

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS- UFSCar/UNESP

JEAN LUCAS FERNANDES DA COSTA

**ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS NO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL E
MÚSCULO ESQUELÉTICO EM RATOS *WISTAR* OBESOS EXÓGENOS FRENTE
AO PROTOCOLO DE TREINAMENTO AERÓBICO E/OU INTERVENÇÃO
DIETÉTICA**

SÃO CARLOS

2022

JEAN LUCAS FERNANDES DA COSTA

ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS NO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL E MÚSCULO
ESQUELÉTICO EM RATOS *WISTAR* OBESOS EXÓGENOS FRENTE AO PROTOCOLO
DE TREINAMENTO AERÓBICO E/OU INTERVENÇÃO DIETÉTICA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia do Exercício.

Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte.

SÃO CARLOS

2022

BANCA EXAMINADORA

Membros Titulares

Prof. Dr. Guilherme Borges Pereira (DCF/UFSCar)

Profa. Dra. Marcela Sene-Fiorese (Pesquisadora do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos [IFSC-USP])

Membros Suplentes

Prof. Dr. Fernando Fabrizzi (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Penápolis [FAFIPE/FUNEPE])

Dra. Cynthia Aparecida de Castro (DMP/UFSCar)

FICHA CATALOGRÁFICA

A ficha catalográfica é fornecida pela Biblioteca Comunitária, após a realização da defesa.

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Jean Lucas Fernandes da Costa, realizada em 24/02/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte (UFSCar)

Prof. Dr. Guilherme Borges Pereira (UFSCar)

Profa. Dra. Marcela Sene Fiorese (Anhanguera)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer aos meus pais Abilio e Tânia por todos os esforços dedicados ao longo dos anos para que eu pudesse ter acesso a uma educação de qualidade, por todo o apoio em minhas decisões e por me confortarem nos momentos mais difíceis de toda a minha jornada acadêmica. Conseguimos, não foi fácil, mas conseguimos.

Às minhas irmãs Alessandra e Mariana e ao meu irmão Pedro por estarem aqui e serem minhas forças, meus braços, pernas e as vezes até cérebro quando o meu sozinho já não dava mais conta.

A todos os membros do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicado ao Exercício por todo o companheirismo nesses anos de mestrado, pela paciência, pelas risadas compartilhadas, pelas alegrias e momentos divididos. Obrigado Carlinha, Valter, Marco, Felipe, Jeferson, João, Nandão, Jean, Diego e Victor. Ah, e não poderia deixar de agradecer ao nosso saudoso assistente de laboratório Zé e à Edileusa por todo o apoio para que nossas pesquisas ocorressem da melhor maneira possível.

Um agradecimento especial ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e a Profa. Dra. Heloísa S. S. Araújo, ao Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas e a Profa. Dra. Fernanda F. Anibal, e ao Laboratório de Imunologia Aplicada e o Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra, por todo o apoio externo para que as análises deste estudo pudessem ser realizadas, por todo o conhecimento técnico compartilhado e pelo carinho nos momentos de trabalho. Muito obrigado.

Aos membros da banca do Exame de Qualificação, Prof. Dr. Guilherme Borges Pereira, Profa. Dra. Marcela Sene-Fiorese e a Dra. Cynthia Aparecida de Castro por todo o apoio ao meu trabalho, ele de fato não chegaria nesta versão apresentada sem as considerações feitas durante o exame.

Aos meus amigos de vida, da graduação e pós-graduação por me aguentarem e me levantarem quando as pernas não tinham mais forças pra continuar caminhando. Não me atreveria a nomeá-los individualmente para não cometer nenhuma injustiça, muito obrigado, de verdade, eu os amo do tamanho do mundo e além.

Eu não poderia deixar de realizar um agradecimento muito especial neste trabalho à Dra. Vanessa de Oliveira Furino por tudo o que ela fez por mim durante esses anos de mestrado.

Van, eu não consigo descrever o quanto eu sou grato pelo o tanto que você me ensinou, ensina e provavelmente continuará me ensinando. Obrigado por dividir os momentos de aprendizagem com muito carinho, você não sabe o quanto me inspira. Foi um presente muito incrível do universo ter te colocado no meu caminho durante essa jornada. Obrigado, obrigado, obrigado.

E por fim e NUNCA menos importante, à minha orientadora Profa. Dra. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte, a minha grande gratidão. Eu poderia ficar por horas te agradecendo por exatamente tudo o que você fez por mim durante esses anos de graduação e mestrado. Obrigado por cada conselho e momentos compartilhados. Obrigado por manter a minha cabeça em calma mesmo quando eu me encontrava no “olho do furacão”. Eu tenho muito orgulho de tudo o que construímos. De orientadora à amiga pra vida toda, muito obrigado Teacher. Obrigado por abrir as portas de seu laboratório, por me mostrar que olhar com otimismo para as situações é sempre o melhor caminho e por deixar momentos de frustrações e dificuldades mais leves e divertidos.

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES (Código de Financiamento 001), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (131213/2020-2), e pela da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (financiamento n. 2017/09602-4).

EPÍGRAFE

*“Palavras são, na minha nada humilde
opinião, nossa inesgotável fonte de magia.
Capazes de formar grandes sofrimentos e a
também remediá-los”*

(Alvo Dumbledore em Harry Potter e as
Relíquias da Morte)

*“A coisa sobre crescer com Fred e George, é
que você meio que começa a pensar que tudo é
possível se você tem coragem suficiente”*

(Gina Weasley em Harry Potter e a Ordem da
Fênix)

RESUMO

A obesidade é uma doença que possui uma etiologia multifatorial que pode levar ao desencadeamento de diversas outras doenças como hipertensão, aterosclerose e diabetes. Além disso, a expansão do tecido adiposo tem levado a consequências nocivas não somente neste tecido, mas de maneira sistêmica. Neste sentido, a busca por estratégias que reduzam adiposidade corporal como o exercício físico e as intervenções dietéticas, têm sido alvos investigativos em diversos estudos. Desta forma, este estudo teve como objetivo determinar as concentrações de marcadores inflamatórios no tecido adiposo visceral e músculo esquelético, verificar as alterações na massa corporal e na área de adipócitos em ratos obesos após o treinamento contínuo de intensidade moderada (MICT) e/ou intervenção dietética. Após oito semanas de indução à obesidade através do consumo de dieta hiperlipídica palatável (HFD), vinte ratos *Wistar* foram subdivididos em quatro grupos: grupo obeso controle (HFD-SED); grupo obeso que recebeu o treinamento com MICT (HFD-MICT); grupo intervenção dietética através do retorno no consumo de dieta padrão (CD) (CD-SED); e grupo intervenção dietética através do retorno no consumo de CD e que recebeu a intervenção com o MICT (CD-MICT). Todos os animais dos grupos de treinamento foram submetidos ao MICT com intensidade de 50-80% do $V_{máx}$, três vezes por semana, durante 8 semanas. O músculo gastrocnêmio (GAST) e o tecido adiposo mesentérico (mWAT) foram coletados para quantificar TNF- α , IL-6 e IL-10, por meio de Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Adicionalmente, o tecido adiposo retroperitoneal (rWAT) e epididimal (eWAT) foram coletados e pesados. A massa corporal foi registrada antes e após o protocolo experimental e a morfologia dos adipócitos do mWAT foi avaliada por meio de análise histológica. Os resultados mostraram que o grupo HFD-SED apresentou maior massa corporal, maiores concentrações de marcadores inflamatórios no mWAT, aumento na área de adipócitos e demais parâmetros de obesidade. O grupos CD-SED e CD-MICT apresentaram reduções da massa corporal, peso relativo dos depósitos de gordura visceral, área de adipócitos do mWAT, e aumento na capacidade máxima de exercício. Além disso, houveram reduções nas concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 frente aos tratamentos no mWAT, mas não em GAST. Além disso, o grupo CD-MICT apresentou valores elevados para a razão IL-10/ TNF- α no mWAT. Finalmente, concluímos que oito semanas intervenção dietética de maneira independente ou combinada ao MICT são eficazes em reduzir alguns dos efeitos deletérios causados pela obesidade.

Palavras-chave: Marcadores inflamatórios. Tecido adiposo visceral. Músculo esquelético. Treinamento contínuo de intensidade moderada. Intervenção dietética. Obesidade exógena. Dieta hiperlipídica palatável.

ABSTRACT

Obesity is a disease that has a multifactorial etiology that can lead to the triggering of several other diseases such as hypertension, atherosclerosis and diabetes. In addition, the expansion of adipose tissue has led to harmful consequences not only in this tissue, but in a systemic way. In this sense, the search for strategies that reduce body adiposity, such as physical exercise and dietary interventions, have been investigative targets in several studies. Thus, this study aimed to determine the concentrations of inflammatory markers in visceral adipose tissue and skeletal muscle, to verify changes in body mass and adipocyte size in obese rats after continuous moderate-intensity training (MICT) and/or dietary intervention. After eight weeks of obesity induction through the consumption of a palatable high-fat diet (HFD), twenty male Wistar rats were divided into four groups: control rats fed with HFD (HFD-SED); obesity rats fed with HFD and submitted to MICT (HFD-MICT); obesity rats that were submitted to a nutritional intervention by switching HFD to chow-diet (CD-SED); and obesity rats that were submitted to MICT and nutritional intervention by switching HFD to chow-diet (CD-MICT). All animals in the training groups were submitted to MICT with an intensity of 50-80% of V_{max} , three times a week, for 8 weeks. The gastrocnemius muscle (GAST) and mesenteric adipose tissue (mWAT) were collected to quantify TNF- α , IL-6 and IL-10 through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Additionally, retroperitoneal (rWAT) and epididymal (eWAT) adipose tissue were collected and weighed. The body mass was recorded before and after the experimental protocol and mWAT adipocyte morphology was assessed using histological analysis. The results showed that the HFD-SED presented higher body mass, higher concentrations of inflammatory markers in mWAT and an increase in adipocyte size and other obesity parameters. The CD-SED and CD-MICT groups showed reductions in body mass, relative weight of visceral fat deposits, adipocyte area of mWAT, and increased maximal exercise capacity. Furthermore, there was a reduction in the concentrations of TNF- α , IL-6 and IL-10 in these groups in mWAT, but not in GAST. In addition, the CD-MICT group showed high values for the IL-10/TNF- α ratio in mWAT. Finally, we conclude that an eight-week dietary intervention independently or associated with MICT are effective in reducing some of the deleterious effects caused by obesity.

Keywords: Inflammatory markers. Visceral adipose tissue. Skeletal muscle. Moderate-intensity continuous training. Dietary intervention. Exogenous obesity. High-fat diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral sobre como a obesidade induz a inflamação local e sistêmica e suas manifestações no sangue, fígado, músculo esquelético e intestino).....	23
Figura 2. O efeito anti-inflamatório do exercício físico no contexto da obesidade.....	24
Figura 3. Desenho Experimental	30
Figura 4. Protocolo de Adaptação e Treinamento dos Animais	35
Figura 5. Índice de Adiposidade.....	43
Figura 6. Morfologia do Tecido Adiposo Mesentérico	44
Figura 7. Fotomicrografia representativa dos adipócitos mesentéricos corados com HE.....	45
Figura 8. Concentração de Citocinas Teciduais no tecido adiposo mesentérico (mWAT) e músculo gastrocnêmio (GAST).....	47
Figura 9. Razões IL-10/ TNF- α teciduais no tecido adiposo mesentérico (mWAT) e músculo gastrocnêmio (GAST)	48
Figura 10. Resumo dos principais resultados encontrados no presente estudo.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição Nutricional das Dietas.....	32
Tabela 2. Medida para avaliação do desempenho dos animais durante a adaptação	33
Tabela 3. Mudanças na massa corporal total (g)	41
Tabela 4. Consumo alimentar (g/dia) e Ingesta Calórica (kcal/dia)	41
Tabela 5. Peso relativos dos tecidos (g/100 massa corporal total)	42
Tabela 6. Variáveis do Treinamento.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AGLs	Ácidos Graxos Livres
cal/g	Calorias por grama
CD	Dieta Padrão
CS	Citrato Sintase
DAG	Diacilglicerol
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPM	Erro Padrão da Média
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
eWAT	Tecido Adiposo Epididimal
FC_{máx}	Frequência Cardíaca Máxima
g	Gramas
g/dia	Gramas por dia
GAST	Músculo gastrocnêmio
HFD	Dieta hiperlipídica palatável
IA	Índice de Adiposidade
IL-10	Interleucina 10
IL-15	Interleucina 15
IL-1ra	Receptor Antagonista de IL-1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de Massa Corporal
kcal/dia	Quilocalorias por dia
kcal/g	Quilocalorias por grama
LDHB	Lactato desidrogenase isoforma B
LPS	Lipopolissacarídeos
m	Metros
m/min	Metros por minuto
m/s	Metros por segundo
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MCT-2	Proteína transportadora de monocarboxilato tipo 2

MEC	Máxima Capacidade de Exercício
mg	Miligramas
MICT	Treinamento Contínuo de Moderada Intensidade
min	Minutos
mWAT	Tecido Adiposo Mesentérico
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF-κB	Fator nuclear kappa B
pg.mg	Picogramas por miligrama
pg/ml	Picogramas por mililitros
PGC1-α	Coativador-1 Alfa do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama
rpm	Rotações por Minuto
rWAT	Tecido Adiposo Retroperitoneal
SED	Sedentário
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRL- 2	Receptores <i>toll-like 2</i>
TRL-4	Receptores <i>toll-like 4</i>
TRVP-4	Receptores transientes vanilóides tipo 4
V_{máx}	Velocidade Máxima
VO_{2máx}	Consumo Máximo de Oxigênio
μl	Microlitros
μm²	Micrômetros quadrados

LISTA DE SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DEFMH	Departamento de Educação Física e Motricidade Humana
LABNUTRI	Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados ao Exercício
LBBM	Laboratório de Bioquímica e Biologia Celular
LIDI	Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas
OMS	Organização Mundial da Saúde
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Obesidade	20
2.2. Obesidade e inflamação	21
2.3. Estratégias de controle da obesidade e inflamação	23
3. HIPÓTESES.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1. Objetivo Geral	27
4.2. Objetivos específicos.....	27
5.1. Considerações éticas e Animais.	28
5.2. Protocolos Experimentais.....	28
5.3. Composição das Dietas	30
5.4. Protocolos de Treinamento.....	33
5.4.1. Adaptação ao Treinamento	33
5.4.2. Teste de Máxima Capacidade de Exercício.....	34
5.4.3. Protocolo de Treinamento Contínuo de Moderada Intensidade (MICT)	34
5.5. Coleta dos Tecidos	35
5.6. Avaliação da Massa Corporal Total e Consumo Alimentar.....	36
5.7. Análise Histológica	36
5.8. Extração e Quantificação de Proteínas Teciduais	37
5.9. Análise da Concentração das Citocinas Teciduais	38
5.10. Análise Estatística	39
6. RESULTADOS	40
6.1 Caracterização Temporal da Massa Corporal e Consumo Alimentar	40
6.2. Massa dos Tecidos e Índice de Adiposidade.....	41
6.3. Morfologia do Tecido Adiposo Mesentérico	43

6.4.	Capacidade Máxima de Exercício (MEC)	45
6.5.	Citocinas Teciduais	46
7.	DISCUSSÃO.....	49
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
9.	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS	70
1)	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	70
2)	SUBMISSÃO DO ARTIGO	71

1. INTRODUÇÃO

Como resultado de um estilo de vida sedentário associado ao consumo de uma dieta obesogênica, o número de indivíduos obesos tem aumentado em todo o mundo (BRAY *et al.*, 2016; GOPALAN *et al.*, 2021). O aumento no acúmulo de gordura, principalmente em compartimentos viscerais (UNANUMO *et al.*, 2018) e em locais ectópicos como o fígado e o músculo esquelético (DI MEO *et al.*, 2017), está diretamente relacionado ao aumento na incidência de diversas doenças crônicas como: dislipidemias; hiperinsulinemia; diabetes mellitus tipo II; doenças cardiovasculares (WANG *et al.*, 2017; MARTINEZ-HUENCHULLAN *et al.*, 2019); esteatose hepática não alcoólica; e alguns tipos de câncer (POLYZOS *et al.*, 2017; ENGIN, 2017). Além disso, diversos estudos têm demonstrado que o remodelamento do tecido adiposo através da expansão dos adipócitos por meio de hipertrofia (aumento no tamanho das células adiposas), está associado a processos como a inflamação sistêmica (JAIS; BRÜNING, 2017), morte dos adipócitos, hipóxia local, e aumento no influxo de ácidos graxos livres para corrente sanguínea (KARCZEWSKI *et al.*, 2018).

Mediante a todas as repercussões da obesidade, a liberação de citocinas por células do sistema imune, tecido adiposo, muscular e endotelial, é considerada como um importante biomarcador dos processos inflamatórios (LODISH *et al.*, 2014; PESSENTHEINER *et al.*, 2020). Essas citocinas podem apresentar ações pleiotrópicas e/ou complementares, possuindo funções pró-inflamatórias, anti-inflamatórias ou moduladoras da inflamação (PETERSEN; PEDERSEN, 2005; ANTUNES *et al.*, 2018). O fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a Interleucina-1 β (IL-1 β), a Interleucina-6 (IL-6), e a Interleucina-10 (IL-10), têm recebido vasta atenção da literatura, principalmente devido as suas ações modulatórias nos processos inflamatórios frente a tratamentos como o exercício físico e intervenções dietéticas (ANTUNES *et al.*, 2018; Haß; HERPICH; NORMAN, 2019).

Considerada como uma importante ferramenta não-farmacológica, o exercício físico é capaz de promover adaptações positivas na modulação dos processos inflamatórios, em humanos e animais obesos (SUSUKI, 2019). Esta estratégia é eficaz em controlar o ganho de peso, diminuir a massa de gordura, reduzir o tamanho e o conteúdo lipídico dos adipócitos, bem como levar a uma redução na expressão de adipocinas (citocinas produzidas pelo tecido adiposo), minimizando os efeitos da lipotoxicidade (processo de redução/prejuízo na função de

órgãos não-adiposos, em resposta ao aumento na concentração de ácidos graxos na corrente sanguínea advindos do processo de lipólise) (WEDDEL-NEERGAARD *et al.*, 2019; BATATINHA *et al.*, 2019).

Adicionalmente, o exercício físico também pode modular a liberação de miocinas (citocinas produzidas e secretadas pelo músculo esquelético), que são peptídeos com funções anti-inflamatórias (PEDERSEN *et al.*, 2007; LEAL *et al.*, 2018). Desde o início do século, estudos têm demonstrado que durante exercício de longa duração, foram observados aumentos nos níveis circulantes de IL-6 (nesse contexto, independente de TNF- α , possuindo uma função anti-inflamatória) (STEENBERG *et al.*, 2000; STEENBERG *et al.*, 2003). Além disso, durante o exercício físico o músculo esquelético expressa e secreta miocinas como a Interleucina-8 (IL-8), o receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra), a Interleucina-15 (IL-15), a IL-10 e a Irisina (WEDDEL-NEERGAARD *et al.*, 2019; LOMBARDI *et al.*, 2019; GONZALEZ-GIL; ELIZONDO-MONTEMAYOR, 2020).

Uma das modalidades de exercício físico mais utilizada com o objetivo de reduzir os efeitos nocivos da obesidade, é o treinamento contínuo de moderada intensidade (MICT, do inglês “*moderate-intensity continuous training*”), caracterizado por intensidades entre 50-75% da frequência cardíaca máxima ($FC_{m\acute{a}x}$), 65-70% do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2m\acute{a}x}$), ou 65-70% da velocidade máxima de corrida ($V_{m\acute{a}x}$) (WEWEGE *et al.*, 2017; KHALAFI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2017). O MICT tem se mostrado eficiente em modular o ganho de peso em animais obesos (WANG *et al.*, 2017), promover adaptações positivas na máxima capacidade de exercício (MEC, do inglês “*Maximal Exercise Capacity*”) (KHALAFI *et al.*, 2020), reduzir o tamanho dos adipócitos (KHALAFI *et al.*, 2020; LACERDA *et al.*, 2019), e promover alterações efetivas no perfil inflamatório do tecido adiposo (LIRA *et al.*, 2012) e músculo esquelético (GOPALAN *et al.*, 2020) através da diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento nas citocinas anti-inflamatórias.

Além do exercício físico, outras estratégias não farmacológicas também utilizadas para reduzir os efeitos prejudiciais causados pela obesidade (e doenças metabólicas associadas a ela) são as intervenções dietéticas (LONGO; PANDA, 2016). Essas abordagens podem ocorrer por meio de alterações no tempo de oferta do alimento (AOUICHAT *et al.*, 2020), reduções na quantidade de alimento ofertado (LOWE *et al.*, 2020) ou mediante a modulações nos macronutrientes presentes nestas dietas (VANGOITSENHOVEN *et al.*, 2018).

As relações entre a obesidade e o desenvolvimento do quadro inflamatório, e a maneira como as estratégias de intervenções (e.g., intervenção dietética e exercício físico) podem reduzir esses efeitos nocivos, serão discutidos na sessão a seguir.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Obesidade

A obesidade é uma doença crônica de origem multifatorial, advinda de alterações genéticas, psicológicas, ambientais, sociais e fisiológicas (GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY, 2017), no entanto, alterações em padrões comportamentais como o consumo de alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcares simples, combinado a um estilo de vida sedentário ou com baixos níveis na prática de exercícios físicos, têm se configurado como importantes fatores desencadeadores da obesidade (BRAY *et al.*, 2016, 2018; GOPALAN *et al.*, 2021). Além disso, ao olharmos para dados epidemiológicos, a nível global, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 1,9 bilhões de indivíduos apresentam sobrepeso, caracterizado por um Índice de Massa Corporal (IMC) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$, e 650 milhões de indivíduos apresentam algum grau de obesidade (IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) (OMS, 2016).

Essas alterações comportamentais (e. g., consumo de dietas obesogênicas e sedentarismo), levam a um balanço energético positivo, bem como uma diminuição no gasto energético de repouso, que podem desencadear um aumento anormal e excessivo de gordura nos depósitos de tecido adiposo (DEPRÉS *et al.*, 2008; UNANUMO *et al.*, 2018), ou em locais ectópicos (e.g. músculo esquelético e fígado) (SNEL *et al.*, 2012; DI MEO *et al.*, 2017), que elevarão, consideravelmente, o risco de produzir consequências negativas a saúde (AFSHIN *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017), como dislipidemias, hiperinsulinemia, diabetes *mellitus* tipo II, doenças cardiovasculares (WANG *et al.*, 2017; MARTINEZ-HUENCHULLAN *et al.*, 2019), esteatose hepática não alcoólica, e alguns tipos de câncer (MILIĆ; LULIĆ; ŠTIMA, 2014; POLYZOS *et al.*, 2017; ENGIN, 2017).

Como descrito anteriormente, a ingestão elevada de calorias e uma diminuição no gasto energético, levam a um desequilíbrio no balanço energético, e esse processo – em períodos prolongados - promove um desbalanço entre a lipólise (quebra do triacilglicerol em moléculas de ácidos graxos e glicerol) e a lipogênese (síntese de ácidos graxos e triglicérides, que serão armazenados no tecido adiposo), fazendo com que a taxa lipogênica seja maior que a taxa lipolítica (KAHN; WANG; LEE, 2019). E frente a esses processos, a expansão do tecido adiposo acontece, por meio da hipertrofia (expansão dos adipócitos existentes) ou hiperplasia (formação de novos adipócitos) (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; FURINO, 2021).

A expansão e remodelamento do tecido adiposo por processos hipertróficos, aumentam a predisposição na instalação de um estado inflamatório de baixo grau (discutidos a seguir), além de acarretar em outras alterações estruturais e funcionais que favorecerão o desenvolvimento da resistência à insulina, deposição de gordura em locais ectópicos, e por consequência a síndrome metabólica (JAIS; BRÜNING, 2017; CHOUGHANI; KAJIMURA, 2019; KAHN; WANG; LEE, 2019).

2.2. Obesidade e inflamação

O tecido adiposo, além de possuir importante função como reserva energética, se configura como um órgão metabolicamente ativo e com funções endócrinas, que regulam o gasto energético e a homeostase da glicose através da produção de adipocinas (TRAYHURN *et al.*, 2007; SPERETTA *et al.*, 2012; BATATINHA *et al.*, 2018). Além disso, ele é composto por adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e populações de células do sistema imune, o que confere a este tecido uma importante função imuno-modulatória (CINTI, 2018; BATATINHA *et al.*, 2018).

A inflamação sistêmica de baixo grau em indivíduos obesos, se origina no tecido adiposo visceral, causado pela hipertrofia dos adipócitos e sinais de estresse celular (GOMARASCA; BANFI; LOMBARDI, 2019). Esses sinais desregulam a produção de adipocinas, citocinas e quimiocinas (FUENTES *et al.*, 2013). A expansão do tecido adiposo por hipertrofia pode levar a dois processos responsáveis pelas respostas inflamatórias durante a obesidade: (a) uma hipóxia local, devido a uma diminuição na perfusão sanguínea em decorrência de um colapso dos vasos sanguíneos responsáveis pela oferta de oxigênio à essas células; e (b) aumento no estresse mecânico entre os adipócitos e a matriz extracelular (RIUS *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2011; FURINO, 2021)

Embora a expansão do tecido adiposo por processos hipertróficos tenha sido apontada como o principal fator desencadeador, diversos outros mecanismos têm sido sugeridos como possíveis “gatilhos” (do inglês “*triggering inflammatory processes*”) para o desenvolvimento da inflamação associada a obesidade, e estes, podem ou não estar associados entre si (KARCZEWSKI *et al.*, 2019).

A obesidade está associada a um aumento na permeabilidade das paredes do intestino, o que resulta em um aumento nos níveis circulantes de lipopolissacarídeos (LPS) produzidos

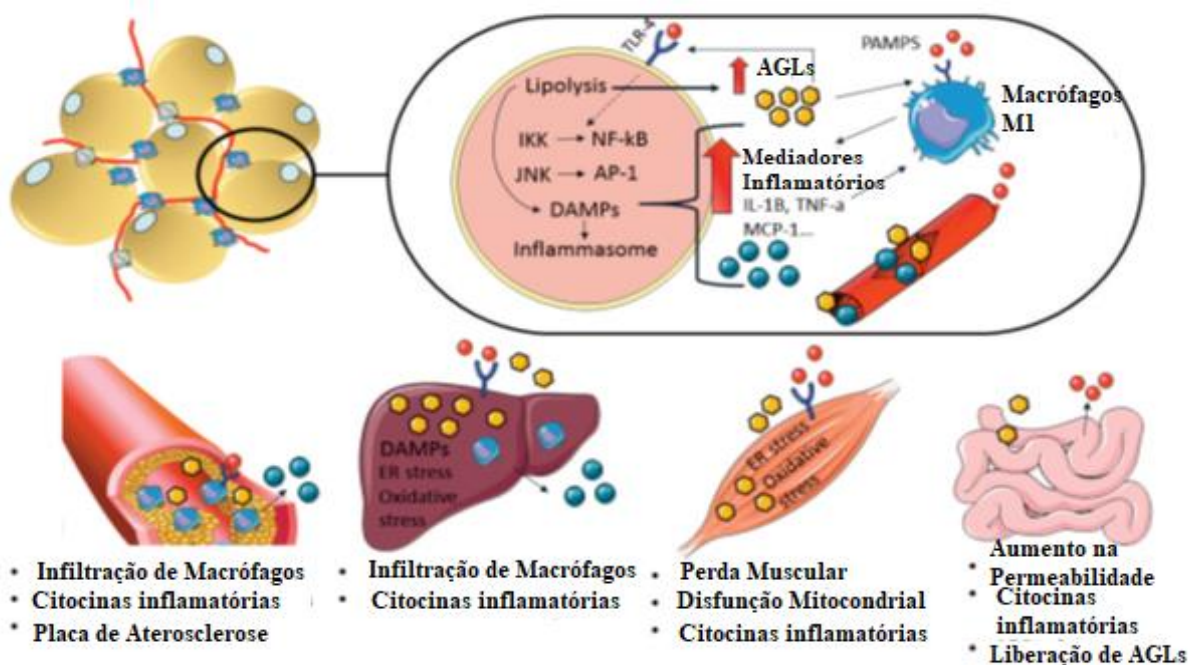
por bactérias Gram-positivas (CANI *et al.*, 2008; DAMMS-MACHADO *et al.*, 2017). Esses LPS iniciam uma cascata de sinalizações via receptores *toll-like 4* (TRL4) nos adipócitos, que levam a ativação de vias metabólicas que são responsáveis pela transcrição de genes inflamatórios, criando ou amplificando as respostas inflamatórias neste tecido (JAYASHREE *et al.*, 2014). Além disso, esses LPS excedentes na corrente sanguínea podem vir a se acumular em depósitos ectópicos como o músculo esquelético e fígado (DI MEO *et al.*, 2017), que por sua vez, levam a um aumento na infiltração de células do sistema imune que produzirão efeitos inflamatórios nestes tecidos, além de aumentar a resistência local à insulina (BATATINHA *et al.*, 2018; GOMARASCA; BANFI; LOMBARDI, 2020).

Além do extravasamento de LPS para a corrente sanguínea, os metabólitos e componentes advindos do consumo de uma dieta obesogênica também podem desencadear processos inflamatórios (KARCZEWSKI *et al.*, 2018). Em particular, os ácidos graxos livres (AGLs), diacilglicerol (DAG) e ceramidas, são creditados por possuírem potentes capacidades sinalizadoras (STERN; RUTKOWSKI; SCHERER, 2016; ERION; SHULMAN, 2010). Os AGLs promovem respostas inflamatórias devido à sua alta afinidade aos TRL4 e aos receptores *toll-like 2* (TRL2), que levarão a ativação da NF- κ B (fator nuclear kappa B) (SAAD *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2014), e essa por sua vez, aumentará a produção de diversos mediadores inflamatórios como a IL-6 e MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1) pelos adipócitos, levando a uma infiltração de macrófagos pró-inflamatórios (M1) (BATATINHA *et al.*, 2018).

Adicionalmente, a morte dos adipócitos também tem sido apontada como importante fator auxiliador no desenvolvimento do quadro inflamatório, pois adipócitos mortos ou que estão entrando em processos apoptóticos contribuem para o aumento no número de macrófagos M1 observados no tecido adiposo (FISCHER-POSOVSKY *et al.*, 2011; KARCZESKI *et al.*, 2018).

Neste sentido, em linhas gerais, o desenvolvimento da inflamação ocorre de maneira multifatorial, podendo levar a uma ou mais alterações metabólicas no próprio tecido adiposo, ou em órgãos não adiposos como o músculo esquelético, fígado e intestino, como demonstrado na figura 1.

Figura 1 - Visão geral sobre como a obesidade induz a inflamação local e sistêmica e suas manifestações no sangue, fígado, músculo esquelético e intestino.



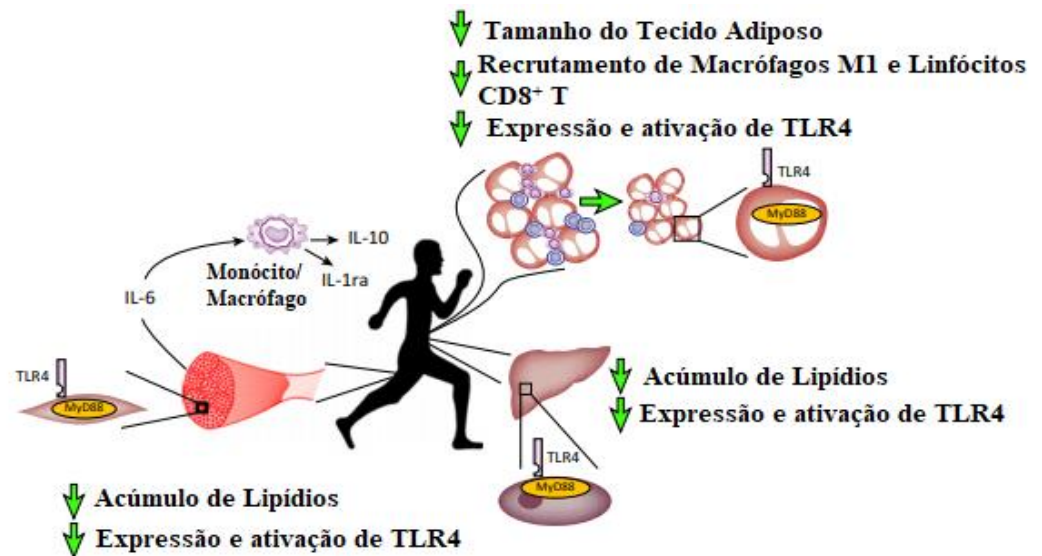
DAMPs: padrões moleculares associados ao perigo; PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; AGLs: ácidos graxos livres; IKK: Inibidor da subunidade beta do fator nuclear kappa- beta ; JNK: c-Jun N-terminal quinase; TLR4: receptor *toll-like* 4; AP-1: ativador de proteína-1; NF-κB: fator nuclear kappa B; LPS: lipopolissacarídeos. Fonte: Adaptado de Batatinha *et al.* (2018).

2.3. Estratégias de controle da obesidade e inflamação

Dentre os mais variados instrumentos de controle da obesidade e seus efeitos prejudiciais ao metabolismo, o exercício físico e a intervenção dietética têm recebido importante atenção da literatura, principalmente devido a ações como: regulação da massa corporal (MILLER *et al.*, 2017; VANGOITSENHOVEN *et al.*, 2018; VERHEGGEN *et al.*, 2016; FURINO *et al.*, 2021); diminuição da gordura abdominal e do tecido adiposo visceral (VERHEGGEN *et al.*, 2016; FURINO *et al.*, 2021); e modulações positivas no perfil inflamatório em indivíduos obesos (GLEESON *et al.*, 2011; LANCASTER; FEBBRAIO; 2014).

Além de promover adaptações cardiovasculares, musculares e hemodinâmicas (PEDERSEN; SALTIN, 2015), o exercício físico promove uma proteção sistêmica contra a inflamação (GLEESON *et al.*, 2011). Essa característica protetora do exercício, se dá através da produção de miocinas pelas fibras do músculo esquelético que serão capazes de promover reduções na produção e expressão de citocinas pró-inflamatórias (e. g. IL-6 e TNF- α) advindas o tecido adiposo e células infiltradas no mesmo, além de aumentar a mobilização e oxidação de gordura (o que levará a uma diminuição no tamanho dos adipócitos), diminuindo também o acúmulo lipídico e a expressão e ativação de TLR4 em diversos tecidos como músculo esquelético, fígado e tecido adiposo (LANCASTER; FEBBRAIO, 2014; GOPALAN *et al.*, 2021; SHIRVANI *et al.*, 2021) (Figura 2).

Figura 2 - O efeito anti-inflamatório do exercício físico no contexto da obesidade



TLR4: Receptores Toll-like 4; MyD88: Fator de diferenciação mielóide 88; IL-10: Interleucina 10; IL-6: Interleucina 6; IL-1ra: Receptor Antagonista de Interleucina 1. Fonte: Adaptado de Lancaster e Febbraio (2014).

Além disso, as intervenções dietéticas, como descrito anteriormente, que podem ocorrer por meio de alterações temporais na oferta do alimento (e.g., restrição alimentar temporal de 8 a 12 horas) (AOUICHAT *et al.*, 2020), reduções na quantidade de alimento ofertado (e.g., restrição calórica vs. *ad libitum*) (LOWE *et al.*, 2020), ou através de modulações nos macronutrientes presentes nestas dietas (e.g., alterações na quantidade de gordura presente

nas dietas) (VANGOITSENHOVEN *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2021; FURINO *et al.*, 2021), também têm se firmado como importantes estratégias para a redução da obesidade e seus efeitos metabólicos adversos. Estas intervenções têm como objetivo criar um balanço energético negativo promovendo uma reprogramação dos substratos energéticos, fazendo com que as células utilizem a gordura para preservar suas reações orgânicas (HOEVENAARS *et al.*, 2014).

Diante do descrito acima, ambas as intervenções – de maneira independente - promovem adaptações positivas frente a modelos experimentais de obesidade, logo, é possível especular que a combinação das duas intervenções possa gerar adaptações em maiores magnitudes, semelhante ao verificado por Verheggen *et al.* (2016), que demonstrou que a combinação da intervenção dietética e o exercício físico promoveu maiores adaptações na composição corporal (e.g., diminuição da massa corporal e massa gorda, além da manutenção da massa livre de gordura), quando comparado a intervenção dietética de maneira independente.

Mediante ao demonstrado até o momento, o desenvolvimento de modelos experimentais que tornem possível uma translação metodológica com aplicabilidade em humanos, é cada vez mais requisitado e desafiador. Furino *et al.* (2021) verificaram que ambas as intervenções promoveram adaptações na composição corporal e adaptações metabólicas positivas em animais previamente alimentados com dieta hiperlipídica palatável, entretanto, em relação a utilização das duas intervenções (MICT [três sessões semanais] e intervenção dietética baseada em modulação dos componentes presentes na dieta), combinadas ou não, frente a alterações inflamatórias no músculo esquelético e tecido adiposo visceral, pouco se sabe até o momento.

3. HIPÓTESES

A utilização da dieta hiperlipídica palatável (HFD; do inglês “*high fat diet*”) será capaz de promover o fenótipo obeso através de aumento na massa corporal dos animais e adiposidade visceral, bem como promover aumentos na concentração de marcadores inflamatórios no tecido adiposo visceral mesentérico e músculo gastrocnêmio.

O treinamento contínuo de moderada intensidade (MICT) e intervenção dietética de maneira independente serão eficientes em reduzir o ganho de massa corporal e demais parâmetros decorrentes do consumo de dieta hiperlipídica e sedentarismo, bem como, promover adaptações na concentração de marcadores inflamatórios no tecido adiposo visceral mesentérico e músculo esquelético, além de promover adaptações na Máxima Capacidade de Exercício (MEC) e parâmetros de adiposidade.

Além disso, a combinação de ambas intervenções será capaz de promover adaptações em maiores magnitudes na massa corporal e demais parâmetros de adiposidade, concentração de marcadores inflamatórios teciduais e MEC, quando comparado aos protocolos realizados de maneira independente.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

O presente estudo pretende determinar a modulação de marcadores inflamatórios no tecido adiposo visceral mesentérico e músculo esquelético, massa corporal e adiposidade frente à intervenção dietética e/ou MICT em ratos *Wistar* com obesidade exógena.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar as adaptações frente a dieta hiperlipídica no desenvolvimento do fenótipo obeso, através de análises da massa corporal, peso relativo dos depósitos de gordura, e morfometria dos adipócitos mesentéricos;
- Avaliar os efeitos de 8 semanas MICT sobre massa corporal, adiposidade e as concentrações de IL-6, IL-10, TNF- α , e razão IL-10/TNF- α , no tecido adiposo visceral mesentérico e músculo esquelético gastrocnêmio;
- Avaliar os efeitos de 8 semanas de intervenção dietética sobre massa corporal, adiposidade e as concentrações de IL-6, IL-10, TNF- α , e razão IL-10/TNF- α , no tecido adiposo visceral mesentérico e músculo esquelético gastrocnêmio;
- Quantificar a variação na Máxima Capacidade de Exercício frente a dieta hiperlipídica palatável, intervenção dietética e MICT;
- Avaliar o volume de tecido adiposo visceral: retroperitoneal, mesentérico e epididimal e músculo esquelético, frente aos tratamentos;
- Avaliar as adaptações na morfometria dos adipócitos no tecido adiposo mesentérico, frente aos protocolos de treinamento e/ou intervenção dietética.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Considerações Éticas e Animais.

Este estudo foi realizado em modelo animal e antes do início do experimento, os objetivos e intervenções a serem realizadas durante a pesquisa foram submetidas a análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O projeto foi avaliado e aprovado sob o protocolo nº 7631210617 (ANEXO I).

Foram utilizados 20 ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus* var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*) com 40-45 dias de idade (\cong 300g), obtidos do Biotério Central da UFSCar. O modelo *Wistar* foi utilizado em razão do aumento expressivo da massa e adiposidade corporal e por apresentar alterações em parâmetros metabólicos associados a síndrome metabólica e desenvolvimento do fenótipo obeso quando alimentados com dieta hiperlipídica (ESTADELLA *et al.*, 2004; DUARTE *et al.*, 2008; DE CASTRO *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2021; FURINO *et al.*, 2021). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados ao Exercício Físico (LABNUTRI) presente no Departamento de Educação Física e Motricidade Humana (DEFMH), e foram alojados em caixas opacas de polipropileno forradas com maravalha e tampas de aço inoxidável, com um número de 4-5 animais por caixa. As condições ambientais foram mantidas controladas durante todo o período experimental: temperatura ambiente 22-24°C controlada por ar condicionado; umidade relativa entre 50-60% controlada por ar condicionado; ciclo claro-escuro (12/12h), com a luz sendo acesa às 18h e desligada às 06h. Aos animais, foram ofertados ração e água *ad libitum* ao longo de todo o estudo.

5.2. Protocolos Experimentais

O desenho experimental do presente estudo foi composto por dois períodos de oito semanas cada, sendo o primeiro um período de indução à obesidade e o segundo um período de intervenção dietética e/ou treinamento contínuo de moderada intensidade (MICT). O delineamento experimental será descrito nesta sessão e ilustrado na Figura 3.

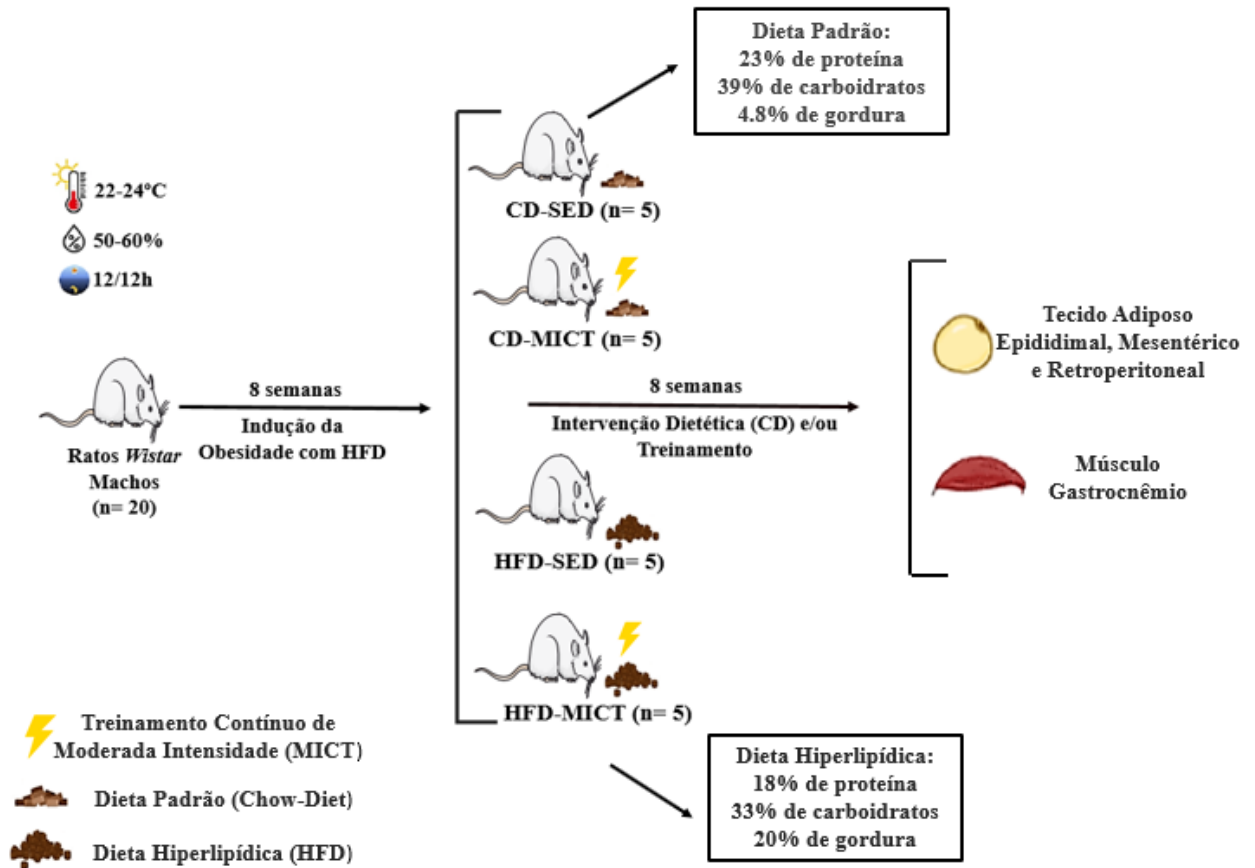
Ao completarem 107 dias de idade, todos os animais foram submetidos a um protocolo de indução à obesidade através do consumo de HFD por um período de oito semanas. Estudos prévios do nosso grupo já demonstraram que a utilização da HFD por oito semanas foi eficaz

em promover o fenótipo obeso em ratos *Wistar*, através de alterações na massa corporal total, percentual de gordura, hipertrofia de adipócitos e peso relativo dos depósitos de gordura visceral mesentérico, retroperitoneal e epididimal (COSTA *et al.*, 2021; FURINO *et al.*, 2021).

Após o período de oito semanas de indução à obesidade, os 20 animais foram subdivididos em 4 grupos: (A) Grupo obeso controle (HFD-SED, n = 5); (B) Grupo obeso que recebeu o treinamento com MICT (HFD-MICT, n = 5); (C) Grupo intervenção dietética através do retorno no consumo de dieta padrão (CD) (CD-SED, n = 5); e (D) Grupo intervenção dietética através do retorno no consumo de CD e que recebeu a intervenção com o MICT (CD-MICT, n = 5). Este período experimental teve uma duração de oito semanas e todos os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina, 48 horas após a última sessão de treinamento.

Os animais realocados aos grupos sedentários (HFD-SED e CD-SED) permaneceram em suas caixas durante todo o período experimental sem nenhum tipo de exercício físico, enquanto os animais designados ao grupo treinamento (HFD-MICT e CD-MICT) realizaram oito semanas de corrida em esteira, sendo iniciado ao mesmo tempo em ambos os grupos.

Figura 3 - Desenho Experimental.



CD-SED: Grupo intervenção dietética através do retorno no consumo de CD sem intervenção com o treinamento; CD-MICT: Grupo intervenção dietética através do retorno no consumo de CD e treinamento contínuo de moderada intensidade; HFD-SED: Grupo que continuou recebendo a dieta hiperlipídica palatável sem intervenção com o treinamento; HFD-MICT: Grupo que recebeu dieta hiperlipídica palatável e recebeu a intervenção com o treinamento contínuo de moderada intensidade. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

5.3. Composição das Dietas

Foram ofertadas aos grupos experimentais dois tipos de dieta: (I) dieta padrão para roedores (CD [do inglês *Chow-Diet*]) da marca Agromix® (Jaboticabal, SP, Brasil) em formato de pellets, contendo ~23g de proteína, ~39g de carboidratos, ~4.8g de gordura, ~5g de fibras, e ~28g de outros nutrientes por 100g de dieta (tabela 1); e (II) dieta hiperlipídica palatável (HFD [do inglês *High-Fat Diet*]) contendo ~18g de proteína, ~33g de carboidratos, ~20g de gordura, ~3g de fibras, e ~26g de outros nutrientes por 100g de dieta (tabela 1).

Para a produção da HFD, os ingredientes eram distribuídos em uma proporção de 3:2:2:1 (ESTADELLA *et al.*, 2004). A cada 100g foram utilizados: 37,5g de ração padrão para roedores; 25g de amendoim torrado; 25g de chocolate ao leite; e 12,5g de biscoitos doces (maisena). Os ingredientes eram pesados em balança de precisão (Marte Científica AS 2000C, São Paulo, SP, Brasil), e posteriormente eram triturados, homogeneizados e modelados em forma de pellets. Essa dieta foi padronizada por Estadella *et al.* (2004) e desde então, tem sido utilizada por diversos estudos como uma eficiente ferramenta na indução da obesidade em ratos *Wistar* (DUARTE *et al.*, 2008; DE CASTRO *et al.*, 2017; FURINO *et al.*, 2021). A composição centesimal das dietas foi previamente estimada por bromatologia, tendo a HFD uma composição de 20% de gordura versus 4.8% da CD (IKA 5000, CBO, Valinhos, SP, Brasil) (COSTA *et al.*, 2021) (tabela 1).

Em resumo, a intervenção dietética realizada neste estudo foi baseada em um retorno para o consumo de dieta padrão para roedores (após 8 semanas de HFD). Não foram realizadas restrições calóricas baseadas em mudanças na oferta de alimento em quantidade ou tempo, apenas modulações nos macronutrientes presentes nas mesmas.

Tabela 1- Composição Nutricional das Dietas

	HFD (Dieta Hiperlipídica Palatável)	CD (Dieta Padrão)
Valor energético (cal/g)	4,665	3,854
Umidade e voláteis (%)	14.72	12.47
Gordura (%)	20	4.80
Carboidratos (%)	32.90	39.23
Proteína (%)	18.12	22.81
Fibras (%)	2.97	5.82
Matéria mineral (%)	3.29	6.87
Potássio (%)	0.60	1.26
Cálcio (%)	0.52	1.2*
Sódio (%)	0.14	0.22
Vitamina A (UI/kg)	1,149.00	25,000.00*
Vitamina D3 (UI/kg)	836.90	4,000.00*
Vitamina E (mg/kg)	229.94	80.00*
Maltose (%)	Não detectado	Não detectado
Xilose livre (%)	Não detectado	Não detectado
Glicose livre (%)	0.12	Não detectado
Frutose livre (%)	0.17	Não detectado
Sacarose (%)	12.49	1.65
Lactose (%)	1.88	Não detectado
Galactose livre (%)	Não detectado	Não detectado
Rafinose (%)	0.30	0.74

Os valores não detectados estão abaixo do limiar de quantificação de 100mg/kg (0.1%).

*Informação nutricional obtida do fabricante. Fonte: Adaptado de Costa *et al.* (2021).

5.4. Protocolos de Treinamento

5.4.1. Adaptação ao Treinamento

Com o objetivo de minimizar o estresse causado pelo treinamento, bem como melhorar a mecânica de movimento e padrão de corrida, os animais foram submetidos à um protocolo de adaptação à corrida em esteira (KUNSTETTER *et al.*, 2018). Durante a oitava semana de indução à obesidade, todos os animais foram alocados em uma esteira ergométrica adaptada para ratos e realizaram um protocolo experimental adaptativo de 5 dias (FURINO *et al.*, 2021).

O protocolo consistia em uma progressão na duração e velocidade, sessão a sessão. Nos dias 1 e 2, os animais correram com uma velocidade de 6m/min durante 10 minutos, no terceiro e quarto dia, a velocidade progrediu para 8m/min e com duração de 12 minutos, e no quinto e último dia, a velocidade utilizada foi de 10m/min com 15 minutos de duração (Figura 4).

Durante este período de adaptação, foi realizada uma avaliação da responsividade destes animais ao treinamento de corrida em esteira, com o objetivo de selecionar quais animais seriam designados aos grupos que realizariam o MICT. Seguindo o modelo de avaliação propostas por Rachetti *et al.* (2013), os animais selecionados para o grupo MICT foram os que possuíram a maior média aritmética (em uma escala de 1 à 5), durante os 5 dias de adaptação (FURINO *et al.*, 2021). O modelo adaptado da medida de avaliação do desempenho dos animais durante o período de adaptação está descrito na tabela 2.

Tabela 2- Medida para avaliação do desempenho dos animais durante a adaptação

Classificação	Desempenho
1	Recusou-se a correr
2	Corredor abaixo da média – esporádico, para e vai, sentido errado
3	Corredor na média
4	Corredor acima da média – consistente, ocasionalmente caiu para trás na esteira
5	Bom corredor – permaneceu consistentemente na frente na esteira

Fonte: adaptado de Rachetti *et al.* (2013).

5.4.2. Teste de Máxima Capacidade de Exercício

Para determinação das adaptações geradas pelo MICT, bem como determinar a intensidade do treinamento, foram realizados testes de Máxima Capacidade de Exercício (MEC, do inglês “*Maximal Exercise Capacity*”). Esses testes ocorreram em três momentos durante as 16 semanas experimentais: (a) 48 horas após a finalização período de adaptação e com um intervalo de 48hrs antes do início dos protocolos de MICT; (b) na quarta semana de treinamento (para que a intensidade do treinamento fosse reajustada); e (c) 48 horas após a última sessão de treinamento.

Após um período de aquecimento com velocidade de 6m/min durante 5 minutos e sem nenhuma inclinação, foram sendo realizados incrementos de 2m/min de velocidade a cada 2 minutos, até a fadiga dos animais (BROOKS; WHITE, 2018; SOUZA *et al.*, 2018; FURINO *et al.*, 2021). Foi determinado como exaustão, a incapacidade de o animal em manter o padrão de corrida durante os incrementos de velocidade. A máxima velocidade atingida (em m/min.) foi determinada como 100% da MEC e utilizada para determinar a intensidade realizada durante as sessões de treinamento, bem como para verificar as adaptações geradas pelo treinamento de corrida em esteira. Durante todo o procedimento, nenhuma forma de choque foi utilizada como estímulo, sendo utilizada apenas a pressão manual na região distal da cauda do animal.

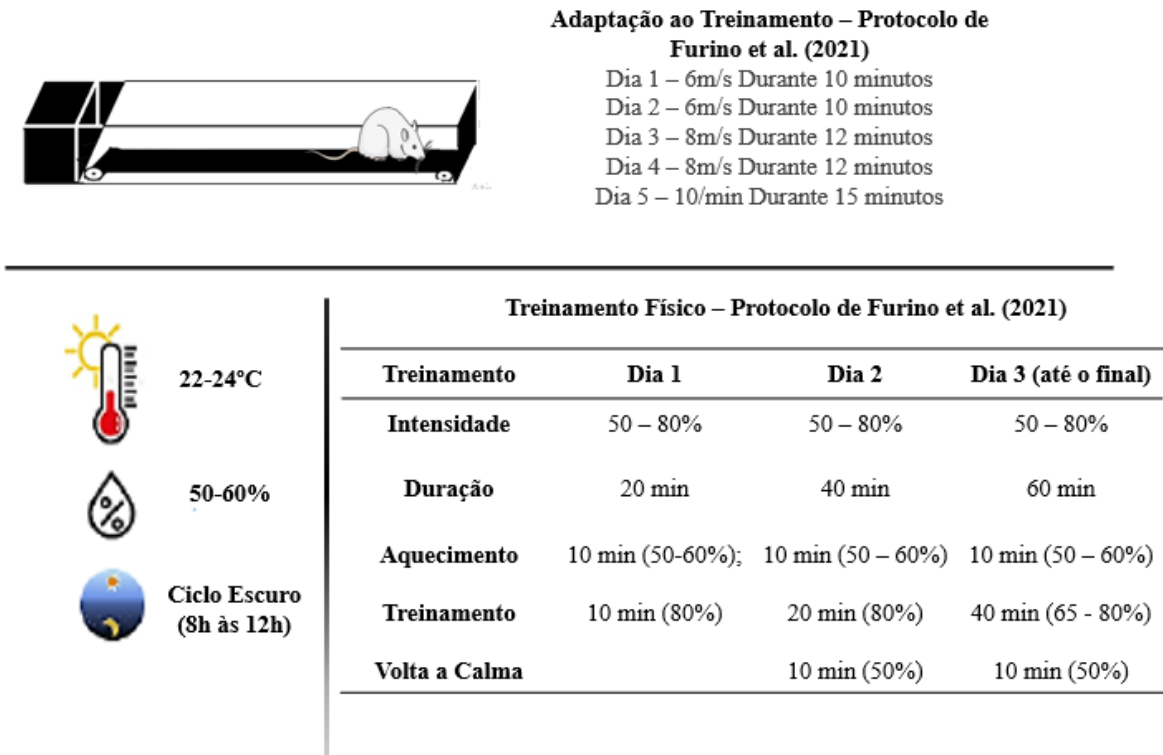
5.4.3. Protocolo de Treinamento Contínuo de Moderada Intensidade (MICT)

O protocolo de treinamento contínuo de moderada intensidade (MICT) foi realizado em uma esteira ergométrica adaptada para ratos que possuía seis pistas individuais separadas por baias acrílicas. O protocolo teve uma frequência de três sessões semanais e foi realizado durante oito semanas, sempre entre as 8-12h respeitando o ciclo claro/escuro dos animais. A duração de cada sessão era de aproximadamente 60 minutos, com uma intensidade de 65-80% da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) (FURINO *et al.*, 2021).

No primeiro dia de treinamento, o protocolo foi realizado durante 20 minutos, fracionados em 10 minutos de aquecimento (50-60% da $V_{m\acute{a}x}$) e 10 minutos com intensidade de 80% da $V_{m\acute{a}x}$. No segundo dia, a duração do protocolo foi de 40 minutos fracionados em: aquecimento (10 minutos à 50-60 da $V_{m\acute{a}x}$); parte principal (20 minutos à 80% da $V_{m\acute{a}x}$); e 10 minutos de volta à calma (50% da $V_{m\acute{a}x}$). Do terceiro ao último dia de treinamento, a sessão teve duração de 60 minutos, subdivida em três partes: 10 minutos de aquecimento (0-5 minutos:

50% da $V_{\text{máx}}$; e 5-10 minutos: 60% da $V_{\text{máx}}$; 40 minutos de parte principal (65-80% da $V_{\text{máx}}$); e 10 minutos de volta à calma (50% da $V_{\text{máx}}$) (FURINO *et al.*, 2021). Os protocolos de adaptação ao treinamento e MICT estão ilustrados na figura 4.

Figura 4 - Protocolo de Adaptação e Treinamento dos Animais.



min: minutos; m/min: metros/minutos. Fonte: elaborada pelo próprio Autor

5.5. Coleta dos Tecidos

Os tecidos adiposos epididimal (eWAT [do inglês *Epididymal White Adipose Tissue*]), retroperitoneal (rWAT [do inglês *Retroperitoneal White Adipose Tissue*]), mesentérico (mWAT [do inglês *Mesenteric White Adipose Tissue*]), e o músculo gastrocnêmio (GAST) foram dissecados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente transferidos e armazenados a -80°C. Além disso, uma pequena porção de mWAT foi fixado em formalina 10% para realização das análises histológicas. Os valores descritos para a massa dos tecidos foram relativizados em relação a massa corporal total dos animais pela fórmula:

Massa relativa dos tecidos (g/100g) = Massa absoluta dos tecidos x 100/ Massa Corporal

5.6. Avaliação da Massa Corporal Total e Consumo Alimentar

A Massa Corporal Total (g) de cada animal foi avaliada semanalmente (reportados em semana 0, 8 e 16) e o consumo alimentar a cada 2-3 dias (reportados em média total), sempre entre 8 e 12 horas, durante todo o período experimental. As dietas foram ofertadas três vezes por semana e o consumo alimentar diário foi calculado (g/dia) pela fórmula: Consumo Alimentar (g/dia) = Ração Ofertada – Sobra da Ração Ofertada

E a ingestão calórica diária (kcal/dia), foi calculada como: Ingestão Calórica Diária = Consumo Alimentar Diário (g/dia) x Energia Total da Dieta Alimentar (kcal/g). No qual, a HFD apresentava um valor energético de 4.665 kcal/g e a CD apresentava um valor de 3.854 kcal/g.

5.7. Análise Histológica

Um pequeno fragmento do mWAT foi alojado dentro de cassetes histológicos e fixado em formalina tamponada 10% por 48 horas. Após a fixação, os tecidos foram transferidos para um recipiente contendo álcool 70% até a realização das análises histológicas.

Para realização da histologia, os tecidos passaram por um processo de desidratação em banhos de álcoois (90% e 100%) por períodos de 1 hora cada, posteriormente, foi realizada uma troca de recipiente e um armazenamento *overnight* em álcool absoluto (100%) e no dia seguinte, foram realizadas mais 2 trocas de 1 hora cada em álcool absoluto. Após o processo de desidratação, os tecidos passaram pelo processo de diafinização em 3 banhos de 1 hora cada em 50% Xilol e posteriormente foram impregnados em parafina 58-62°C por 1 hora e depois a 60°C *overnight*. No dia seguinte os tecidos foram impregnados por mais 1 hora em parafina 58-62%, e por fim, foram incluídos em parafina histológica (Merck Milipore, São Paulo, SP, Brasil). Após inclusos em parafina, os fragmentos foram seccionados em 5µm de espessura em micrótomo rotativo e estendidos sobre banho maria em temperatura entre 40-42°C durante 1 minuto para aumentar a aderência sobre as lâminas.

Após esses procedimentos, as lâminas contendo 2 fragmentos de tecido, permaneceram em estufa por 24 horas em temperatura de 37°C para completa fixação sobre a lâmina e posteriormente passaram por processo de: desparafinização em xilol; hidratação em

banhos crescentes de álcoois; reidratação em água destilada; e por fim, foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Após esse processo, os tecidos foram desidratados em álcool absoluto e clarificados em xilol até a montagem permanente em resina Permout (Fischer Chemical™).

As lâminas coradas com HE foram scaneadas (3D Histech Pannoramic Desk BF) e digitalizadas utilizando o software Pannoramic Viewer. Neste estudo, digitalizamos 5 imagens para cada animal na objetiva de 20x e a área de 100 adipócitos (μm^2) foram analisadas através do software ImageJ Fiji ([v 2.0.0] (National Institutes of Health, USA) e seu respectivo *plugin* Adiposoft (v. 1.15) (GALARRAGA *et al.*, 2012; PARLEE *et al.*, 2014).

5.8. Extração e Quantificação de Proteínas Teciduais

Em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) da UFSCar, os protocolos de extração e quantificação de proteínas teciduais foram realizados. Amostras de mWAT (~200mg) e GAST (~100mg) foram homogeneizadas, respectivamente, em 600 μl e 500 μl de um tampão de extração proteica contendo: SDS 0,1% (p/v); Triton 1% (v/v); Tris-HCl pH 7.8; 50nM; NaCl 150nM; EDTA 15nM; EGTA 5nM; e inibidores de protease Complete-Mini Roche® (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). As amostras de mWAT foram processadas em rápidas agitações com *beads* de cerâmica (2x30 segundos à 6m/s) e amostras de GAST (3x30 segundos à 4m/s) utilizando o equipamento FastPrep-24™ (MP Biomedicals, CA, USA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf® Centrifuge 5430/5430R, Alemanha) durante 10 minutos em 10.000 rotações por minuto (rpm) (mWAT) e durante 15 minutos em 13.000 rpm (GAST), ambos em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para microtubos estéreis e armazenados a -80°C para posteriores análises.

A quantificação proteica foi analisada através de um ensaio colorimétrico de proteínas à bases de ácido bicinonínico (BCA, Aro146-500), seguindo as especificações do fabricante (Boster Biological Tecknology, Pleasanton, CA, EUA). As amostras foram dispostas em microplacas de ELISA (NEST Biotechnology, Wuxi, Jiangsy, China) para leitura e análise pelo leitor de microplacas SpectraMax i3 (Software SoftMaxPro, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA, EUA). A quantificação proteica foi baseada na curva padrão em relação as concentrações de cada amostra e foram expressas em $\mu\text{g/ml}$.

5.9. Análise da Concentração das Citocinas Teciduais

Em parceria com o Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) da UFSCar, a análise das concentrações das citocinas teciduais foi realizada. As quantificações foram determinadas pelo método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) nos tecidos homogeneizados (após todas as etapas descritas anteriormente – item 5.8.), seguindo as especificações de cada kit (BD Biosciences Pharmingen[®], San Diego, California, EUA). As citocinas analisadas foram: IL-6 (Cat. No. 550319); IL-10 (Cat. No. 555134) e TNF- α (Cat. No. 558535).

A técnica se baseou no modelo ELISA sanduíche, na qual microplacas de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas e permaneceram overnight. Posteriormente, as microplacas foram lavadas 3 vezes com 300 μ l/poço de solução salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7,2-Tween-20 0,05% (PMS-Tw) e incubadas com uma solução bloqueadora contendo albumina (PMS pH 7,2 + 4%) por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, após mais um ciclo de lavagens, as amostras foram adicionadas em duplicatas (25-50 μ l por poço) e efetuadas curvas padrão de citocinas recombinantes. As microplacas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas e, em seguida, uma nova lavagem foi realizada. Após esta etapa, foram adicionados os anticorpos anti-citocinas biotinilados ou conjugado com enzima peroxidase e mantidos por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Após 5 ciclos de lavagens com PBS, foi adicionado 100 μ l de solução reveladora contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. A reação foi bloqueada com 50 μ l de ácido sulfúrico 1 molar e a leitura realizada no espectrofotômetro 450nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir da curva de concentração dos padrões e as concentrações finais expressas em pg/ml.

As concentrações finais das amostras foram calculadas a partir da curva de concentração dos padrões de citocinas e das concentrações finais de proteína nos tecidos, e foram expressas em pg.mg⁻¹.

5.10. Análise Estatística

O tratamento estatístico e a confecção dos gráficos foram realizados através da utilização do software GraphPad Prism (8.0.2.) e os resultados estão apresentados como média e erro padrão da média (EPM) para todas as variáveis, e a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

O Teste *t* pareado foi utilizado para comparações pré e pós oito semanas de treinamento e/ou intervenção dietética, para a variável Máxima Capacidade de Exercício (MEC). O teste paramétrico de análise de variância para dois fatores (ANOVA Two-way) foi usado para identificar possíveis alterações induzidas pelos fatores intervenção dietética e/ou treinamento nas variáveis: massa corporal, peso relativo dos tecidos, consumo alimentar, índice de adiposidade, área de adipócitos e concentração de marcadores inflamatórios no tecido adiposo mesentérico e músculo gastrocnêmio. Quando o teste ANOVA Two-way detectava diferenças estatísticas, o teste de comparações múltiplas Post-hoc de Tukey foi utilizado. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0.05$).

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização Temporal da Massa Corporal e Consumo Alimentar

Como observado na tabela 3 (página 41), os valores da massa corporal no início do experimento (semana 0) não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$), demonstrando a homogeneidade da amostra durante o início dos procedimentos experimentais. Após as oito semanas de indução da obesidade com o consumo de HFD (semana 8), os animais tiveram uma média de ~35% de aumento na massa corporal total, sem diferenças entre os grupos ($p > 0,05$), demonstrando que a indução da obesidade ocorreu de maneira homogênea entre todos os animais.

Após a indução da obesidade, a próxima etapa teve por objetivo verificar os efeitos do MICT e/ou intervenção dietética sobre a massa corporal total (g) (semana 16). Os nossos achados demonstraram que o grupo HFD-SED apresentou valores superiores para a massa corporal total, e que após 8 semanas de intervenção dietética (CD-SED) ($p = 0,002$), e 8 semanas intervenção dietética combinada ao treinamento (CD-MICT) ($p = 0,003$) esses valores foram reduzidos (tabela 3).

Ao verificarmos os efeitos do treinamento e/ou intervenção dietética ($\Delta\%$) entre a semana 16 e a semana 8, também pudemos analisar a magnitude das intervenções – combinadas ou não – na modulação da massa corporal total dos animais. Após o tratamento estatístico, verificamos que o grupo que realizou a intervenção dietética (CD-SED) ($p = 0,02$) e ao grupo que recebeu as duas intervenções combinadas (CD-MICT) ($p = 0,002$) apresentaram valores reduzidos quando comparado aos animais controles obesos (HFD-SED) (tabela 3).

Tabela 3- Mudanças na massa corporal total (g)

Grupo	Massa Corporal Total (g)			
	Semana 0	Semana 8	Semana 16	Δ % (S ¹⁶ -S ⁸)
HFD-SED	400.2 ± 12.3	559.6 ± 28.3	641.7 ± 33.9	14.6 ± 1.6
HFD-MICT	392.8 ± 7.0	551.4 ± 20.1	588.6 ± 17.3	6.9 ± 1.9
CD-SED	359.6 ± 23.6	465.0 ± 40.6	470.4 ± 32.7 ^a	2.0 ± 3.2 ^a
CD-MICT	370.0 ± 21.1	488.0 ± 32.7	474.8 ± 34.9 ^a	-2.6 ± 3.6 ^a

HFD-SED, dieta hiperlipídica sedentário (n = 5); HFD-MICT, dieta hiperlipídica e MICT (n = 5); CD-SED, dieta padrão sedentário (n = 5); e CD-MICT, dieta padrão e MICT (n = 5). Dados apresentados em média ± EPM (p < 0.05). ^a Comparado a HFD-SED. HFD: dieta hiperlipídica; CD: dieta padrão; g: grama; S: semana. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Os valores médios do consumo alimentar diário (g/dia) e ingesta calórica (kcal/dia) estão apresentados na Tabela 4. Diante do consumo diário, os grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre si (p > 0,05), no entanto, ao avaliarmos os valores para a ingesta calórica - baseada no cálculo descrito no item 5.6 - o grupo CD-SED apresentou valores inferiores quando comparado ao grupo HFD-SED (p = 0,009).

Tabela 4- Consumo alimentar (g/dia) e Ingesta Calórica (kcal/dia)

Grupo	Consumo Diário (g/dia)	Ingesta Calórica (kcal/dia)
HFD-SED	23.33 ± 0.7	108.9 ± 3.4
HFD-MICT	21.38 ± 0.5	99.8 ± 2.7
CD-SED	23.30 ± 1.0	89.9 ± 4.1 ^a
CD-MICT	25.00 ± 1.3	96.4 ± 5.0

HFD-SED, dieta hiperlipídica sedentário (n = 5); HFD-MICT, dieta hiperlipídica e MICT (n = 5); CD-SED, dieta padrão sedentário (n = 5); e CD-MICT, dieta padrão e MICT (n = 5). Dados apresentados em média ± EPM (p < 0.05). ^a Comparado a HFD-SED. HFD: dieta hiperlipídica; CD: dieta padrão; g/dia: gramas por dia; kcal/dia: quilocalorias por dia. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

6.2. Massa dos Tecidos e Índice de Adiposidade

Após as oito semanas de treinamento e/ou intervenção dietética, os animais foram eutanasiados e a massa dos depósitos de tecido adiposo visceral (epididimal [eWAT], retroperitoneal [rWAT], e mesentérico [mWAT]) e músculo gastrocnêmio (GAST) foram pesados e relativizados pela massa corporal total dos animais (massa do tecido x 100/ massa corporal total).

Os valores para o peso relativo dos tecidos normalizados pela massa corporal total estão apresentados na tabela 5. Para o tecido adiposo mesentérico (mWAT), os grupos CD-SED

($p = 0,003$) e CD-MICT ($p = 0,0009$) apresentaram valores reduzidos quando comparado ao grupo HFD-SED. Para o tecido adiposo epididimal (eWAT), os mesmos grupos apresentaram reduções nos valores quando comparados ao grupo HFD-SED ($p = 0,01$ e $p = 0,0001$, respectivamente). Para o tecido adiposo retroperitoneal (rWAT), os grupos CD-SED ($p = 0,001$) e CD-MICT ($p = 0,003$) apresentaram valores reduzidos quando comparado ao grupo HFD-SED. Além disso, para o rWAT, o grupo CD-MICT apresentou valores inferiores quando comparado ao grupo HFD-MICT ($p = 0,04$). Nenhuma diferença foi verificada no peso relativo no músculo gastrocnêmio (GAST), entre os grupos ($p > 0,05$).

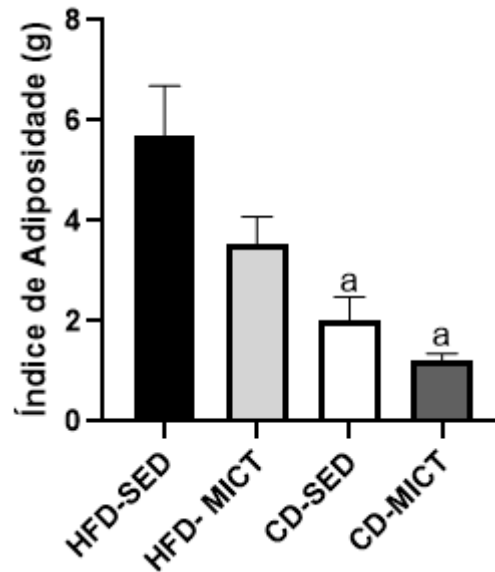
Tabela 5- Peso relativos dos tecidos (g/100 massa corporal total)

Peso Relativo dos Tecidos (g/100 massa corporal total)				
GRUPOS	mWAT	eWAT	rWAT	GAST
HFD-SED	1.99 ± 0.32	2.93 ± 0.53	2.73 ± 0.47	0.43 ± 0.03
HFD-MICT	1.10 ± 0.18	1.89 ± 0.28	1.63 ± 0.31	0.47 ± 0.01
CD-SED	0.61 ± 0.09 ^a	1.24 ± 0.23 ^a	0.77 ± 0.24 ^a	0.50 ± 0.00
CD-MICT	0.44 ± 0.05 ^a	0.81 ± 0.10 ^a	0.37 ± 0.06 ^{ac}	0.52 ± 0.01

HFD-SED, dieta hiperlipídica sedentário (n = 5); HFD-MICT, dieta hiperlipídica e MICT (n = 5); CD-SED, dieta padrão sedentário (n = 5); e CD-MICT, dieta padrão e MICT (n = 5). Dados apresentados em média ± EPM ($p < 0,05$). ^a Comparado a HFD-SED. ^c Comparado a HFD-MICT. mWAT: tecido adiposo mesentérico; eWAT: tecido adiposo epididimal; rWAT: tecido adiposo retroperitoneal; GAST: musculo gastrocnêmio. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Após a análise dos pesos relativos dos tecidos, a razão entre os depósitos de gordura visceral e a massa corporal foi calculada para que tivéssemos acesso ao índice de adiposidade (IA) que é um indicador do estoque excessivo de tecido adiposo no corpo do animal (TAYLOR; PHILLIPS, 1996). O cálculo de IA é descrito como: gordura epipidimal + retroperitoneal + mesentérica / massa corporal total. Os nossos achados (figura 5) demonstram que o grupo HFD-SED apresentou valores elevados para o IA, apresentando reduções para ao grupos CD-SED ($p = 0,003$) e CD-MICT ($p = 0,0005$).

Figura 5 - Índice de Adiposidade.

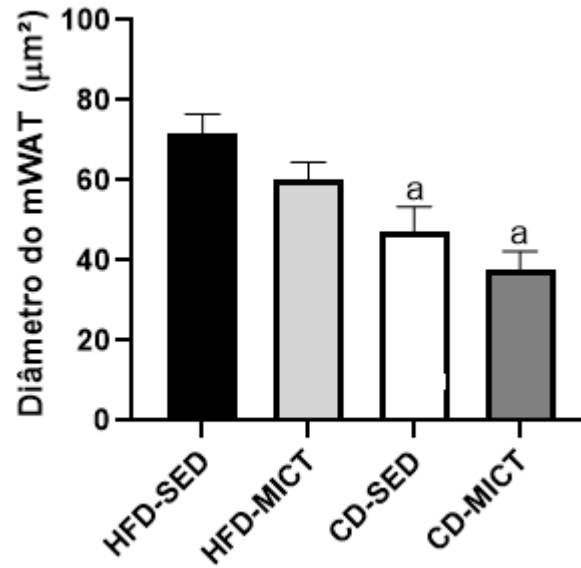


Dados apresentados em média \pm EPM ($p < 0.05$). HFD-SED, dieta hiperlipídica sedentário ($n = 5$); HFD-MICT, dieta hiperlipídica e MICT ($n = 5$); CD-SED, dieta padrão sedentário ($n = 5$); e CD-MICT, dieta padrão e MICT ($n = 5$). ^a Comparado a HFD-SED. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

6.3. Morfologia do Tecido Adiposo Mesentérico

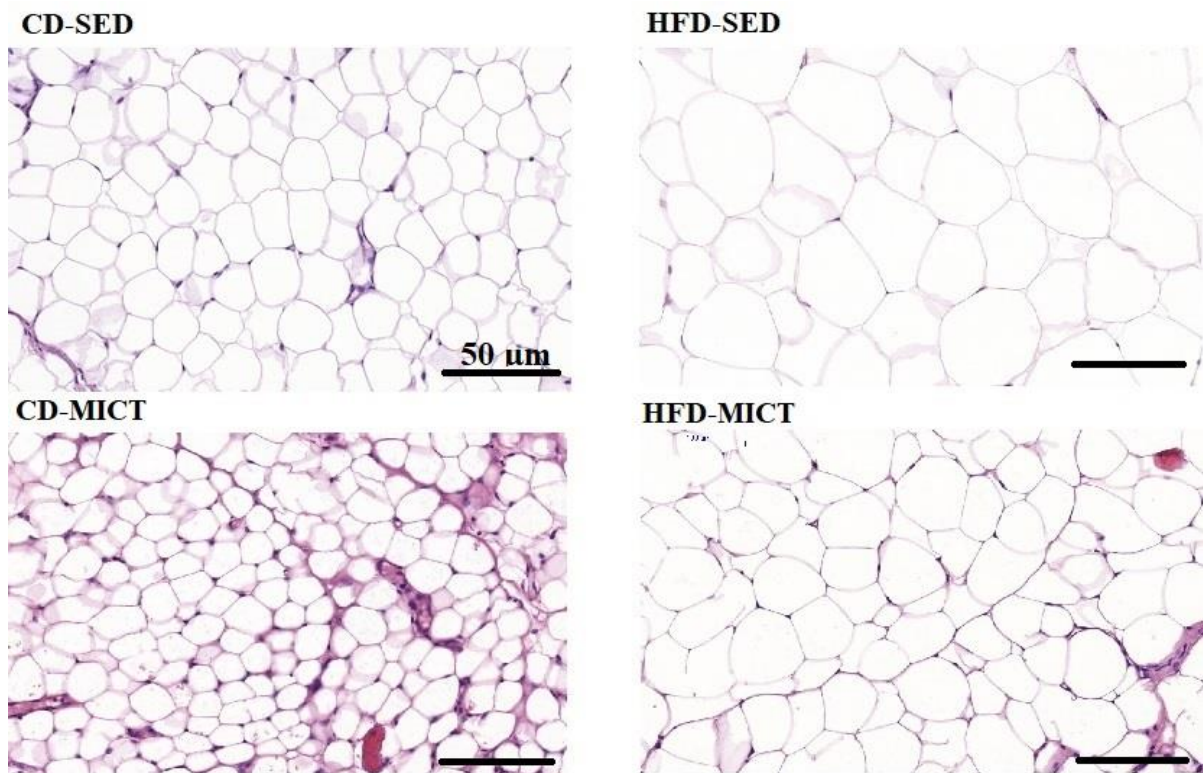
Os valores do diâmetro dos adipócitos (μm^2) são apresentados na figura 6. Semelhante à massa corporal e ao peso relativo do depósito mWAT, os grupos CD-SED ($47,16 \pm 6,25 \mu\text{m}^2$, $p = 0,01$) e o CD-MICT ($37,59 \pm 4,73 \mu\text{m}^2$, $p = 0,002$) apresentaram diâmetros dos adipócitos reduzidos quando comparado ao grupo HFD-SED ($71,72 \pm 4,79 \mu\text{m}^2$), sem diferença para o grupo que recebeu apenas MICT (HFD-MICT, $p = 0,58$). Esses dados sugerem que a intervenção dietética isolada e associada ao MICT, é eficaz em reduzir a expansão do tamanho dos adipócitos causada pelo consumo da HFD e pelo sedentarismo, a fim de manter as características saudáveis desse tecido.

Figura 6 - Morfologia do Tecido Adiposo Mesentérico.



Dados apresentados em média \pm EPM ($p < 0.05$). HFD-SED, dieta hiperlipídica sedentário ($n = 5$); HFD-MICT, dieta hiperlipídica e MICT ($n = 4$); CD-SED, dieta padrão sedentário ($n = 5$); e CD-MICT, dieta padrão e MICT ($n = 4$). ^a Comparado a HFD-SED. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Figura 7 - Fotomicrografia representativa dos adipócitos mesentéricos corados com HE.



HFD-SED, dieta hiperlipídica sedentário (n = 5); HFD-MICT, dieta hiperlipídica e MICT (n = 4); CD-SED, dieta padrão sedentário (n = 5); e CD-MICT, dieta padrão e MICT (n = 4). As imagens foram tiradas com ampliação de 20x, com barra de escala preta representando 50µm. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

6.4. Capacidade Máxima de Exercício (MEC)

As variáveis do treinamento, obtidas durante os testes de Capacidade Máxima de Exercício (MEC) estão reportadas na tabela 6. Durante o período pré-intervenção com o treinamento, o grupo HFD-MICT apresentou valores superiores para as variáveis tempo de exaustão (min) ($p = 0,001$), distância percorrida (m) ($p = 0,002$) e MEC (m/min) ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo CD-SED. Após 8 semanas de treinamento, ambos os grupos apresentam adaptações positivas quando comparado aos valores pré-treinamento em todos os parâmetros ($p < 0,001$).

Ao compararmos a magnitude das adaptações na MEC ($\Delta\%$) geradas mediante ao treinamento e intervenção dietética baseada em retorno ao consumo de dieta padrão, foi verificado que o grupo que recebeu a intervenção dietética (CD-MICT) apresentou valores

superiores quando comparado ao grupo que permaneceu se alimentando com a dieta hiperlipídica palatável (HFD-MICT) ($p < 0,001$).

Tabela 6- Variáveis do Treinamento

		HFD-MICT	CD-MICT
Pré-treinamento	MEC (m/min)	26.80 ± 0.49 ^b	21.20 ± 0.49
	Tempo de exaustão (min)	21.20 ± 0.49 ^b	16.00 ± 1.09
	Distância percorrida (m)	568.80 ± 21.48 ^b	340.80 ± 29.56
Pós-treinamento	MEC (m/min)	33.60 ± 0.74 ^d	34.40 ± 0.74 ^d
	Tempo de exaustão (min)	29.60 ± 0.74 ^d	30.40 ± 0.67 ^d
	Distância percorrida (m)	996.80 ± 47.68 ^d	1047.60 ± 45.08 ^d
Δ da MEC (%)		25.36 ± 1.80	62.72 ± 5.99 ^c

HFD-MICT, dieta hiperlipídica e MICT (n = 5); e CD-MICT, dieta padrão e MICT (n = 5). Dados apresentados em média ± EPM ($p < 0.05$). ^b comparado a CD-MICT. ^c comparado a HFD-MICT. ^d Pré-treinamento vs. pós-treinamento no mesmo grupo. m/min : metros por minuto; min: minutos; m: metros; MEC: máxima capacidade de exercício. Fonte: elaborada pelo próprio autor

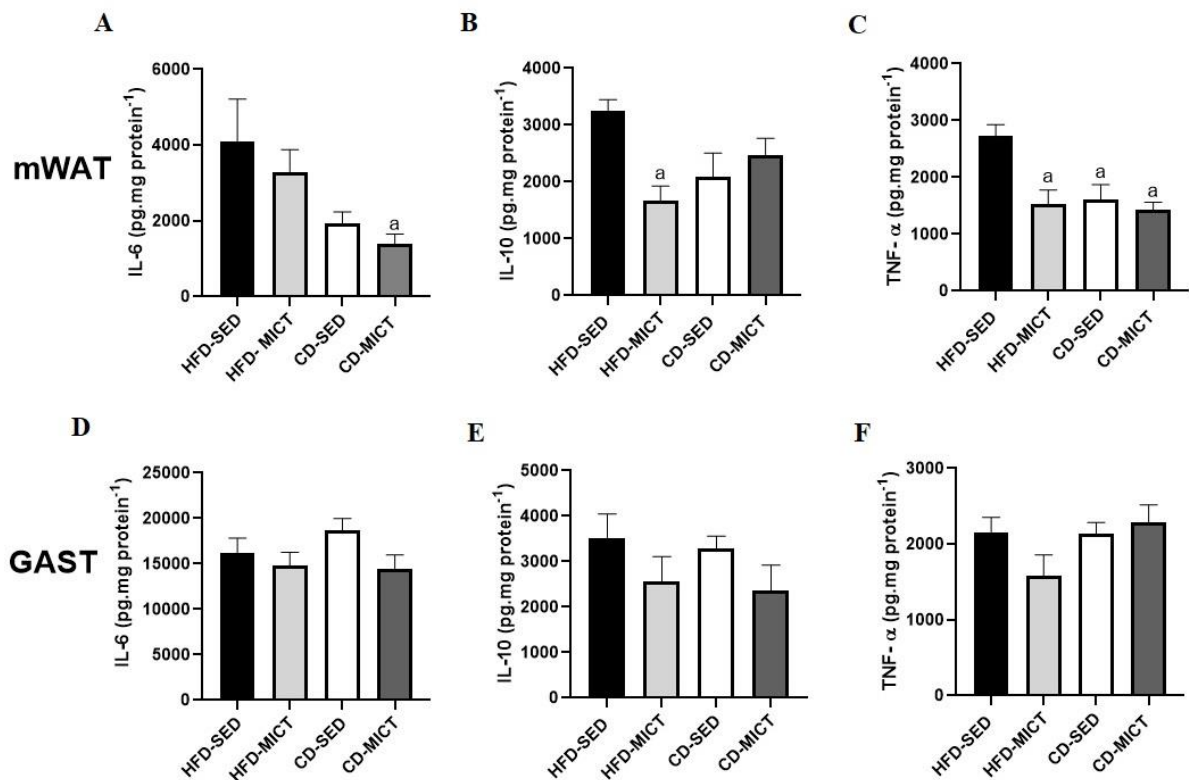
6.5. Citocinas Teciduais

Na figura 8 (painel A, B e C) observam-se os valores de concentração das citocinas teciduais (pg.mg^{-1}) para o tecido adiposo mesentérico (mWAT). Para a citocina IL-6 (figura 8A), os valores estavam elevados no grupo HFD-SED, apresentando somente um efeito redutor para o grupo que recebeu os dois tratamento de maneira combinada (intervenção dietética e MICT [CD-MICT])($p = 0,04$), sem nenhuma diferença estatística verificado para os grupos que realizaram as intervenções de maneira independente: HFD-MICT ($p = 0,82$); ou CD-SED ($p = 0,13$). Para a citocina IL-10 (figura 8B), os valores também estavam elevados para o grupo HFD-SED, sofrendo apenas influência mediante ao treinamento de maneira isolada (HFD-MICT) ($p = 0,02$), sem nenhuma diferença para os grupos CD-SED ($p = 0,06$) ou CD-MICT ($p = 0,16$). Os valores da a citocina TNF- α (figura 8C) – também elevados no grupo HFD-SED – foram reduzidos em todos os tratamentos, de maneira independente (HFD-MICT [$p = 0,006$]; e CD-SED [$p = 0,01$]), ou combinadas (CD-SED [$p = 0,003$]).

Na figura 8 (painel D, E e F) observam-se os valores de concentração das citocinas para o músculo gastrocnêmio (GAST). Os valores não apresentaram nenhuma alteração frente

ao consumo de dieta hiperlipídica palatável e sedentarismo (HFD-SED) e nenhuma adaptação ocasionada pelos protocolos experimentais – de maneira dependente ou independente – para nenhuma das citocinas ($p > 0,05$).

Figura 8 - Concentração de Citocinas Teciduais no tecido adiposo mesentérico (mWAT) e músculo gastrocnêmio (GAST).

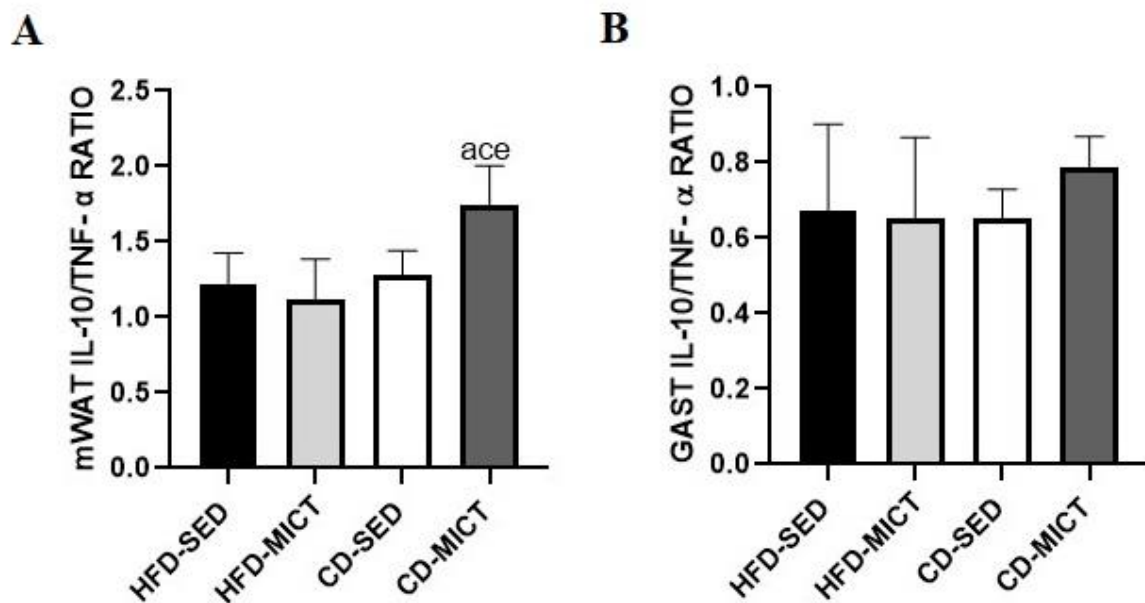


Dados apresentados em média \pm EPM ($p < 0.05$). **(A)(D)** IL-6: interleucina-6, **(B)(E)** IL-10: interleucina-10, **(C)(F)** TNF- α : fator de necrose tumoral – alpha. HFD-SED, dieta hiperlipídica sedentário ($n = 5$); HFD-MICT, dieta hiperlipídica e MICT ($n = 5$); CD-SED, dieta padrão sedentário ($n = 5$); e CD-MICT, dieta padrão e MICT ($n = 5$). ^a Comparado a HFD-SED. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Na figura 9 encontram-se os valores para a razão IL-10/ TNF- α . Para o tecido adiposo mesentérico (figura 9A) o grupo que recebeu as duas intervenções combinadas (CD-MICT) apresentou valores mais elevados quando comparado ao grupo HFD-SED ($p = 0,01$), HFD-MICT ($p = 0,003$) e CD-SED ($p = 0,03$). Esses achados, demonstraram que a combinação das duas intervenções estimulou a produção de citocinas com características anti-inflamatórias de

maneira mais elevada do que a produção de citocinas com características pró-inflamatórias, conferindo um efeito positivo no perfil inflamatório desse tecido. No entanto, para o músculo gastrocnêmio (GAST) (figura 9B), nenhuma diferença foi verificada sob nenhuma das condições, obesidade, intervenção dietética e/ou treinamento ($p > 0,05$).

Figura 5 - Razões IL-10/ TNF- α teciduais no tecido adiposo mesentérico (mWAT) e músculo gastrocnêmio (GAST).



Tecido adiposo mesentérico (mWAT)(A); músculo gastrocnêmio (GAST) (B). Dados apresentados em média \pm EPM ($p < 0.05$). HFD-SED, dieta hiperlipídica sedentário ($n = 5$); HFD-MICT, dieta hiperlipídica e MICT ($n = 5$); CD-SED, dieta padrão sedentário ($n = 5$); e CD-MICT, dieta padrão e MICT ($n = 5$). ^a comparado a HFD-SED. ^c comparado a HFD-MICT. ^e comparado a CD-SED. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

7. DISCUSSÃO

Esse estudo reporta os efeitos do exercício aeróbico de moderada intensidade (MICT) e intervenção dietética – associadas ou não – na massa corporal, parâmetros de obesidade, área de adipócitos e na modulação de marcadores inflamatórios em ratos *Wistar* obesos previamente alimentados com dieta hiperlipídica palatável (HFD). De acordo com nossas hipóteses, era esperado que o protocolo de treinamento proposto, a intervenção dietética ou a combinação dos dois tratamentos fossem capazes de regular o ganho de massa destes animais, promover adaptações na máxima capacidade de exercícios (MEC), reduzir a área de adipócitos, e gerar adaptações no perfil inflamatório do tecido adiposo mesentérico (mWAT) e músculo gastrocnêmio (GAST), promovendo alterações nas concentrações de marcadores inflamatórios como a IL-6, IL-10 e TNF- α . No entanto, nem todos estes resultados foram confirmados. Ao contrário das hipóteses, os nossos achados demonstraram somente adaptações geradas no mWAT após 48 horas do último teste de MEC, enquanto nenhuma adaptação nos marcadores inflamatórios no GAST foi verificada. Adicionalmente, o protocolo de intervenção dietética combinada ao MICT com intensidade de 65-80% do $V_{m\acute{a}x}$, foi capaz de diminuir o ganho de massa corporal dos animais, melhorar a máxima capacidade de exercício e perfil inflamatório no tecido adiposo, reduzir a área de adipócitos e o peso relativo dos três compartimentos adiposos avaliados. Além disso, a intervenção dietética de maneira independente foi capaz de gerar adaptações em todos os parâmetros relacionados a obesidade (massa corporal total, peso relativos dos depósitos de gordura, índice de adiposidade e área de adipócitos). Esses achados sugerem que a redução na adiposidade corporal e na expressão de marcadores inflamatórios no tecido adiposo mesentérico desempenharam um maior papel nos benefícios induzidos pela intervenção dietética e a combinação dos dois tratamentos.

Após oito semanas de indução da obesidade através da HFD, os animais apresentaram aproximadamente 35% de ganho na massa corporal, demonstrando que mesmo com um teor de 20% de gordura, a HFD utilizada neste estudo foi eficiente em causar alterações neste parâmetro. A maioria dos estudos que utilizam HFD, apresentam dietas com alto teor de gordura (~45-60%) para o desenvolvimento da obesidade precocemente, o que dificulta a translação de resultados para a área clínica, principalmente frente a protocolos de intervenções cujos objetivos são reduzir a obesidade e seus efeitos deletérios, uma vez que esses valores são

superiores ao consumo humano, cuja dieta ultra processada possui entre 30-40% de gordura (LAI; CHANDRASEKERA; BARNARD, 2014; LANG *et al.*, 2019).

Além disso, estudos têm demonstrado que a utilização da dieta com 20% de gordura é capaz de desenvolver o fenótipo obeso em animais através de alterações como a instalação de um quadro de inflamação crônica de baixo grau e disfunção endotelial (OISHI *et al.*, 2019), aumento da massa corporal, alterações em parâmetros metabólicos associados a obesidade e outras comorbidades, aumento nos depósitos adiposos viscerais, além de alteração da composição corporal (e. g., aumento no percentual de gordura) (FURINO *et al.*, 2021), e também aumento na taxa de lipogênese nos tecidos adiposos (SENE-FIORESE *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2008).

Os efeitos do MICT e intervenção dietética na modulação da massa corporal em animais obesos, têm sido amplamente investigados na literatura, entretanto, seus resultados continuam controversos. Wang *et al.* (2017) verificaram que o MICT (65-70% do $VO_{2\text{máx}}$) foi capaz de causar uma redução na massa corporal do animais - com uma menor magnitude quando comparado ao HIIT (do inglês, “*high-intensity interval training*”) - porém significativa quando comparado aos animais controles. Em contrapartida, estudos verificaram que o MICT com intensidade de 70% da capacidade máxima de corrida (MARTINEZ-HUENCHULLAN *et al.*, 2019) ou 65-70% do $V_{\text{máx}}$ (KHALAFI *et al.*, 2020) não foi eficiente em promover diferenças na modulação da massa corporal causada pelo consumo de HFD. Estes estudos tiveram um *range* de 7-10 semanas de indução da obesidade e de 8-12 semanas de treinamento, no entanto, nenhum deles teve como objetivo realizar uma intervenção dietética. Além disso, diversos estudos têm demonstrado que a intervenção dietética baseada em restrição calórica é efetiva em reduzir a massa corporal devido à um balanço energético negativo e uma reprogramação dos substratos energéticos, fazendo com que a célula utilize a gordura como fonte energética para realizar suas funções metabólicas (MILLER *et al.*, 2017; VANGOITSENHOVEN *et al.*, 2018). Adicionalmente, a associação entre o exercício físico e intervenção dietética possui um maior impacto adaptativo para massa corporal, do que as adaptações geradas pelas intervenções de maneira independente (VERHEGGEN *et al.*, 2016).

Em acordo com estes estudos, nossos achados demonstraram que frente a oito semanas de intervenção dietética combinada ou não com o MICT (CD-SED e CD-MICT, respectivamente), o ganho de massa causada pela HFD descrito anteriormente, foi revertido.

Ademais, assim como verificado por Furino *et al.* (2021), os mesmos protocolos foram capazes de reduzir o peso relativo dos depósitos de gordura viscerais, enquanto o MICT de maneira independente não foi capaz de promover tais adaptações. Estes resultados podem estar associados à redução da frequência semanal em nosso protocolo de treinamento, que quando comparado aos estudos prévios da literatura (3 sessões semanais vs. 5 sessões semanais), talvez não tenha sido efetivo em promover um aumento no gasto energético de repouso ou criar um balanço energético negativo suficiente. Em contrapartida, diferentemente dos estudos que realizaram intervenções dietéticas, os nossos achados sugerem que uma pequena variação no percentual de gordura (~14,2%) seja eficiente em reduzir a massa corporal de animais obesos, não sendo necessária a utilização de dietas baseadas em restrição calórica (temporal ou em quantidade) (AOIUCHAT *et al.*, 2020; LOWE *et al.*, 2020), ou com grandes modulações na quantidade de gordura presente na dieta (e. g. Δ 51%) (VAINSOITSENHOVEN *et al.*, 2018; HANSSON *et al.*, 2019).

Em relação aos demais parâmetros relacionados a adiposidade corporal e os efeitos nocivos ao metabolismo, recentes estudos do nosso laboratório têm reportado aumento exacerbado na área dos adipócitos do tecido adiposo branco, bem como aumento no peso relativo destes tecidos frente ao tratamento crônico com a HFD (OISHI *et al.*, 2018, ALVES, 2019; FURINO *et al.*, 2021). Além disso, já é bem demonstrado que 5 sessões semanais de MICT - de maneira independente - se configuram como uma importante ferramenta de combate a hipertrofia dos adipócitos e esses efeitos são resultados de um aumento no gasto energético de repouso, o desenvolvimento de um balanço energético negativo e também um aumento na taxa lipolítica frente ao protocolo de treinamento (KHALAFI *et al.*, 2020; LACERDA *et al.*, 2019). Complementarmente, a área de adipócitos em ratos cujo fenótipo obeso foi desencadeado frente ao consumo de HFD (60% de gordura) possuem grande influência frente a protocolos de intervenções dietéticas com uma redução de ~51% na quantidade de gordura presente na dieta, ou o retorno ao consumo de dieta padrão (VAINSOITSENHOVEN *et al.*, 2018; HANSSON *et al.*, 2019).

Em acordo parcial a literatura que versa sobre as reduções na área de adipócitos frente a utilização do MICT ou intervenção dietética de maneira independente, os nossos achados sugerem que somente a intervenção dietética (CD-SED) e a combinação das duas intervenções (CD-MICT) foram capazes de promover tais adaptações, sem nenhuma diferença para o grupo

que realizou somente o MICT (HFD-MICT) de maneira exclusiva. No entanto, ao olharmos para a Figuras 6 e 7, e compararmos as diferenças entre os valores médios de cada grupo, podemos observar que quando comparado ao grupo HFD-SED, o grupo HFD-MICT apresentou uma diminuição de ~30% na área de adipócitos.

Frente a estes resultados é possível que devido à frequência semanal de treinamento utilizada em nosso estudo (3 vezes por semana) tenha sido insuficiente em promover tais mudanças – assim como na massa corporal total -, enquanto a estratégia utilizada no protocolo de intervenção dietética (Δ 15,2% de gordura entre a HFD e dieta padrão [CD]) foi efetiva em reduzir a área de adipócitos como nos estudos mencionados anteriormente, demonstrando que a utilização de intervenções dietéticas com alterações menos acentuadas (e. g. diferente das observadas na literatura) já se configuram como importante ferramenta redutora da hipertrofia dos adipócitos frente a HFD e o sedentarismo. Adicionalmente aos dados de massa corporal e demais parâmetros relacionados à composição corporal, o MICT de maneira independente também não foi efetivo em reduzir a área dos adipócitos do mWAT, e esse achado pode estar relacionado ao fato de o mWAT possuir uma importante característica em aumentar suas taxas lipogênicas após o exercício, com o objetivo de reestabelecer os níveis lipídicos que foram utilizados durante a prática do mesmo, prejudicando a redução de massa corporal e hipertrofia dos adipócitos analisados (LEHNIG *et al.*, 2019).

Em relação ao consumo alimentar, a literatura tem demonstrado que a ingestão de uma dieta hiperlipídica pode induzir à hiperfagia, levando os animais a aumentarem a frequência das refeições devido à palatabilidade da dieta (LOUIS-SYLVESTRE; GIACHETTI; LE MAGNEN, 1984; WARWICK, 1996; LEIGH; KENDIG; MORRIS, 2019; SULEIMAN; MOHAMED; BAKAD, 2020). Entretanto, estudos que versam sobre a influência da HFD no consumo alimentar e ganho de massa corporal ainda são controversos. Embora existam estudos que não observaram alterações no consumo alimentar, verificaram que os animais alimentados com HFD tiveram um aumento na massa corporal e aumento no peso relativo dos depósitos de gordura, independentemente do padrão de consumo alimentar (GAO; MA; LIU, 2015; FURINO *et al.*, 2021), enquanto outros estudos verificaram que o consumo diário nos grupos alimentados com HFD foi inferior quando comparado aos controles e mesmo assim o ganho de peso foi superior aos animais alimentados com dieta padrão (ZAMBON *et al.*, 2009; SPERETTA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2021). É possível que o aumento

na ingestão calórica advinda da dieta HFD (4.665 kcal/g vs. 3.854 kcal/g da CD) e a quantidade de lipídios presentes nesta dieta (20% vs. 4.8% da CD) tenham levado a respostas que aumentam a saciedade (DÍAZ-URBINA *et al.*, 2018), bem como podem ter levado a um nível mais alto de eficiência energética, reduzindo o consumo diário (DÍAZ-URBINA *et al.* 2018; GAO; MA; LIU, 2015), o que pode explicar a ausência de diferenças no consumo alimentar observado em nosso estudo.

Diante do demonstrado até o momento, é possível afirmar que embora o modelo de MICT utilizado em nosso estudo (65-80% do $V_{máx}$, 3 vezes por semana) não tenha sido efetivo em reduzir os parâmetros relacionados à obesidade, ele foi capaz de gerar adaptações na capacidade máxima de exercício (MEC). E a correlação positiva entre o MICT e a MEC em animais alimentados com HFD também têm sido amplamente investigados na literatura, entretanto os dados se apresentam controversos. Enquanto, Ribeiro *et al.* (2019) verificaram que dois meses de MICT com intensidade de 50% do $V_{máx}$ (5 sessões semanais) não foi capaz de alterar este parâmetro em animais obesos, Khalafi *et al.* (2020) verificaram que com intensidade de 65-70% da $V_{máx}$ (5 sessões semanais), o MICT realizado por doze semanas promoveu adaptações positivas na MEC, distância e tempo de corrida no grupo MICT quando comparado ao grupo sedentário.

Em nossos achados, ambos os grupos que realizaram o treinamento (HFD-MICT e CD-MICT) apresentaram adaptações positivas para a MEC, quando comparado aos valores pré-treinamento. No entanto, após as oito semanas de treinamento, as magnitudes das adaptações entre os grupos foram diferentes, no qual o grupo HFD-MICT apresentou variações ($\Delta\%$ MEC) em menores magnitudes quando comparado ao grupo CD-MICT (~25% e ~63%, respectivamente). Essas diferenças adaptativas na MEC em modelos animais frente ao protocolo de exercício físico em animais obesos também já foram reportados na literatura, principalmente devido a alguns efeitos da HFD no metabolismo destes animais como: (a) um rápido acúmulo de lactato sanguíneo, devido a uma diminuição na atividade da LDHB (lactato desidrogenase isoforma B- uma enzima responsável pela conversão de lactato em piruvato) no músculo esquelético, bem como uma diminuição na atividade da MCT-2 (proteína transportadora de monocarboxilato tipo 2) no fígado (proteína que regula a circulação de lactato) (CHEN *et al.*, 2017); (b) alteração no metabolismo da glicose através do aumento de ceramidas e ácidos graxos causadas pela HFD, que induzem à uma resistência insulínica bem

como uma intolerância a glicose (MARDARE *et al.*, 2016); (c) prejuízo na função mitocondrial no músculo esquelético através de uma diminuição na atividade da enzima Citrato Sintase (importante enzima para o ciclo de Krebs), e uma ativação no NAD(P)H oxidase no músculo que leva a um aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) que aumentam o estresse oxidativo além de prejudicar a cadeia transportadora de elétrons (TAKADA *et al.*, 2015); (d) redução na sinalização de vias lipolíticas pelo aumento do TRVP4 (receptor do potencial transiente vanilóide do tipo 4), que regula negativamente a PGC-1 α (coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama) que está associada à função mitocondrial (CHEN *et al.*, 2015). E em nosso estudo, nós especulamos que estas possíveis alterações nesses parâmetros fisiológicos e bioquímicos tenham influenciado a magnitude das adaptações e performance do grupo HFD-MICT ao final do período experimental (uma vez que ambos os grupos realizaram o mesmo modelo de treinamento, somente as dietas aplicadas eram diferentes), principalmente devido aos efeitos deletérios no músculo esquelético (RIBEIRO *et al.*, 2019).

Com o objetivo de consolidar o desenvolvimento do fenótipo obeso e do desenvolvimento de um quadro inflamatório através da expressão e concentração de marcadores como as citocinas, nós verificamos as concentrações de alguns destes marcadores inflamatórios (e.g., IL-6, IL-10 e TNF- α) no mWAT. No grupo HFD-SED, esses valores estavam elevados quando comparados aos demais grupos, o que confirma a instalação de um quadro inflamatório tecidual. Em complemento, nossos achados demonstraram que essas concentrações foram reduzidas após oito semanas de intervenção dietética (TNF- α), após oito semanas de treinamento (IL-10 e TNF- α) ou após oito semanas de intervenção dietética combinada ao treinamento (IL-6 e TNF- α).

Entretanto, assim como descrito anteriormente, ainda não há um consenso sobre o início da resposta inflamatória na obesidade, pois parece que existem diversos mecanismos associados ao desenvolvimento deste quadro, podendo estes, estarem ou não associados entre si (KARCZEWSKI *et al.*, 2018). Além da infiltração de macrófagos do tipo M1 no tecido adiposo, diversos “gatilhos” têm sido apontados como importantes fatores na associação entre obesidade e inflamação como: (a) presença de lipopolissacarídeos (LPS) produzidos pelas bactérias gram-positivas, que por um aumento na permeabilidade do intestino, extravasam para a corrente sanguínea produzindo uma resposta inflamatória através de sua alta afinidade aos

receptores *toll-like* 4 (TLR-4) (CANI *et al.*, 2008; DAMMS-MACHADADO *et al.*, 2017; BATATINHA *et al.*, 2018); (b) aumento nos níveis de ácidos graxos livres (AGLs) na corrente sanguínea sem que haja a oxidação dos mesmos, fazendo com que se liguem à receptores TLR-4 e TLR-2 que levarão a fosforilação de vias que serão responsáveis pela transcrição de quimiocinas, que por sua vez, aumentarão ainda mais a infiltração de macrófagos do tipo M1 (NGUYEN *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2004); (c) a morte dos adipócitos que liberam proteínas que se ligam à receptores de outros adipócitos (estruturas “*crown-like*”), levando também à um aumento na expressão de quimiocinas e infiltração de macrófagos M1 (FISCHER-POSOVSKY *et al.*, 2011); e (d) a expansão do tecido adiposo que pode levar à um aumento no estresse mecânico associado com a interação entre os adipócitos expandidos e a matriz extracelular; e a hipóxia através de uma diminuição na perfusão sanguínea para estas células (RIUS *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2011).

Além da diminuição da área de adipócitos, massa corporal e peso relativo dos depósitos de gordura verificados em nosso estudo, a diminuição de citocinas inflamatórias no mWAT mesentérico causada pelas intervenções, pode ter ocorrido de maneira multifatorial, através da reversão de todos estes processos citados acima. Em adição, diversos estudos apontam que diminuição da inflamação pode estar associada a fatores como a inibição da inflamação do tecido por uma regulação na ativação e expressão TLR4, supressão na infiltração de macrófagos, uma aceleração do “*switching*” fenotípico de macrófagos M1 para M2 (KAWANISHI *et al.*, 2010), diminuição na infiltração de macrófagos e neutrófilos no tecido adiposo (KAWANISHI *et al.*, 2015) e também uma redução na expansão dos adipócitos (GUZIK *et al.*, 2017). Exceto pela morte dos adipócitos, todos estes processos envolvidos no desenvolvimento e exacerbação do quadro inflamatório mediante ao quadro de obesidade, bem como os efeitos reversores deste processo frente a protocolos de intervenção dietética e treinamento, estão associados a ativação ou inibição – respectivamente - da NF- κ B (fator nuclear kappa B), que é uma via responsável pela transcrição de genes inflamatórios como o aumento na expressão de quimiocinas que levarão ao recrutamento de células inflamatórias, e citocinas pró-inflamatórias que podem levar a uma polarização pro-inflamatória de células do sistema imune (REILLY; SALTIEL, 2017; KARCZEWSKI *et al.*, 2018).

Diferentemente da IL-6 e TNF- α , a citocina IL-10 apresenta uma característica anti-inflamatória e possui um importante papel na modulação dos processos inflamatórios durante

a obesidade, principalmente na regulação e diminuição do processo inflamatório causado pelo exercício físico (DAFTARIAN *et al.*, 1996, LIRA *et al.*, 2009a; 2009b; FEBBRAIO, 2014; ROCHA-RODRIGUES *et al.*, 2017). Em contrapartida, os nossos achados demonstraram que a concentração de IL-10 no mWAT estava elevada no grupo HFD-SED. Alguns estudos também verificaram um aumento nesta citocina causado pela obesidade, associando esse fenômeno ao aumento de concentração LPS e/ou citocinas pró-inflamatórias (e.g. IL-6 e TNF- α) que levam a um aumento na produção de IL-10 por contra regulação, com o objetivo de minimizar o estado inflamatório (ESPOSITO *et al.*, 2003; JUGE-AUBRY *et al.*, 2005, YAMASHITA *et al.*, 2010). Esse mecanismo contra regulatório ocorre, pois a IL-10 é uma citocina capaz de estimular a sua própria produção, inibir a produção de outras citocinas inflamatórias (e.g., IL-1 β , TNF- α e IL-6), diminuir a produção de EROs e também aumentar a secreção de receptores solúveis a TNF, que antagonizam os efeitos inflamatórios do TNF- α no tecido adiposo (YAMASHITA *et al.*, 2010).

Curiosamente, em seu estudo, Yamashita *et al.* (2010) verificou que uma intervenção dietética baseada em restrição na ingesta calórica (redução de 20% na ingestão calórica diária quando comparado ao grupo controle) em ratos alimentados previamente com dieta HFD (15 semanas) foi eficiente em levar a uma diminuição na expressão de IL-10 em dois compartimentos de tecido adiposo (mesentérico e retroperitoneal), entretanto, sem nenhuma diferença entre os grupos sedentários e os grupos que realizaram 10 semanas de treinamento contínuo de moderada intensidade (55% do VO₂^{máx}), enquanto os nossos achados sugerem o contrário, demonstrando que somente o treinamento foi capaz de diminuir a expressão de IL-10 no grupo HFD-MICT, enquanto nenhuma diferença foi vista para os grupos que receberam a intervenção dietética (CD-SED) ou tiveram as duas intervenções realizadas (CD-MICT), e é possível que essa diminuição na concentração de IL-10 frente ao protocolo de treinamento também tenha ocorrido por um mecanismo de contra regulação, visto que as concentrações de TNF- α foram reduzidas frente a esse protocolo.

Outro mecanismo que poderia explicar os benefícios do treinamento aeróbico em animais obesos está na liberação de miocinas pelas fibras do músculo esquelético. É bem elucidado na literatura, os efeitos anti-inflamatórios do exercício físico causado pela mediação das miocinas, independentemente da diminuição da gordura (ROSA-NETTO *et al.*, 2009; BALDUCCI *et al.*, 2012). Além disso, estudos recentes têm verificado que a HFD tem gerado

um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF- α no músculo esquelético, e que o treinamento como MICT (GOPALAN *et al.*, 2021) e a natação (SHIRVANI *et al.*, 2021) têm desempenhado importante papel na diminuição deste estado inflamatório do tecido. Estes autores associam este fenômeno à diminuição na deposição de gordura ectópica neste compartimento causada pelo treinamento (GOPALAN *et al.*, 2021), ou por uma regulação negativa do expressão de TLR4/ MyD88 (fator de diferenciação mielóide 88) (SHIRVANI *et al.*, 2021). Entretanto, assim como Lacerda *et al.* (2019), nós não verificamos diferenças nas concentrações das citocinas no músculo esquelético (GAST) 48 horas após o último teste de capacidade máxima. Como não foram realizadas análises histológicas ou de outros parâmetros bioquímicos no músculo gastrocnêmio no presente estudo, especula-se que nossos protocolos experimentais talvez não tenham sido efetivos em reduzir a deposição de gordura neste tecido (nenhuma diferença foi encontrada para o peso relativo do GAST), porém análises mais complexas do músculo esquelético são necessárias para afirmar quais mecanismos estariam de fato influenciando nossos achados.

A razão IL-10/TNF- α tem sido usada em diversos estudos como um indicador de estado inflamatório e morbidades, e seus valores baixos estão associados a prognósticos desfavoráveis (LIRA *et al.*, 2012; JUNG *et al.*, 2008; KAUR *et al.*, 2006; LEONIDOU *et al.*, 2007). Estudos prévios demonstraram que o treinamento aeróbico foi capaz de promover aumentos nesta razão, tanto em níveis séricos (ROCHA-RODRIGUES *et al.*, 2017; CHAGAS *et al.*, 2017) ou teciduais (LIRA *et al.*, 2009a; 2012). Em contrapartida, nossos achados demonstraram que esse efeito ocorreu somente quando houve a combinação entre a intervenção dietética com o MICT, sugerindo que ambas as intervenções – quando combinadas – apresentam um efeito anti-inflamatório do tecido adiposo mesentérico. Entretanto, como não foram verificadas diferenças nas concentrações das citocinas de maneira independente no GAST, já esperávamos que a razão não se alterasse. Assim como estes estudos, atribuímos esses valores elevados na razão IL-10/TNF- α para o grupo CD-MICT devido a um aumento nas concentrações de marcadores anti-inflamatórios (IL-10) que apresentam uma função inibitória na produção de marcadores pró-inflamatórios, como o TNF- α (YAMASHITA *et al.*, 2010).

São poucas as evidências na literatura, que se debruçaram em investigar os efeitos de uma intervenção dietética combinada ao MICT ou não, nos valores da razão IL-10/TNF- α , porém, neste estudo não foram evidenciadas mudanças para o grupo que realizou a intervenção


dietética ou treinamento de maneira independente, logo, sugerimos estudos futuros que busquem investigar esses efeitos em outros depósitos de tecido adiposo e musculares e/ou outros modelos de intervenção dietética e treinamento, associados ou não.

Este estudo possui algumas limitações como: (1) o número de amostras por grupo teve um limite de 5 animais, talvez um número maior de animais poderia elicitar conclusões mais robustas; (2) nós não realizamos análises histológicas do músculo esquelético para adicionar este parâmetro a nossas investigações e verificar possíveis alterações na deposição de gordura neste tecido. Com isso, nós sugerimos novas perspectivas para estudos futuros com um maior número de animais por grupo, demais análises musculares e períodos de intervenção maiores.

A figura 10 resume os principais resultados encontrados neste estudo com a prática do MICT, intervenção dietética ou a combinação de ambos, em todos os parâmetros analisados.

Figura 6 - Resumo dos principais resultados encontrados no presente estudo.

	Massa Corporal	Peso Relativo (mWAT, rWAT e eWAT)	Peso Relativo (GAST)	Diâmetro mWAT	MEC	IA	Citocinas mWAT	Citocinas GAST	Razão IL-10/TNF- α
 CD-SED (n= 5)	↓	↓	↔	↓	⊘	↓	↓ TNF- α	↔	↔
 CD-MICT (n= 5)	↓	↓	↔	↓	↑↑	↓	↓ TNF- α ↓ IL-6	↔	↑ mWAT
 HFD-MICT (n= 5)	↔	↔	↔	↔	↑	↔	↓ TNF- α ↓ IL-10	↔	↔

 Treinamento Contínuo de Moderada Intensidade (MICT)
 Dieta Padrão (Chow-Diet)
 Dieta Hiperlipídica (HFD)

↓ Redução ↑ Aumento
 ⊘ Não Analisado ↔ Sem Diferença

HFD-MICT, dieta hiperlipídica e MICT (n = 5); CD-SED, dieta padrão sedentário (n = 5); e CD-MICT, dieta padrão e MICT (n =5); mWAT: tecido adiposo mesentérico; eWAT: tecido adiposo epididimal; rWAT: tecido adiposo retroperitoneal; GAST: músculo gastrocnêmio; MEC: máxima capacidade de exercício; IA: índice de adiposidade. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por fim, conclui-se que o consumo de dieta hiperlipídica palatável com um teor de 20% de gordura foi eficiente em desenvolver o fenótipo obeso em ratos *Wistar*, através da análise de variáveis como massa corporal total, peso relativo dos depósitos de gordura, índice de adiposidade e análises histológicas, demonstrando que a utilização de dietas com teor lipídico excessivo – como visto em diversos estudos – parece ser muito extremo e desnecessário. Adicionalmente, o presente estudo foi capaz de verificar que uma intervenção dietética baseada em um retorno ao consumo para a dieta padrão (modulando apenas os nutrientes), sem realizar restrições calóricas em quantidade ou de maneira temporal também promoveu adaptações positivas mediante ao quadro de obesidade, como uma redução significativa na massa corporal, área dos adipócitos, na massa relativas dos depósitos de gordura e índice de adiposidade, além de promover uma redução nas concentrações de marcadores inflamatórios no tecido adiposo visceral mesentérico. E isso demonstra que de fato, realizar intervenções dietéticas consideradas extremas e que estejam associadas à baixa aderência do indivíduo, não seja necessária para reduzir alguns dos parâmetros relacionados à obesidade. Além disso a utilização do modelo de treinamento contínuo de moderada intensidade (MICT) foi efetivo em promover adaptações positivas na máxima capacidade de exercício mesmo nos animais obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

Complementarmente, verificamos que a combinação das duas intervenções foi capaz de promover adaptações positivas em todas as variáveis analisadas neste estudo, reduzindo todos os parâmetros relacionados ao excesso de gordura (massa corporal, peso relativo dos tecidos, índice de adiposidade, e adicionalmente a área dos adipócitos), promovendo alterações na máxima capacidade de exercício em maiores magnitudes, além de ser mais efetiva em promover modificações positivas no status inflamatório do tecido adiposo mesentérico (diminuindo IL-6 e TNF- α ; elevando a razão IL-10/ TNF- α). Diferentemente de muitos estudos, demonstramos que a realização de um protocolo de MICT baseado em 3 sessões semanais quando combinado à intervenção dietética seja efetivo em reduzir os efeitos nocivos da obesidade, não sendo necessária a realização de um protocolo de treinamento de 5 vezes por semana.

Dessa forma, demonstramos aqui, que ambas as intervenções – quando combinadas - são efetivas em reduzir alguns dos efeitos deletérios causados pela obesidade, principalmente os conectados à expansão exacerbada do tecido adiposo visceral.

REFERÊNCIAS

AFSHIN, A. *et al.* GBD 2015 Obesity Collaborators: Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **The New England journal of medicine**, v. 377, p. 13–27, 2017.

ALVES, J. M. **Efeitos do treinamento físico sobre adiposidade visceral, tecido adiposo marrom e parâmetros metabólicos de ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica.** 2019. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

ANTUNES, B. M. *et al.* Anti-inflammatory response to acute exercise is related with intensity and physical fitness. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 4, p. 5333-5342, 2018.

AOUICHAT, S. *et al.* Time-Restricted Feeding Improves Body Weight Gain, Lipid Profiles, and Atherogenic Indices in Cafeteria-Diet-Fed Rats: Role of Browning of Inguinal White Adipose Tissue. **Nutrients**. v. 12, n. 8, p. 2185, 2020. 12(8):2185.

BALDUCCI, S. *et al.* Italian Diabetes Exercise Study (IDES) Investigators. Changes in physical fitness predict improvements in modifiable cardiovascular risk factors independently of body weight loss in subjects with type 2 diabetes participating in the Italian Diabetes and Exercise Study (IDES). **Diabetes Care**, v. 35, n.6. p. 1347-1354, 2012.

BATATINHA H. A. P., ROSA NETO, J. C., KRUGER, K. Inflammatory features of obesity and smoke exposure and the immunologic effects of exercise. **Exercise Immunology Review**, n. 25, p. 96-111, 2019.

BRAY, G. A. *et al.* Management of obesity. **Lancet**, v. 387, n. 10031, p. 1947-1956, 2016

BROOKS, G. A.; WHITE, P. exercise. 2018.

CANI, P. D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-1772, 2008.

CHAGAS, E. F. B. *et al.* Effect of Moderate-Intensity Exercise on Inflammatory Markers Among Postmenopausal Women. **Journal of Physical Activity and Health**, v. 14, n. 6, p. 479-485, 2017.

CHEN, C. J. *et al.* Diet-induced obesity accelerates blood lactate accumulation of rats in response to incremental exercise to maximum. **American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 313, n. 6, p. 601-607, 2017.

CHEN, N. *et al.* Effects of treadmill running and rutin on lipolytic signaling pathways and TRPV4 protein expression in the adipose tissue of diet-induced obese mice. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, n. 4, p. 733-742, 2015.

CHOUCHANI, E. T.; KAJIMURA, S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. **Nature Metabolism**, v.1, n. 2, p. 189-200, 2019.

CINTI, S. Adipose Organ Development and Remodeling. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 4, p. 1357-1431, 2018.

COSTA, L. R. *et al.* High-Intensity Interval Training Does Not Change Vaspin and Omentin and Does Not Reduce Visceral Adipose Tissue in Obese Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. February, p. 1–11, 2021.

DAFTARIAN, P. *et al.* IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Immunology**, n. 157, p. 12-20, 1996.

DAMMS-MACHADO, A. *et al.* Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. **American Journal of Clinical Nutrition**, n. 1, p. 127-135, 2017.

DESPRÉS, J. P. *et al.* Abdominal obesity: the cholesterol of the 21st century? **Canadian Journal of Cardiology**, v. 24, p. 7-12, 2008.

DE CASTRO, C. A. *et al.* Experimental type 2 diabetes induction reduces serum vaspin, but not serum omentin, in Wistar rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 1, p. 26-33, 2017.

DÍAZ-URBINA, D. *et al.* Effects of a high-fat diet on behavioral eating patterns. **Acta Colombiana de Psicología**, v. 21, n. 1, p. 106–115, 2018.

DI MEO, S.; IOSSA, S.; VENDITTI, P. *et al.* Improvement of obesity-linked skeletal muscle insulin resistance by strength and endurance training. **The Journal of Endocrinology**, v. 234, n. 3, p. 159-181, 2017.

DUARTE, F. O. *et al.* Caloric restriction and refeeding promoted different metabolic effects in fat depots and impaired dyslipidemic profile in rats. **Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 177–186, 2008.

ENGIN, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 960, p. 1-17, 2017.

ERION, D. M.; SHULMAN, G. I. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 16, n. 4, p. 400-402, 2010.

ESPOSITO, K. *et al.* Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1055-1058, 2003.

ESTADELLA, D. *et al.* Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218–224, 2004.

FEBBRAIO, M. A. Role of interleukins in obesity: implications for metabolic disease. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 25, n. 6, p. 312-129, 2014.

FISCHAR-POSOVSKY, P. *et al.* Targeted deletion of adipocytes by apoptosis leads to adipose tissue recruitment of alternatively activated M2 macrophages. **Endocrinology**, n. 152, p. 3074–3081, 2011.

FUENTES, E. *et al.* Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

FURINO, V. O. *et al.* Dietary Intervention, When Not Associated with Exercise, Upregulates Irisin/FNDC5 While Reducing Visceral Adiposity Markers in Obese Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. August, p. 013298, 2021.

FURINO, V. O. **Modulação de irisina, composição corporal e parâmetros metabólicos em ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica palatável frente ao protocolo de treinamento e/ou intervenção dietética.** 2021. 2015f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.

GALARRAGA, M. *et al.* Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. v. 53, p. 2791–2796, 2012.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY. Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, p. 1–25, 2017.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 129–139, 2010.

GAO, M.; MA, Y.; LIU, D. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.

GONZALEZ-GIL, A. M.; ELIZONDO-MONTEMAYOR, L. The Role of Exercise in the Interplay between Myokines, Hepatokines, Osteokines, Adipokines, and Modulation of Inflammation for Energy Substrate Redistribution and Fat Mass Loss: A Review. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1899, 2020.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P. *et al.* Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 15, n. 3, p. 17034, 2017.

GOPALAN, V. *et al.* A 12-week aerobic exercise intervention results in improved metabolic function and lower adipose tissue and ectopic fat in high-fat diet fed rats. **Bioscience Reports**, v. 41, n.1, p. BSR20201707, 2021.

GOMARASCA, M.; BANFI, G.; LOMBARDI, G. Myokines: The endocrine coupling of skeletal muscle and bone. **Advances in clinical chemistry**, v. 94, p. 155–218, 2020.

GUZIK, T. J. *et al.* The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. **Cardiovascular Research**, v. 113, n. 9, p. 1009–1023, 2017.

HANSSON, B. *et al.* Adipose cell size changes are associated with a drastic actin remodeling. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

HAß, U.; HERPICH, C.; NORMAN, K. Anti-Inflammatory Diets and Fatigue. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2315, 2019.

JAIS, A.; BRÜNING, J. C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 24-32, 2017.

JAYASHREE, B. *et al.* Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 388, n. 1-2, p. 203-210, 2014.

JUGE-AUBRY, C. E. *et al.* Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. **Cytokine**, v. 29, n. 6, p. 270-274, 2005.

JUNG, S. H. *et al.* Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 371-375, 2008.

KAHN, C. R.; WANG, G.; LEE, K. Y. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 10, p. 3990-4000, 2019

KARCZEWSKI, J. *et al.* Obesity and inflammation. **European Cytokine Network**, v. 29, n. 3, p. 83-94, 2018.

KAUR, K. *et al.* Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 41, n. 6, p. 1023-1030, 2006.

KAWANISHI, N. *et al.* Exercise training attenuates neutrophil infiltration and elastase expression in adipose tissue of high-fat-diet-induced obese mice. **Physiology Reports**, v. 3, n. 8, p. 12534, 2015.

KAWANISHI, N. *et al.* Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exercise Immunology Review**, v. 16, p. 105-118, 2010.

KHALAFI, M. *et al.* The Impact of Moderate-Intensity Continuous or High-Intensity Interval Training on Adipogenesis and Browning of Subcutaneous Adipose Tissue in Obese Male Rats. **Nutrients**. v. 12, n. 4., p. 925, 2020. 12(4):925.

KUNSTETTER, A. C. *et al.* Pre-exercise exposure to the treadmill setup changes the cardiovascular and thermoregulatory responses induced by subsequent treadmill running in rats. **Temperature**, v. 5, n. 2, p. 109–122, 2018.

LACERDA, D. R. *et al.* Aerobic training reduces immune cell recruitment and cytokine levels in adipose tissue in obese mice. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, n. 5, p. 512-520. 2019.

- LANG, P. *et al.* Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.
- LEAL, L. G.; LOPES, M. A.; BATISTA, M. L. JR. Physical Exercise-Induced Myokines and Muscle-Adipose Tissue Crosstalk: A Review of Current Knowledge and the Implications for Health and Metabolic Diseases. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 1307, 2018.
- LEE, J.Y. *et al.* Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 16971-16979, 2004.
- LEHNIG, A. C.; DEWAL, R. S.; BAER, L. A. *et al.* Exercise Training Induces Depot-Specific Adaptations to White and Brown Adipose Tissue. **iScience**, v. 11, p. 425-439, 2019.
- LEIGH, S. J.; KENDIG, M. D.; MORRIS, M. J. Palatable western-style cafeteria diet as a reliable method for modeling diet-induced obesity in rodents. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2019, n. 153, p. 1–10, 2019.
- LEONIDOU, L. *et al.* Cytokine production and hospital mortality in patients with sepsis-induced stress hyperglycemia. **Journal of Infection**, v. 55, n. 4, p. 340-346, 2007.
- LIRA, F. S. *et al.* Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF-alpha ratio in rat adipose tissue. **Cytokine**, v. 45, n. 2, p. 80-55, 2009a.
- LIRA, F. S. *et al.* Exercise training decreases adipose tissue inflammation in cachectic rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n. 2, p. 91-98, 2012.
- LIRA, F. S. *et al.* Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: effect of exercise. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, n. 2, p. 70-75, 2009b.
- LODISH, H. *et al.* **Biologia Celular e Molecular**. 14ª Edição. Editora Artmed, 2014.
- LOMBARDI, G.; ZIEMANN, E.; BANFI, G. Physical Activity and Bone Health: What Is the Role of Immune System? A Narrative Review of the Third Way. **Frontiers in Endocrinology (Lausanne)**, v. 10, n. 60, 2019.
- LONGO, V.D.; PANDA, S. Fasting. Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 1048-1059, 2016.
- LOUIS-SYLVESTRE, J.; GIACHETTI, I.; LE MAGNEN, J. Sensory versus dietary factors in cafeteria-induced overweight. **Physiology & behavior**, v. 32, n. 6, p. 901-905, 1964.
- LOWE, D. A. *et al.* Effects of Time-Restricted Eating on Weight Loss and Other Metabolic Parameters in Women and Men with Overweight and Obesity: The TREAT Randomized Clinical Trial. **JAMA Internal Medicine**, v. 180, n. 11, p. 1491-1499, 2020.

MARDARE, C. *et al.* Endurance and Resistance Training Affect High Fat Diet-Induced Increase of Ceramides, Inflammasome Expression, and Systemic Inflammation in Mice. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, n. 4536470, 2016.

MARTINEZ-HUENCHULLAN, S. F. *et al.* Constant-Moderate and High-Intensity Interval Training Have Differential Benefits on Insulin Sensitive Tissues in High-Fat Fed Mice. **Frontiers in Physiology**. v. 10, p. 459, 2019

MILIĆ, S.; LULIĆ, D.; ŠTIMA, C. D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 20, p. 9330-9337, 2012. 2014 7

MILLER, K. N. *et al.* Aging and caloric restriction impact adipose tissue, adiponectin, and circulating lipids. **Aging Cell**, v. 16, n. 3, p. 497–507, 2017.

NGUYEN, M. T., FAVELYUKIS, S., NGUYEN, A. K., *et al.* A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 35279-25292, 2007.

OISHI, J. C. *et al.* Endothelial dysfunction and inflammation precedes elevations in blood pressure induced by a high-fat diet. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, n. 6, p. 558–567, 2018.

PARLEE, S. D. *et al.* Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. **Methods in Enzymology**, v. 537, p. 93–122, 2014.

PEDERSEN, B. K. *et al.* Role of myokines in exercise and metabolism. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 3, p. 1093-1098, 2007.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as medicine - Evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 25, n. 3, p. 1-72, 2015.

PESENTHEINER, A. R.; DUCASA, G. M.; GORDTS, P. Proteoglycans in Obesity-Associated Metabolic Dysfunction and Meta-Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 769, 2020.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology** (1985), v. 90, n. 4., p. 1154-1162, 2005.

POLYSOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. **Minerva Endocrinológica**, v. 42, n. 2, p. 92-108, 2017.

RACHETTI, A. L. F. *et al.* Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 237, n. 1, p. 283–289, 2013.

- REILLY, S. M., SALTIER, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, p. 633-643, 2017.
- RIBERIO, F. M. *et al.* Limited Effects of Low-to-Moderate Aerobic Exercise on the Gut Microbiota of Mice Subjected to a High-Fat Diet. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 149, 2019.
- RIUS, J. *et al.* NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. **Nature**, v. 453, p. 807-811, 2008.
- ROCHA, Guilherme L. *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. **The Scientific World Journal**, v. 2016, 2016.
- ROCHA-RODRIGUES, S. *et al.* Impact of physical exercise on visceral adipose tissue fatty acid profile and inflammation in response to a high-fat diet regimen. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 87, p. 114-124, 2017.
- ROSA-NETO, J. C. *et al.* Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 5, p. 697-704, 2009.
- SAAD, M. J.; SANTOS, A.; PRADA, P. O. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 31, n. 4, p. 283-293, 2016.
- SENE-FIORESE, M. *et al.* Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat diet. **Obesity**, v. 16, n. 10, p. 2217–2222, 2008.
- SHIRVANI, H. *et al.* Swimming exercise improves gene expression of PPAR- γ and downregulates the overexpression of TLR4, MyD88, IL-6, and TNF- α after high-fat diet in rat skeletal muscle cells. **Gene**, v. 775, p.145441, 2021.
- SNEL M, *et al.* Ectopic fat and insulin resistance: pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions. **International Journal of Endocrinology**, v. 2012, p. 983814, 2012.
- SOUZA, R. W. A. *et al.* Differential regulation of cysteine oxidative post-translational modifications in high and low aerobic capacity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.
- STEENBERG, A. *et al.* Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. **Journal of Physiology**, v. 529, p. 237-242, 2000.
- STEENBERG, A. *et al.* IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 2, p. 433–437, 2003.

STERN, J. H.; RUTKOWSKI, J. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. **Cell Metabolism**, n. 23, v. 5, p. 770-784, 2016.

SULEIMAN, J. B.; MOHAMED, M.; BAKAR, A. B. A. A systematic review on different models of inducing obesity in animals: Advantages and limitations. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 7, n. 1, p. 103–114, 2020.

SUN, K., KUSMINSKI, C. M., SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 2084- 2101, 2011.

SUZUKI, K. Chronic Inflammation as an Immunological Abnormality and Effectiveness of Exercise. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 223, 2019.

TAKADA, S. *et al.* Sesamin prevents decline in exercise capacity and impairment of skeletal muscle mitochondrial function in mice with high-fat diet-induced diabetes. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 11, p. 1319-1330, 2015.

TAYLOR, B. A.; PHILLIPS, S. J. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. **Genomics**, v. 34, n. 3, p. 389-398, 1996.

UNANUMO, X. *et al.* Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 9, e. 12997, 2018.

VANGOITSENHOVEN, R. *et al.* At similar weight loss, dietary composition determines the degree of glycemic improvement in diet-induced obese C57BL/6 mice. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–16, 2018.

VERHEGGEN, R. J. H. M. *et al.* A systematic review and meta-analysis on the effects of exercise training versus hypocaloric diet: distinct effects on body weight and visceral adipose tissue. **Obesity Reviews**, v. 17, n. 8, p. 664–690, 2016.

WANG, N. *et al.* High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice. **Life Sciences**. n. 191, p. 122-1311, 2017.

WARWICK, Z. S. Probing the causes of high-fat diet hyperphagia: a mechanistic and behavioral dissection. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 20, n. 1., p. 155-161, 1996.

WEDELL-NEERGAARD, A.S. *et al.* Exercise-Induced Changes in Visceral Adipose Tissue Mass Are Regulated by IL-6 Signaling: A Randomized Controlled Trial. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 844-855, 2019.

WEWEGE, M. *et al.* The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review

and meta-analysis. **Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 18, n. 6, p. 635-646.

WHO. **Obesity and overweight: Fact sheet 2016**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acessado em. 30 ago. 2021.

YAMASHITA, A. S. *et al.* Depot-specific modulation of adipokine levels in rat adipose tissue by diet-induced obesity: the effect of aerobic training and energy restriction. **Cytokine**, v. 55, n. 3, p. 168-174, 2010.

ZAMBON, L. *et al.* Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 5, p. 707-7015, 2009.

ANEXOS

1) PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE IRISINA EM RATOS WISTAR INDUZIDOS A OBESIDADE E FRENTE AO PROTOCOLO DE TREINAMENTO AERÓBICO", protocolada sob o CEUA nº 7631210617, sob a responsabilidade de **Vanessa de Oliveira Furino e equipe; Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte; Carla Roberta de Oliveira Carvalho; Fernanda de Freitas Aníbal** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 18/07/2017.

We certify that the proposal "SERUM CONCENTRATION OF IRISIN IN WISTAR RATS INDUCED OBESITY AND AEROBIC TRAINING PROTOCOL", utilizing 70 Heterogenics rats (70 males), protocol number CEUA 7631210617, under the responsibility of **Vanessa de Oliveira Furino and team; Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte; Carla Roberta de Oliveira Carvalho; Fernanda de Freitas Aníbal** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 07/18/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [01/2018](#) a [07/2018](#)

Área: [Centro de Ciências Biológicas E da Saúde](#)

Origem: [Biotério Central da UFSCar](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [40 a 45 dias](#)

N: [70](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [90 a 100 g](#)

Resumo: A obesidade é uma patologia caracterizada pelo aumento de tecido adiposo determinando uma relação sinérgica entre obesidade e inflamação. As principais citocinas envolvidas nesse processo aumentam as chances de serem desenvolvidas Síndrome Metabólica (SM), resistência insulínica (RI), doenças cardiovasculares (DCV) e diabetes mellitus 2 (DM2). Nesse sentido, ressalta-se a influência do exercício físico que provoca alterações positivas e de correções fisiológicas no músculo e na secreção dos marcadores inflamatórios e reduz o risco de DCV e doenças arteriocoronárias (DAC). Dentre as miocinas secretadas, a irisina além de exercer efeitos benéficos no metabolismo de glicose e lipídios, estimula a termogênese, lipólise e transdiferenciação de adipócitos. Mas, ainda existe na literatura uma lacuna de trabalhos que investiguem o comportamento da irisina frente a obesidade e diabetes. Nesse sentido, o estudo objetiva avaliar o comportamento da produção de irisina durante o desenvolvimento da obesidade e frente ao protocolo de treinamento aeróbico em ratos Wistar. Para tal, ratos machos da linhagem Wistar irão receber dieta hiperlipídica durante 16 semanas. Os grupos serão randomicamente divididos e o grupo exercitado será submetido ao exercício aeróbico por 6 semanas, 3x/semana, em esteira (20m/min) por 60 minutos com intensidade moderada a vigorosa.

Local do experimento: Laboratório de nutrição e metabolismo da Universidade Federal de São Carlos e os ratos permanecerão no biotério do mesmo laboratório localizado no departamento de educação física e motricidade humana

São Carlos, 17 de abril de 2018

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

- 2) **SUBMISSÃO DO ARTIGO:** “Dietary intervention associated with Moderate-Intensity Continuous Training (MICT) promote changes in inflammatory profile in visceral adipose tissue but not in skeletal muscle in diet-induced obese rats” (Costa *et al.*, 2022). Publicado no dia 24/03/2022, DOI: 10.3389/fphys.2022.836484.



Dietary Intervention Associated With Moderate-Intensity Continuous Training Leads to Changes in the Inflammatory Profile in Visceral Adipose Tissue but Not in Skeletal Muscle in Diet-Induced Obese Rats

Jean Lucas Fernandes da Costa^{1*}, Vanessa de Oliveira Furino¹,
Cynthia Aparecida de Castro², João Manoel Alves^{3,4} and
Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte¹

OPEN ACCESS

Edited by:

Giuseppe D'Antona,
University of Pavia, Italy

Reviewed by:

Patricia Chimin,
State University of Londrina, Brazil
Santosh Kumar Maurya,
The Ohio State University,
United States

*Correspondence:

Jean Lucas Fernandes da Costa
je.eanfernandes@hotmail.com

¹ Department of Physical Education and Human Motricity-DEFMH, Biological and Health Sciences Center-CCBS, Federal University of São Carlos-UFSCar, São Carlos, Brazil, ² Department of Morphology and Pathology-Biological and Health Sciences Center-CCBS, Federal University of São Carlos-UFSCar, São Carlos, Brazil, ³ Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ⁴ Center of Research of Inflammatory Diseases, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

This study aimed to determine the concentrations of inflammatory markers in visceral adipose tissue (VAT) and skeletal muscle, and changes in body mass and adipocyte size in diet-induced obese rats after moderate-intensity continuous training (MICT) and/or dietary intervention. After 8 weeks of obesity induction through a high-fat diet (HFD) consumption, twenty diet-induced obese male Wistar rats were divided into four groups