



EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA MORFOLOGIA DO TECIDO ADIPOSO E NOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM FÊMEAS OBRAS

Palavras-chave: exercício físico aeróbio, fêmeas obesas, tecido adiposo.

Autores:

Guilherme Alves dos Santos

Ms. Teresa Maria Da Ré Silva

Prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni

Profa. Dra. Maria Andréia Delbin

Instituto de Biologia - Universidade Estadual De Campinas – UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

A prevalência de obesidade em diversas populações, inclusive no Brasil, tem crescido constantemente e a susceptibilidade a esse quadro se apresenta de forma diferente entre os sexos. Foi demonstrado que as mulheres são mais propensas a desenvolverem obesidade severa e apresentam maiores riscos de complicações, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 (DM2), hipertensão arterial sistêmica, apneia do sono, câncer e transtornos mentais, em comparação aos homens (RYAN, 2007; MANRIQUE-ACEVEDO et al., 2020).

O tecido adiposo é caracterizado como um órgão multifuncional, que garante suporte energético de acordo com as necessidades apresentadas pelo organismo, sendo metabolicamente ativo e essencial para as funções fisiológicas, que contribuem para a homeostase corporal (SANTOS; TORRENT, 2010), podendo ser dividido em tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). O TAB sintetiza e libera uma variedade de substâncias bioativas conhecidas como adipocinas, as quais regulam muitos processos fisiológicos, apresentando assim, funções endócrinas e imunológicas (SAKERS, et al., 2022).

O exercício físico aeróbio promove benefícios cardiovasculares e endócrino-metabólicos. Tendo um grande impacto sobre o tecido adiposo, reduzindo sua característica inflamatória, melhorando a sensibilidade à insulina, em alguns casos, promovendo perda de peso, papel importante na regulação positiva do tecido adiposo e medidor da resposta anti-inflamatória (PEDERSEN, 2011; BASTU et al., 2018; YANG et al., 2021).

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio de moderada intensidade na morfologia do tecido adiposo perigonadal e do tecido adiposo interescapular e nos biomarcadores inflamatórios em camundongos fêmeas obesas.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

A partir do protocolo experimental (CEUA/UNICAMP nº 5849-1/2021), fêmeas da linhagem C57BL/6 JUnib foram divididas em quatro grupos: SD (sedentárias, ração padrão contendo 64% de carboidratos, 22% de proteínas e 4% de lipídios-3,6 kcal/g), TR (treinadas, ração padrão), OB/SD (sedentárias, dieta hiperlipídica contendo 32% de carboidratos, 20,3% de proteínas e 38% de lipídios-6,2 kcal/g) e OB/TR (treinadas, dieta hiperlipídica). Os grupos OB/SD e OB/TR receberam dieta hiperlipídica por 16 semanas para indução da obesidade. Na 9ª semana, os grupos TR e OB/TR iniciaram o treinamento físico aeróbio em esteira, com duração de 8 semanas, mantendo as respectivas dietas e totalizando 16 semanas de protocolo experimental.

3.2 Treinamento físico aeróbio

O protocolo de treinamento físico consistiu em corrida em esteira ergométrica (AVS Projetos, Brasil) por 8 semanas, 5 dias por semana, com sessões de 60 minutos realizadas no período da manhã. A velocidade máxima (V_{MAX}) atingida no teste de esforço (FERREIRA et al., 2007), foi utilizada para definir a intensidade do treinamento físico, padronizado entre 50 e 60% da V_{MAX} . Na primeira semana, a velocidade e o tempo foram aumentados progressivamente até atingir o padrão final da sessão: 10 min a 40% da V_{MAX} , 40 min a 50–60% da V_{MAX} e 10 min a 40% da V_{MAX} , com inclinação de 0%.

3.3 Coleta de Tecidos

Os animais foram anestesiados com cetamina 80mg/kg e xilazina 10mg/kg intraperitoneal e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca para obtenção do soro, a eutanásia foi realizada por aprofundamento da anestesia e exsanguinação. O tecido adiposo perigonadal (TA_p), o tecido adiposo interescapular (TA_i) (SAKERS, et al., 2022) e a tibia foram coletados.

3.4 Histologia

As amostras de TA_p e TA_i foram fixadas por imersão em paraformaldeído 4% em solução-tampão de fosfato salino 0,1M (PBS, pH 7,4), a 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas em solução-tampão e desidratadas em bateria de alcoóis e embebidas em historresina (Leica Microsystems Heidelberg, Alemanha). Cortes de 5 µm foram corados pelo método de hematoxilina e eosina-floxina B 1%. Os materiais foram documentados em fotomicroscópio Eclipse 800 (Nikon, Japão), utilizando-se a câmera digital P6FL PRO (Optika, Itália) (BENNETT et al., 1976; CASTELUCCI et al., 2019).

3.5 Biomarcadores inflamatórios

Amostras de soro foram utilizadas para determinação de biomarcadores inflamatórios pelo método de ELISA utilizando kit comercial e seguindo as instruções do fabricante. Foram determinadas as concentrações de adiponectina (ELM-Adiponectin, RayBiotech), leptina (ELM-Leptin-1, RayBiotech) e TNF-α (MHSTA50, R&D Systems).

3.6 Análise estatística

Os valores experimentais foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de n experimentos indicados em cada caso. Análise de variância, ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni, foi empregada para avaliar diferenças entre os grupos experimentais (GraphPad Software, Estados Unidos). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização do modelo de obesidade

O peso corporal dos animais no início do protocolo experimental foi semelhante em todos os grupos. Porém, ao final do protocolo experimental, os grupos OB/SD e OB/TR, apresentaram aumento do peso final em comparação aos grupos SD e TR, respectivamente, associado com aumento da ingesta calórica (Tabela 1). Tanto o peso do TA_p quanto do TA_i, mostraram-se maiores nos grupos OB/SD e OB/TR, em comparação com os grupos SD e TR (Tabela 1). Assim, a dieta hiperlipídica foi eficiente para indução do modelo experimental de obesidade. O treinamento físico aeróbio foi efetivo na redução do TA_i no grupo OB/TR quando comparado ao grupo OB/SD (Tabela 1). Em relação ao consumo hídrico, os animais dos grupos OB/SD e OB/TR apresentaram menor consumo de água em comparação aos grupos SD e TR, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Peso inicial, peso final, peso do tecido adiposo perigonadal (TA_p), peso do tecido adiposo interescapular (TA_i), ingesta calórica e consumo hídrico de camundongos fêmeas dos grupos sedentária (SD), treinada (TR), obesa sedentária (OB/SD) e obesa treinada (OB/TR)..

	SD (8)	TR (8)	OB/SD (8)	OB/TR (8)
Peso Inicial (gramas)	20,0 ± 0,3	20,0 ± 0,2	21,0 ± 0,5	21,0 ± 0,2
Peso Final (gramas)	24,8 ± 0,6	24,0 ± 0,4	47,5 ± 1,3*	45,2 ± 2,2 [#]
TA_p (mg/mm tibia)	369 ± 65	279 ± 34	2863 ± 150*	2573 ± 226 [#]
TA_i (mg/mm tibia)	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,2	13,9 ± 1,7 *	8,9 ± 1,0 ^{# +}
Ingesta Calórica (kcal/animal/dia)	11,7 ± 0,2	11,0 ± 0,5	30,4 ± 2,2*	27,6 ± 1,8 [#]
Consumo Hídrico (ml/animal/dia)	21,0 ± 0,5	20,0 ± 0,7	12,0 ± 0,5*	11,0 ± 0,8 [#]

O comprimento da tibia (milímetro) foi utilizado para normalização do peso do TA_p e TA_i (miligramas/milímetro), consumo hídrico (mililitro/animal/dia) e ingesta calórica (quilocaloria/animal/dia). Valores expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao SD; [#] $p < 0,05$ comparado ao TR; ⁺ $p < 0,05$ comparado ao OB/SD.

4.2 Análise Qualitativa do Tecido Adiposo

A avaliação histológica do TA_p revelou características morfológicas típicas de TAB. No grupo TR, observou-se redução no diâmetro dos adipócitos em comparação ao grupo SD (Figura 1). Em contraposição, o grupo OB/SD apresentou adipócitos hipertrofiados, com bordas celulares irregulares e um vacúolo lipídico central proeminente, responsável pelo deslocamento nuclear periférico. O grupo OB/TR também apresentou adipócitos hipertrofiados, contudo com disposição e contornos celulares mais regulares do que os observados no grupo OB/SD (Figura 1). O TA_i apresentou características morfológicas típica de TAM, sendo possível observar nos grupos SD e TR adipócitos multiloculares com múltiplas inclusões lipídicas de pequeno volume (Figura 2). No grupo OB/SD, foi observada uma acentuada hipertrofia dos adipócitos, acompanhada da presença de adipócitos brancos dismórficos. Por fim, no grupo OB/TR, verificou-se um padrão compatível com hipertrofia dos adipócitos, embora as alterações morfológicas tenham se mostrado menos pronunciadas em comparação ao grupo OB/SD (Figura 2).

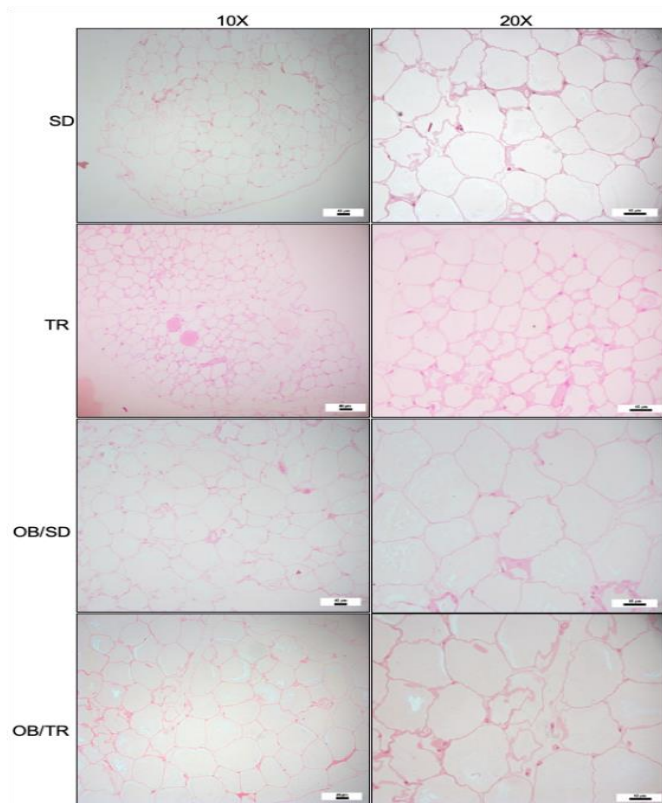


Figura 1: Fotomicrografias representativas do tecido adiposo perigonadal (TAP) de camundongos fêmeas dos grupos sedentária (SD), treinada (TR), obesa sedentária (OB/SD) e obesa treinada (OB/TR). As imagens digitais foram obtidas utilizando objetivas 10x e 20x. N = 2 a 4 animais. Escala de 40 μ m.

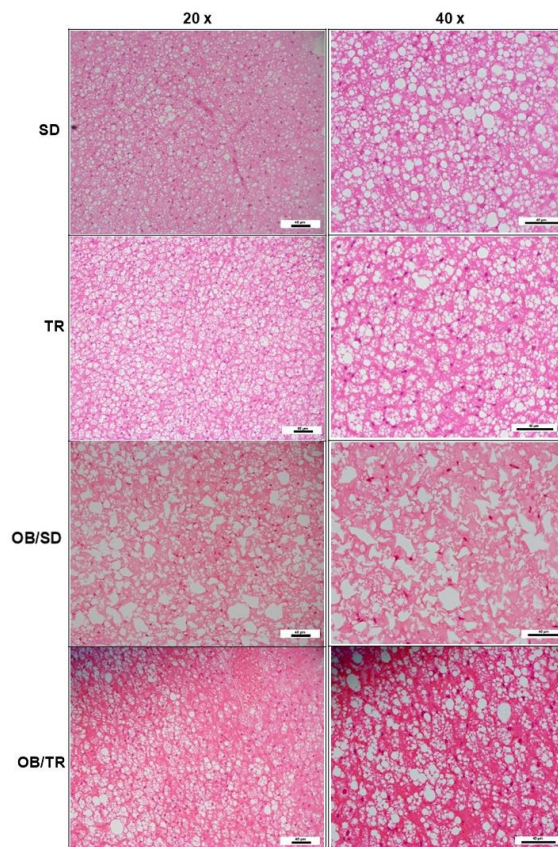


Figura 2: Fotomicrografias representativas do tecido adiposo interescapular (TAi) de camundongos fêmeas dos grupos sedentária (SD), treinada (TR), obesa sedentária (OB/SD) e obesa treinada (OB/TR). As imagens digitais foram obtidas utilizando objetivas 20x e 40x. N = 2 a 4 animais. Escala de 40 μ m.

4.3 Análise Quantitativa do Tecido Adiposo

A análise da área dos adipócitos brancos no TAP (Figura 3A) evidenciou diferenças significativas entre os grupos experimentais. Os grupos OB/SD e OB/TR apresentaram adipócitos com áreas maiores em comparação aos grupos SD e TR, respectivamente, indicando hipertrofia associada à obesidade. No entanto, ao observar os grupos OB/SD e OB/TR, apesar da condição de obesidade, os animais do grupo OB/TR apresentaram uma tendência de redução dos adipócitos em relação ao OB/SD, sugerindo que a prática regular de exercício físico pode atenuar, ao menos parcialmente, a hipertrofia dos adipócitos do TAP induzida pela obesidade.

Ao observarmos a frequência de distribuição de adipócitos brancos no TAP (Figura 3B), os grupos SD e TR apresentam maior proporção de adipócitos de menor tamanho em comparação aos respectivos grupos obesos. Além disso, observa-se que o grupo OB/TR exibe uma frequência mais elevada de adipócitos menores e uma menor proporção de adipócitos hipertrofiados em relação ao grupo OB/SD, reforçando a evidência de que o exercício físico aeróbico contribui para a preservação da morfologia tecidual, atenuando a hipertrofia dos adipócitos associada à obesidade.

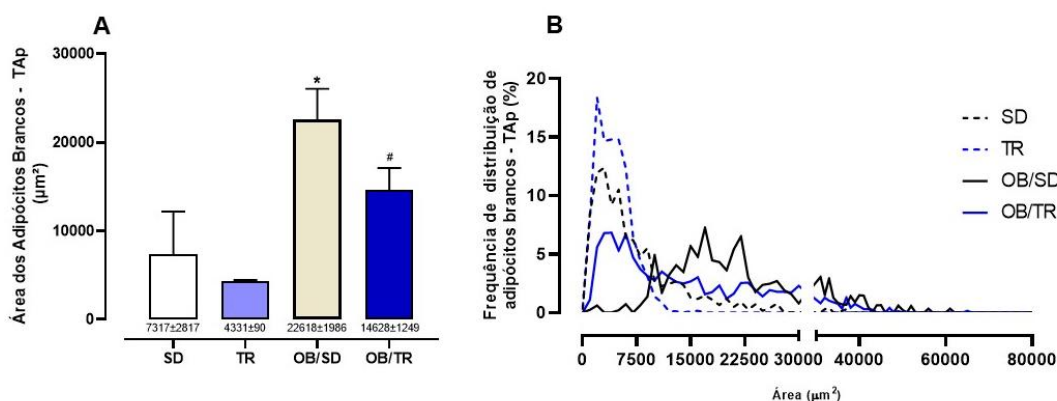


Figura 3: Área dos adipócitos brancos - TAP (μ m², painel A), Frequência de distribuição de adipócitos brancos - TAP (%), painel B). Grupos: sedentária (SD), treinada (TR), sedentária e dieta hiperlipídica (OB/SD) e treinada e dieta hiperlipídica (OB/TR). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao SD; # $p < 0,05$ comparado ao TR. N = 2 a 4 animais.

O conteúdo lipídico no TAI foi similar em todos os grupos experimentais (Figura 3A). Por outro lado, ao analisarmos a área dos adipócitos brancos no TAI (Figura 4B) observamos diferenças significativas entre os grupos, refletindo alterações morfológicas. Os grupos OB/SD e OB/TR apresentaram adipócitos com áreas significativamente maiores quando comparados aos grupos SD e TR, respectivamente, evidenciando a hipertrofia celular associada à obesidade. Entretanto, o grupo OB/TR também apresentou tendência de redução dos adipócitos brancos no TAI em relação ao OB/SD, o que indica que a prática de exercício físico aeróbio pode atenuar parcialmente a hipertrofia desses adipócitos.

Esse efeito modulador do exercício físico aeróbio também pôde ser observado na frequência de distribuição de adipócitos brancos no TAI (Figura 4C), os grupos SD e TR mostraram uma maior proporção de adipócitos menores. Nos grupos OB/SD e OB/TR, a frequência desses adipócitos menores foi reduzida, refletindo a hipertrofia associada à obesidade. Contudo, observa-se que o grupo OB/TR apresentou uma distribuição mais favorável, com maior presença de adipócitos de menor tamanho, sugerindo que o exercício físico aeróbio, é capaz de atenuar a hipertrofia dos adipócitos na obesidade.

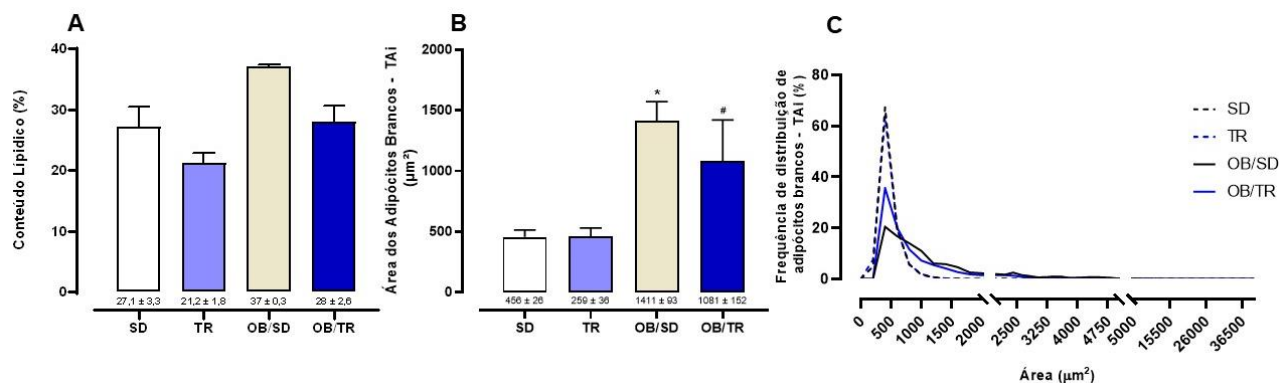


Figura 4: Conteúdo lipídico - TAI (%), Área dos adipócitos brancos - TAI (μm²) e Frequência de distribuição de adipócitos brancos - TAI (%). Grupos: sedentária (SD), treinada (TR), sedentária e dieta hiperlipídica (OB/SD) e treinada e dieta hiperlipídica (OB/TR). Valores expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: *p<0,05 comparado ao SD; #p<0,05 comparado ao TR. N = 3 a 5 animais.

4.4 Análise dos níveis séricos de adipocinas

A adiponectina é um hormônio predominantemente secretado pelos adipócitos e reconhecida por suas propriedades anti-inflamatórias. Alterações nos genes responsáveis pela produção e regulação da adiponectina podem predispor os indivíduos ao desenvolvimento de condições como síndrome metabólica, resistência à insulina, diabetes, obesidade e doenças arteriais coronarianas (VOLP et al., 2008). No entanto, apesar das evidências previamente descritas na literatura, a análise dos níveis séricos de adiponectina (Figura 5A) não demonstrou diferenças significativas entre os grupos avaliados.

Por outro lado, em relação à leptina, um hormônio secretado pelo tecido adiposo que informa ao cérebro sobre os estoques de energia (WISSE, 2004), observamos alterações significativas entre os grupos (Figura 5B). A concentração de leptina no grupo OB/SD aumentou em comparação ao grupo SD, sendo o treinamento físico aeróbio efetivo em reduzir os valores no grupo OB/TR.

Por fim, em relação ao TNF-α, uma citocina pró-inflamatória associada à fisiopatologia de doenças metabólicas, a análise de seus níveis séricos (Figura 5C) demonstrou diferenças significativas entre os grupos OB/SD e OB/TR em comparação aos grupos SD e TR. Cabe destacar que o exercício físico aeróbio foi capaz em reduzir o quadro inflamatório nos animais OB/TR. Esses achados indicam que, no contexto da obesidade, caracterizado por uma desregulação da homeostase metabólica e pela instalação de um estado inflamatório, os níveis circulantes de TNF-α encontram-se elevados. A prática regular de exercício físico aeróbio tem o potencial de regular o processo inflamatório associado à obesidade, podendo promover a redução da expressão e liberação dessa citocina.

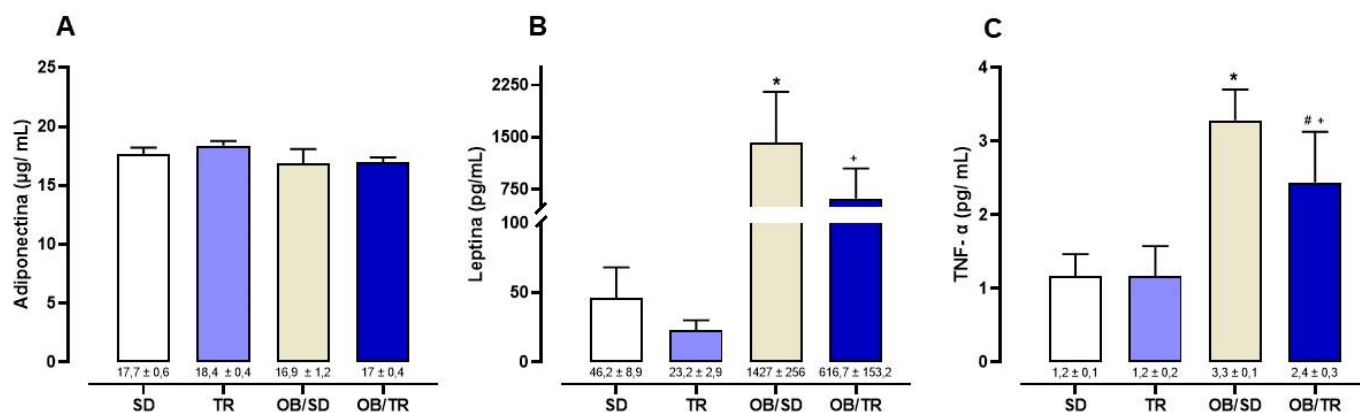


Figura 5: Adiponectina (μg/mL), Leptina (pg/mL) e TNF-α (pg/mL). Grupos: sedentária (SD), treinada (TR), sedentária e dieta hiperlipídica (OB/SD) e treinada e dieta hiperlipídica (OB/TR). Valores expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: *p<0,05 comparado ao SD; #p<0,05 comparado ao TR; +p<0,05 comparado ao OB/SD. N = 5 a 9 animais.

5. CONCLUSÃO

Nesse estudo demonstramos que camundongos fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica apresentaram alterações morfológicas significativas no tecido adiposo perigonadal e no tecido adiposo interescapular, com aumento da área dos adipócitos e inflamação sistêmica. O treinamento físico aeróbico foi capaz em atenuar algumas alterações morfológicas, preservando a arquitetura dos adipócitos, com redução da inflamação sistêmica.

Esses achados reforçam a complexidade funcional do tecido adiposo, não apenas como reservatório energético, mas como órgão endócrino e imunológico ativo, cuja disfunção está intimamente relacionada a processos inflamatórios e ao desenvolvimento de comorbidades metabólicas. Assim, a modulação do tecido adiposo por meio do exercício físico aeróbico, destaca-se como uma estratégia não farmacológica, se mostrando eficaz na prevenção e controle das complicações associadas à obesidade, evidenciando seu potencial terapêutico e sua relevância para a promoção da saúde.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BASTU, E. et al. Effects of Irisin and Exercise on Metabolic Parameters and Reproductive Hormone Levels in High-Fat Diet-Induced Obese Female Mice. **Reproductive Sciences**, v. 25, n. 2, p. 281-291, fev. 2018.
2. BENNETT, H.S. et al. Science and Art in Preparing Tissues Embedded in Plastic for Light Microscopy, with Special Reference to Glycol Methacrylate, Glass Knives and Simple Stains. **Stain Technology**, v. 51, n. 2, p. 71-97, jan. 1976.
3. CASTELUCCI, B.G. et al. Recruitment of monocytes and mature macrophages in mouse pubic symphysis relaxation during pregnancy and postpartum recovery. **Biology of Reproduction**, 14 jun. 2019.
4. FERREIRA, J.C. et al. Maximal Lactate Steady State In Running Mice: Effect Of Exercise Training. **Clinical and Experimental Pharmacology And Physiology**, São Paulo, v. 34, p. 760-765, 17 abr. 2007.
5. MANRIQUE-ACEVEDO, C. et al. Obesity and cardiovascular disease in women. **Int J Obes**. 2020 Jun;44(6):1210-1226.
6. PEDERSEN, B.K. Muscles and their myokines. **Journal Of Experimental Biology**, v. 214, n. 2, p. 337-346, 15 jan. 2011. The CompanyofBiologists.
7. RYAN, D. Obesity in women: a life cycle of medical risk. **International Journal of Obesity**. v.31, p. S3-S7, 2007.
8. SANTOS, L.C.; TORRENT, I.F. O Tecido Adiposo e a Produção de Adipocinas. **Synthesis Revista Digital: FAPAM**, v. 2, n. 2, p. 110-119, 1 jan. 2010.
9. SARKERS, A. et al. Adipose-tissue plasticity in health and disease. **Cell**. 2022 Feb 3;185(3):419-446.
10. VOLP, Ana Carolina Pinheiro; ALFENAS, Rita de Cássia G.; COSTA, Neuza Maria Brunoro; MINIM, Valéria Paula Rodrigues; STRINGUETA, Paulo César; BRESSAN, Josefina. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica: inflammationbiomarkerscapacity in predictingthemetabolicsyndrome. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 537-549, abr. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27302008000300015>.
11. WISSE, Brent E.. The Inflammatory Syndrome. **Journal Of The American Society Of Nephrology**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 2792-2800, nov. 2004. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.asn.0000141966.69934.21>.
12. YANG, J. et al. Effects of Long-Term DHA Supplementation and Physical Exercise on Non-Alcoholic Fatty Liver Development in Obese Aged Female Mice. **Nutrients**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 501, 3 fev. 2021.