



**Tese de Doutorado**

**Análise das alterações musculares de ratos obesos  
frente a intervenção do exercício de natação – um  
estudo envolvendo a composição corporal, morfologia  
muscular e citocinas circulantes.**

**Cristina Arrais Lima**

**São Carlos**

**2020**



**Análise das alterações musculares de ratos obesos frente a intervenção do exercício de natação – um estudo envolvendo a composição corporal, morfologia muscular e citocinas circulantes.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Stela Marcia Mattiello**  
**Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilseac**

**São Carlos**

**2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Cristina Arrais Lima, realizada em 14/02/2020:

---

Profa. Dra. Stela Marcia Mattiello  
UFSCar

---

Prof. Dr. Hugo Celso Dutra de Souza  
USP

---

Prof. Dr. Ricardo Augusto Barbieri  
USP

---

Profa. Dra. Paula Regina Mendes da Silva Serrão  
UFSCar

---

Prof. Dr. Richard Eloin Liebano  
UFSCar

Dedico essa tese ao meu filho e amigo Lucas

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, por sentir sua presença em minha vida e por ter me dado anjos, minha família, que fazem meu caminho mais leve. Agradeço ao meu filho, que ainda pequeno entendeu a ausência e sempre me deu Amor. Minha mãe que nunca soltou minha mão. Meu irmão que me acalma, me escuta com todo seu amor. Meu pai, que me ensina a ter persistência. Minha sobrinha por sua amizade e carinho.

Agradeço a prof. <sup>a</sup> Stela, pelo aprendizado. Ao meu co-orientador prof. Fernando, pela paciência e ensinamentos, obrigada por tudo Zé. Para a família Lafar, Isabela, Bia, Jéssica, Glauca, Aline e Marina, obrigada pelo convívio, pela ajuda e pelos ensinamentos compartilhados. Em especial, a Alyssa, Ludmilla e Ricardo, me ajudaram neste trabalho e sem vocês não teria conseguido, obrigada pela amizade, companheirismo e lealdade, levo vocês em meu coração.

Agradeço aos membros da minha banca, por aceitarem o convite de participarem desse momento de extrema importância para mim e contribuírem com minha formação profissional. Obrigado pela dedicação e colaboração.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado concedida.

Agradeço também a todos os professores e funcionários que fazem parte da excelente equipe da Pós-Graduação do Departamento de Fisioterapia.

Agradeço aos funcionários do Biotério Central da UFSCar, a empresa fornecedora de maravalha e toda rede de suporte que de alguma forma colaborou com minha pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira fizeram parte deste trabalho.

## Resumo

A obesidade tem um caráter multifatorial podendo estar relacionada à fatores hereditários, farmacológicos e especialmente a dietas desequilibradas. O acúmulo de gordura pode ocorrer em diferentes tecidos e locais do corpo, trazendo diferentes consequências. As gorduras que se acumulam no abdômen, as chamadas viscerais ou centrais, parecem não apenas se correlacionarem com as doenças metabólicas, como diabetes mellitus tipo II, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares, como também com alguns tipos de cânceres e causar uma inflamação sistêmica crônica leve. Essa condição tornou-se um problema na saúde pública e milhões gasto por ano no combate ao sobrepeso e obesidade, não apenas no adulto, mas também em crianças e adolescentes em todo o mundo. Na literatura o tratamento para a obesidade é multidisciplinar, porém no geral é preciso equilibrar a ingestão com o gasto energético, e para isso os exercícios são as ferramentas mais recomendadas em tratamentos não medicamentosos. Sendo assim, esse trabalho de tese está composto por 2 estudos: Estudo 1, cujo objetivo foi verificar as mudanças causadas pela obesidade nos parâmetros do peso corporal, na porcentagem de gordura corporal e abdominal e massa óssea em ratos obesos através do escaneamento corporal feito pelo aparelho Dual-Energy X-ray absorptiometry Scan (HOLOGIC<sup>®</sup>) pré e pós treino de natação. Ainda, correlacionar essas medidas com hormônios ligados ao desequilíbrio causado pela obesidade, como a Leptina, e a tentativa do retorno ao equilíbrio metabólico, como adiponectina e irisina. Essas medidas foram feitas após o treino de natação, que foi escolhido pela não sobrecarga causada nas articulações. O Estudo 2 teve por objetivo verificar o acúmulo de gordura no tecido musculoesquelético, especialmente nos músculos vasto medial, vasto lateral, tibial anterior e gastrocnêmios e analisar as citocinas circulantes, a fim de investigar a inflamação sistêmica causada pela obesidade. Neste estudo analisamos as citocinas IL-4 e IL-10, consideradas anti-inflamatórias e TNF $\alpha$  e IL-6, pró-inflamatórias. Os resultados apontaram que a natação em ratos obesos, promoveu redução da gordura central e corporal, bem como aumento na concentração de IL-4 em apenas nos animais obesos, mostrando uma tentativa de recuperar o equilíbrio metabólico. A partir desses estudos identificamos que a natação foi eficaz na modulação da gordura acumulada no abdome, bem como nos músculos estudados, de ratos obesos. Esses resultados colaboram com a literatura sobre o exercício como uma ferramenta, não medicamentosa, no combate a obesidade e suas mudanças, mesmo sem nenhuma intervenção na dieta.

## LISTA DE FIGURAS

### **Estudo 1**

Figura I- Apresentação do período de adaptação e treino de natação dos ratos.

Figura II- Apresentação das citocinas ao longo do experimento

### **Estudo 2**

Figura I- Representação gráfica da média dos grupos para cada citocina analisada

Figura II- Fotomicrografias das lâminas coradas com ORO.

Figura III- Fotomicrografias das lâminas coradas com Tricrômico de Masson.

## **Estudo 1**

Tabela I- Apresentação dos dados do DXA corporal e abdominal no período de 12 semanas dos animais obesos e magros

Tabela II- Apresentação dos dados do DXA corporal de todos os animais após o treino de natação e sedentários.

Tabela III- Apresentação dos dados do DXA abdominal de todos os animais após-treino de natação e sedentários.

## **Estudo 2**

Figura 1. Análise das citocinas circulantes dos animais obesos e controle nos tempos de 12 semanas e pós-treino de natação.

Figura 2. Análise da gordura intramuscular, corante ORO, dos ratos obesos e controle, pré e pós natação.

Figura 3. Análise do tecido conjuntivo, corante Tricrômico de Masson, em ratos obesos e controle, pré e pós natação.

Tabela 1. Teste de regressão com as variáveis, gordura intramuscular, porcentagem de gordura e tecido conjuntivo.



## SUMÁRIO

<b>CONTEXTUALIZAÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS DA TESE .....</b>	<b>16</b>

### Estudo 1

<b>RESUMO .....</b>	<b>18</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>OBJETIVO .....</b>	<b>20</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>Animais.....</b>	<b>21</b>
<b>Grupos Experimentais .....</b>	<b>21</b>
<b>Dieta .....</b>	<b>21</b>
<b>Protocolo do Exercício de Natação.....</b>	<b>22</b>
<b>Composição Corporal .....</b>	<b>22</b>
<b>Citocinas .....</b>	<b>23</b>
<b>ANALISE DOS RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>

### Estudo 2

<b>RESUMO .....</b>	<b>34</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVO .....</b>	<b>36</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>Animais.....</b>	<b>36</b>
<b>Grupos Experimentais .....</b>	<b>37</b>
<b>Dieta .....</b>	<b>37</b>
<b>Tempos de análise das variáveis do estudo.....</b>	<b>37</b>

<b>Protocolo do Exercício de Natação.....</b>	<b>38</b>
<b>Citocinas e Adipocinas .....</b>	<b>38</b>
<b>Composição Corporal .....</b>	<b>38</b>
<b>Avaliação da Glicemia Sanguínea de jejum.....</b>	<b>38</b>
<b>Processo Histológico Muscular.....</b>	<b>39</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>Alteração Morfológica Muscular .....</b>	<b>40</b>
<b>Resultados de regressão linear multivariável .....</b>	<b>42</b>
<b>Composição de gordura corporal .....</b>	<b>44</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>49</b>

## CONTEXTUALIZAÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A obesidade tem um caráter hereditário, hormonal e um desequilíbrio entre a ingestão hipercalórica e gasto energético (1) e essa condição causa um aumento do peso corporal, aumento do tecido adiposo, tanto abdominal também chamado central, como nos membros inferiores (2,3). Esse último parece ter um caráter protetor no surgimento de doenças secundárias a obesidade, como as doenças cardíacas e diabetes mellitus tipo II (4). Ao contrário, o acúmulo e aumento das células adipócitas central, correlaciona-se não apenas com doenças cardíacas e a diabetes, mas também com aumento do triglicérides, colesterol e alguns tipos de cânceres (5). O acúmulo de células lipídicas também ocorre em outros tecidos como o muscular. Esse acúmulo de gordura intramuscular pode ser o início de doenças osteomusculares degenerativas como as artroses, causada pela fraqueza e mudança na arquitetura deste tecido(6,7).

Outra mudança é o aumento da liberação de citocinas causada por macrófagos residentes em resposta ao estresse celular (8). Essa liberação também recruta mais macrófagos e outras células do sistema imune como o natural killer (NK) e eosinófilos, tornando um ambiente de estresse (9). Esse ambiente pode levar a uma resposta pró-inflamatória com a presença de IFN  $\gamma$  ou uma resposta anti-inflamatória na presença de IL-4 (10). Em condições normais deste tecido, os monócitos atraídos para uma resposta imune é predominantemente M2, com características anti-inflamatórias e com a presença da citocina IL-4 (8), já em condições de obesidade, tanto em hiperplasia (aumento do número de células adipócitas), como na hipertrofia (aumento do tamanho das células adipócitas) ocorre um mudança deste perfil M2 para o perfil M1 (11).

Essa mudança na característica M2 para M1, modifica a citocina ambiente de IL-4 para a IFN  $\gamma$  e as citocinas liberadas pelos macrófagos, de IL-4 e IL-10 passa a ser TNF $\alpha$  e IL-6, deixando de ser uma resposta anti-inflamatória para tornar-se uma resposta pró-inflamatória (8). Considerando que essa mudança é causada pelo estresse celular, como consequência do aumento do tecido adiposo, essa resposta pró-

inflamatória entra em um processo vicioso e crônico, não apenas local, mas também na circulação sistêmica (12).

Essas citocinas circulantes são reconhecidas por outros tecidos, como a membrana sinovial das articulações, pelo tecido muscular esquelético e ainda pelo humor vítreo, e assim desencadeia um processo inflamatório persistente e sistêmico (13). Um exemplo das mudanças causadas pela obesidade em outros tecidos, é o muscular. Este tem seu conteúdo de infiltrado de gordura aumentado e esse aumento causa um maior recrutamento de células imunes, como os macrófagos, e dá início a uma inflamação local, que pode levar a uma fraqueza muscular, mudança na arquitetura, fadiga e doenças articulares (14).

Outra consequência desta inflamação muscular, é o aumento de citocinas inflamatórias na circulação, contribuindo para a manutenção da inflamação causada pelo aumento do tecido adiposo (15). Essa inflamação persistente muscular diminui o recrutamento de células satélites para o reparo do tecido e assim há um aumento da fibrose muscular, que também contribui para a fraqueza e mudanças neste tecido (16).

Portanto, o aumento do tecido adiposo tem consequências não apenas local, mas leva a um processo inflamatório que é sensível a outros tecidos e ainda esses tecidos ajudam na manutenção de uma inflamação persistente e sistêmica, que tem como consequência mudanças teciduais que podem levar ao surgimento de doenças crônicas, como as diabetes e osteoartrite (17). Levando o aumento do tecido adiposo como causa primária destas mudanças, poderia mudar o que parece ser o objetivo principal da obesidade que é a perda de peso corporal para a diminuição deste tecido e assim diminuir o processo vicioso inflamatório sistêmico e crônico (18).

Na tentativa de mudar esse perfil e não apenas a perda de peso (19,20), os exercícios podem atuar na redução do tecido adiposo e como consequência diminuir o estresse e a liberação das citocinas mantenedoras desta inflamação sistêmica crônica (21,22). No entanto, é preciso considerar que os exercícios para um indivíduo obeso podem causar danos e piorar sua condição (22). Exercícios de impacto podem dar início, por exemplo, a osteoartrite de joelho, que é doença inflamatória e progressiva, que pode causar dores e limitações que contribuem para a desistência do exercício e a manutenção do sedentarismo, agravando o quadro da obesidade (23). Dado que as

células imunes também são recrutadas para reparo de tecidos, estas podem contribuir ainda mais com o processo inflamatório (24).

Outro ponto é a não continuidade do exercício, quando pensamos no início de um programa de exercício para a redução de massa corporal para obesos, precisamos considerar a sobrecarga causada nas articulações, bem como a fadiga muscular que em obesos é mais precoce. As fibras oxidativas (resistentes a fadiga) estão negativamente relacionadas a condições metabólicas anormais, enquanto que as fibras glicolíticas (sensíveis a fadiga) estão diretamente relacionadas as síndromes metabólicas (25).

Ainda deve ser considerada a aptidão pessoal e a escolha de um programa individual, com cargas e ciclos de exercícios progressivos (26,27). Em alguns trabalhos os resultados mostraram que a obesidade é flutuante, e o indivíduo volta a ganhar peso com o abandono do tratamento (28). Considerando que a perda de peso e diminuição do tecido adiposo através dos exercícios, também é o tratamento da hipertensão e diabetes tipo II, deixando o indivíduo normotenso e com taxas glicêmicas normais, a consequência do seu abandono, também podem ser o início das doenças metabólicas ligadas a obesidade (29).

Sendo assim, nesta tese o objetivo foi investigar as alterações corporais causada por um perfil obesogênico, como o aumento de massa corporal total, massa de gordura total, porcentagem de gordura corporal e composição óssea e as citocinas sistêmicas para caracterização inflamatória. A intervenção do treino de natação, com o benefício da flutuabilidade, por 3 vezes semanais, dias não consecutivos, por 8 semanas. Esta proposta de treinamento foi usada com parâmetros próximos aos protocolos existentes na clínica de reabilitação. Para isso, no primeiro estudo verificamos se o treino de natação seria capaz de mudar os parâmetros da composição corporal (massa corporal, porcentagem de gordura e massa óssea). E no segundo estudo, analisamos as concentrações de citocinas anti e pró-inflamatórias e a gordura intramuscular após o treino de natação.

Assim, os resultados dessa tese colaboram com o entendimento das mudanças causadas pela obesidade e os benefícios de um treino de natação por 8 semanas, mesmo em uma dieta hipercalórica.

**REFERÊNCIA BIBLIOGRAFIA**

1. Thaker V V. Genetic and Epigenetic Causes of Obesity. *Adolesc Med State Art Rev* [Internet]. 2017;28(2):379–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30416642><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6226269>
2. Medina G, Vera-Lastra O, Peralta-Amaro AL, Jiménez-Arellano MP, Saavedra MA, Cruz-Domínguez MP, et al. Metabolic syndrome, autoimmunity and rheumatic diseases. *Pharmacol Res* [Internet]. 2018;133:277–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.009>
3. Gabriela M, Aline P, Almeida C De, Bianca J, Marcos A, Mattiello SM. a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int* [Internet]. 2019;39(4):627–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-019-04271-2>
4. Roca-Rivada A, Castelao C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Crujeiras AB, et al. FND5/Irisin Is Not Only a Myokine but Also an Adipokine. *PLoS One*. 2013;8(4):1–10.
5. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2011;108(37):15324–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1100255108>
6. Pedroso MG, de Almeida AC, Aily JB, de Noronha M, Mattiello SM. Fatty infiltration in the thigh muscles in knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int* [Internet]. 2019 Apr 9 [cited 2019 Oct 8];39(4):627–35. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00296-019-04271-2>
7. Dannhauer T, Ruhdorfer A, Sattler M, Wirth W, Eckstein F. Cross sectional and longitudinal relationship of thigh adipose tissue with knee pain, radiographic OA status, and structural progression – data from the osteoarthritis initiative. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2014;22(4):S331. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458414006530>
8. Oh DY, Morinaga H, Talukdar S, Bae EJ, Olefsky JM. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes*. 2012;61(2):346–54.
9. Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2016;12(1):15–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.189>

10. Himmerich H, Fischer J, Bauer K, Kirkby KC, Sack U, Krügel U. Stress-induced cytokine changes in rats. *Eur Cytokine Netw.* 2013;24(2):97–103.
11. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175–84.
12. Fenton JI, Nuñez NP, Yakar S, Perkins SN, Hord NG, Hursting SD. Diet-induced adiposity alters the serum profile of inflammation in C57BL/ 6N mice as measured by antibody array. *Diabetes, Obes Metab.* 2009;11(4):343–54.
13. Collins KH, Herzog W, Reimer RA, Reno CR, Heard BJ, Hart DA. Diet-induced obesity leads to pro-inflammatory alterations to the vitreous humour of the eye in a rat model. *Inflamm Res [Internet].* 2018;67(2):139–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-017-1102-y>
14. Huh JY. The role of exercise-induced myokines in regulating metabolism. *Arch Pharm Res [Internet].* 2017; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0994-y>
15. Sakuma K, Yamaguchi A. Sarcopenic obesity and endocrinal adaptation with age. *Int J Endocrinol.* 2013;2013.
16. Laumonier T, Menetrey J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J Exp Orthop [Internet].* 2016;3(1):15. Available from: <http://jeo-esska.springeropen.com/articles/10.1186/s40634-016-0051-7>
17. Fu Y, Huebner JL, Kraus VB, Griffin TM. Effect of aging on adipose tissue inflammation in the knee joints of F344BN rats. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci.* 2016;71(9):1131–40.
18. Martinez-Huenchullan SF, Tam CS, Ban LA, Ehrenfeld-Slater P, Mclennan S V., Twigg SM. Skeletal muscle adiponectin induction in obesity and exercise. *Metabolism [Internet].* 2020;102:154008. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.154008>
19. Scomparin DX, Grassioli S, Gomes RM, Torrezan R, De Oliveira JC, Gravena C, et al. Low-intensity swimming training after weaning improves glucose and lipid homeostasis in MSG hypothalamic obese mice. *Endocr Res.* 2011;36(2):83–90.
20. Bilski J, Mazur-Bialy AI, Wierdak M, Brzozowski T. The impact of physical activity and nutrition on inflammatory bowel disease: The potential role of cross talk between adipose tissue and skeletal muscle. *J Physiol Pharmacol.* 2013;64(2):143–55.
21. Ramos D, Martins EG, Viana-gomes D, Casimiro-lobes G. Biomarkers of oxidative stress and tissue damage released by muscle. 2013;5:1–5.
22. Teichtahl AJ, Wluka AE, Wang Y, Wijethilake PN, Strauss BJ, Proietto J, et al. Vastus medialis fat infiltration - a modifiable determinant of knee cartilage loss.

- Osteoarthr Cartil. 2015;23(12):2150–7.
23. Collins KH, Herzog W, MacDonald GZ, Reimer RA, Rios JL, Smith IC, et al. Obesity, metabolic syndrome, and musculoskeletal disease: Common inflammatory pathways suggest a central role for loss of muscle integrity. *Front Physiol.* 2018;9(FEB).
  24. Collins KH, Herzog W, MacDonald GZ, Reimer RA, Rios JL, Smith IC, et al. Obesity, metabolic syndrome, and musculoskeletal disease: Common inflammatory pathways suggest a central role for loss of muscle integrity. *Front Physiol.* 2018;9(FEB).
  25. Pattanakuhar S, Pongchaidecha A, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. The effect of exercise on skeletal muscle fibre type distribution in obesity: From cellular levels to clinical application. *Obes Res Clin Pract [Internet].* 2017;11(5):112–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.orcp.2016.09.012>
  26. Villareal DT, Aguirre L, Gurney AB, Waters DL, Sinacore DR, Colombo E, et al. Aerobic or resistance exercise, or both, in dieting obese older adults. *N Engl J Med.* 2017;376(20):1943–55.
  27. Tallis J, James RS, Seebacher F. The effects of obesity on skeletal muscle contractile function. *J Exp Biol.* 2018;221(13).
  28. Speretta G, Rosante M, Duarte F, Leite R, Lino A, Andre R, et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics [Internet].* 2012;67(12):1469–77. Available from: <http://clinics.org.br/article.php?id=938>
  29. Gaesser GA, Tucker WJ, Jarrett CL, Angadi SS. Fitness versus Fatness: Which Influences Health and Mortality Risk the Most? *Curr Sports Med Rep.* 2015;14(4):327–32.



## **OBJETIVOS DA TESE**

Foi analisar o efeito do exercício de natação na composição corporal e gordura abdominal, acúmulo de gordura intramuscular e citocinas sistêmicas em ratos obesos.

Objetivo específico:

- Verificar através do aparelho DXA a massa corporal total, a porcentagem de gordura corporal e abdominal e a massa óssea após 8 semanas de natação em ratos obesos.
- Verificar o soro de ratos obesos, as citocinas IL-4, IL-10, IL-6 e TNF $\alpha$  e ainda a Leptina, adiponectina e irisina após o treino de natação.
- Verificar a gordura intramuscular dos músculos vasto lateral, gastrocnêmio e tibial anterior, com corante específico para lipídeos, em ratos obesos após o treino de natação.
- Verificar o tecido conjuntivo muscular com corante Tricrômico de Masson em ratos obesos após natação.

## Estudo 1

Título: A relação da irisina circulante com a composição corporal e o treinamento de natação em ratos obesos

Autores: Cristina Arrais Lima <sup>1</sup>, Fernando Augusto Vasilceac <sup>2</sup>, Cynthia Aparecida de Castro<sup>3</sup>, Fernanda Anibal<sup>3</sup>, Jéssica Bianca Aily<sup>1</sup>, Stela Marcia Mattiello<sup>1</sup>.

## RESUMO

**Objetivo:** Analisar a relação entre irisina, adiponectina e leptina circulantes com alterações na composição corporal de ratos obesos após o treinamento de natação.

**Método:** Foram utilizados 24 ratos Wistar machos, com idades entre 4-6 semanas. Eles foram primeiramente divididos em 2 grupos, grupo de dieta indutora de obesidade (OB 12 semanas n = 12) e grupo de dieta padrão em roedores (grupo controle, GC 12 semanas n = 12). Posteriormente, foram subdivididos em grupo obeso de natação (OB EXE n = 6), grupo obeso sedentário (OB Sed n = 6), grupo controle de natação (GC EXE n = 6) e grupo controle sedentário (GC Sed n = 6). Os animais do grupo obeso receberam uma dieta rica em gordura de 20% da energia total na forma de gordura e 40% da energia total em sacarose durante o experimento. Os grupos de natação foram submetidos a 8 semanas de natação por 1 hora, 3 vezes por semana. A análise da composição corporal foi realizada três vezes: semana inicial (V0), semana 12 e semana 20. Os animais foram sacrificados e o soro removido e congelado. A análise das citocinas Leptina, Irisina e Adiponectina foi realizada pelo método ELISA.

**Análise de Dados:** Os dados foram analisados com teste ANOVA one way seguido de Post Hoc Bonferroni para comparação intergrupos e Kruskal Wallis para dados não paramétricos e processados pelo software SPSS 20. Foi aplicada análise de correlação entre as variáveis grupo e tempo utilizando o teste de Spearman com  $R \geq 0,8$  e  $p \leq 0,05$ .

**Resultados:** A dieta Indutora de Obesidade (DIO), por 12 semanas, foi capaz de aumentar massa corporal total, porcentagem de gordura, massa de gordura e conteúdo da massa óssea em nossos animais ( $p < 0,05$ ). O treinamento em natação alterou alguns aspectos da composição corporal, como a diminuição da gordura corporal total e da massa de gordura abdominal. A densidade óssea dos nadadores obesos se recuperou, bem como a massa magra. **Conclusão:** A natação pode influenciar positivamente os níveis circulantes de irisina e adiponectina, bem como a composição corporal, em animais com uma dieta rica em gordura e açúcar.

**Palavras Chaves:** obesidade, natação, tecido adiposo, composição corporal

## INTRODUÇÃO

O estilo de vida sedentário e mudanças nos hábitos alimentares contribuem para o contínuo aumento da gordura corporal e visceral, levando ao sobrepeso e a obesidade. A obesidade se caracteriza pelo aumento do tecido adiposo, e nos últimos 10 anos a obesidade tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (1). A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso; e mais de 700 milhões, obesos (2). No Brasil a taxa de sobrepeso é de 52,5% e destes 17,5% são obesos. (2).

As complicações da obesidade estão associadas com morbidade e mortalidade prematura, hipertensão, doenças coronarianas, diabetes mellitus tipo II e alguns tipos de câncer (3–5). Ainda associa-se, o aumento da carga mecânica causada nas articulações, alterações biomecânicas nos membros, aumento da gordura intramuscular (6), fraqueza e mudança na arquitetura muscular (7–11). Além disso, mudanças corporais como o aumento da massa óssea, diminuição da massa magra e aumento da porcentagem total de gordura, podem contribuir para o início e progressão de doenças degenerativas musculoesqueléticas, bem como a manutenção de um estado inflamatório sistêmico crônico e como consequência maior liberação de citocina circulante, como a leptina, adiponectina e irisina (12).

Quando buscamos tentativas para amenizar essas alterações corporais os exercícios aeróbicos, com duração mínima de 150 minutos por semana parecem ser o mais recomendado na literatura (13). Não há um consenso na literatura sobre a sequência de dias ou qual modalidade aeróbica mais eficaz, mas seus benefícios incluem diminuição de doenças cardiovasculares, normalização da pressão arterial, melhora da diabetes tipo II, diminui as chances do surgimento de câncer de colón e depressão (14).

Os exercícios com baixo impacto, como a natação, podem auxiliar inibindo o início e progressão da obesidade, reduzindo o risco do surgimento das doenças metabólicas e melhorando a qualidade de vida (15). Outro benefício da natação é a redução da gordura branca que tem um maior acúmulo visceral, maior quantidade de células do sistema imune e é responsável pelo processo inflamatório causado pelo

aumento das células adipócitas e sua redução mostra-se independente da perda de peso (16,17).

Além disso, a liberação de miocinas na circulação após os exercícios parece depender de alguns fatores, como o tempo de exercício, efeito agudo ou crônico do exercício e doenças crônicas associadas, como a diabetes e obesidade. Independente dos fatores que podem influenciar no exercício, a maioria dos trabalhos concorda que a Irisina auxilia na melhora das desordens metabólicas e doenças relacionadas a idade (18).

Na tentativa de medir essas alterações causadas pelo sobrepeso e obesidade, pode-se usar o aparelho Dual-Energy X-ray absorptiometry Scan (DXA). Por meio deste, é possível selecionar a modalidade animais pequenos e dados como massa corporal total, porcentagem de gordura, composição óssea e massa magra são calculadas com precisão ao término do scanner (19). Além de apresentar resultados corporais totais, também pode-se selecionar partes de interesse do animal e obter todos os dados do DXA desta área (20), tornando-se uma valiosa ferramenta para compreensão de mudanças, não metabólicas, causadas pela obesidade.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo analisar as alterações causadas por uma dieta hiperlipídica, associada a um treino de natação em ratos Wistar e como a irisina poderia auxiliar na mudança deste perfil hiperlipídico. Nós hipotetizamos que o treino de natação por 8 semanas seria capaz de melhorar as alterações corporais causadas pela obesidade.

## **OBJETIVO**

### Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi analisar a relação entre a irisina circulante com a composição corporal e o treino de natação em ratos obesos

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados 24 ratos Wistar, machos, de 4-6 semanas de idade ( $150 \pm 5.05\text{g}$ ), procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos-SP. Os animais foram colocados em caixas plásticas, com acesso a ração e água livre. Foram mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia (DFisio-UFSCar), em condições ambientais controladas e sala climatizada em ciclo de 12h claro/escuro. Foi utilizado *National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals* (21). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética Animal da UFSCar e aprovado sob o Nº 1085210317.

### Grupos Experimentais

Inicialmente os animais foram divididos em 2 grupos: um grupo recebeu a dieta de indução a obesidade (OB n= 12) e o outro grupo recebeu a dieta padrão para roedores (GC n=12). Todos os animais foram mantidos em gaiolas, com respectivas dietas por 12 semanas. Posteriormente, cada grupo foi subdividido em 2 grupos, de forma aleatória: Grupo DIO: obeso sedentário (OB Sed n=6) e grupo natação (OB EXE n=6); e Grupo GC: grupo controle sedentário (GC Sed n=6) e grupo controle natação (GC EXE n=6). Os grupos natação foram treinados por 8 semanas e os grupos sedentários foram mantidos nas caixas plásticas.

### Dieta

Os animais do grupo DIO receberam uma dieta de indução de obesidade contendo 20% do total de energia, na forma de gordura, 40% da energia total em sacarose com densidade de dieta hipercalórica de 5,12 Kcal/g, diferentemente da dieta padrão com 12% na forma de gordura e 3,7% na forma de sacarose, totalizando 4,07 Kcal/g (22). Todos os animais foram pesados semanalmente, a fim de registrar o

ganho de peso ao longo do experimento (10). A dieta padrão foi fornecida pelo biotério central da Universidade Federal de São Carlos UFSCar.

#### Protocolo do Exercício de Natação

O programa de exercício foi realizado em tanques individuais (50 cm x 23 cm x 23 cm) com água limpa e mantidos a  $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ . O período de adaptação foi de 02 semanas, com a frequência de 03 vezes, não consecutivas, em água rasa (15 cm) por 15 minutos na primeira semana e 30 minutos na segunda semana. Após este período os animais foram colocados em águas profundas (40cm) por 55 minutos. Na primeira semana foi utilizado uma sobrecarga de 3% da massa corporal, atado a cauda, com incremento do 1% a cada semana, até atingir 5% da sua massa corpórea total (figura 1) (23). O protocolo de exercício foi realizado 3 dias por semana, durante 8 semanas. (24,25)

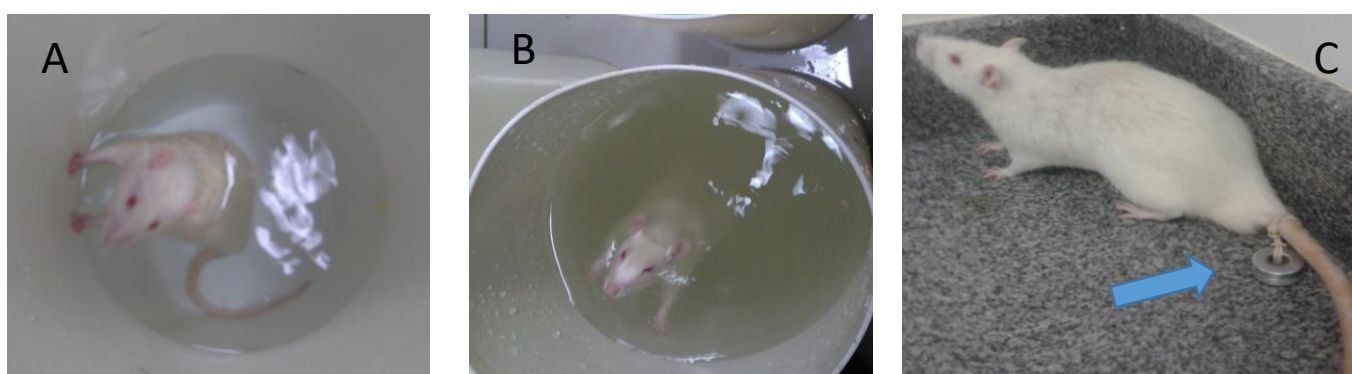


Figura 1: A-1ª semana de adaptação de natação, água rasa (15 cm), B- Treino de natação com água profunda (40 cm), C- Seta: Peso atado na cauda do animal.

#### Composição Corporal

A composição corporal e abdominal foi medida pelo aparelho Energia dual de raio-X absorciometria (DXA) com software para animais pequenos, em 3 momentos do experimento;

- 1- Semana V0, previamente a indução da dieta rica em gordura e açúcar.
- 2- Após 12 Semanas após a indução da dieta (Dio 12 e GC 12) e previamente ao início do treino de natação.

### 3- Após treinamento de natação, (OB EXE, OB Sed, GC EXE, and GC Sed)

Previamente a análise pelo DXA, os animais foram pesados e anestesiados com Xilazina e Cetamina e posicionados para a análise de acordo com o protocolo para animais pequenos do aparelho. As patas dianteiras, traseiras e a cauda foram posicionadas com fitas adesivas. Os dados MassFat (Massa de Gordura), Lean+BMC (Massa Magra+ Conteúdo Massa Óssea), Total Mass (Massa Total Corporal, % Fat (Porcentagem De Gordura Corporal), BMC (Conteúdo Massa Óssea) e Lean (Massa Magra) foram coletados e analisados. Ao término do experimento, os animais foram eutanasiados com overdose de barbitúrico (Euthanyl®, MTC Animal Health Inc., Cambridge, Ontario, Canada) (10,26).

#### Citocinas

As citocinas Leptina, Irisina e adiponectina foram analisadas no soro coletado minutos antes da eutanásia dos animais com 32 semanas de idade. O sangue após coletado ficou em repouso na geladeira por 4 horas. Posteriormente, foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi congelado a -80°C. As citocinas foram quantificadas no soro pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), de acordo com instruções do fabricante (OptEIA-BD Biosciences, USA). A leitura das amostras foi realizada em um filtro de 450 nm e o limiar de sensibilidade do ELISA com soro foi especificado de acordo com as indicações do fabricante (24,25).

#### **ANALISE DOS RESULTADOS**

As diferenças na composição corporal entre animais obesos e magros na semana 12 foram examinadas usando o teste t independente. A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi usada para comparar a massa magra abdominal, a massa total abdominal, o percentual de gordura abdominal, o percentual de gordura corporal e a massa gorda seguida de um teste post hoc de Bonferroni. No entanto, para variáveis não paramétricas, o teste correspondente Kruskal Wallis foi utilizado para comparar o BMC abdominal, a massa gorda abdominal, a massa total corporal, o BMC



corporal e a massa magra corporal. Os coeficientes de correlação de Spearman foram utilizados para descrever a associação entre as variáveis grupo e tempo. Um valor de  $p < 0,05$  foi aceito como estatisticamente significativo.(4).

## RESULTADOS

Os resultados corporais para os animais no tempo 12 semanas, dos grupos OB\_12 semanas e GC\_12 semanas, apontaram diferença estatística significativa entre os grupos, para a massa corporal total, sendo maior para o grupo DIO ( $p=0,002$ ), acompanhado do aumento de percentual de gordura total ( $p=0,001$ ). A massa óssea, assim como a gordura total também aumentaram para o grupo DIO, porém a massa magra, não foi diferente entre os grupos (IC 95% e  $p>0,05$ ) (Tabela 1)

**Tabela 1.** DXA dos animais obesos e controle pré- treino de natação.

	DXA Corporal		DXA Abdominal	
	OB 12	GC 12	OB 12	GC 12
Massa de Gordura	201,1 ( DP 96,8)*	90,3 (DP 24,1)	23,7 (DP 1,9)*	12,5 (DP 4,5)
Massa Total	808,2 (DP 107) *	654,7 (DP 46)	108,2 (DP 8,3)	106,5 (DP 2,1)
% Gordura	25,1 (DP 7,5)*	13,6 (DP 2,8)	28,1 (DP 8,4) *	13,25 (DP 3,62)
Massa Óssea	19,12 (DP 1,8)*	15,8 (DP 1,8)	0,67 (DP 0,06)*	0,72 ( 0,09)
Massa Magra	543,7 (DP 57,5)	548,5 (DP 26,8)	80,7 (DP 3,2) *	91,7 (DP 3,9)

Valores expressos em Media (DP)

\* Significância estatística  $p < 0,05$

Nas análises corporais realizadas com os grupos OB EXE, grupo OB Sed, GC EXE e GC Sed, observamos os valores do grupo OB Sed estão aumentados e com diferença estatística em todos os parâmetros analisados pelo DXA ( $p < 0,05$ ), e interessante notar que os valores do grupo OB EXE se equivalem aos valores dos animais controle (GC), até mesmo na massa magra, que comparado com o OB Sed houve perda significativa ( $p=0,002$ ), assim como aumento na porcentagem de gordura corporal e abdominal (30% e 33,3%, respectivamente). Ainda no grupo OB Sed, massa de gordura total teve

um aumento de duas vezes mais em relação aos outros grupos ( $p=0,002$ ). Esses valores são mostrados na tabela 2.

**Tabela 2.** DXA corporal dos animais obesos e controle, natação e sedentário.

	DXA Corporal			
	OB_EXE	OB_Sed	GC_Nat	GC_Sed
<b>Massa de Gordura</b>	167,9 ( DP 56,5) b	250,0 ( DP 58,4)	122,9 ( DP 53,6) b	130,6 (DP 32,1) b
<b>Massa Total</b>	774,3 ( DP 82)	874,7 (DP 115)	729,1 (DP 58) b	728,6 (DP 70) b
<b>% Gordura</b>	21,3 ( DP 5,4) b	30,4 ( DP 5,9)	16,5 (DP 6,5) b	17,2 (DP 4,2) b
<b>Massa Óssea</b>	18,7 ( DP 1,7)	20,9 ( DP 1,7)	18,8 (DP 1,5)	18,2 (DP 1,4) b
<b>Massa Magra</b>	587,6 ( DP 47,2) b	401,7 ( DP 224)	587,3 (DP 31) b	582,6 (DP 40) b

Valores são expressos por Média (DP)

b  $p<0.05$ , diferença significativa quando comparado com OB\_EXE

c  $p<0.05$ , diferença significativa quando comparado com OB\_Sed

d  $p<0.05$ , diferença significativa quando comparado com GC\_EXE

d  $p<0.05$ , diferença significativa quando comparado com GC\_Sed

Nas análises abdominais realizadas, no grupo OB EXE, foram observados valores elevados no parâmetro massa magra em comparação ao grupo OB Sed ( $p = 0,02$ ), mesmo no grupo controle, todos os parâmetros foram menores em relação ao grupo exercício obeso e o grupo obeso sedentário, como mostrado na tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados do DXA dos ratos obesos e controle na região abdominal

	DXA Abdominal			
	OB_EXE	OB_Sed	GC_Nat	GC_Sed
<b>Massa de Gordura</b>	35,45 ( DP 12,9)	50,5 ( DP 23,55)	17,3 ( DP 6,5) b	23,47 ( DP 5,6) b
<b>Massa Total</b>	121,4 ( DP 14)	188,06 ( DP 20,7)	117,4 ( DP 11,66)	110,7 ( DP 10,8) b
<b>% Gordura</b>	28,6 ( DP 5,3)	33,3 ( DP 5,2)	13,7 ( DP 4,9) a b	13,25 ( DP 3,62) b
<b>Massa Óssea</b>	0,67 ( DP 0,06)	0,73 ( DP 0,04)	0,78 ( DP 0,06) a	0,8 ( DP 0,03) a
<b>Massa Magra</b>	92,1 ( DP 2,3) c	85,83 ( DP 3,1)	94,8 ( DP 9,1) b	91,46 ( DP 3,9) b

Valores são expressos por Média (DP)

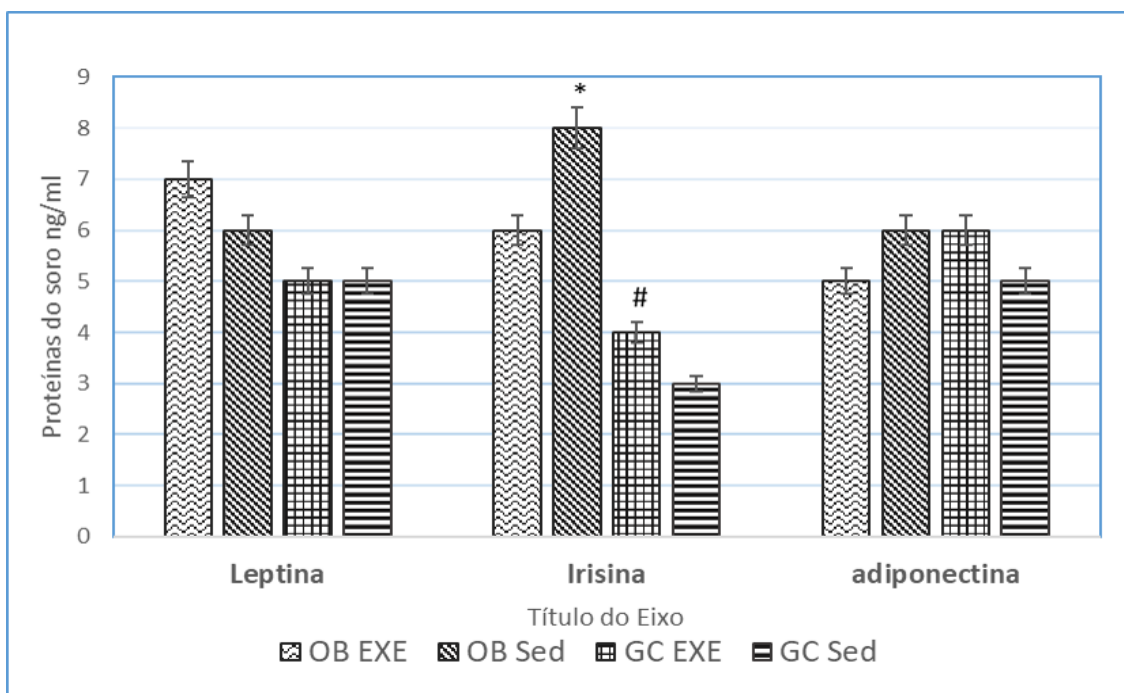
a  $p<0.05$ , diferença significativa quando comparado com OB\_EXE

b  $p<0.05$ , diferença significativa quando comparado com OB\_Sed

c  $p<0.05$ , diferença significativa quando comparado com GC\_EXE

d  $p<0.05$ , diferença significativa quando comparado com GC\_Sed

A irisina foi detectada em todos os grupos, com diferença estatística entre os grupos OB EXE e OB Sed (1,008,04 e 8,476 respectivamente,  $p = 0,001$ ) e GC EXE com GC Sed. Leptina e Adiponectina foram detectáveis em todos os grupos, embora não houvesse diferenças significativas entre eles, como mostra a Figura 2. Nossos resultados também demonstraram uma correlação moderada e negativa entre a irisina e porcentagem de gordura  $R^2 = 0,451$  ( $p = 0,04$ ).



**Fig 2:** Demonstrando as citocinas ao longo do experimento.  
Diferença estatística em relação a Irisina do grupo OB EXE (\*)  
Diferença estatística em relação ao grupo Mg Sed (#)

## DISCUSSÃO

A obesidade é um problema de saúde pública, onde o aumento do acúmulo do tecido adiposo pode trazer consequências não somente pelo aumento da carga articular, mas por modificar a composição corporal, a composição óssea e porcentagem de gordura total e abdominal, e como consequência há o surgimento de doenças crônicas e progressivas precocemente, além de um estado inflamatório crônico leve colocando a obesidade na lista das chamadas Síndrome Metabólica. (27–29). Nosso estudo fornece uma análise dessas alterações em três momentos diferentes de uma dieta hipercalórica ininterrupta com a intervenção do treinamento de natação e como a leptina, a irisina e a adiponectina ajudam nesse processo.

Nossos resultados mostraram que uma alimentação rica em gordura e açúcar pode causar alterações em todos os parâmetros medidos pelo DXA, no período de 12 semanas da dieta hipercalórica. Esses resultados vão ao encontro com outros trabalhos, que também observaram aumento da gordura abdominal e corporal, aumento da massa óssea e diminuição da massa magra nos ratos obesos comparados com o controle (30,31) . Apesar da natação não ter características de um exercício de impacto e em alguns trabalhos não ter efeito sobre a massa óssea (32). Entretanto, nossos resultados mostraram que a natação, com carga progressiva adicionada, facilitou um efeito positivo na massa óssea, demonstrando a eficiência do treinamento em natação nesses grupos de estudo.

Em relação à massa óssea, o grupo obeso sedentário demonstrou aumento em relação ao grupo obeso nadador, resultado que também colabora com a literatura sobre os mecanismos envolvidos na obesidade e no metabolismo ósseo. Além disso, consideramos a presença de irisina, que parece ter um efeito sobre a remodelação óssea e promove um aumento e efeito protetor sobre esse tecido (33). Por outro lado, a presença de irisina no grupo obeso sedentário nos levou a uma discussão interessante, pois seus mecanismos e como seus receptores funcionam ainda não são conhecidos, embora pareça estabelecer o conceito de irisina como miosina relacionada ao exercício (34).

No entanto, alguns resultados mostram que a irisina pode ser secretada por outros tecidos, como tecido adiposo (35,36) e nossos resultados estão de acordo com esse conceito de múltiplos órgãos, uma vez que o grupo obeso sedentário apresentou 50% de gordura abdominal. Assim, podemos entender que o estresse causado por esse aumento pode levar a mecanismos compensatórios ainda não totalmente compreendidos na literatura (37). Por outro lado, a irisina também estava presente no grupo de exercícios controle e teve uma correlação negativa com o percentual de gordura, mostrando que a irisina ajuda na redução de gordura no exercício e sob estresse (38,39). Com relação aos benefícios encontrados nos grupos de natação, houve redução e manutenção do percentual de gordura abdominal e corporal nos grupos obesos e de controle, dados relevantes quando consideramos o tecido adiposo como órgão secretor de citocinas pró-inflamatórias e que sua redução pode estar relacionado a um perfil melhorado de citocinas (40).

Embora a adiponectina fosse detectável em todos os grupos, não houve diferenças estatísticas entre eles. As concentrações desse hormônio parecem ser controversas na literatura, tanto em estudos séricos quanto em análises musculares (41,42), e ainda pode ser encontrado em diferentes concentrações em diferentes intensidades de exercício, bem como na presença de doenças como diabetes e obesidade. Assim, vale ressaltar que, apesar de não haver diferença estatística, os grupos obesos e nadadores sedentários apresentaram maior concentração desse hormônio, o que pode indicar uma tentativa de melhorar o estresse causado pela obesidade (37).

Nossa pergunta inicial foi respondida satisfatoriamente: que um exercício sem impacto, com uma característica hipogravitacional, mas não intensa, poderia ajudar os indivíduos a combater o chamado estilo de vida sedentário e alterar parâmetros que levam a doenças crônicas associadas, como acúmulo de gordura abdominal, como em nossos resultados esse percentual de gordura diminuiu. Ainda há controvérsia na literatura sobre modalidades e intensidade de exercícios que ajudariam a entender os benefícios da irisina. Assim, o presente estudo tem como objetivo contribuir para essa discussão, mostrando que a irisina pode ser liberada por outros tecidos, como o tecido adiposo.

Concluindo, este trabalho mostrou as alterações causadas pela obesidade na composição corporal total e abdominal em animais obesos e a relação da irisina com a obesidade. A irisina está presente na circulação, principalmente em animais saudáveis treinados em natação, porém a irisina está alterada em obesos sedentários, demonstrando outro possível mecanismo envolvido no controle da obesidade.

## REFERÊNCIAS

1. Bortolin RC, Vargas AR, Gasparotto J, Chaves PR, Schnorr CE, Martinello KB, et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: Comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes* [Internet]. 2018;42(3):525–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2017.225>
2. WHO, World Health Organization, Obesity and overweight. 2019;(June):2016. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity->

and-overweight

3. Griffin TM, Fermor B, Huebner JL, Kraus VB, Rodriguiz RM, Wetsel WC, et al. Diet-induced obesity differentially regulates behavioral, biomechanical, and molecular risk factors for osteoarthritis in mice. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4).
4. Collins KH, Hart DA, Reimer RA, Seerattan RA, Waters-Banker C, Sibole SC, et al. High-fat high-sucrose diet leads to dynamic structural and inflammatory alterations in the rat vastus lateralis muscle. *J Orthop Res*. 2016;34(12):2069–78.
5. Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med* [Internet]. 1988 Jul 1 [cited 2019 Jun 11];109(1):18–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3377350>
6. Pedroso MG, de Almeida AC, Aily JB, de Noronha M, Mattiello SM. Fatty infiltration in the thigh muscles in knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int* [Internet]. 2019 Apr 9 [cited 2019 Oct 8];39(4):627–35. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00296-019-04271-2>
7. Calle EE, Rodriguez C, Walker-thurmond K, Thun MJ. *new england journal*. 2003;1625–38.
8. Griffin TM, Huebner JL, Kraus VB, Yan Z, Guilak F. Induction of osteoarthritis and metabolic inflammation by a very high-fat diet in mice: Effects of short-term exercise. *Arthritis Rheum*. 2012;64(2):443–53.
9. Louer CR, Furman BD, Huebner JL, Kraus VB, Olson SA, Guilak F. Diet-induced obesity significantly increases the severity of posttraumatic arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 2012;64(10):3220–30.
10. Collins KH, Reimer RA, Seerattan RA, Leonard TR, Herzog W. Using diet-induced obesity to understand a metabolic subtype of osteoarthritis in rats. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2015;23(6):957–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.01.015>
11. Braymer HD, Harrison-bernard LM, Primeaux SD. *resistant rats*. 2018;42(3):535–41.
12. Collins KH, Herzog W, MacDonald GZ, Reimer RA, Rios JL, Smith IC, et al. Obesity, metabolic syndrome, and musculoskeletal disease: Common inflammatory pathways suggest a central role for loss of muscle integrity. *Front Physiol*. 2018;9(FEB).
13. Ruiz-Casado A, Martín-Ruiz A, Pérez LM, Provencio M, Fiuza-Luces C, Lucia A. Exercise and the Hallmarks of Cancer. *Trends in Cancer* [Internet]. 2017;3(6):423–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.007>

14. Fiuza-luces C, Garatachea N, Berger NA, Lucia A. Exercise is the Real Polypill. 2019;330–58.
15. Scomparin DX, Grassioli S, Gomes RM, Torrezan R, De Oliveira JC, Gravena C, et al. Low-intensity swimming training after weaning improves glucose and lipid homeostasis in MSG hypothalamic obese mice. *Endocr Res*. 2011;36(2):83–90.
16. Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise regulation of adipose tissue. *Adipocyte* [Internet]. 2016;5(2):153–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21623945.2016.1191307>
17. Goh J, Goh KP, Abbasi A. Exercise and Adipose Tissue Macrophages: New Frontiers in Obesity Research? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7(June):1–8.
18. Son JS, Chae SA, Testroet ED, Du M, Jun H. Expert Review of Endocrinology & Metabolism Exercise-induced myokines : a brief review of controversial issues of this decade. *Expert Rev Endocrinol Metab* [Internet]. 2018;13(1):51–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/17446651.2018.1416290>
19. Fernanda M, Resende B De, Marcus G, Melo V, Jorge C, Érica M, et al. Leptin as an obesity marker in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* [Internet]. 2018;38(9):1671–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-018-4082-5>
20. Sutlovic D, Boric I, Sliskovic L, Popovic M, Knezovic Z, Nikolic I, et al. Bone mineral density of skeletal remains : Discordant results between chemical analysis and DXA method. *Leg Med* [Internet]. 2016;20:18–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.03.008>
21. Liu Y, Huang Y, Xiao Z, Ren X, Yang C. Effect of Ar/CCl4 combined purification on microstructure and mechanical properties of 2219 aluminum alloy ingot. Vol. 21, *Fenmo Yejin Cailiao Kexue yu Gongcheng/Materials Science and Engineering of Powder Metallurgy*. 2016. 408–414 p.
22. Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. *Nutrition*. 2004;20(2):218–24.
23. Gobatto CA, De Mello MAR, Sibuya CY, De Azevedo JRM, Dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol*. 2001;130(1):21–7.
24. Rocha GL da, Crisp AH, Oliveira MRM de, Silva CA da, Silva JO, Duarte ACGO, et al. Effect of High Intensity Interval and Continuous Swimming Training on Body Mass Adiposity Level and Serum Parameters in High-Fat Diet Fed Rats. *Sci World J* [Internet]. 2016;2016:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2016/2194120/>
25. Liao C-F, Yang T-Y, Chen Y-H, Yao C-H, Way T-D, Chen Y-S. Effects of swimming

- exercise on nerve regeneration in a rat sciatic nerve transection model. *BioMedicine* [Internet]. 2017;7(1):3. Available from: <http://biomedicine.edp-open.org/10.1051/bmdcn/2017070103>
26. Bisek P. Dual-energy bone-mineral. 2018;(January).
  27. Collins KH, Hart DA, Seerattan RA, Reimer RA, Herzog W. Diet-induced Obesity, Systemic Inflammation, and the Development of Hip and Shoulder Osteoarthritis: Insights from a Rat Model. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2017;25(2017):S315. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458417305769>
  28. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2017;13(11):633–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>
  29. Yamanaka JS, Fukada SY, Issa JPM, Shimano AC, Tavares JMRS. INFLUENCE OF HIGH-FAT DIET ON BONE TISSUE : AN EXPERIMENTAL STUDY IN GROWING RATS. (17).
  30. Collins KH, Reimer RA, Herzog W. Increased adiposity in response to high fat/high sucrose diet is associated with increased concentrations of cytokines and adipokines in synovial fluid. *Osteoarthr Cartil*. 2014;22(2014):S64.
  31. Sun ARJ, Panchal SK, Friis T, Sekar S, Crawford R, Brown L, et al. Obesity-associated metabolic syndrome spontaneously induces infiltration of pro-inflammatory macrophage in synovium and promotes osteoarthritis. *PLoS One*. 2017;12(8):1–22.
  32. Gómez-Bruton A, González-Agüero A, Gómez-Cabello A, Casajús JA, Vicente-Rodríguez G. Is Bone Tissue Really Affected by Swimming? A Systematic Review. *PLoS One*. 2013;8(8).
  33. Ooi FK, Norsyam WM, Ghosh AK, Sulaiman SA, Chen CK, Hung L kim. Effects of short-term swimming exercise on bone mineral density, geometry, and microstructural properties in sham and ovariectomized rats. *J Exerc Sci Fit* [Internet]. 2014;12(2):80–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jesf.2014.09.001>
  34. Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, Pignataro P, Buccoliero C, Liu P, et al. The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(39):12157–62.
  35. Grygiel-Górniak B, Puszczewicz M. A review on irisin, a new protagonist that mediates muscle-adipose-bone-neuron connectivity. Vol. 21, *European review for medical and pharmacological sciences*. 2017. p. 4687–93.
  36. Stanford KI, Goodyear LJ. Muscle-adipose tissue cross talk. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(8).



37. Roca-Rivada A, Castelao C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Crujeiras AB, et al. FNDC5/Irisin Is Not Only a Myokine but Also an Adipokine. *PLoS One*. 2013;8(4):1–10.
38. Makras P, Perakakis N, Kountouras J, Mantzoros CS. Irisin in metabolic diseases. *Endocrine* [Internet]. 2018;260–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-017-1476-1>
39. Park KH, Zaichenko L, Brinkoetter M, Thakkar B, Sahin-efe A, Joung KE, et al. the Metabolic Syndrome. 2013;(C):1–10.
40. Leal LG, Lopes MA, Jr MLB. Physical Exercise-Induced Myokines and Muscle-Adipose Tissue Crosstalk : A Review of Current Knowledge and the Implications for Health and Metabolic Diseases. 2018;9(September):1–17.
41. Lu Y, Li H, Shen SW, Shen ZH, Xu M, Yang CJ, et al. Swimming exercise increases serum irisin level and reduces body fat mass in highfat-diet fed Wistar rats. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2016;15(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-016-0263-y>
42. Shirvani H, Arabzadeh E. Metabolic cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue in high-intensity interval training vs . moderate-intensity continuous training by regulation of PGC-1 $\alpha$ . *Eat Weight Disord - Stud Anorexia, Bulim Obes* [Internet]. 2018;0(0):0. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s40519-018-0491-4>

## Estudo 2

Título: Influência da natação no infiltrado de gordura muscular dos músculos vasto lateral, tibial anterior e gastrocnêmio em ratos com dieta indutora de obesidade.

Autores: Cristina Arrais Lima <sup>1</sup>, Fernando Augusto Vasilceac <sup>2</sup>, Cynthia Aparecida de Castro<sup>3</sup>, Stela Marcia Matiello<sup>1</sup>.

## RESUMO

**Objetivo:** Analisar a influência da natação na infiltração de gordura muscular dos músculos vasto lateral, tibial anterior e gastrocnêmio em ratos com dieta indutora de obesidade e alterações nas citocinas anti e pró-inflamatórias. **Métodos:** Foram utilizados 24 ratos Wistar machos, com idades entre 4-6 semanas. Os animais foram divididos em 2 grupos: grupo de dieta indutora de obesidade (OB 12 n = 12) e grupo de dieta padrão para roedores (grupo controle, SD 12 n = 12) por 12 semanas. Os animais do grupo obeso receberam uma dieta rica em gordura de 20% da energia total na forma de gordura e 40% da energia total em sacarose. Após 12 semanas, os dois grupos foram subdivididos: grupo obeso nadador (OB EXE n = 6), grupo obeso sedentário (OB Sed n = 6), grupo controle natação (SD EXE n = 6) e grupo controle sedentário (SD Sed n = 6). Os grupos de natação foram submetidos a 8 semanas de natação por 1 hora, 3 vezes por semana. No final do treinamento, todos os animais foram sacrificados e os músculos vasto lateral, gastrocnêmio e tibial anterior foram coletados. As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 e IL-4 do soro de todos os animais foram analisadas por ELISA. Os músculos vasto lateral (VL), gastrocnêmio (GC) e tibial anterior (AT) foram congelados, processados e corados com óleo vermelho O (ORO) e Tricrômico de Masson e tecido conjuntivo e gordura intramuscular. **Análise dos dados:** Os dados de citocinas e manchas musculares foram analisados por ANOVA de uma via para dados paramétricos e Kruskal Wallis para dados não paramétricos. Foi realizado um teste de regressão linear para as variáveis percentual de gordura corporal e coloração muscular com ORO e Masson. Para todos os dados, um nível de significância de  $p \leq 0,05$  foi considerado e analisado pelo software SPSS 20. **Resultados:** Após 12 semanas, as citocinas IL-10, TNF $\alpha$  e IL-6 aumentaram nos grupos obesos e IL-4 no grupo controle ( $p < 0,05$ ). Após o treinamento de natação, apenas a IL-4 aumentou no grupo de obesos ( $p = 0,03$ ). Houve aumento da gordura intramuscular no OB Sed comparado ao OB EXE e diminuição do infiltrado de gordura do músculo gastrocnêmio após o treinamento de natação em relação aos músculos vasto lateral e tibial anterior ( $p = 0,002$ ). O tecido conjuntivo também aumentou no grupo obeso (OB 12) em comparação com o grupo SD (SD 12), ( $p = 0,003$ ) e diminuiu no músculo tibial anterior após o treinamento de natação (OB EXE,  $p = 0,04$ ) em comparação ao grupo sedentário (OB Sed). O teste de regressão mostrou uma interação entre a gordura intramuscular dos músculos GC, VL e TA com o percentual de gordura corporal. **Conclusão:** O treinamento em natação influencia a redução da infiltração de gordura nos músculos gastrocnêmio, vasto lateral e tibial anterior, com TNF $\alpha$  reduzido. Existe uma relação moderada entre a

concentração de gordura corporal e o infiltrado de gordura muscular nos músculos VL, GC e TA.

**Palavras Chaves:** exercício de natação, gordura intramuscular, citocina, composição corporal

## INTRODUÇÃO

A obesidade, segundo a Organização Mundial de Saúde, é considerada um agravo multifatorial e é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. (1). Uma característica importante da obesidade é o aumento do tecido adiposo, principalmente o tecido adiposo branco ou central, que funciona como um órgão secretor de citocinas e hormônios e interage com outros órgãos e tecidos (2,3).

Alguns estudos demonstraram que o aumento do tecido adiposo causa estresse celular e, portanto, uma alteração nas células imunes residentes, maior recrutamento de macrófagos e um aumento subsequente na liberação de citocinas pró-inflamatórias circulantes, resultando em inflamação sistêmica crônica. No entanto, o início e a progressão dessa inflamação têm características particulares, pois não é uma inflamação causada por uma infecção clássica (4). A inflamação desse tecido começa com o estresse celular e a morte celular, aumentando ainda mais o processo inflamatório através do aumento do recrutamento de macrófagos e aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF  $\alpha$  e IL-6 (5). Esse processo se torna crônico por meio de aumentos contínuos ou mantidos no tecido adiposo, causando desequilíbrio nas respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (6).

Através da função endócrina do tecido adiposo, essas citocinas são liberadas na circulação e podem ser sensíveis a outros tecidos e órgãos, levando a inflamação sistêmica crônica e, como consequência, o surgimento de doenças metabólicas, como resistência à insulina, bem como articulações. Inflamação e acúmulo de células adipócitas em outros tecidos. O acúmulo de gordura observado em outros tecidos, como os músculos, apresenta características inflamatórias semelhantes, como

aumento de citocinas pró-inflamatórias locais (7,8). Essa alteração no tecido pode levar a uma diminuição da área transversa e a um aumento da fibrose muscular. Como consequência, observam-se fraqueza muscular, aumento do tecido conjuntivo, má ativação muscular e alterações em sua arquitetura (9,10).

Na literatura, o exercício físico é uma excelente ferramenta para o tratamento não medicamentoso da obesidade (11,12). Entre os benefícios do exercício estão resposta anti-inflamatória aprimorada, resistência cardiovascular aprimorada, resistência insulínica aprimorada e perda de peso (13–15). Existem várias modalidades de exercícios e, dentre elas, o exercício aquático tem sido estudado e mostrou efeitos positivos em relação à perda de percentual de gordura corporal e abdominal. Além disso, a natação tem um efeito de flutuabilidade, que protege as articulações do impacto causado pelo exercício no solo (16,17).

Assim, para melhor compreender as alterações causadas pela obesidade e os benefícios do treinamento em natação, este estudo teve como objetivo mensurar citocinas anti e pró-inflamatórias em ratos obesos, bem como infiltrado de gordura intramuscular e tecido conjuntivo muscular.

## **OBJETIVO**

### Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do treinamento de natação no infiltrado de gordura intramuscular nos músculos vasto lateral, tibial anterior e gastrocnêmio em ratos obesos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### Animais

Foram vinte e quatro ratos Wistar, machos de 4-6 semanas de idade ( $250 \pm 5.05g$ ), procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos-SP. Os animais foram colocados em caixas plásticas, com acesso a ração e água livre. Foram mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia (DFisio-UFSCar), em condições

ambientais controladas e sala climatizada em ciclo de 12h claro/escuro. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética Animal da UFSCar e aprovado sob o Nº 1085210317.

#### Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 2 grupos, um grupo recebeu dieta indutora de obesidade e o outro grupo recebeu dieta padrão em roedores (SD) por 12 semanas (OB 12 semanas, n = 12 e SD 12 semanas, n = 12). Posteriormente, os animais foram divididos em 4 grupos: grupo obeso sedentário (OB Sed n = 6), grupo obeso nadador (OB EXE n = 6), grupo controle nativo (SD EXE n = 6), grupo controle sedentário (SD Sed n = 6).

#### Dieta

Os animais do grupo obeso receberam dieta indutora de obesidade, 20% da energia total de gordura e 40% da energia total de sacarose, por 22 semanas. Os ratos foram pesados semanalmente para verificar o ganho de peso. A densidade calórica da dieta hipercalórica é de 5,12 Kcal /g e a dieta padrão é de 4,07 Kcal / g (18). Os animais controle receberam a dieta padrão de ratos, fornecida pelo biotério central da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar, em condições de livre acesso.

#### Tempos de análise das variáveis do estudo

Inicialmente, os animais foram divididos em 2 grupos, grupo de dieta indutora de obesidade (OB 12 semanas n = 12) e grupo de dieta padrão em roedores (SD 12 semanas n = 12). Posteriormente, esses grupos foram subdivididos em grupo obeso nadador (OB EXE n = 6), grupo obeso sedentário (OB Sed n = 6), grupo controle nativo (SD EXE n = 6) e grupo controle sedentário (SD Sed n = 6). Os animais exercitados receberam 2 semanas de adaptação ao treinamento de natação, seguidos de 8 semanas, 3 vezes por semana durante 1h / dia, em dias não consecutivos, sempre pela manhã. Quarenta e oito horas após a sessão final de treinamento, todos os animais foram sacrificados e os músculos tibial anterior, vasto lateral, gastrocnêmio e o sangue foram coletados.

### Protocolo do Exercício de Natação

Foi realizado o programa de natação em tanques individuais (50 cm x 23 cm x 23 cm) com água limpa e com temperatura mantida a  $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ . O período de adaptação foi de 2 semanas, com a frequência de 3 vezes não consecutivas. Os animais foram inseridos em água rasa (15 cm) por 15 minutos e com progressão para águas profundas (40cm) por 55 minutos. Na primeira semana foi utilizado uma sobrecarga de 3% relacionado ao peso corporal fixado à cauda dos animais, com incremento de 1% a cada semana, até atingir 5% do seu peso corpóreo (19). O protocolo de exercício foi realizado durante 3 dias por semana durante 8 semanas (20,21).

### Citocinas e Adipocinas

As citocinas IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, foram analisadas no soro, que foi coletado minutos antes da eutanásia dos animais após 48h do último treino de natação. O sangue após coletado ficou em repouso na geladeira por 4 horas. Posteriormente, foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As citocinas foram quantificadas de acordo com instruções do fabricante empregando o método de ELISA (OpTeia\_BD biosciences\_USA). A leitura das amostras foi realizada em filtro de 450 nm. Após as análises, os dados foram transformados e normalizados pela curva padrão (22).

### Composição Corporal

O percentual de gordura foi medido por absorciometria de dupla energia por raios X (DXA), utilizando software para pequenos animais, nos 3 momentos do experimento, pré-indução de obesidade na semana 1 (VO), após 12 semanas de dieta de indução de obesidade (12 Semanas) e após o treino de natação (20 semanas) (22,23).

### Avaliação da Glicemia Sanguínea de jejum

A glicemia de jejum foi obtida em três etapas: pré-indução da obesidade (VO), após caracterização da obesidade (grupos OB 12 e SD 12) e após treinamento de natação nos OB EXE, OB Sed, SD EXE e SD Sed. Amostras de sangue foram coletadas da veia da cauda e os níveis foram medidos usando o dispositivo Accu-Check (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN) (24).

#### Processo Histológico Muscular

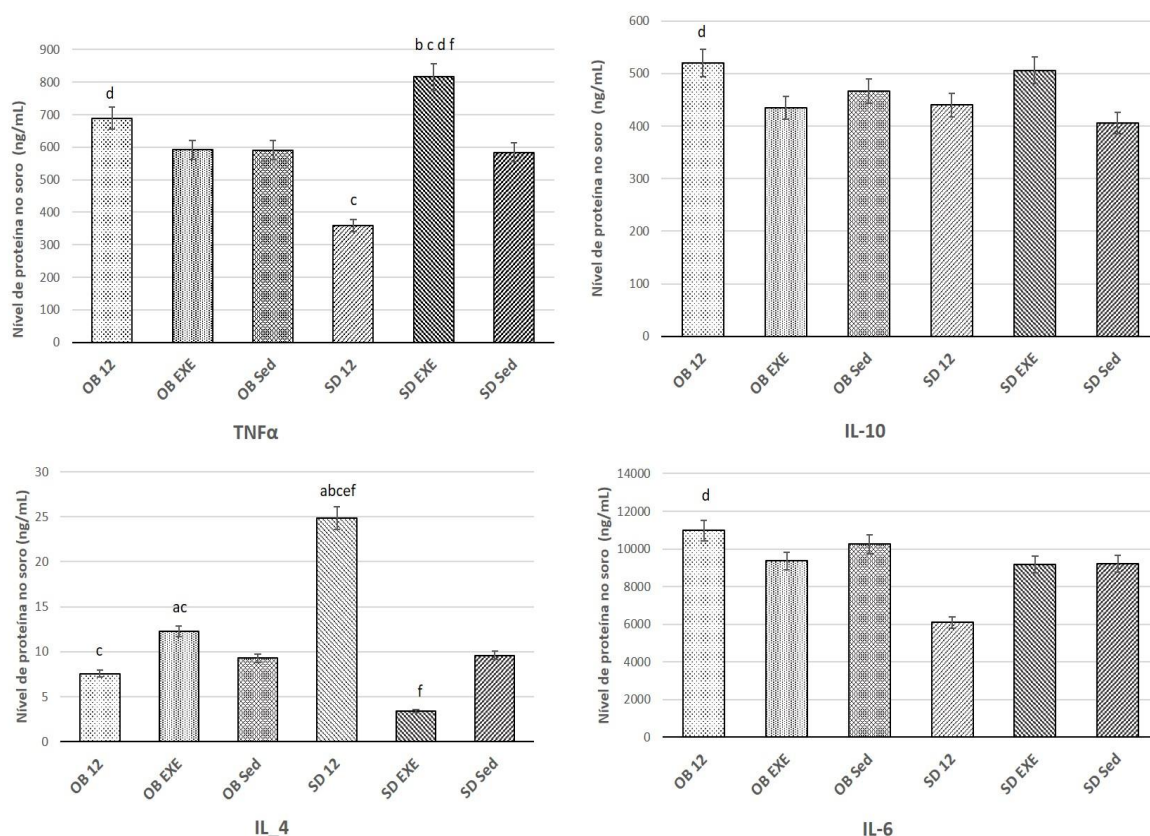
Após a eutanásia, os músculos vasto lateral, tibial anterior e gastrocnêmio foram coletados, separados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 ° C. Os músculos foram cortados em 10 µ usando um criostato a -25 ° C. As lâminas foram armazenadas a -25 ° C antes da coloração. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Oil Red O (ORO). A solução estoque ORO foi feita adicionando 2,5 g de Oil Red O (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canadá) a 400 ml de propilenoglicol a 99% (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canadá). As lâminas foram lavadas em água destilada, rapidamente mergulhadas em propilenoglicol a 90% e coradas por 2 horas na solução ORO. O Tricrômico de Masson foi processado e corado de acordo com o manual do fabricante (kit-Tricrômico masson, Êxodo®). Ambas as lâminas foram fotografadas usando um equipamento de microscópio óptico (Axiolab; Carl Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com uma câmera AxioCamHRc (Carl Zeiss). Para o ORO, 10-25 imagens foram usadas para cada músculo animal em uma magnitude 20X e analisadas com o programa Matlab (25). Para o Trocrômico de Masson, usamos o software *Image Pro-Plus*. Análises morfométricas foram realizadas para avaliar a área de seção muscular (AEC), o número total de fibras musculares e a porcentagem de densidade do tecido conjuntivo. A quantificação da densidade do tecido conjuntivo e CSA foram calculadas como descrito em Sabatine e colaboradores (24).

## **RESULTADOS**

Após a indução da obesidade (OB 12 e SD 12), os animais apresentaram maiores concentrações de IL-6, IL-10 e TNF $\alpha$  na circulação sistêmica; apenas a IL-4 foi



menor nesse período. Em relação ao período de treinamento pós-natação, as concentrações dessas citocinas diminuíram, com diferença estatística nos grupos de obesidade ( $p < 0,05$ ) e, curiosamente, a IL-4 apresentou maiores concentrações no grupo OB EXE em comparação com o OB 12 e OB Sed ( $p = 0,002$ ). A citocina TNF $\alpha$  apresentou maiores concentrações no grupo controle do exercício (SD EXE) em relação ao grupo controle sedentário (SD Sed),  $p < 0,05$ . As citocinas são mostradas separadamente na figura 1.

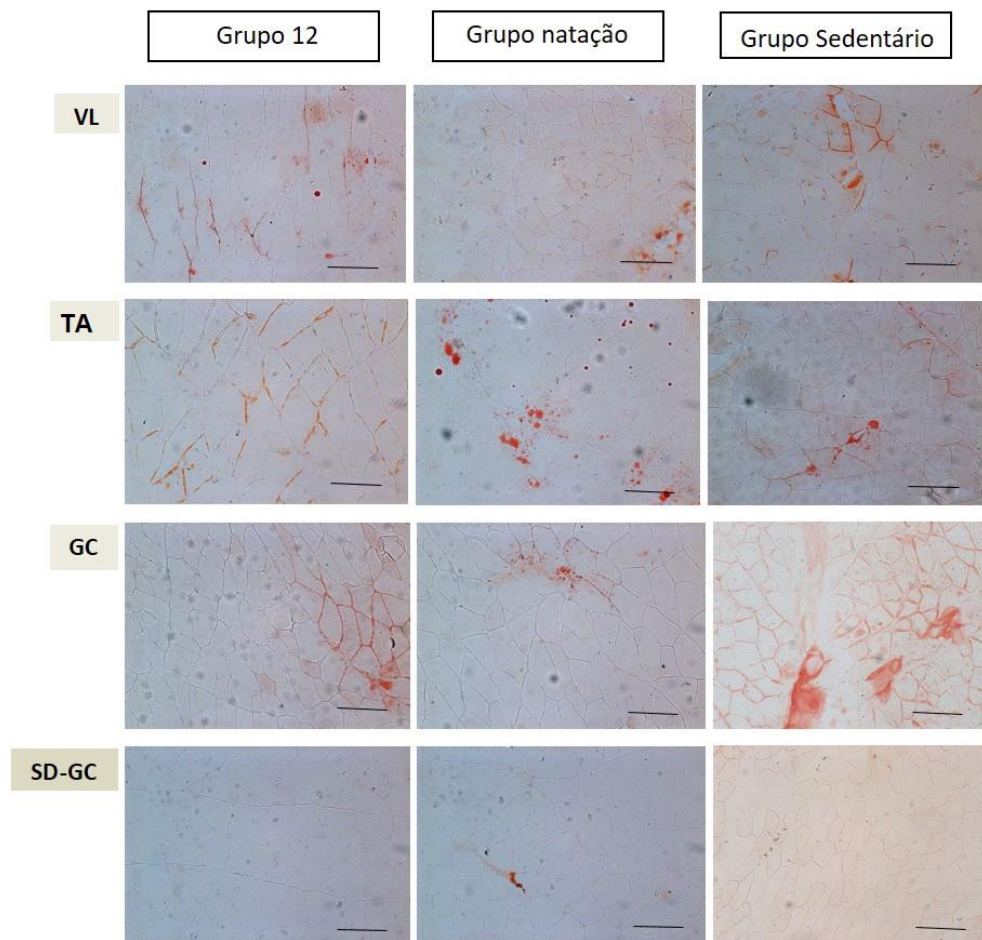


**Figura 1.** Citocinas de animais obesos em diferentes momentos do experimento. Os valores são expressos como média (DP): (a)  $p < 0,05$ , significativamente diferente em comparação com OB 12; (b)  $p < 0,05$ , significativamente diferente em comparação com OB EXE; (c)  $p < 0,05$ , significativamente diferente em comparação com o OB Sed; (d)  $p < 0,05$ , significativamente diferente em relação ao SD 12; (e)  $p < 0,05$ , significativamente diferente em comparação com SD EXE; (f)  $p < 0,05$ , significativamente diferente em comparação com o SD Sed.

#### Alteração Morfológica Muscular

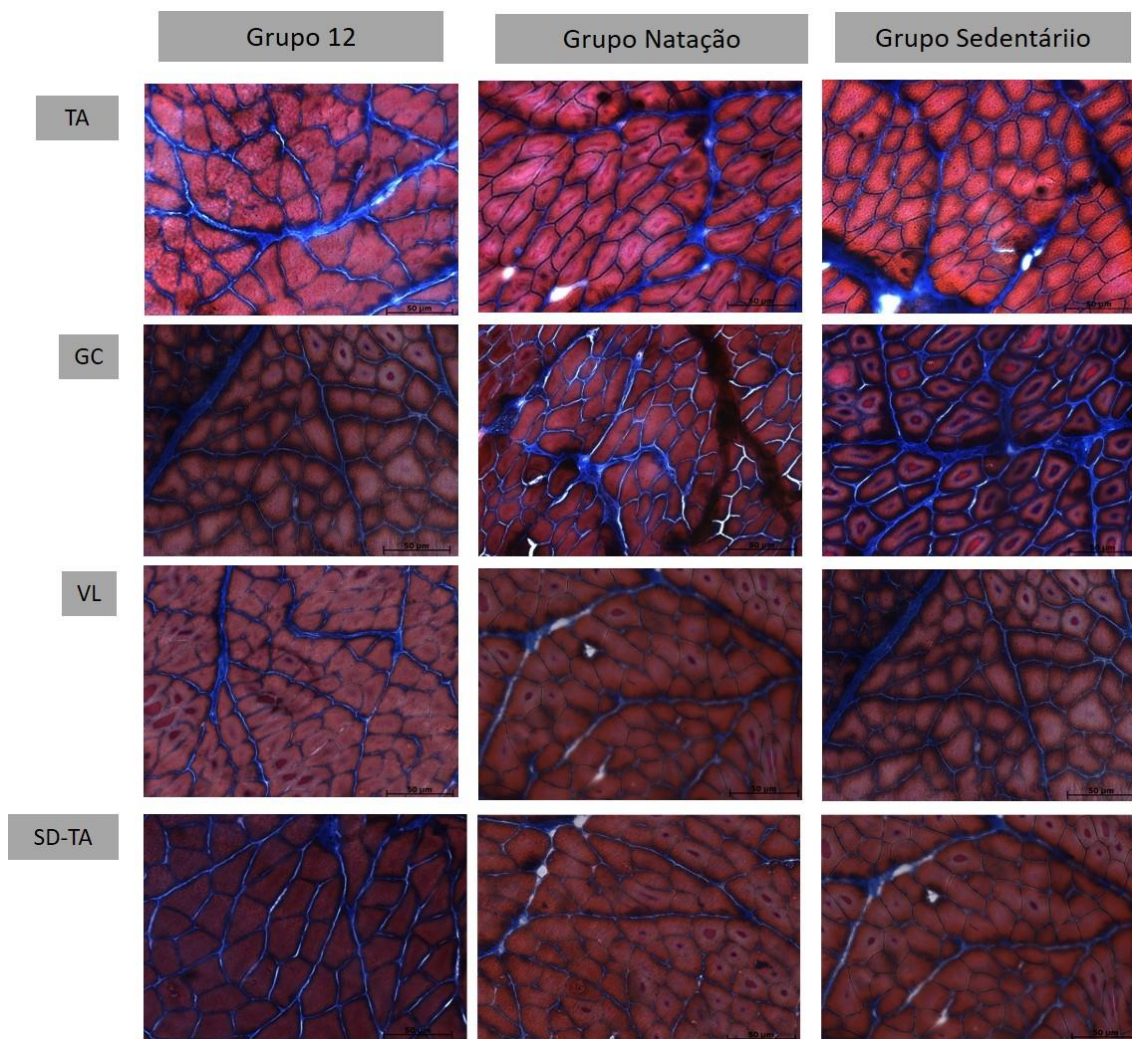
Os músculos vasto lateral, tibial anterior e gastrocnêmio apresentaram maior infiltrado de gordura no grupo obeso por 12 semanas (12 semanas) ( $p < 0,05$ ) e esse infiltrado continuou nos grupos OB EXE e OB Sed em relação ao controle. Os resultados

mostram que, após a natação, a infiltração de gordura diminuiu no músculo gastrocnêmio no grupo obeso em relação aos demais músculos ( $p = 0,04$ ) (Figura 2).



**Figura 2.** Análise da infiltração de gordura com coloração Oil Red O mostrando cada grupo. A barra de escala preta representa 50  $\mu$ m, as imagens foram tiradas com aumento de 20X, infiltração de gordura no vasto lateral (VL), tibial anterior (AT) e gastrocnêmio (GC) nos músculos OB 12Wks (OB 12Wks), natação (OB EXE ) e grupo sedentário (OB Sed), comparado com os músculos gastrocnêmio (GC) no grupo controle (SD-GC).

Os músculos vasto lateral, tibial anterior e gastrocnêmio apresentaram aumento do tecido conjuntivo no período de 12 semanas no grupo obeso (OB 12 semanas) em comparação ao grupo controle, SD-TA ( $p < 0,05$ ), porém após as 8 semanas. No período da natação, apenas o músculo tibial anterior demonstrou uma diminuição no tecido conjuntivo (TC) no grupo da natação obesa (OB EXE) em comparação ao grupo controle (SD Sed) (Figura 3).



**Figura 3.** Tricrômico de Masson no músculo tibial anterior. A barra de escala preta representa 50  $\mu$ m, as imagens foram tiradas com ampliação de 20X, tecido conjuntivo nos músculos tibial anterior (AT), gastrocnêmio (GC) e músculos vasto lateral (VL) nos grupos OB 12 (OB 12) e natação (OB EXE) e grupo sedentário (OB Sed), comparado com os músculos tibiais anteriores (AT) no grupo controle (SD-AT).

Na análise morfológica da área transversa (AT), os músculos vasto lateral e tibial anterior não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos sedentário e nadador ( $p > 0,05$ ). Entretanto, o músculo gastrocnêmio apresentou menor área transversa (CSA) entre os grupos OB Sed e os grupos controle, ambos nadadores e sedentários (SD EXE e SD Sed  $p < 0,05$ ).

#### Resultados da Glicemia

Nossos animais não apresentaram alterações glicêmicas nas análises de glicemia de jejum em nenhum período do experimento.

### Resultados de regressão linear multivariável

A Tabela 1 descreve a variabilidade da gordura intramuscular (ORO) de acordo com o tecido conjuntivo (TC) e o percentual de gordura corporal. Para a gordura intramuscular de gastrocnêmio (GC), o modelo final, composto por percentual de gordura corporal e TC, é capaz de explicar 41% da variabilidade da gordura intramuscular de GC. Se a TC for estável, o percentual de gordura corporal pode prever 34% da variabilidade da gordura intramuscular do GC ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, quando o percentual de gordura corporal é estável, a TC pode prever 53% da gordura intramuscular do GC ( $p < 0,001$ ). Em relação à gordura intramuscular do tibial anterior (TA), o modelo final é capaz de explicar 37% da variabilidade da gordura corporal. Além disso, o percentual de gordura corporal pode prever apenas 52% da gordura intramuscular do TA ( $p < 0,05$ ). Por fim, em relação à gordura intramuscular do vasto lateral (VL), o modelo final, também composto por percentual de gordura corporal e tomografia computadorizada, é capaz de explicar 63% da variabilidade da gordura intramuscular do VL. Se a TC for estável, o percentual de gordura corporal pode prever 34% da variabilidade da gordura intramuscular da VL ( $p < 0,05$ ). No entanto, quando o percentual de gordura corporal é estável, a TC pode prever 61% dos valores de gordura intramuscular do VL ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 1.** Modelo de regressão linear explicando a variabilidade da gordura intramuscular (ORO)

	B	SE B	$\beta$	$p$	$R^2$	R Ajustado
<i>Oro GC</i>					0.454	0.413
Constante	0.872	4.300		0.843		
% Gordura Corporal	0.316	0.134	0.339	0.026		
TC	0.782	0.210	0.534	0.001		
<i>Oro TA</i>					0.414	0.371
Constante	6.192	5.015		0.228		
% Gordura Corporal	0.681	0.196	0.523	0.002		
<i>Oro VL</i>					0.653	0.627
Constante	1.162	2.417		0.651		
% Gordura Corporal	0.270	0.982	0.339	0.010		
TC	0.706	0.141	0.615	0.001		

Abreviações: TC: tecido conectivo; Oro: Oil Red O; GC: gastrocnêmio; TA: tibial anterior; VL: vasto lateral.

#### Composição de gordura corporal

O percentual de gordura corporal foi maior nos grupos OB 12 (21,9%) em comparação ao grupo controle SD 12 (13,6%) ( $p < 0,05$ ). Após o treinamento de natação, o grupo OB EXE (18,2%) não mostrou diferenças em relação aos grupos controle (SD EXE 15,9% e SD Sed 13,6%); no entanto, o grupo OB Sed (25,1%) apresentou maior concentração de gordura corporal do que o OB EXE, Grupos SD EXE e SD Sed ( $p < 0,05$ ).

### **DISCUSSÃO**

Neste estudo, a dieta utilizada para a indução de obesidade em 12 semanas promoveu o aumento da concentração de citocinas sistêmicas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL-6, estando de acordo com os dados da literatura. Sabe-se que aumento do tecido adiposo corporal causa um estresse celular, levando ao aumento de células inflamatórias e conseqüentemente uma maior liberação destas citocinas (15). Neste mesmo período também observamos que houve uma maior concentração da citocina IL-10, considerada anti-inflamatória. Estudos tem mostrado que existe uma predominância em macrófagos do tipo M2 considerados de perfil anti-inflamatórios no tecido adiposo, porém na obesidade, o estresse causado nas células adiposas e seu aumento, modifica esse predomínio de macrófagos tipo M2 para macrófagos tipo M1. Desta forma, ocorre um aumento na proporção M1/M2 neste tecido, levando a maior liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias circulantes (3,6). Essa condição, pode levar a manutenção do estado inflamatório sistêmico, o qual é causa das doenças chamadas metabólicas, incluindo a obesidade, diabetes tipo II e doenças cardíacas (26).

Um importante resultado do nosso estudo, foi que após 8 semanas de treino, nos grupos obesos, tanto natação como sedentário, apresentaram redução de citocinas TNF $\alpha$  e IL-6 quando comprado com o grupo controle. Este fato pode indicar uma melhora no perfil inflamatório, ou um ganho na resposta M2 em relação a M1,

mesmo quando consideramos o grupo obeso sedentário. Essa conclusão pode ser pela presença de IL-4, citocina perfil M2, que pode auxiliar na manutenção da homeostase entre as respostas M2/M1 tornando o ambiente com citocinas anti-inflamatórias ou ainda inibindo a resposta M1 do tecido adiposo (5).

Nossos resultados também mostram um aumento no infiltrado de gordura muscular, nos músculos vasto lateral, gastrocnêmio e tibial anterior, no grupo obeso 12 semanas em relação ao controle. Esse infiltrado de células de gordura no músculo apresenta a mesma ação encontrada, quando há aumento do tecido adiposo. Entre as fibras musculares ocorre proliferação de células lipídicas, bem como aumento do seu tamanho, causando um esse estresse celular neste tecido. Como consequência, ocorre um aumento de infiltrado de células inflamatórias, levando à inflamação local (27). A inflamação muscular pode se tornar persistente e ter como consequência, a não ativação das células satélites musculares, por conseguinte promover um reparo tecidual anormal, levando ao aumento da fibrose muscular. Em nossos resultados o aumento da gordura muscular ocorreu conjuntamente com o aumento da fibrose muscular, no mesmo período de 12 semanas de dieta indutora de obesidade (28,29). A consequência dessas mudanças, tanto do aumento de gordura, assim como da fibrose muscular, pode ter ocorrido devido aumento no infiltrado de células imune, que provavelmente levou a manutenção da inflamação e assim permanecendo em um ciclo crônico. Este estado crônico intramuscular pode ser causa de alterações no tecido muscular como fraqueza, mudança na arquitetura e bem como predispor o surgimento de doenças crônicas e degenerativas, como a osteoartrite, que pode surgir prematuramente (33,34).

Outro resultado importante é a correlação da gordura intramuscular com o acúmulo de gordura corporal e a fibrose, mostrando uma interação no desequilíbrio causado em um tecido com outro tecido ou órgão. As citocinas liberadas na corrente sanguínea encontra outras ligações com receptores distantes, promovendo uma reação em cadeia de uma inflamação persistência, por essa razão trabalhos vem mostrando a correlação de uma inflamação no tecido adiposo abdominal, com as membranas sinoviais das articulações, não apenas dos joelhos, como também em mãos e ombros, ou ainda, com o humor vítreo. E como consequência dessas inflamações, podem causar uma cascata de eventos que levam a doenças sistêmicas e

crônicas, não só em tecido, mas também em órgãos, como a diabetes tipo II e hipertensão arterial (30,31).

Portanto, recursos que busquem diminuir o acúmulo de gordura, tanto central como periférico, poderiam ajudar a controlar o surgimento dessas doenças metabólicas, que são limitantes, não apenas nas atividades diárias, mas também na perda da qualidade de vida. Alguns trabalhos vêm mostrando diferentes formas de diminuir o infiltrado de células imunes e infiltrado de gordura em tecidos, como exercício, aplicado no treino de natação, e em esteira (35). Ainda não existe um consenso com relação ao volume de exercícios, bem como intensidade, na frequência e tipo de treino, a fim de compreender como esse recurso modificaria as repostas sistêmicas e crônica, para interromper esse ciclo (31,32). Sendo assim, nossos resultados nos grupos pós-treino, mostraram efeito benéfico da natação em animais obesos, visto pela diminuição do infiltrado de gordura corporal, como muscular, adicionado a redução da fibrose muscular e diminuição das citocinas pró-inflamatórias circulantes (32,33).

Trazemos em nossa conclusão, que o aumento do tecido adiposo causado pela dieta hipercalórica aumentou citocinas pró-inflamatórias na circulação periférica e ainda modificou o conteúdo de fibrose e gordura intramuscular em ratos obesos. No entanto, conseguimos mostrar que o treino de natação pode ser uma ferramenta positiva na melhora do perfil inflamatório sistêmico, no infiltrado de gordura corporal e muscular, bem como na redução da fibrose muscular.

## REFERÊNCIAS

1. WHO, World Health Organization, Obesity and overweight. 2019;(June):2016. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. McNelis JC, Olefsky JM. Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease. Immunity [Internet]. 2014;41(1):36–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.010>
3. van Meijel RLJ, Blaak EE, Goossens GH. Adipose tissue metabolism and inflammation in obesity [Internet]. Mechanisms and Manifestations of Obesity in Lung Disease. Elsevier

- Inc.; 2019. 1–22 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813553-2.00001-4>
4. Liu R, Nikolajczyk BS. Tissue immune cells fuel obesity-associated inflammation in adipose tissue and beyond. *Front Immunol*. 2019;10(JULY).
  5. Apostolopoulos V, de Courten MPJ, Stojanovska L, Blatch GL, Tangalakis K, de Courten B. The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(1):43–57.
  6. Appari M, Channon KM, McNeill E. Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes. *Antioxidants Redox Signal*. 2018;29(3):297–312.
  7. Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators Inflamm*. 2013;2013.
  8. Fink LN, Costford SR, Lee YS, Jensen TE, Bilan PJ, Oberbach A, et al. Pro-Inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-Fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans. *Obesity*. 2014;22(3):747–57.
  9. Marcus RL, Addison O, Lastayo PC. Intramuscular adipose tissue attenuates gains in muscle quality in older adults at high risk for falling. A brief report. *J Nutr Heal Aging*. 2013;17(3):215–8.
  10. Collins KH, Herzog W, MacDonald GZ, Reimer RA, Rios JL, Smith IC, et al. Obesity, metabolic syndrome, and musculoskeletal disease: Common inflammatory pathways suggest a central role for loss of muscle integrity. *Front Physiol*. 2018;9(FEB).
  11. Bassi D, Bueno P de G, Nonaka KO, Selistre-Araujo HS, Leal AM de O. Exercise alters myostatin protein expression in sedentary and exercised streptozotocin-diabetic rats. *Arch Endocrinol Metab* [Internet]. 2015;59(2):148–53. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2359-39972015000200148&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-39972015000200148&lng=en&tlng=en)
  12. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol* [Internet]. 2018;36(1):14–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004>
  13. Lange AK, Vanwanseele B, Fiatarone singh MA. Strength training for treatment of osteoarthritis of the knee: A systematic review. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2008 Oct 15 [cited 2019 Jul 1];59(10):1488–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18821647>
  14. Giles ED, Jackman MR, MacLean PS. Modeling Diet-Induced Obesity with Obesity-Prone Rats: Implications for Studies in Females. *Front Nutr* [Internet]. 2016;3(November):1–13. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2016.00050/full>
  15. Title R, Affects O, Integrity M, Collins KHKH, Herzog W, MacDonald GZ, et al. Increased adiposity in response to high fat/high sucrose diet is associated with increased concentrations of cytokines and adipokines in synovial fluid. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2016;34(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17909824> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1860072&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20864021> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid>
  16. Munukka M, Waller B, Rantalainen T, Häkkinen A, Nieminen MT, Lammentausta E, et al.



- Efficacy of progressive aquatic resistance training for tibiofemoral cartilage in postmenopausal women with mild knee osteoarthritis: a randomised controlled trial. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2016 Oct [cited 2019 Jul 1];24(10):1708–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27211862>
17. Waller B, Ogonowska-Slodownik A, Vitor M, Lambeck J, Daly D, Kujala UM, et al. Effect of Therapeutic Aquatic Exercise on Symptoms and Function Associated With Lower Limb Osteoarthritis: Systematic Review With Meta-Analysis. *Phys Ther* [Internet]. 2014;94(10):1383–95. Available from: <https://academic.oup.com/ptj/article-lookup/doi/10.2522/ptj.20130417>
  18. Estadella D, Oyama LM, Bueno AA, Habitante CA, Souza GI, Ribeiro EB, et al. A palatable hyperlipidic diet causes obesity and affects brain glucose metabolism in rats. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2011;10(1):168. Available from: <http://www.lipidworld.com/content/10/1/168>
  19. Gobatto CA, De Mello MAR, Sibuya CY, De Azevedo JRM, Dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol*. 2001;130(1):21–7.
  20. Rocha GLD, Crisp AH, Oliveira MRMD, Silva CAD, Silva JO, Duarte ACGO, et al. Effect of high intensity interval and continuous swimming training on body mass adiposity level and serum parameters in high-fat diet fed rats. *Sci World J*. 2016;2016.
  21. Chang J, Liao Z, Lu M, Meng T, Han W, Ding C. Systemic and local adipose tissue in knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2018; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458418311075>
  22. Collins KH, Hart DA, Reimer RA, Seerattan RA, Herzog W. Response to diet-induced obesity produces time-dependent induction and progression of metabolic osteoarthritis in rat knees. *J Orthop Res*. 2016;34(6):1010–8.
  23. Mazess RB, Barden HS, Bisek JP, Hanson J. Dual-energy x-ray absorptiometry for total-body and regional bone-mineral and soft-tissue composition. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1990 Jun 1 [cited 2019 Jul 1];51(6):1106–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2349926>
  24. Sabadine MA, Russo TL, Luna GF, Oliveira Leal AM. Effects of mesenchymal stromal cells on type 1 diabetes mellitus rat muscles. *Muscle and Nerve*. 2018;58(4):583–91.
  25. Collins KH, Hart DA, Reimer RA, Seerattan RA, Waters-Banker C, Sibole SC, et al. High-fat high-sucrose diet leads to dynamic structural and inflammatory alterations in the rat vastus lateralis muscle. *J Orthop Res*. 2016;34(12):2069–78.
  26. Oh DY, Morinaga H, Talukdar S, Bae EJ, Olefsky JM. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes*. 2012;61(2):346–54.
  27. Himmerich H, Fischer J, Bauer K, Kirkby KC, Sack U, Krügel U. Stress-induced cytokine changes in rats. *Eur Cytokine Netw*. 2013;24(2):97–103.
  28. Szczepankiewicz D, Skrzypski M, Pruszyńska-Oszmałek E, Kołodziejski PA, Sassek M, Stefańska B, et al. Interleukin 4 affects lipid metabolism and the expression of pro-inflammatory factors in mature rat adipocytes. *Immunobiology*. 2018;223(11):677–83.
  29. Żelechowska P, Agier J, Kozłowska E, Brzezińska-Błaszczyk E. Mast cells participate in chronic low-grade inflammation within adipose tissue. *Obes Rev*. 2018;19(5):686–97.

30. Collins KH, Paul HA, Hart DA, Reimer RA, Smith IC, Rios JL, et al. A High-Fat High-Sucrose Diet Rapidly Alters Muscle Integrity, Inflammation and Gut Microbiota in Male Rats. *Sci Rep.* 2016;6(June):1–10.
31. Collins KH, Reimer RA, Herzog W. Increased adiposity in response to high fat/high sucrose diet is associated with increased concentrations of cytokines and adipokines in synovial fluid. *Osteoarthr Cartil.* 2014;22(2014):S64.
32. Collins KH, Paul HA, Hart DA, Reimer RA, Smith IC, Rios JL, et al. A High-Fat High-Sucrose Diet Rapidly Alters Muscle Integrity, Inflammation and Gut Microbiota in Male Rats. *Sci Rep.* 2016;6(November):1–10.
33. Collins KH, Hart DA, Smith IC, Issler AM, Reimer RA, Seerattan RA, et al. Acute and chronic changes in rat soleus muscle after high-fat high-sucrose diet. *Physiol Rep.* 2017;5(10):1–10.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

### ARTIGO EM JORNAL OU REVISTA

RIBEIRO, IVANA LEÃO; CAMARGO, PAULA REZENDE; ALBURQUERQUE-SENDÍN, FRANCISCO; FERRARI, ANGÉLICA VIANA; **ARRAIS, CRISTINA LIMA**; SALVINI, TANIA FÁTIMA. Three-dimensional scapular kinematics, shoulder outcome measures and quality of life following treatment for breast cancer - A case control study.. *Musculoskeletal Science and Practice.* , v.40, p.72 - 79, 2019.

ALYSSA CONTE DA SILVA ; RICARDO M. LIBERATORI JR.; JÉSSICA BIANCA AILY; GLAUCIA HELENA GONÇALVES; **CRISTINA ARRAIS LIMA** ; LUDMILLA MATTOS; MARCOS DE NORONHA; STELA MÁRCIA MATTIELLO. Eficiência da técnica de compressão isquêmica sobre a dor e função em indivíduos com dor no ombro: uma revisão sistemática. *JMPT*, 2019

SALAMA, ISABEL CRISTINA ; ARRAIS-LIMA, CRISTINA ; ARRAIS-SILVA, WAGNER WELBER . Evaluation of Boldine Activity against Intracellular Amastigotes of *Leishmania amazonensis*. *KOREAN JOURNAL OF PARASITOLOGY*, v. 55, p. 337-340, 2017.

### PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E SEMINÁRIOS NO PERÍODO:

11° Congresso Internacional de Fisioterapia- Salvador\_Bahia  
ARRAIS-LIMA, C.; VASILCEAC, F.; Piazzi, I; MATTIELLO, SM  
Análise da composição corporal em ratos obesos após exercício de natação, 2019.

PIAZZI I; ARRAIS-LIMA, C.; Russo T; MATTIELLO, SM  
Treinamento Físico Aeróbico Promove Redução De Tecido Não Contrátil no músculo esquelético de ratos obesos, 2019.

### 54° Congresso Anual SBFIS

Marine D.; Alves, JM; ARRAIS-LIMA, C.; Duarte, AC  
BEHAVIOR OF BLOOD PRESSURE AND INTRACRANIAN PRESSURE IN THE DEVELOPMENT OF OBESITY PROCESS,, 2019.

Furino V.; ARRAIS-LIMA, C.; Duarte, AC  
CONSUMPTION OF PALATABLE HYPERLIPID DIET INDUCES THE EXPANSION OF VISCERAL ADIPOSE TISSUE, RAISES HDL CHOLESTEROL AND BONE MINERAL DENSITY IN WISTAR RATS,2019.

WCPT Congress 2017

BARRETO, R. ; RIBEIRO, L. ; LUCERA, G. ; ARRAIS-LIMA, C. ; CAMARGO, P. . Pain Catastrophizing in Patients with Shoulder Pain. 2017.

#### OUTRAS INFORMAÇÕES:

ARRAIS-LIMA, C.

Participação em banca de TCC

Júlia Ferreira Custódio. Avaliação da hiperfagia e sua relação com o metabolismo ósseo, composição corporal de ratas com osteoporose, 2019(Gerontologia) Universidade Federal de São Carlos

Palestra

ARRAIS-LIMA, C. Tópicos em Imunologia Básica, 2019. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Avaliação de trabalhos em congressos

XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar, como avaliador de resumo (2019)

Cursos

Escrita Científica ministrado pelo Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato, realizado pela Universidade Federal de São Carlos, em São Carlos (SP), 2018

Projeto de Extensão

Pilates para pacientes com dores no joelho. Atendimento USE.  
Período: agosto/2019 a dezembro/2019