A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para comparação entre os grupos. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA on Ranks seguido pelo teste de Dunn's para a comparação entre os grupos. Os níveis de significância foram ajustados para 5% ( $p < 0.05$ ). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0 (Califórnia, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise da composição corporal e variáveis metabólicas

Podemos observar na Tabela 4 os resultados referentes a massa corporal total dos camundongos bem como a massa de diferentes tecidos obtidos. Segundo os dados, a restrição calórica feita isoladamente ou em conjunto com o exercício físico, foi capaz de reduzir a massa do tecido adiposo subcutâneo quando comparado com os grupos controle e exercício físico. Ao analisarmos o músculo estriado esquelético é possível verificar que a restrição calórica feita isoladamente ou em conjunto com o exercício físico pôde garantir alterações na massa do gastrocnêmio, contudo, nenhuma diferença é observada no músculo sóleo.

Ambos os protocolos de treinamento físico ou de restrição calórica foram capazes de diminuir a massa corporal total em comparação com o grupo controle. Contudo, a restrição calórica ou a restrição calórica somado ao exercício físico foi capaz de promover uma diminuição mais acentuada desses valores, não havendo diferenças entre os CR e EX+CR.

Tabela 4 - Massa absoluta total e de diferentes tecidos de todos os grupos

Grupos	Tecido adiposo subcutâneo	Fígado	Gastrocnêmio	Sóleo	Massa corporal total
Controle	0,23 ± 0,041	1,10 ± 0,314	0,24 ± 0,025	0,014 ± 0,002	24,15 ± 1,275
Exercício	0,25 ± 0,057	1,18 ± 0,090	0,23 ± 0,013	0,013 ± 0,002	22,59 ± 1,048 <sup>a</sup>
Restrição calórica	0,07 ± 0,041 <sup>a,b</sup>	0,88 ± 0,161 <sub>a,b</sub>	0,17 ± 0,022 <sup>a,b</sup>	0,012 ± 0,001	17,49 ± 0,845 <sup>a,b</sup>
Exercício + Restrição calórica	0,13 ± 0,060 <sup>a,b,c</sup>	1,04 ± 0,090	0,14 ± 0,023 <sup>a,b,c</sup>	0,017 ± 0,026	18,52 ± 1,505 <sup>a,b</sup>

Nota. Os valores estão representados por média e desvio padrão ± dos dados obtidos de todos os grupos experimentais. As diferenças entre (0,05).

(a) quando comparado com o grupo controle

(b) quando comparado com o grupo Exercício

(c) quando comparado com o grupo Exercício + Restrição calórica

Todos os camundongos foram pesados três vezes por semana, os dados foram convertidos em médias semanais, e as oscilações de massa corporal total podem ser observadas na figura 13.

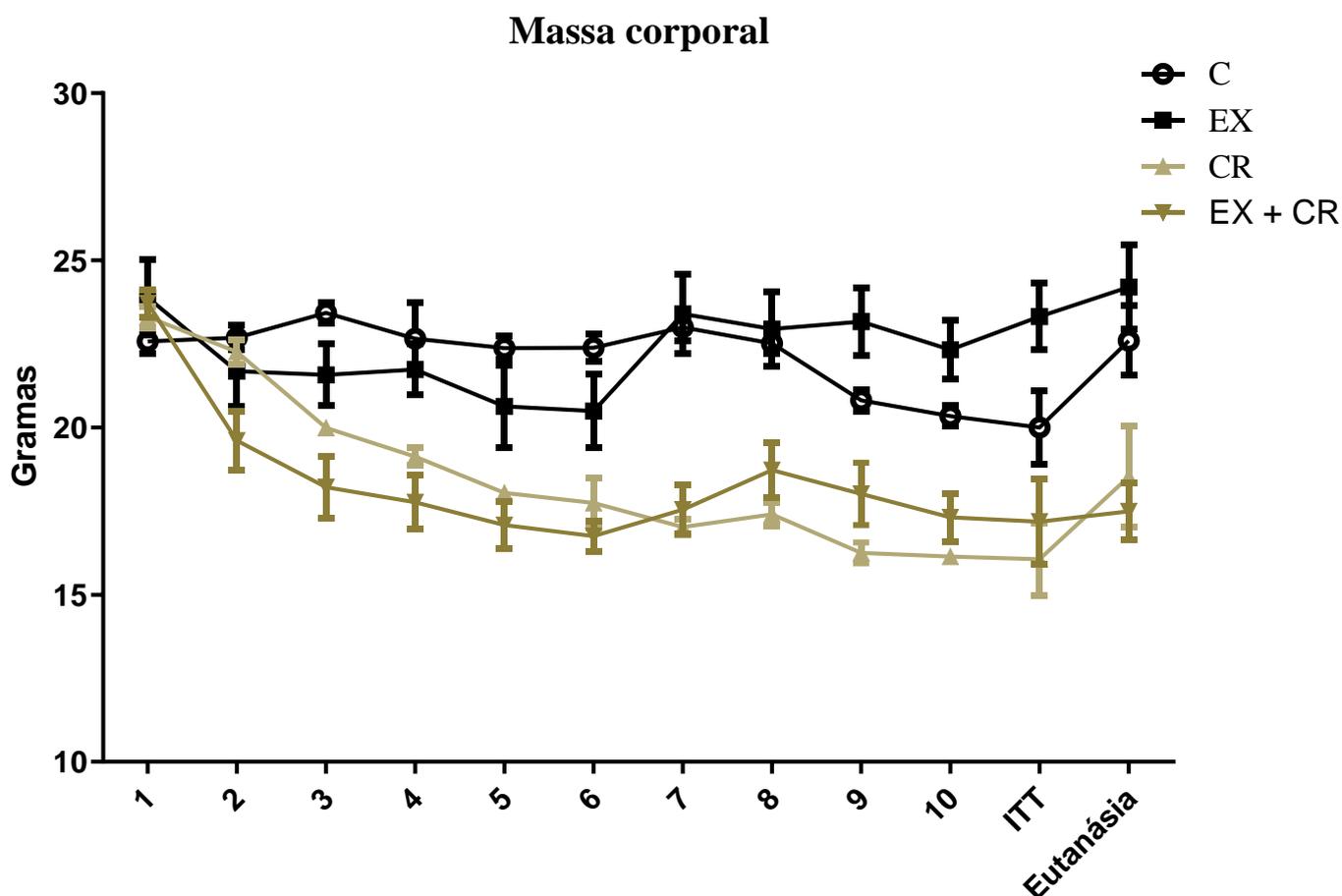


Figura 13 - Variação de massa corporal dos camundongos

Todos os animais foram pesados três vezes por semana para a obtenção de uma média semanal. Adicionalmente, a massa corporal total foi mensurada no dia do teste de resistência à insulina (ITT) e no dia da eutanásia. Variação de massa corporal semanal (média  $\pm$  erro padrão representado pelas barras)

Com o objetivo de obter dados mais precisos relativos a composição corporal dos camundongos, e utilizando métodos práticos, foi calculado o índice de adiposidade dos animais. Esse cálculo leva em consideração a somatória da massa do tecido adiposo retroperitoneal, subcutâneo e epididimal; divididos pela massa corporal total e multiplicado por 100 (percentual). Dessa forma, os resultados apontam que os grupos EX e CR+EX obtiveram um menor índice de adiposidade quando comparados com os grupos controle e restrição calórica. Utilizando do mesmo raciocínio para a obtenção do índice de adiposidade, foi calculado também o índice de musculatura, que levou em consideração a massa do músculo gastrocnêmio, sóleo e erector longo do dedo (EDL). Logo, através da análise da Figura 6b, é possível verificar que a restrição calórica em conjunto ao exercício físico diminuiu esse parâmetro no comparativo com os demais grupos experimentais.

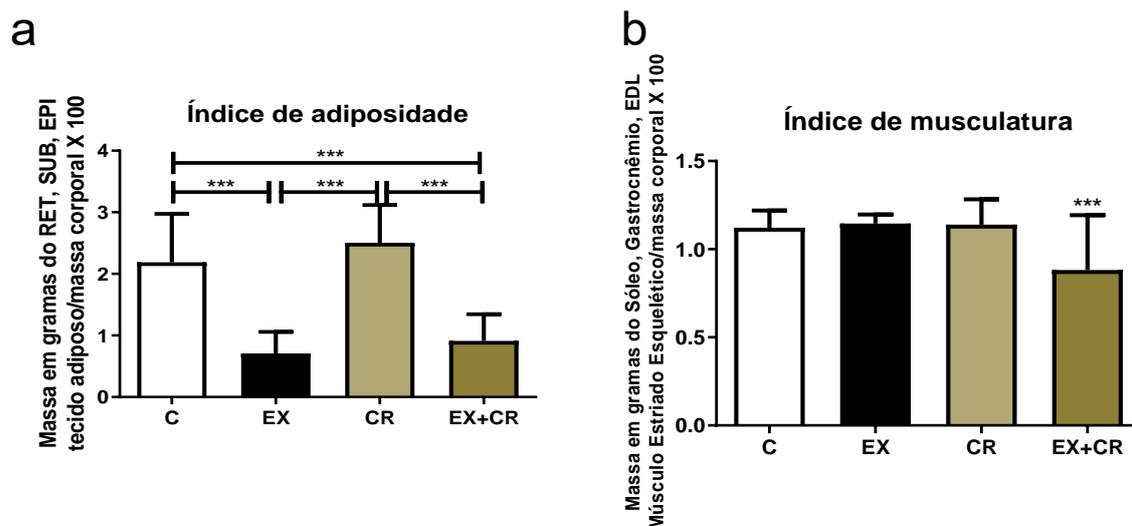


Figura 14 - Índice de adiposidade e musculatura.

A Figura 14a demonstra o índice de adiposidade que é calculado a partir da somatória da massa do tecido adiposo retroperitoneal, subcutâneo e epididimal; dividido pela massa corporal total e multiplicado por 100. O exercício físico isoladamente ou em conjunto com a restrição calórica, foi capaz de diminuir o índice de adiposidade. Na figura 14b podemos verificar o índice de musculatura, calculado a partir da somatória da massa do músculo sóleo, gastrocnêmio e EDL; divididos pela massa corporal total e multiplicado por 100. Dessa forma, o menor índice de musculatura foi observado no grupo EX+CR. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SE. Significância \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

Sabendo da importância do tecido hepático para o controle metabólico, bem como a sua suscetibilidade a variações nutricionais e energéticas, como por exemplo, o conteúdo de glicogênio que pode influenciar diretamente na massa desse tecido, o fígado foi pesado e dessa forma foi possível constatar uma diminuição no peso absoluto desse órgão no grupo EX em comparação com C e CR, sendo que os mesmos resultados não foram observados em EX+CR, conforme demonstrado na Figura 15a. Contudo, ao relativizar a massa do fígado com a massa corporal total dos camundongos, como visto na Figura 15b, não há diferenças com significância estatística.

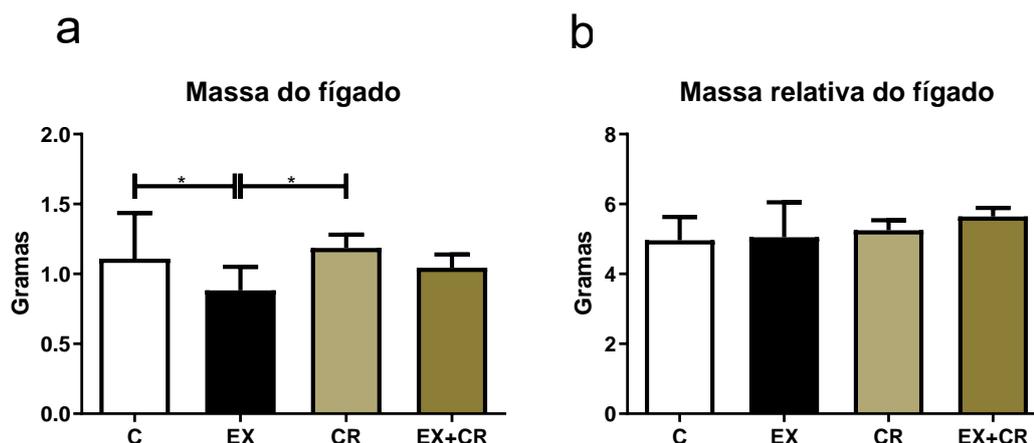


Figura 15 - Massa hepática total e relativa.

O grupo EX apresentou menor massa hepática em comparação com C e CR (Figura 15a). Contudo, ao relativizar a massa hepática com a massa corporal total, não há diferença entre os grupos (Figura 15b). Os valores estão expressos em média  $\pm$  SE. Significância \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

Ao avaliarmos a glicose sérica, foi possível constatar que o exercício físico somado a restrição calórica foi capaz de diminuir a glicemia do grupo EX+CR, conforme demonstrado na Figura 16a. Em contrapartida, ambos os grupos que foram submetidos ao treinamento físico, ou seja, o EX e EX+CR, apresentaram maiores níveis de ácidos graxos séricos não esterificados (Figura 16b), ao passo de que não houve diferença no colesterol sérico de nenhum dos grupos.

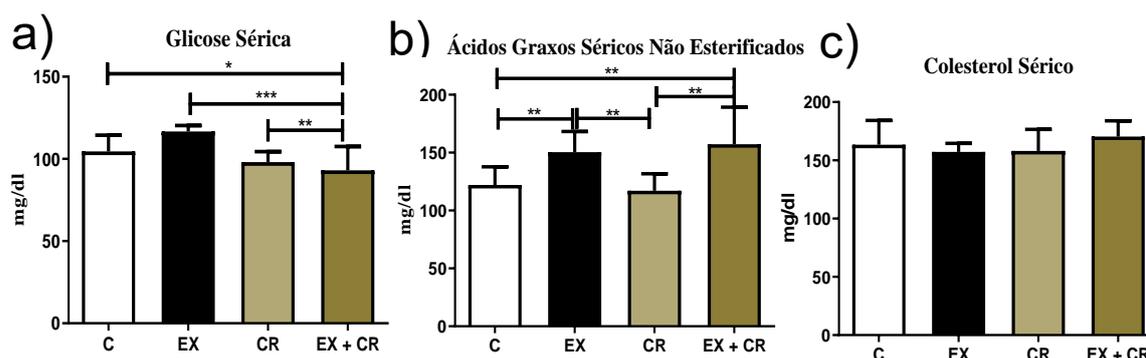


Figura 16 - Glicose, ácidos graxos não esterificados e colesterol sérico.

O grupo EX+CR apresentou menores níveis de glicose sérica (Figura 16a). Os grupos EX e EX+CR obtiveram maiores níveis de ácidos graxos não esterificados em comparação com o grupo C e CR (Figura 16b). Na análise do colesterol sérico, não houve diferença entre os grupos experimentais. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SE. Significância \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

No teste de resistência à insulina demonstrado na Figura 17, podemos ver que a curva de decaimento de glicemia demonstra uma única diferença entre os grupos EX e EX+CR aos 25 minutos após a administração da insulina. Contudo, já na Figura 17b, é possível ver que o grupo EX+CR teve um menor percentual de decaimento por minuto em comparação com os demais grupos experimentais.

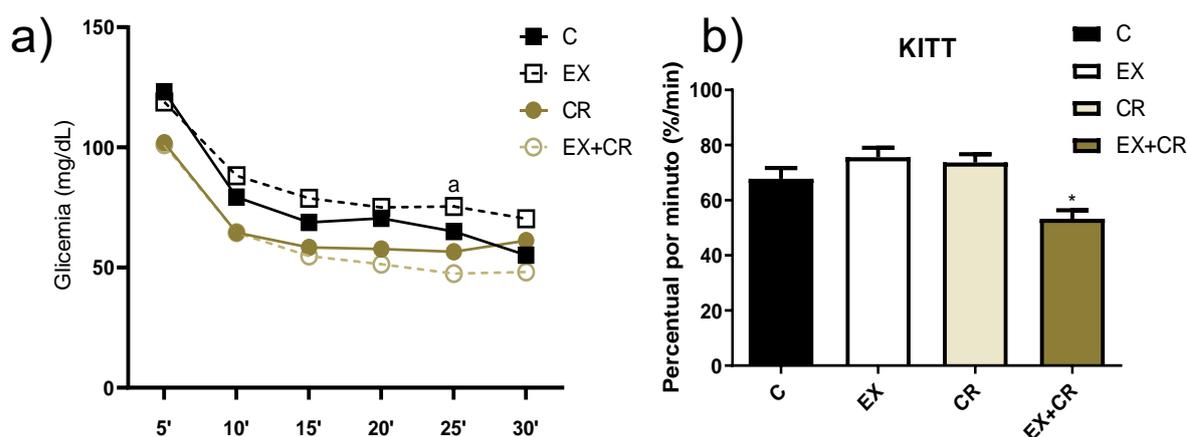


Figura 17 - Teste de sensibilidade à insulina e taxa de decaimento da glicemia.

A figura demonstra a curva de decaimento da glicemia ao longo do teste de resistência a insulina, dessa forma é possível ver uma única diferença entre os grupos EX e EX+CR aos 25 minutos após à administração de insulina nos camundongos. O grupo EX+CR apresentou um menor percentual por minuto na curva de decaimento da glicemia em comparação com os demais grupos experimentais. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SE. Significância \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

#### 1.64.2 Análise do tecido adiposo

Constatamos que o grupo sedentário que foi submetido a restrição calórica teve maiores quantidades de IL 1 $\beta$  em comparação com C (falta o p-value de todas as comparações). Entretanto, conforme demonstrado na Figura 18a, esse mesmo resultado parece ser anulado pelo treinamento físico, uma vez que, os níveis dessa citocina nos grupos EX e EX+CR permanecem sem diferença estatística em comparação com o grupo controle. É plausível ainda que a restrição calórica seja capaz de aumentar as quantidades de MCP1 no tecido adiposo, uma vez que essa proteína esteve aumentada nos grupos CR e EX+CR, conforme demonstrado no gráfico da Figura 10b.

Um dos efeitos da adoção da restrição calórica de maneira concomitante com o treinamento físico é o aumento do TNF $\alpha$  e da IL-6, sendo possível observar nas Figuras 18c e 18d, respectivamente, um aumento dessas proteínas no tecido adiposo subcutâneo em comparação com o grupo controle.

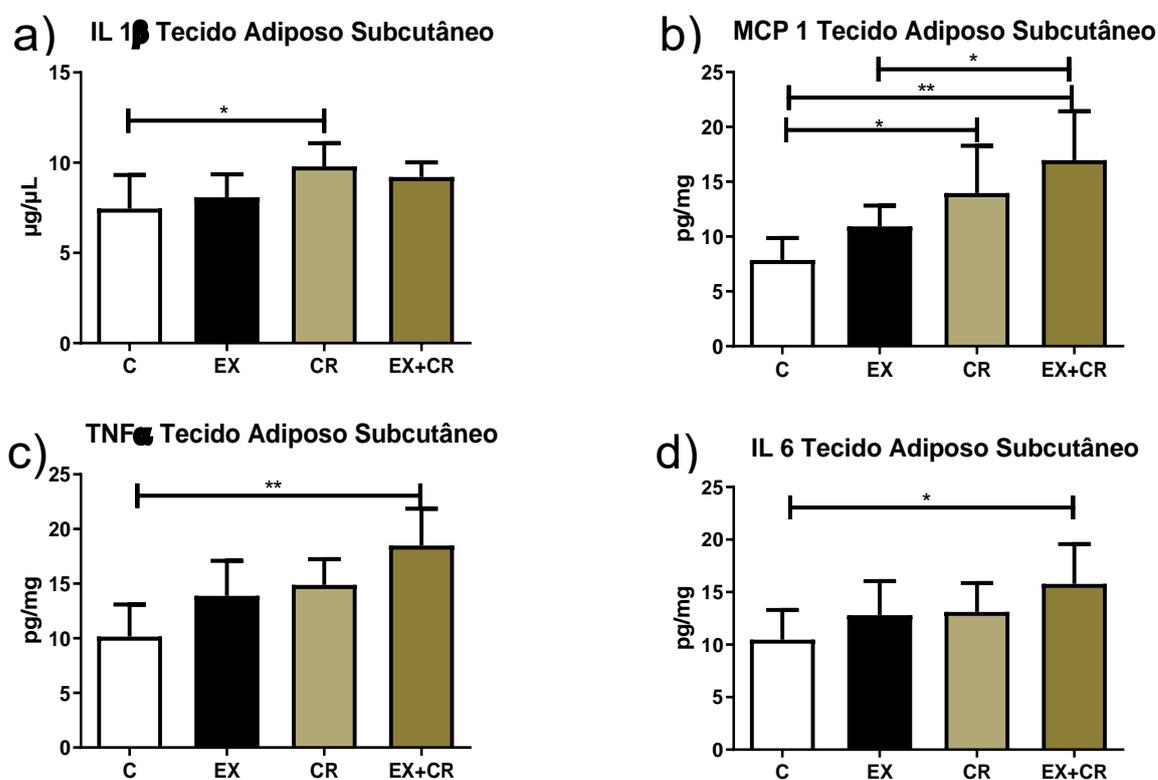


Figura 18 - Citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo subcutâneo.

O grupo CR apresentou maiores níveis de IL1 $\beta$  em comparação com C. O grupo EX+CR apresentou maiores níveis de MCP1 em relação ao C e EX. O grupo CR apresentou maiores níveis de MCP1 quando comparado com C. O exercício físico em conjunto com a restrição calórica foi capaz de promover uma maior quantidade de TNF $\alpha$  e IL 6 em comparação com C. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SE. Significância \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

Ao que concerne as citocinas anti-inflamatórias, verificamos que a restrição calórica foi capaz de aumentar a IL-1ra no tecido adiposo subcutâneo, uma vez que os resultados obtidos nos grupos CR e EX+CR para esse peptídeo estiveram aumentados frente aos grupos controle e os mesmos resultados não são observados no comparativo do grupo EX versus C, conforme demonstrado na Figura 19a. Embora seja capaz de que o exercício feito sem a restrição calórica não pareça ser capaz de aumentar a IL-1ra no tecido adiposo, pudemos constatar que o grupo EX apresentou maiores quantidades de IL-10 face aos demais grupos, e esses resultados

aparentemente são anulados quando o exercício é feito em conjunto com a restrição calórica (Figura 18b).

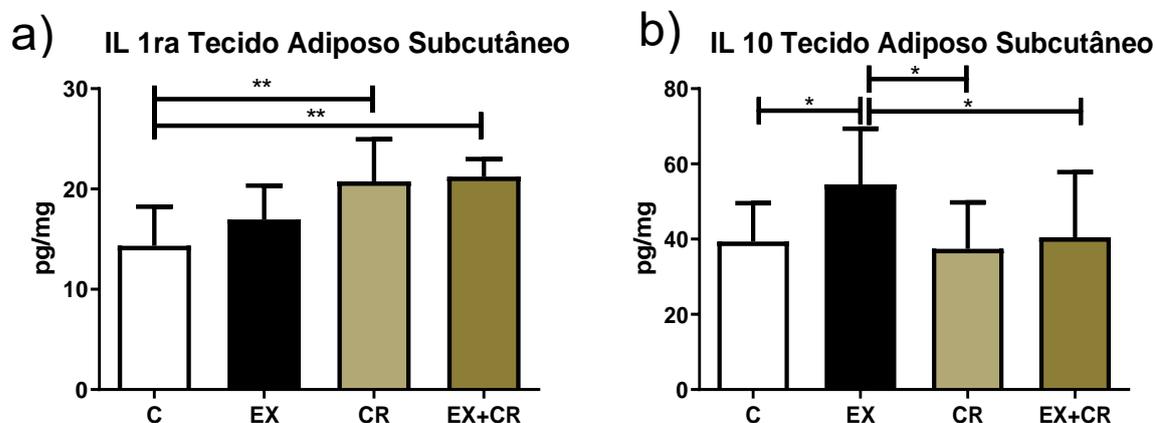


Figura 19 - Citocinas anti-inflamatórias no tecido adiposo branco.

A restrição calórica é capaz de aumentar a IL-1ra no tecido adiposo subcutâneo, independentemente de ser adotada em indivíduos sedentários ou treinados, conforme demonstrado pelos resultados dos grupos CR e EX+CR. O exercício físico feito sem a restrição calórica é capaz de promover a IL-10 no tecido adiposo subcutâneo, contudo, ao adotar o exercício físico em conjunto com a restrição calórica, esses resultados são anulados. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SE. Significância \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

De encontro com os resultados quantitativos obtidos através do ELISA, podemos afirmar que o exercício físico em conjunto com a restrição calórica seja capaz de aumentar os níveis de MCP-1 no tecido adiposo, uma vez que a expressão gênica dessa proteína também se demonstra aumentada no grupo EX+CR em comparação com os demais. Entretanto, conforme demonstrado na Figura 20a, pudemos ver que o EX apresentou níveis aumentados face ao grupo CR. Na análise dos resultados demonstrados no gráfico, seria plausível inclusive afirmar que o exercício físico é capaz de aumentar a MCP1, que a restrição calórica sozinha não conseguiria influenciar a expressão gênica, mas que quando ambos feitos em conjunto o resultado aparenta ser potencializado para o aumento desta quimiocina.

Pudemos constatar resultados semelhantes acerca do TNF $\alpha$ , uma vez que o grupo EX apresentou uma maior expressão desse gene em comparação com a restrição calórica, e que embora não se tenha significância de acordo com a análise estatística, poderia haver a possibilidade desse aumento em comparação com o grupo C. Ao investigarmos a figura 20b, é possível inferir que a restrição calórica no grupo sedentário não foi capaz de promover nenhuma alteração. Todavia, a adoção dos dois protocolos, tanto o exercício físico quanto a restrição calórica, são capazes de

potencializar o aumento da expressão gênica de TNF $\alpha$ , pois, observamos que o grupo EX+CR teve resultados maiores em comparação aos demais grupos, inclusive com o EX.

Contudo, conforme demonstrado no gráfico da Figura 20c, os protocolos de treinamento físico ou de restrição calórica, feitos isoladamente ou não, puderam garantir uma menor expressão gênica de NF-kB em comparação com o grupo C, que foi submetido apenas ao protocolo de *Time Restricted Feeding*.

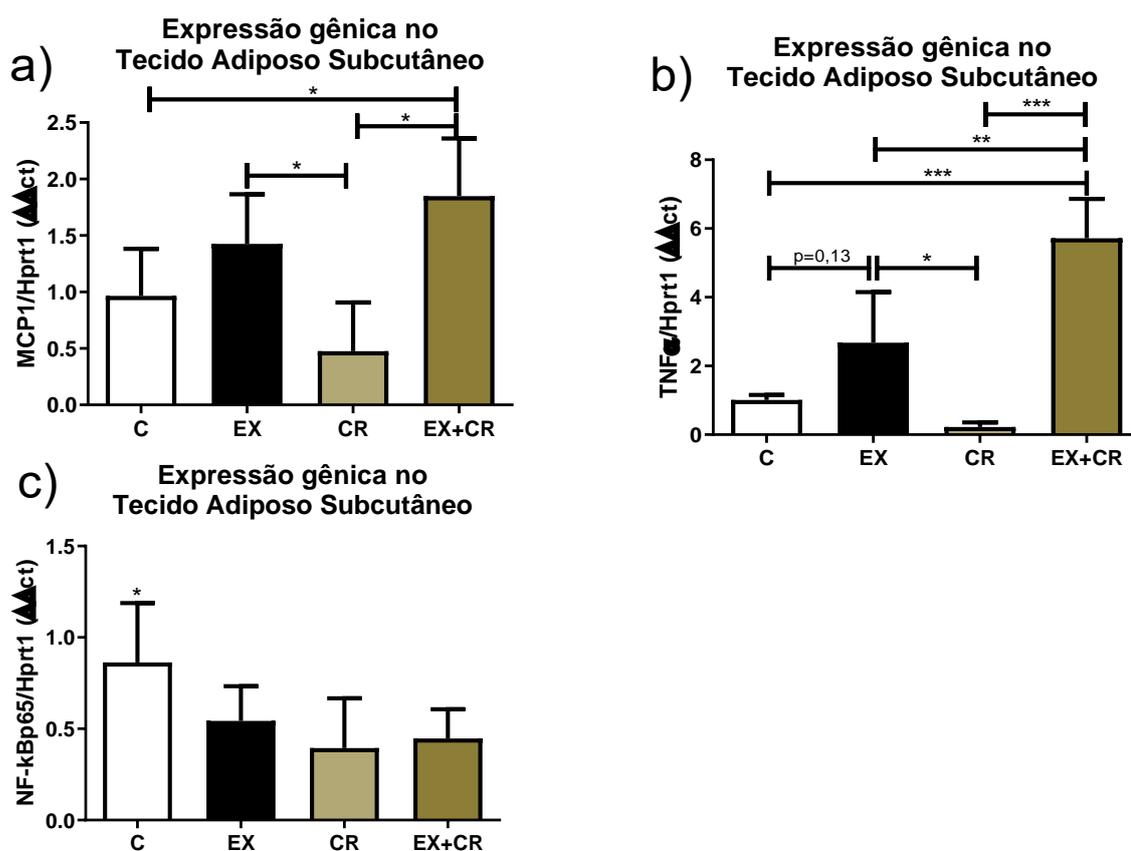


Figura 20 - Expressão gênica no tecido adiposo subcutâneo.

O exercício físico foi capaz de promover a MCP-1 no tecido adiposo subcutâneo em comparação com os grupos C e CR, embora a restrição calórica sozinha não tenha promovido alterações desse gene no tecido, aparentemente a adoção de ambas as estratégias aparenta potencializar o aumento desse gene. Resultados semelhantes foram observados acerca do TNF $\alpha$ , uma vez que o exercício físico feito sozinho ou em conjunto com a restrição calórica tenha aumentado essa expressão gênica. Todas as abordagens diminuíram a expressão gênica de NF-kB. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SE. Significância \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

### 4.3 Análise do músculo estriado esquelético

A Figura 21 demonstra os resultados obtidos a partir do músculo gastrocnêmio dos camundongos, dessa forma, nenhum dos protocolos adotados foi capaz de influenciar as quantidades de IL 1 $\beta$  em nenhum dos grupos. O exercício físico é capaz de aumentar a MCP1 no músculo, conforme demonstrado pelos resultados do grupo EX em comparação os demais grupos do trabalho. Contudo, quando o exercício físico é adotado em conjunto da restrição calórica, esse efeito é anulado.

O TNF $\alpha$  esteve aumentado no grupo EX+CR em comparação ao grupo C, no entanto, esses mesmos resultados não são observados em nenhum outro grupo experimental. Podemos afirmar que o exercício físico é capaz de influenciar as os níveis de IL-6 no músculo gastrocnêmio, independentemente de ser feito com a restrição calórica ou não, conforme demonstrado pelos resultados do gráfico na Figura 21d. Sendo assim, é possível afirmar que embora não haja diferenças entre os grupos EX e EX+CR, os níveis de IL-6 estiveram aumentados no comparativo desses grupos com o grupo C e o CR.

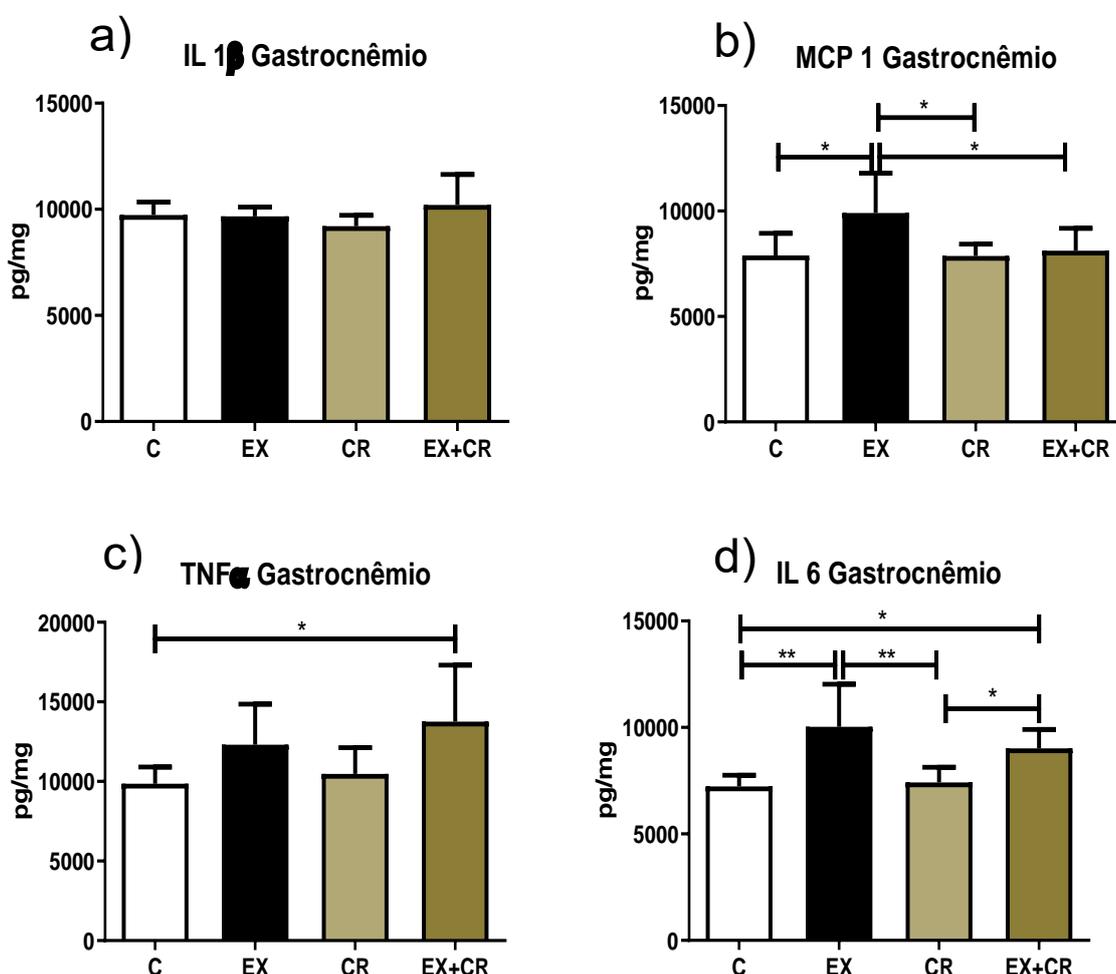


Figura 21 - Citocinas pró-inflamatórias no músculo estriado esquelético

Não houve alterações quanto a IL1 $\beta$  no músculo gastrocnêmio. O grupo EX apresentou maiores níveis de MCP1 em comparação com os demais grupos experimentais. O exercício físico em conjunto da restrição calórica foi capaz de aumentar o TNF $\alpha$  em comparação com o grupo C. O exercício físico independente ou em conjunto com a restrição calórica foi capaz de aumentar a IL-6 em comparação com os demais grupos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SE. Significância \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

Os gráficos contidos na Figura 22 não demonstram nenhuma diferença de IL-1ra e IL10 nos grupos experimentais.

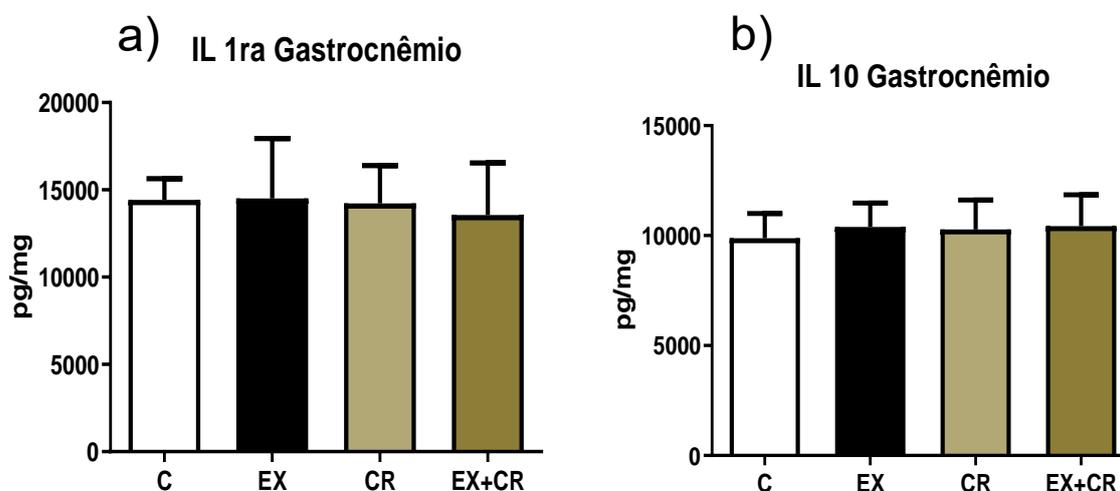


Figura 22 - Citocinas anti-inflamatórias no músculo estriado esquelético

Não houve diferença de IL-1ra e IL-10 no músculo gastrocnêmio em nenhum dos grupos experimentais. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SE. Significância \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

### 4.3 Análise do fígado

O protocolo de exercício físico demonstrado pelo grupo EX sem a adição da restrição calórica, foi capaz de promover a IL-17 no tecido hepático em comparação aos grupos C e CR, embora fosse de se esperar o mesmo fenômeno no grupo EX+CR, não foi possível observar diferenças com significância estatística no comparativo desses indivíduos com os grupos C, EX e CR.

Adicionalmente, pudemos constatar que o exercício físico somado com a restrição calórica foi capaz de proporcionar um aumento na quantidade de MCP1 no tecido hepático do grupo EX+CR, conforme demonstrado na Figura 23b. Se tratando dos níveis de TNF $\alpha$ , não foi possível verificar nenhuma diferença com significância estatística. O grupo com menor quantidade de IL-6 foi o grupo C em comparação com todos os demais grupos do projeto. Logo, podemos ressaltar de que tanto o exercício

físico quanto a restrição calórica são capazes de aumentar as quantidades de IL-6 no fígado, isso quando realizados sozinhos ou em combinação de um com o outro.

Conforme demonstrado na Figura 23, o exercício físico feito pelo grupo EX foi capaz de aumentar a IL-10 no fígado em comparação com o grupo EX+CR. Contudo, não foi possível constatar alterações com significância estatística entre os demais grupos experimentais.

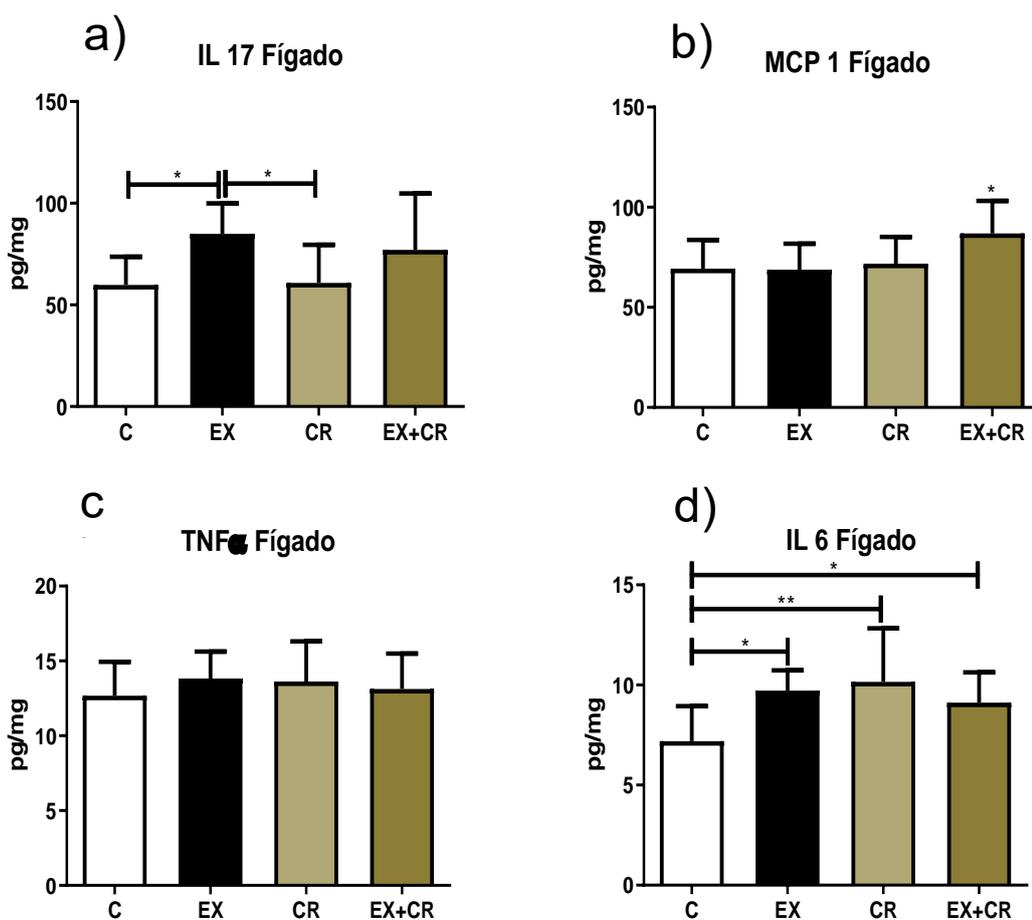


Figura 23 - Citocinas pró-inflamatórias no fígado.

O grupo EX apresentou maiores quantidades de IL-17 em comparação com C e CR. A MCP-1 esteve aumentada no grupo EX+CR face aos demais grupos experimentais. Nenhum dos protocolos foi capaz de influenciar os níveis de TNFα. Todos os grupos que foram submetidos a restrição calórica ou ao exercício físico, de maneira conjunta ou não, apresentaram maiores quantidades de IL-6 no fígado. Os

valores estão expressos em média  $\pm$  SE. Significância \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

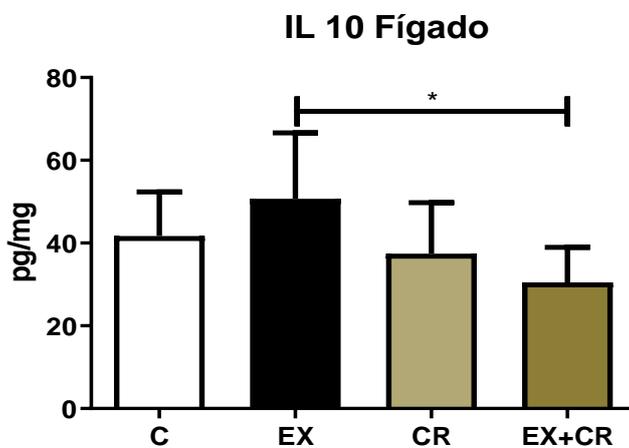


Figura 24 - Citocina anti-inflamatória no fígado

O grupo EX apresentou maiores níveis de IL-10 do que o grupo EX+CR. Contudo, não há diferenças entre os demais grupos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  SE. Significância \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

## 5 DISCUSSÃO

Para o presente projeto adotamos uma restrição calórica de 40%, ou seja, os camundongos consumiam cerca de 60% do que seria o seu consumo habitual, sendo que para a primeira semana os grupos tiveram o seu consumo habitual registrado, ao longo da segunda semana de projeto foi dado início ao protocolo de restrição calórica, com base nos dados coletados na semana anterior. A terceira semana foi marcada pelo início do protocolo de treinamento físico, ressaltando que antes os camundongos foram adaptados e a velocidade máxima em esteira foi registrada. Se tratando da terceira semana até o término do experimento, os camundongos submetidos ao protocolo de restrição calórica foram alimentados com 60% do consumo de seus grupos pareados, ou seja, o grupo CR teve acesso a quantidade de 60% consumida pelo grupo C, já o grupo EX+CR consumiu o mesmo percentual, só que de acordo com os registros do grupo EX.

Através das análises feitas ao longo do projeto, foi possível observar que os protocolos utilizados são capazes de sustentar alterações independentes uns dos outros, uma vez que há diferenças no comparativo das variáveis entre todos os grupos. Nota-se que os protocolos de treinamento e restrição calórica quando adotados em conjunto proporcionam modificações em relação a glicose sérica, além de um menor percentual de decaimento em razão da administração da insulina. Já o treinamento físico é capaz de modificar o metabolismo relacionado aos ácidos graxos.

Se tratando das citocinas pró-inflamatórias analisadas no tecido adiposo, mais precisamente da MCP1, TNF $\alpha$  e IL-6, o exercício físico em conjunto da restrição calórica conseguiu proporcionar um aumento desses marcadores em comparação com o grupo C. O mesmo resultado não é observado para a IL-1 $\beta$  no tecido adiposo, mas nesse caso CR teve maiores valores em relação ao controle. Ainda se tratando desse grupo, a MCP1 também se demonstrou aumentada em relação ao grupo C.

As citocinas anti-inflamatórias do tecido adiposo subcutâneo se demonstram suscetíveis a aumentar tanto em decorrência da restrição calórica, quanto do exercício físico, de maneira independente.

O exercício físico é capaz de aumentar a expressão gênica de MCP1 no tecido adiposo, uma vez que o grupo EX+CR obteve maiores níveis no comparativo com os grupos não submetidos ao protocolo de treinamento. Já se tratando da expressão

gênica de TNF $\alpha$ , o treinamento físico aeróbico também foi capaz de aumentar esse marcador. Vale ressaltar que o grupo EX+CR apresentou maiores quantidades do que os demais grupos e o EX obteve maiores níveis em relação a CR.

Aparentemente o treinamento físico é capaz de aumentar MC1 e IL-6 no músculo em comparação com os demais grupos. Contudo, é notável uma diminuição de IL-6 proporcionada por EX+CR.

Dentre algumas algumas citocinas foram mensuradas no tecido hepático, foi possível notar que todos os protocolos foram capazes de proporcionar um aumento de IL-6 em relação a C.

A massa corporal dos camundongos variou ao longo do projeto, de maneira que os grupos submetidos aos protocolos de restrição calórica demonstraram diferenças em comparação com o grupo C e EX na massa dos tecidos (tecido adiposo, fígado, gastrocnêmio e sóleo) e da massa corporal total registrada momentos antes da eutanásia. Com base nos dados registrados na Tabela 4, podemos afirmar que a restrição calórica foi capaz de diminuir o tecido adiposo subcutâneo e a massa do fígado, bem como do músculo gastrocnêmio. Se tratando do grupo EX+CR, é plausível acreditar que o exercício de alguma forma possa preservar o tecido adiposo, uma vez que os registros apontam uma menor quantidade de massa do tecido adiposo subcutâneo em comparação com o grupo C e EX, mas valores maiores do que do grupo CR.

O tecido adiposo apresenta um papel complexo na homeostase energética geral, tanto em condições fisiológicas como em enfermidades, estando intrinsecamente ligado ao metabolismo de lipídeos (ácidos graxos), armazenando-os e disponibilizando esses nutrientes para tecidos como o músculo estriado esquelético e cardíaco. Adicionalmente, o fígado é fundamental para integrar os mecanismos metabólicos relacionados a manutenção energética do organismo (55).

Todos os aspectos da biologia do tecido adiposo estão relacionadas ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos, tais como a síndrome metabólica, obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, câncer e distúrbios neurodegenerativos. Há ainda alterações morfológicas celulares (hipertrofia/hiperpasia/atrofia), metabólicas (diferenças na taxa de lipólise/lipogênese e grau de reesterificação e liberação de ácidos graxos pelos adipócitos, níveis de ácidos graxos livres na circulação, além da reesterificação de ácidos graxos entre o tecido adiposo e fígado), e endócrinos (produção de adipocinas)(18, 19, 55).

A determinação da adiposidade foi feita a partir da somatória da massa dos tecidos adiposos subcutâneo, retroperitoneal e epididimal; divididos pela massa corporal total; e multiplicado por 100 (percentual) (88).

Dessa forma, de acordo com a Figura 16a podemos afirmar que o exercício físico independente da restrição calórica é capaz de reduzir os compartimentos de deposição de gordura, uma vez que os grupos EX e EX+CR demonstram um menor índice de adiposidade. Em contrapartida, a restrição calórica somada ao exercício pode diminuir o conteúdo do músculo estriado esquelético nos membros inferiores avaliados.

O fígado é um importante órgão para o controle metabólico, sendo responsável pela manutenção da glicemia, seja através da glicogenólise (quebra de glicogênio), produção de glicose a partir de compostos não glicosídicos (gliconeogênese), liberação de ácidos graxos, ou no armazenamento de nutrientes a serem disponibilizados durante momentos de escassez, como por exemplo, a síntese de glicogênio via glicogênese ou até mesmo na síntese de ácidos graxos através da lipogênese (89).

É sabido que não apenas a massa corporal sofre influência a partir da oferta de nutrientes, mas também diferentes tecidos do organismo. Tendo em vista o papel central que o fígado tem no controle da oferta de nutrientes para os tecidos periféricos, sabemos que a massa hepática também está suscetível a sofrer variações de acordo com essas condições (89, 90)

Em um experimento realizado com o objetivo de avaliar o transcriptoma hepático de camundongos submetidos a diferentes períodos de jejum, foi possível constatar que durante as primeiras 12 horas de jejum os animais perderam cerca de 12% da sua massa corporal. Depois disso, a perda permaneceu estável a uma taxa de aproximadamente 7% por dia, de modo que os animais reduziram cerca de 30% após 72 horas de jejum. Se tratando especificamente do fígado, o seu peso úmido diminuiu mais do que a massa corporal, especialmente nas primeiras 12 horas de jejum, desacelerando a perda com o transcorrer do tempo, dessa forma a massa hepática reduziu aproximadamente 44, 5, 11 e 10% por dia; após 12, 24, 48 e 72 horas de jejum respectivamente (90).

Se tratando de variáveis relativas ao metabolismo hepático durante o jejum, o níveis de amônia podem aumentar duas vezes em relação ao basal após um período de 24 horas de jejum, sendo que após 72 horas pode chegar a mais de 5,2 vezes em

comparação ao basal. Ao que concerne as concentrações de glicose e lactato, o jejum de 12 e 24 horas não são o suficiente para promover alterações, sendo que essas mudanças podem ser vistas apenas a partir de 48 horas de jejum (90).

Mesmo sabendo de toda a importância do fígado no controle dos parâmetros metabólicos e manutenção da glicemia, bem como a sua suscetibilidade a variações relativas a sua massa e o consumo energético, não pudemos constatar diferenças referentes a massa relativa do fígado entre os grupos experimentais.

A contribuição relativa para a geração de ATP capaz de satisfazer as necessidades energéticas durante o exercício físico são determinadas pela intensidade e duração do mesmo. Outros fatores podem influenciar o metabolismo durante o exercício, como por exemplo, o grau de treinamento, a composição da dieta, gênero, idade e condições ambientais. Durante esforços de curta duração (poucos segundos) e alta intensidade a maior contribuição energética é feita pelo sistema ATP – Creatina Fosfato (CP) e glicogênio intramuscular. Sabemos ainda que durante exercícios com a duração aproximada de 1 minuto, a principal fonte energética se dá através da quebra de glicogênio intramuscular (91).

Se tratando de eventos que duram muitos minutos até horas, o metabolismo oxidativo de carboidratos e ácidos graxos são os responsáveis por suprir quase toda a demanda de ATP necessárias para a sustentação da contração do músculo estriado esquelético. Dessa forma, a maior parte dos substratos intra e extramusculares são o glicogênio muscular, glicose plasmática (oriunda da glicogenólise e gliconeogênese), até de ácidos graxos estocados no próprio tecido muscular ou oriundos do armazenamento do tecido adiposo. Mais uma vez é importante ressaltar que a contribuição relativa desses substratos para o metabolismo energético são determinados pela intensidade e duração do exercício físico (63, 91).

Em exercícios de intensidade baixa e moderada há uma predominância na oxidação de ácidos graxos, ao passo que o aumento de intensidade implica numa mudança na obtenção de substratos proporcionados. Podemos considerar que o máximo nas taxas de oxidação de ácidos graxos ocorre em aproximadamente 60% - 65% do  $VO_{2\text{máx}}$  (23).

Embora a quantidade de glicogênio muscular seja a mais importante fonte de carboidratos durante a contração muscular decorrente do exercício físico, a glicose plasmática também apresenta um papel importante na contribuição de oferta de carboidratos a serem oxidados, especialmente nos exercícios prolongados. Dessa

forma, há um interesse na investigação constante na regulação glicêmica por parte do músculo estriado esquelético durante o exercício físico, principalmente em condições de resistência à insulina e diabetes do tipo 2 (23, 91).

Como sabemos, a insulina atua como um facilitador para a captação de glicose, principalmente nos tecidos que tem o transportador de glicose 4 (*Glucose Transporter 4*, GLUT4), adicionalmente, o exercício é capaz de atuar de maneira sinérgica por diferentes mecanismos para que ocorra essa regulação da glicemia através do músculo estriado esquelético. A captação de glicose ocorre por difusão facilitada e sua eficiência pode ser determinada por três características distintas, entre elas estão: a oferta de glicose para o tecido; o transporte de glicose para o sarcolema, sendo dependente da atuação do GLUT4; a fosforilação do carbono 6 da glicose pela enzima hexoquinase, lembrando que há a utilização de uma molécula de ATP para essa atuação, além de minerais como  $Mg^{2+}$ , o produto da atuação da hexoquinase sob a glicose é a formação da glicose 6 fosfato, e dessa forma a célula consegue garantir parcialmente com que a molécula de açúcar permaneça no meio intracelular (92-94).

Levando em consideração essas três características que determinam a eficiência da captação de glicose pelo músculo estriado esquelético, e partindo do pressuposto de que o exercício físico é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina. Indivíduos previamente treinados e com dados coletados durante o repouso possuem uma maior sensibilidade a insulina e oferta de glicose para o tecido muscular via o aumento da capilarização, além de um aumento na expressão e translocação do GLUT4 e maior atividade da enzima hexoquinase e expressão mitocondrial (95).

Conforme exposto anteriormente, a glicose sérica foi determinada a partir de amostra de sangue obtidas no momento da eutanásia dos grupos experimentais, ou seja, com os camundongos em repouso e decorridas 72 horas após a última sessão de treinamento. É válido ressaltar de que no dia da eutanásia e mais precisamente momentos antes do procedimento, os camundongos permaneceram em ambiente controlado, cobertos e isolados para evitar de que os animais ficassem estressados e essa situação pudesse interferir na qualidade das amostras coletadas. Adicionalmente, a ordem de eutanásia dos camundongos ocorreu intercalada entre os grupos e de maneira aleatória entre os indivíduos do mesmo grupo experimental.

O grupo EX+CR apresentou menores valores de glicose sérica quando comparada com todos os demais grupos experimentais, e dessa forma, sugere-se de que os efeitos decorrentes dos protocolos experimentais para esse parametro só

possam ser observados quando houver a adoção em conjunto da restrição calórica e do exercício físico e não de maneira isolada. Tal afirmativa é sustentada por não ter sido possível constatar nenhuma alteração nos grupos EX e CR em comparação com o grupo controle do projeto.

Se tratando dos ácidos graxos séricos não esterificados demonstrados na Fig 16b, podemos afirmar que o exercício físico aeróbio de intensidade moderada é capaz de aumentar essas moléculas no sangue. De maneira que, embora o exercício físico seja capaz de aumentar esses ácidos graxos, não é possível constatar que a restrição calórica consiga exercer algum efeito sobre esse parâmetro, pois o grupo CR não apresentou diferenças em comparação com o controle, além do mais os resultados são bastante semelhantes ao investigarmos os grupos EX e EX+CR, ou seja, esses dois grupos se diferenciam dos demais, mas não apresentam diferenças entre eles. A utilização de CR por 6 semanas em camundogos jovens que foram alimentados previamente com dieta hiperlipídica com o intuito de promover a obesidade, e ratos idosos e obesos resultou em uma diminuição na adiposidade no tecido mesentérico, isso independente da idade dos animais, além da melhora na sensibilidade da insulina em todos os grupos experimentais, sendo os resultados mais pronunciados em animais jovens (96).

O procedimento de teste de resistência à insulina foi muito importante para determinar quais seriam as possíveis influências dos protocolos experimentais no funcionamento deste hormônio. De maneira que a curva de decaimento da glicemia é bastante semelhante entre todos os grupos experimentais do trabalho, com exceção dos 25 minutos onde pudemos constatar diferenças entre o grupo EX e EX+CR. Embora possa parecer que nenhum protocolo estivesse sendo capaz de influenciar a resistência à insulina, é plausível afirmar que o exercício físico em conjunto com a restrição calórica sejam capazes de diminuir o percentual de decaimento da glicemia por minuto, uma vez que há diferenças entre este parâmetro na comparação do grupo EX+CR com os demais grupos, conforme demonstrado na Fig. 17b.

O treinamento físico aeróbico é capaz de induzir uma variedade de adaptações metabólicas em indivíduos com os mais variados níveis de treinamento, tais modificações não se limitam ao momento imediato em que o exercício está sendo executado, mas permeiam por longos períodos e dessa forma conseguem influenciar inclusive o metabolismo de repouso. Muitos desses mecanismos são capazes de aumentar a sensibilidade a insulina e melhora o controle metabólico da glicemia.

Contudo, já se tem demonstrado que as modificações relativas a sensibilidade à insulina de indivíduos treinados em comparação com destreinados costuma ser menor, tanto na resposta da insulina em razão a uma carga de glicose, quanto nos níveis basais desse hormônio(97, 98).

Conforme exposto anteriormente, a investigação do presente projeto utiliza um protocolo de restrição calórica, proporcionado cerca de 60% da quantidade consumida pelos grupos C e EX para os camundongos CR e EX+CR. Esse tipo de protocolo reduz o consumo energético total, e acaba invariavelmente reduzindo o consumo de macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios) e também de micronutrientes (vitaminas e minerais).

Quando esse tipo de conduta é adotada é plausível com que o organismo dos animais se adapte a fazer um melhor aproveitamento dos alimentos no que se refere a absorção e metabolismo dos nutrientes (99)

Dessa forma, podemos inferir que os camundongos submetidos a restrição calórica em conjunto com o exercício físico apresentam uma menor curva na velocidade de decaimento da glicemia em resposta a insulina, em razão da evidente privação de nutrientes.

A contração do músculo estriado esquelético vai muito além do movimento, pois um conjunto extenso de moléculas podem ser secretados por esse tecido durante esses momentos específicos (11, 32, 63, 84)

É possível constatar através de técnicas de proteômica, a capacidade que o músculo estriado tem em secretar uma mistura complexa de mais de 300 miocinas diferentes, das quais a maior parte desses componentes conseguem atuar de maneira autocrina, paracrina e até mesmo endocrina, ou seja, através dos fluidos corporais são capazes de chegarem em outros tecidos e então influencia-los em suas respectivas funções (82).

Entretanto, há vários mecanismos moleculares que necessitam serem esclarecidos, pelos quais conseguem promover um “crosstalk” entre os órgãos e tecidos do organismo. Sabendo da vasta gama de moléculas produzidas pelo músculo estriado esquelético em decorrência do exercício físico, devemos considerar que outros tecidos também estão suscetíveis à síntese e secreção de moléculas e esses componentes são capazes de influenciar várias células próximas e mais distantes de sua origem. Esses peptídeos e ácidos nucleicos sintetizados pelo estresse fisiológico decorrente do exercício físico e que podem ser secretados por todos os tecidos do

organismo, seja pelo fígado, músculo ou tecido adiposo por exemplo, são chamados coletivamente de exercinas (83).

De maneira paradoxal e controversa a alguns achados na literatura, a restrição calórica do estudo, administrada no grupo CR acabou por aumentar a IL-1 $\beta$  detectada no tecido adiposo, o que pode ser um indicativo de aumento da inflamação nessa região. Porém, sabemos que o método utilizado para mensurar essa citocina, atribui apenas informações quantitativas da molécula no tecido, sendo assim não é possível afirmar de que o tecido adiposo desses camundongos estavam sintetizando esse peptídeo, e sim apenas de que esse componente estava em maior quantidade no tecido, em outras palavras, embora o grupo CR tenha uma quantidade maior de IL-1 $\beta$  no tecido adiposo subcutâneo isso não necessariamente significa que a síntese ocorreu pelos adipócitos, podendo ter ocorrido por outras células.

Se tratando da IL-1 $\beta$  no músculo estriado esquelético, não há diferenças entre os grupos experimentais. Entretanto, os protocolos de treinamento físico foram capazes de promover um aumento da IL-6 no músculo estriado esquelético, não sofrendo influência pelo consumo dietético dos camundongos.

Levando em consideração a importância da IL-6 como uma exercina/miocina capaz de atuar de maneira imunometabólica, e dessa forma influenciar os processos metabólicos como por exemplo a lipólise no tecido adiposo, além da produção e liberação de glicose pelo fígado, seja através da gliconeogênese ou glicogenólise (32, 85). Sabe-se que essa exercina/miocina é crucial para os possíveis efeitos anti-inflamatórios proporcionados pelo exercício físico, pois é capaz de promover o aumento de IL-1ra e IL-10. (11, 32, 82-85) Todavia, sabe-se que a produção de IL-6 durante o exercício físico é independente de características relacionadas ao sistema pró-inflamatório da família das interleucinas 1 (100).

Sabendo da relação da exercina IL-6 e sua necessidade para a secreção de IL-10 e IL-1ra (32, 84), pudemos perceber no experimento que embora a IL-6 no músculo estriado esquelético estivesse aumentada nos grupos submetidos ao exercício, o mesmo não ocorreu em relação a IL-10 e IL-1ra.

Podemos sustentar a fidedignidade dos dados pelo fato de que a secreção dessas duas exercinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-1ra) serem dependentes do tempo de contração muscular proporcionado pelo exercício físico (101), além da interação desses peptídeos com seus respectivos receptores (102).

Ao que concerne os aspectos relativos a IL-6 e sua respectiva influência na mobilização de substratos energéticos, essa proteína atua na mobilização de lipídios no tecido adiposo, sendo capaz de promover a lipólise. As concentrações intersticiais de IL-6 nesse tecido são aproximadamente 100 vezes maiores do que no plasma, o que comprova a sua relevância como uma proteína que exerce funções paracrinas e autocrinas. Sabe-se ainda que a IL-6 é capaz de aumentar os ácidos graxos livres (não esterificados) e a oxidação de gorduras (61, 62).

É muito interessante confrontarmos o resultado demonstrado na Figura 14a, onde podemos ver que o grupo EX+CR demonstrou um menor índice de adiposidade, e uma menor taxa de decaimento da glicemia (Figura 15a). Tendo em vista esses dois resultados e confrontando-os com os demonstrados na Figura 15b, onde aparentemente esse grupo experimental apresentou uma maior quantidade de MCP1 comparado com os outros grupos experimentais. O mesmo foi observado em relação ao TNF $\alpha$  e IL-6 quando comparados com o grupo controle.. Dessa forma, e nas condições investigadas pelo estudo, podemos levantar a hipótese de que parece não haver uma relação direta entre o índice de adiposidade e quantidade dessas citocinas no tecido adiposo de camundongos não obesos.

Um estudo que investigou os efeitos metabólicos e inflamatórios da restrição calórica em comparação a uma dieta hiperlipídica em camundongos, constatou que a restrição foi capaz de reduzir os níveis de MCP1 no fígado e tecido adiposo em relação com o grupo controle (não submetido a dieta hiperlipídica e nem a restrição calórica). Em contrapartida, a expressão gênica de MCP-1, IL-6, TNF $\alpha$ , e SOCS3 estiveram maiores no grupo submetidos a dieta hiperlipídica em comparação com o controle e ao que fez restrição calórica. Como conclusão, os pesquisadores afirmam que a restrição calórica foi capaz de proporcionar um menor nível de adiposidade, além de contribuir para uma diminuição da inflamação tanto no fígado quanto no tecido adiposo (57).

Os nossos resultados apontam um aumento na expressão gênica de MCP1 e TNF $\alpha$  no tecido adiposo dos camundongos que foram submetidos ao exercício físico com ou sem a restrição calórica. Contudo, embora a expressão gênica dessas moléculas esteja aumentada nos grupos EX e EX+CR, a quantidade total de MCP1 e TNF $\alpha$  no tecido adiposo não reflete os mesmos resultados (Figura 18b e Figura 18c). Logo, embora se tenha aparentemente um estímulo para a síntese desses peptídeos pelo tecido adiposo, é plausível acreditar em mecanismos contrarregulatórios não

investigados pelo estudo e que possam estar influenciando na quantidade de MCP1 e TNF $\alpha$  no tecido adiposo. Devemos lembrar que a quantidade total de MCP1 no tecido adiposo esteve aumentada nos grupos submetidos apenas a restrição calórica. Ao passo que, a restrição calórica em conjunto com o exercício físico, demonstrado pelo grupo EX+CR, foi capaz de aumentar a MCP1 no tecido hepático, não foram observadas diferenças referentes ao TNF $\alpha$ .

Se tratando da quantidade de MCP1 no músculo estriado esquelético, pudemos verificar um aumento no grupos submetido exclusivamente ao exercício físico em comparação com os demais. Levando em consideração essa molécula como uma indicadora de lesão tecidual, é possível considerar que o exercício físico foi um estressor para o músculo estriado esquelético. Em contrapartida, a restrição calórica foi capaz de reduzir a quantidade de MCP1 nesse tecido, uma vez que os grupos submetidos a esse protocolo com ou sem o exercício físico apresentaram níveis semelhantes ao grupo controle.

Uma outra constatação que podemos fazer, agora se tratando da IL6 no tecido adiposo, é que o protocolo de exercício quando empregado em conjunto com a restrição calórica, conforme demonstrado pelo grupo EX+CR na Figura 18dd, foi capaz de aumentar os níveis dessa proteína no tecido adiposo subcutâneo. Ao confrontarmos esse resultado com os demonstrados na Figura 16b, pudemos verificar que esse grupo também apresentou maiores níveis de ácidos graxos não esterificados em comparação com os grupos C e CR, e esse parâmetro se manteve aumentado no comparativo do grupo EX confrontado com os C e CR. Dessa forma, é plausível afirmar que o treinamento físico seja capaz por si só de aumentar os ácidos graxos não esterificados, sendo que os níveis desses ácidos graxos podem sofrer influência da IL6 proporcionada pelo treinamento físico em conjunto com a restrição calórica (64)

Ainda corroborando com a importante função metabólica da IL-6 na mobilização de substratos energéticos, os grupos submetidos de maneira combinada ou isolada aos protocolos de restrição calórica e/ou exercício físico apresentaram maior níveis de IL-6 no tecido hepático, conforme demonstrado na Figura 23d.

Como sabemos, a IL-1ra desempenha um papel natural como um antagonista de receptor, e dessa forma consegue atuar inibindo a sinalização dos receptores de IL-1 (59), como consequência, acredita-se que a IL-1ra seja considerada uma proteína anti-inflamatória. Essa molécula pode ser sintetizada por uma variedade de células, sendo alta a sua expressão por parte de adipócitos, e dessa forma podemos

compreende-lo como um modulador para as funções inflamatórias das proteínas da família da IL-1. Uma dieta extremamente restritiva (800kcal/d), empregada em mulheres obesas durante 28 dias foi capaz de aumentar a expressão gênica de IL-1ra e IL-10 nesse público, e dessa forma colaborar para um melhor controle do perfil inflamatório do tecido adiposo (103).

Embora a maior parte dos achados da literatura façam afirmativas acerca da IL-1ra em obesos (humanos e camundongos)(9, 54, 57, 103, 104), os achados demonstrado na Figura 19a e demonstrados em um modelo não obeso, indicam que a restrição calórica seja capaz de aumentar a quantidade desse peptídeo no tecido adiposo, independente do treinamento físico.

A respeito da IL-10, podemos verificar que o grupo EX apresentou maiores níveis no tecido adiposo em comparação com os demais, ao passo que no fígado houve um aumento no grupo EX em relação com o EX+CR.

Outro estudo que teve por objetivo investigar a restrição calórica em um modelo experimental de diabetes utilizou 40 ratos divididos em 4 grupos distintos, dos quais: um não diabético com livre acesso a alimentação; outro não diabético com restrição calórica; mais dois grupos diabéticos sendo um com livre acesso a ração e outro também submetido a restrição calórica. Encontrou-se que a restrição calórica foi capaz de diminuir citocinas pró-inflamatórias como por exemplo a IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, além do TNF $\alpha$ , ao passo que houve um aumento significativo na quantidade de IL-10 (105).

O NF- $\kappa$ B compreende uma família de fatores de transcrição responsáveis por coordenar respostas inflamatórias relacionadas a imunidade inata e adaptativa, além de diferenciação, proliferação e sobrevivência celular em organismos pluricelulares. Em mamíferos o NF- $\kappa$ B pode ser ativado de duas formas: pela via canônica, tendo a sinalização dependente do modulador essencial de NF- $\kappa$ B (NEMO); ou a via não canônica, a qual independe de NEMO. A ativação do NF- $\kappa$ B ocorre a partir de estímulos inflamatórios proporcionados por sinais extracelulares, como por exemplo, pela ativação de receptores do fator de necrose tumoral, os do tipo toll, ou até mesmo da família das IL-1(106).

Ao verificarmos a expressão de NF- $\kappa$ B no tecido adiposo, como demonstrado na Figura 20c é possível observar que todos os grupos experimentais apresentaram uma diminuição desse parametro em comparação com o grupo o grupo C. Dessa forma, todas as intervenções (restrição calórica ou treinamento físico) foram capazes

de diminuir o NF- $\kappa$ B. Essa hipótese é sustentada pelo fato de que os grupos EX, CR ou EX+CR apresentaram um aumento na quantidade total de IL-1ra ou IL-10 no tecido adiposo em comparação com o grupo C.

Aparentemente a restrição calórica é capaz de aumentar a longevidade e retardar uma série de doenças crônicas não transmissíveis (54, 55, 99, 107, 108). As alterações metabólicas proporcionadas por esse tipo de conduta nutricional ainda precisam ser investigadas e esclarecidas, pois acredita-se que os efeitos benéficos da restrição calórica são proporcionados por um aumento da oxidação de ácidos graxos livres e pela concomitante diminuição da atividade enzimática responsável pela síntese e armazenamento de ácidos graxos. Entretanto, os resultados proporcionados pela restrição calórica são decorrentes de períodos em que há um aumento da atividade de enzimas responsáveis pela síntese e armazenamento de lipídios, intercalados por períodos de um aumento da taxa de oxidação de ácidos graxos, que por vezes são desproporcionais ao consumo de ácidos graxos. Tais fatos explicariam as alterações na composição corporal proporcionadas por esse tipo de estratégia nutricional (109).

Através do estudo pudemos obter resultados que demonstram valores quantitativos relativos as citocinas nos tecidos. Entretanto, esses valores não são suficientes para embasar respostas relativas a origem das mesmas, nem como essas proteínas podem estar influenciando os tecidos investigados.

O estudo foi desenhado de maneira a abordar as alterações causadas por protocolos de restrição calórica e treinamento físico, buscando investigar se os resultados decorrentes ocorrem de maneira independente ou somatória. Dessa forma, o trabalho demonstra relevância ao explorar variações desses peptídeos e proteínas no músculo estriado esquelético, tecido adiposo e hepático. Contudo, os dados presentes acerca dessas citocinas são quantitativos, logo, é de extrema importância que futuras pesquisas sejam conduzidas com o objetivo de investigar de maneira mais profunda quais são as manifestações biológicas proporcionadas pela restrição calórica e o exercício físico de maneira conjunta ou isolada. A continuidade e o desenvolvimento de novos estudos que tenham as mesmas motivações demonstradas neste trabalho, poderiam ser capazes de fornecer informações acerca da capacidade migratória dessas moléculas, fomentando a discussão sobre o *crosstalk* entre diferentes tecidos, além da ativação de vias intracelulares por parte delas.

Espera-se que no futuro possamos obter respostas mais concisas em relação a influência da restrição calórica e do exercício físico no perfil de citocinas, miocinas e adipocinas, bem como a atuação dessas moléculas em tecidos e órgãos específicos, além dos desdobramentos à nível intracelular proporcionados por esses componentes, tanto no curto quanto no longo prazo após a adesão às práticas de hábitos e estilo de vida em questão.

Considerando os resultados obtidos através das intervenções propostas, pudemos verificar através de um modelo experimental eutrófico que não há benefícios relativos adicionais ao metabolismo da glicose, mas que o exercício físico é capaz de proporcionar uma modificação no padrão da utilização de substrato energético utilizado em repouso. Adicionalmente, ambos os protocolos são capazes de influenciar alterações quantitativas de citocinas no tecido adiposo, muscular esquelético e hepático.

## **6 CONCLUSÃO**

Através dos dados obtidos no presente estudo, pode-se constatar que tanto o exercício físico de intensidade moderada quanto a restrição calórica de 40%, somados ou não, são agentes estressores suficientes capazes de proporcionar uma série de alterações no comportamento celular, secreção de moléculas e expressão de genes relacionados com a inflamação.

Dessa forma, pode-se concluir que a adoção da restrição calórica e do treinamento físico aeróbico somados, em um modelo experimental eutrófico, não foi capaz de proporcionar benefícios e alterações relativas ao metabolismo da glicose. Em contrapartida, o treinamento físico aeróbico é capaz de proporcionar uma modificação na utilização de substrato energético durante o repouso.

Através do presente estudo pudemos também concluir que o exercício físico é capaz de aumentar IL-10 no tecido adiposo subcutâneo, MCP-1 e IL-6 no músculo estriado esquelético. Ao passo que a restrição calórica aumenta IL-1 $\beta$ , IL-1ra e MCP-1 no tecido adiposo. Quando ambas modificações são adotadas em conjunto há um aumento de MCP-1 no tecido adiposo e hepático, IL-6 no tecido adiposo, além de TNF $\alpha$  no tecido adiposo e no músculo estriado esquelético.



## REFERÊNCIAS\*

1. Egger G, Dixon J. Beyond obesity and lifestyle: a review of 21st century chronic disease determinants. *Biomed Res Int*. 2014;2014:731685.
2. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet*. 2016;387(10026):1377-96.
3. Bluher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):288-98.
4. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(9):1431-7.
5. Aparicio-Martinez P, Perea-Moreno AJ, Martinez-Jimenez MP, Redel-Macias MD, Pagliari C, Vaquero-Abellan M. Social Media, Thin-Ideal, Body Dissatisfaction and Disordered Eating Attitudes: An Exploratory Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(21).
6. Batista M, Zigic Antic L, Zaja O, Jakovina T, Begovac I. Predictors of Eating Disorder Risk in Anorexia Nervosa Adolescents. *Acta Clin Croat*. 2018;57(3):399-410.
7. Nadir Contesini FA, Márcia de-Toledo Blake, Carlos BM Monteiro, Luiz C Abreu, Vitor E Valenti, Fernando S Almeida, Alexandre P Luciano, Marco A Cardoso, Jucemar Benedet, Francisco de Assis Guedes de Vasconcelos, Claudio Leone and Deivis Elton Schlickmann Frainer. Nutritional strategies of physically active subjects with muscle dysmorphia. *International Archives of Medicine*. 2013;6:6.
8. Homan K. Athletic-ideal and thin-ideal internalization as prospective predictors of body dissatisfaction, dieting, and compulsive exercise. *Body Image*. 2010;7(3):240-5.
9. Most J, Gilmore LA, Smith SR, Han H, Ravussin E, Redman LM. Significant improvement in cardiometabolic health in healthy nonobese individuals during caloric restriction-induced weight loss and weight loss maintenance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2018;314(4):E396-E405.
10. Meléndez MG-GA. Sedentarism, active lifestyle and sport: impact on health and obesity prevention. *Nutricion Hospitalaria*. 2013;28:89-98.
11. Fiuza-Luces C, Garatachea N, Berger NA, Lucia A. Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(5):330-58.
12. Tremblay MS, Colley RC, Saunders TJ, Healy GN, Owen N. Physiological and health implications of a sedentary lifestyle. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2010;35(6):725-40.
13. Pedersen BK. The diseasome of physical inactivity--and the role of myokines in muscle-fat cross talk. *The Journal of physiology*. 2009;587(Pt 23):5559-68.
14. Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(7):1334-59.
15. Hughes DC, Ellefsen S, Baar K. Adaptations to Endurance and Strength Training. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(6).
16. Organization WH. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. 2004.
17. Heinonen S, Jokinen R, Rissanen A, Pietilainen KH. White adipose tissue mitochondrial metabolism in health and in obesity. *Obes Rev*. 2020;21(2):e12958.
18. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.
19. Choe SS, Huh JY, Hwang JJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:30.

20. Argiles JM, Lopez-Soriano J, Almendro V, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Med Res Rev.* 2005;25(1):49-65.
21. Sigal NGBEHGPKGAWRJ. Effects of Exercise on Glycemic Control and Body Mass in Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA Intern Med.* 2001;286:10.
22. Aragon AA, Schoenfeld BJ, Wildman R, Kleiner S, VanDusseldorp T, Taylor L, et al. International society of sports nutrition position stand: diets and body composition. *J Int Soc Sports Nutr.* 2017;14:16.
23. Hargreaves M, Spriet LL. *Exercise Metabolism: Fuels for the Fire.* Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(8).
24. Yang A, Mottillo EP. Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics. *Biochem J.* 2020;477(5):985-1008.
25. Tsiloulis T, Watt MJ. Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;135:175-201.
26. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell metabolism.* 2013;17(2):162-84.
27. SILVÉRIO R. A modulação da lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL) e da perilipina 1 contribui para o aumento da lipólise em pacientes caquéticos. In: Paulo UdS, editor. 2011. p. 117.
28. Smith U, Kahn BB. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *J Intern Med.* 2016;280(5):465-75.
29. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2011;93:S52-S9.
30. Barzilai N, Banerjee S, Hawkins M, Chen W, Rossetti L. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. *J Clin Invest.* 1998;101(7):1353-61.
31. Sorriento D, Rusciano MR, Visco V, Fiordelisi A, Cerasuolo FA, Poggio P, et al. The Metabolic Role of GRK2 in Insulin Resistance and Associated Conditions. *Cells.* 2021;10(1).
32. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc.* 2004;63(2):263-7.
33. Higgs S. Social norms and their influence on eating behaviours. *Appetite.* 2015;86:38-44.
34. Cena H, Calder PC. Defining a Healthy Diet: Evidence for The Role of Contemporary Dietary Patterns in Health and Disease. *Nutrients.* 2020;12(2).
35. Thomas DT, Erdman KA, Burke LM. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance. *J Acad Nutr Diet.* 2016;116(3):501-28.
36. Collaborators GBDO, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med.* 2017;377(1):13-27.
37. Karl JP, Roberts SB. Energy density, energy intake, and body weight regulation in adults. *Adv Nutr.* 2014;5(6):835-50.
38. Treasure J, Duarte TA, Schmidt U. Eating disorders. *The Lancet.* 2020;395(10227):899-911.
39. Frank GKW, Shott ME, DeGuzman MC. The Neurobiology of Eating Disorders. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2019;28(4):629-40.
40. Erzegovesi S, Bellodi L. Eating disorders. *CNS Spectr.* 2016;21(4):304-9.
41. Martinez Segura A, Cortes Castell E, Rizo Baeza MM, Gil Guillen VF. [Evaluation of Gym Users' Diet with Muscle Dysmorphia (Bigorexia)]. *Nutr Hosp.* 2015;32(1):324-9.

42. Thomas DT, Erdman KA, Burke LM. American College of Sports Medicine Joint Position Statement. Nutrition and Athletic Performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2016;48(3):543-68.
43. Wu J, Liu J, Li S, Ma H, Wang Y. Trends in the prevalence and disability-adjusted life years of eating disorders from 1990 to 2017: results from the Global Burden of Disease Study 2017. *Epidemiol Psychiatr Sci.* 2020;29:e191.
44. Soares MJ, Muller MJ. Resting energy expenditure and body composition: critical aspects for clinical nutrition. *Eur J Clin Nutr.* 2018;72(9):1208-14.
45. Westerterp KR. Control of energy expenditure in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2017;71(3):340-4.
46. Cunningham JJ. A reanalysis of the factors influencing basal metabolic rate in normal adults. *American Journal Clinical NUTRITION.* 1980;33:2372-4.
47. Shizgal AMRH. The Harris Benedict equation reevaluated: resting energy requirements and the bodt cell mass. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1984;40:168-82.
48. Dorighello GG, Rovani JC, Luhman CJ, Paim BA, Raposo HF, Vercesi AE, et al. Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. *Br J Nutr.* 2014;111(6):979-86.
49. Arguin H, Dionne IJ, Senechal M, Bouchard DR, Carpentier AC, Ardilouze JL, et al. Short- and long-term effects of continuous versus intermittent restrictive diet approaches on body composition and the metabolic profile in overweight and obese postmenopausal women: a pilot study. *Menopause.* 2012;19(8):870-6.
50. Faris MA, Kacimi S, Al-Kurd RA, Fararjeh MA, Bustanji YK, Mohammad MK, et al. Intermittent fasting during Ramadan attenuates proinflammatory cytokines and immune cells in healthy subjects. *Nutr Res.* 2012;32(12):947-55.
51. Trepanowski JF, Kroeger CM, Barnosky A, Klempel MC, Bhutani S, Hoddy KK, et al. Effect of Alternate-Day Fasting on Weight Loss, Weight Maintenance, and Cardioprotection Among Metabolically Healthy Obese Adults: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med.* 2017;177(7):930-8.
52. Varady KA, Roohk DJ, McEvoy-Hein BK, Gaylinn BD, Thorner MO, Hellerstein MK. Modified alternate-day fasting regimens reduce cell proliferation rates to a similar extent as daily calorie restriction in mice. *FASEB J.* 2008;22(6):2090-6.
53. Harvey AE, Lashinger LM, Otto G, Nunez NP, Hursting SD. Decreased systemic IGF-1 in response to calorie restriction modulates murine tumor cell growth, nuclear factor-kappaB activation, and inflammation-related gene expression. *Mol Carcinog.* 2013;52(12):997-1006.
54. Lopez-Lluch G, Navas P. Calorie restriction as an intervention in ageing. *J Physiol.* 2016;594(8):2043-60.
55. Golbidi S, Daiber A, Korac B, Li H, Essop MF, Laher I. Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction. *Curr Diab Rep.* 2017;17(12):123.
56. Chung HY, Lee EK, Choi YJ, Kim JM, Kim DH, Zou Y, et al. Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *J Dent Res.* 2011;90(7):830-40.
57. Park CY, Park S, Kim MS, Kim HK, Han SN. Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;490(3):636-42.
58. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(4):189-95.
59. Yazdi AS, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. *Adv Exp Med Biol.* 2016;941:21-9.
60. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? *Int J Mol Sci.* 2018;19(8).

61. Uciechowski P, Dempke WCM. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology*. 2020;98(3):131-7.
62. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2012;122(4):143-59.
63. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell*. 2014;159(4):738-49.
64. Wedell-Neergaard AS, Lang Lehrskov L, Christensen RH, Legaard GE, Dorph E, Larsen MK, et al. Exercise-Induced Changes in Visceral Adipose Tissue Mass Are Regulated by IL-6 Signaling: A Randomized Controlled Trial. *Cell Metab*. 2019;29(4):844-55 e3.
65. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-26.
66. Bianconi V, Sahebkar A, Atkin SL, Pirro M. The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Curr Opin Hematol*. 2018;25(1):44-51.
67. Li S, Lu J, Chen Y, Xiong N, Li L, Zhang J, et al. MCP-1-induced ERK/GSK-3beta/Snail signaling facilitates the epithelial-mesenchymal transition and promotes the migration of MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(7):621-30.
68. Engin AB. Adipocyte-Macrophage Cross-Talk in Obesity. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:327-43.
69. Raju PPAJWKS. Therapeutic approaches for the delivery of TNF- $\alpha$  siRNA. *Therapeutic Delivery*. 2017;8:343-55.
70. Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(6):482-93.
71. Karalis TTPGKP. TNF- $\alpha$  and Obesity. *TNF Pathophysiology Molecular and Cellular Mechanisms*. 2010;11:45–156.
72. Sandra A. Schreyer; Streamson C. Chua JRCL. Obesity and Diabetes in TNF- $\alpha$  Receptor-deficient Mice. *Journal Clinical Investigation*. 1998;102:402-11.
73. Ouyang W, O'Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*. 2019;50(4):871-91.
74. Conrad ML, Renz H, Blaser K. Immunological approaches for tolerance induction in allergy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;352:1-26.
75. Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, Roque S, Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):297.
76. Schulke S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front Immunol*. 2018;9:455.
77. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(4):232-41.
78. Blair SN. Physical inactivity: the biggest public health problem of the 21st century. *Journal of Sports Medicine*. 2009;43:1-2.
79. P. DUPABRCKKCBLATNZMJJLGJ. Physical Activity Advice Only or Structured Exercise Training and Association With HbA1c Levels in Type 2 Diabetes. *American Medical Association*. 2011;305:1790-9.
80. DYPMPNA GALLAGHER DB, PAUL DEURENBERG, ZIMIAN WANG,, NORMAN KRASNOW FXP-S, AND STEVEN B. HEYMSFIELD. Organ-tissue mass measurement allows modeling of REE and metabolically active tissue mass. *American Physiological Society*. 1998:E249-E58.
81. Baskin KK, Winders BR, Olson EN. Muscle as a "mediator" of systemic metabolism. *Cell Metab*. 2015;21(2):237-48.
82. Giudice J, Taylor JM. Muscle as a paracrine and endocrine organ. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;34:49-55.

83. Safdar A, Saleem A, Tarnopolsky MA. The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(9):504-17.
84. Pedersen BK. Muscles and their myokines. *J Exp Biol.* 2011;214(Pt 2):337-46.
85. Charlotte Keller AS, Henriette Pilegaard, Takuya Osada, Bente Klarlund Pedersen, and P. Darrell Neuffer. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *The FASEB Journal.* 2001.
86. Reeves PG. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. *American Society for Nutritional Science.* 1997;1:838s-41s.
87. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5.
88. Shanmugam M, Jeyakumar AV, Nappan V, Giridharan. Chronic Dietary Vitamin A Supplementation Regulates Obesity in an Obese Mutant WNIN/Ob Rat Model. *Obesity.* 2006;14:7.
89. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med.* 2016;48:e218.
90. Sokolovic M, Sokolovic A, Wehkamp D, Ver Loren van Themaat E, de Waart DR, Gilhuijs-Pederson LA, et al. The transcriptomic signature of fasting murine liver. *BMC Genomics.* 2008;9:528.
91. Hargreaves M, Spriet LL. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nat Metab.* 2020;2(9):817-28.
92. Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 2008;88(1):287-332.
93. Muscella A, Stefano E, Lunetti P, Capobianco L, Marsigliante S. The Regulation of Fat Metabolism During Aerobic Exercise. *Biomolecules.* 2020;10(12).
94. Alsted TJ, Ploug T, Prats C, Serup AK, Hoeg L, Schjerling P, et al. Contraction-induced lipolysis is not impaired by inhibition of hormone-sensitive lipase in skeletal muscle. *J Physiol.* 2013;591(20):5141-55.
95. Sylow L, Kleinert M, Richter EA, Jensen TE. Exercise-stimulated glucose uptake - regulation and implications for glycaemic control. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(3):133-48.
96. Catalano KJ, Stefanovski D, Bergman RN. Critical role of the mesenteric depot versus other intra-abdominal adipose depots in the development of insulin resistance in young rats. *Diabetes.* 2010;59(6):1416-23.
97. Borghouts L. Exercise and Insulin Sensitivity: A Review. *International Journal of Sports Medicine.* 2000;21:1-12.
98. Pohl DLFLWHHSA. Diminished Insulin Response in Highly Trained Athletes. *Metabolism.* 1978;27.
99. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med.* 2011;32(3):159-221.
100. Nordmann TM, Seelig E, Timper K, Cordes M, Coslovsky M, Hanssen H, et al. Muscle-Derived IL-6 Is Not Regulated by IL-1 during Exercise. A Double Blind, Placebo-Controlled, Randomized Crossover Study. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139662.
101. Tom Cullen AWT, Richard Webb, Michael G. Hughes. Interleukin-6 and associated cytokine responses to an acute bout of high intensity interval exercise: the effect of exercise intensity and volume. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism.* 2016:1-26.
102. Fischer C. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise Immunology Review.* 2006;12:6-33.
103. Clement K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J.* 2004;18(14):1657-69.

104. Madeo F, Carmona-Gutierrez D, Hofer SJ, Kroemer G. Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell Metab.* 2019;29(3):592-610.
105. Ugochukwu NH, Figgers CL. Caloric restriction inhibits up-regulation of inflammatory cytokines and TNF-alpha, and activates IL-10 and haptoglobin in the plasma of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 2007;18(2):120-6.
106. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFkappaB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016;8(3):227-41.
107. Anton S, Leeuwenburgh C. Fasting or caloric restriction for healthy aging. *Exp Gerontol.* 2013;48(10):1003-5.
108. Vaiserman A, Lushchak O. Implementation of longevity-promoting supplements and medications in public health practice: achievements, challenges and future perspectives. *J Transl Med.* 2017;15(1):160.
109. Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, Aggarwal I, Hellerstein MK. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(1):E108-16.