



**Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP**



MARIA FERNANDA CURY RODRIGUES

**INFLAMAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL EM RATAS  
OVARIECTOMIZADAS: EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO E  
DA REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO**

São Carlos-SP

2016

**MARIA FERNANDA CURY RODRIGUES**

**INFLAMAÇÃO NO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL EM RATAS  
OVARIECTOMIZADAS: EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO E  
DA REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas associação ampla UFSCar/UNESP da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas, área de concentração: Ciências Fisiológicas

**Orientador:** Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez

**São Carlos-SP**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R696i Rodrigues, Maria Fernanda Cury  
Inflamação no tecido adiposo visceral em ratas  
ovariectomizadas : efeitos do treinamento resistido  
e da reposição de estrogênio / Maria Fernanda Cury  
Rodrigues. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
81 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2016.

1. Ovariectomia. 2. Treinamento resistido. 3.  
Reposição de estrogênio. 4. Citocinas. 5. Inflamação.  
I. Título.

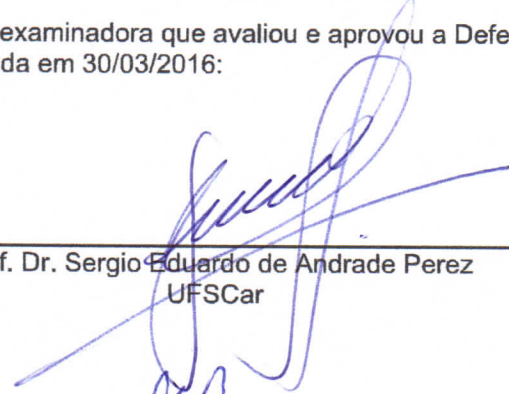


---

**Folha de Aprovação**

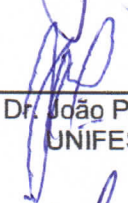
---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Maria Fernanda Cury Rodrigues, realizada em 30/03/2016:



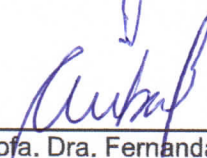
---

Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez  
UFSCar



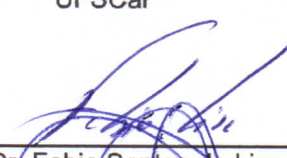
---

Prof. Dr. João Paulo Botero  
UNIFESP



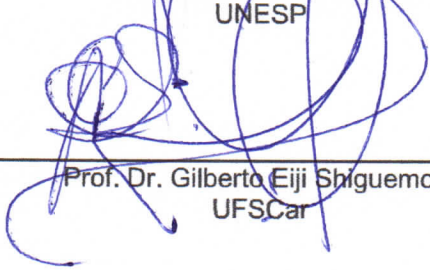
---

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal  
UFSCar



---

Prof. Dr. Fabio Santos de Lira  
UNESP



---

Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto  
UFSCar

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a todas as pessoas que fizeram parte de forma direta ou indireta da construção deste trabalho, especialmente ao meu querido e amado pai Dário Renato Rodrigues, que me ensinou a lutar pela vida e pelos sonhos, minha querida e amada mãe Loren Cury Rodrigues, que me ensinou a ser determinada e vencer todos os obstáculos, minha querida e amada tia Vivinha que sempre me incentivou nos momentos mais difíceis. Sem palavras para agradecer o apoio de vocês.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre guiou meus passos.

A meu pai querido e amado Dário Renato Rodrigues, minha estrela que brilha distante, mas que sempre sinto perto. Esteve e estará comigo em todos os momentos mais importantes me incentivando e inspirando. Meu exemplo de caráter, força e dignidade, que me ensinou a lutar pela vida e pelos sonhos. Sempre em meu coração.

À minha querida e amada mãe Loren Cury Rodrigues, exemplo de força e caráter e que sempre me auxiliou e apoiou nos momentos mais difíceis. Obrigada por ter acreditado em mim! Não tenho palavras para agradecer por todos os conselhos e incentivo.

À querida e amada Tia Vinha, pessoa muito especial e contagiante, que sempre alegrou meus dias e muitas vezes noites de estudo! Sem palavras para agradecer todo carinho e apoio.

Ao querido e saudoso Professor João Carlos Zuin, muito obrigada por ter aberto as portas que me levaram a trilhar na carreira acadêmica que tanto me alegrou e satisfaz.

Às minhas avós Vitória Cury Nassur e Antônia Caruso Rodrigues que tanto me ensinaram e me incentivaram! Saudades dos conselhos e carinho! Sempre em meu coração.

Às minhas queridas e amadas irmãs Renata Maria e Raquel Maria, pela compreensão e amizade! Obrigada pelo apoio e carinho.

Ao meu orientador, Professor Doutor Sérgio Eduardo de Andrade Perez, pelo incentivo e confiança em meu trabalho, por sua disponibilidade em sempre me ajudar, pelos preciosos conhecimentos a mim concedidos. Sou muito grata pelos ensinamentos e amizade.

À Professora Doutora Heloísa Selistre de Araújo, que sempre me apoiou e me deu a oportunidade de trabalhar em um excelente laboratório sob sua supervisão fundamental para a realização desse trabalho. Não tenho como agradecer a confiança, apoio e amizade. Minha eterna gratidão.

Ao Professor Doutor Vilmar Baldissera, minha gratidão por ter compartilhado todo seu conhecimento que foi fundamental para minha maturidade e formação profissional.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular-UFSCar, os meus agradecimentos, especialmente à Sabrina Peviani Messa que contribuiu muito para a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia do Exercício-UFSCar, aos meus companheiros de projeto Mateus Moraes Domingos, Markus Campos, Luciane Magri, Marina

Rodrigues, Gustavo Canevazzi, Fernanda Danieli e Jeferson Teixeira. Sempre aprendi muito com cada um de vocês! Agradeço especialmente à Cristiani Gomes, Natalia Santanielo, Anderson Lino e Fabiano Candido Ferreira que sempre estiveram do meu lado me auxiliando em tudo que precisei! Muito obrigada pelo apoio.

Às pesquisadoras e professoras, Anabele Cornachione, Rafaella Nascimento, Camila Gatto, Kelli Micocci e Daiana Vianna e Graziéle Deriggi Pisani, que sempre com muita disposição e competência me auxiliaram em análises e questões importantes sobre o meu trabalho.

À técnica do Laboratório de Fisiologia do Exercício-UFSCar, Tatiana Passos, pelo incentivo e apoio, pela disponibilidade em ajudar sempre com muita competência e segurança e acima de tudo muito obrigada pela amizade.

À técnica do Laboratório de Nutrição e Esporte-USP, Ivanir Santana de Oliveira Pires, pela disponibilidade e ajuda que foram essenciais para a concretização desse trabalho.

*Muitíssimo obrigada a todos!!!*

*“Se você quer construir um navio, não peça às pessoas que consigam madeira, não dê a elas tarefas e trabalhos. Fale, antes, a elas, longamente, sobre a grandeza e a imensidão do mar”.*

Antoine de Saint-Exupéry



## RESUMO

A ovariectomia associada à diminuição de estrogênio está associada com o aumento na prevalência da obesidade, condição que aumenta o risco de síndrome metabólica. Em mulheres, evidências mostram que a inflamação induzida pela obesidade no tecido adiposo visceral (TAV) promove desregulação na expressão de citocinas inflamatórias. A reposição de estrogênio (RE) e o treinamento resistido (TR) possuem efeitos benéficos em mulheres pós menopausadas, porém não se sabe se estas intervenções são eficazes em minimizar a inflamação no TAV. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do TR e da RE em marcadores pró e anti-inflamatórios no tecido adiposo branco visceral mesentérico de ratas ovariectomizadas. Ratas fêmeas Sprague-Dowley foram divididas em 6 grupos: Sham-Sedentárias (Sham-Sed), Ovariectomizadas- Sedentárias (Ovx-Sed), Sham-Treinadas (Sham-TR), Ovx-TR, Ovx-Sed-RE e Ovx-TR-RE. A RE foi feita por meio de cápsulas silásticas, contendo  $17\beta$ -estradiol. O TR exigiu que os animais escalassem uma escada vertical de 1,1m com frascos cônicos contendo pesos atados em suas caudas e teve duração de 12 semanas. A morfologia foi avaliada por análise histológica. A expressão gênica foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase- Tempo Real (PCR-RT) e a concentração proteica por ensaios Multiplex/Luminex. A ovariectomia aumentou o tamanho do adipócito e reduziu a expressão de moléculas anti-inflamatórias no TAV, que foi restaurada parcialmente pela RE. Por sua vez, o TR, foi capaz de minimizar o aumento da inflamação no TAV das ratas Ovx. Concluímos que a RE, bem como o TR foram eficazes em atenuar a inflamação promovida pela Ovx no TAV.

**Palavras chave:** ovariectomia, treinamento resistido, reposição de estrogênio, citocinas, inflamação.

## ABSTRACT

The ovariectomy associated with decreased estrogen is associated with increased prevalence of obesity, a condition that increases the risk of metabolic syndrome. Evidence shows that inflammation-induced obesity in visceral adipose tissue (VAT) promotes deregulation in the expression of inflammatory cytokines. Hormone replacement (HR) and resistance training (RT) have beneficial effects on postmenopausal women, but it is unclear whether these interventions are effective in minimizing inflammation in VAT. The aim of this study was to evaluate the effects of RT and ER in adipocyte size, gene expression and protein concentration of inflammatory markers. Rats Sprague-Dowley females were divided into six groups: Sham-Sedentary (Sham-Sed), Ovariectomized Sedentary (Ovx-Sed), Sham-Trained (Sham-TR), Ovx-TR, Ovx-Sed-ER and Ovx-TR-ER. The ER was performed using Silastic<sup>®</sup> capsules. During the 12-week RT, the animals climbed a ladder with weights attached to the tails. The morphology was confirmed by histological analysis. The gene expression was performed by RT-PCR and protein concentration by Multiplex / Luminex assays. Ovariectomy increased adipocyte size and decreased expression of anti-inflammatory molecules in TAV, which was partially restored by RE. In turn, TR, was able to minimize the increase in inflammation in TAV of Ovx rats. We conclude that ER and TR were effective in alleviating inflammation promoted by Ovx in TAV.

**Keywords:** ovariectomy, resistance training, estrogen replacement, cytokines, inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Esquema que repretenta os tipos de obesidade.....	15
9	
<b>Figura 02.</b> Infiltração de macrófagos pró-inflamatórios M1 no tecido adiposo.....	19
<b>Figura 03.</b> Adipocinas secretadas pelo tecido adiposo.....	20
<b>Figura 04.</b> Recrutamento de macrófagos no tecido inflamado.....	25
<b>Figura 05.</b> Via de sinalização do TLR4.....	26
<b>Figura 06.</b> Modelo esquemático dos efeitos do exercício sobre a expressão de adipocinas no tecido adiposo branco (TAB).....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AGL:** Ácidos Graxos Livres
- EH:** Esteatose hepática não alcoólica
- EROS:** Espécies reativas de oxigênio
- IL-6:** Interleucina-6
- IL-8:** Interleucina-8
- IL-10:** Interleucina-10
- IL-12:** Interleucina-12
- IL-18:** Interleucina-18
- LPS:** Lipopolissacarídeos
- MCP-1:** Proteína quimioatraente de monócito-1
- NF-  $\kappa$ B:** Fator nuclear Kappa B
- OVX:** ovariectomia
- PCR:** Proteína-C-reativa
- TA:** Tecido adiposo
- TAG:** Triacilglicerol
- TNF $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa
- TAM:** Tecido adiposo marrom
- TAB:** Tecido adiposo branco
- TABV:** Tecido adiposo branco visceral
- TGF- $\beta$ :** Fator transformador de crescimento - $\beta$
- TLRs:** Receptores semelhantes ao *toll*
- TLR4:** Receptor semelhante ao *toll*- 4
- TR:** treinamento resistido
- RE:** Reposição de estrogênio
- RH:** Reposição hormonal

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>12</b>
1.1 Menopausa e deficiência de estrogênio.....	12
1.2 Obesidade na menopausa.....	14
1.3 Tecido adiposo.....	16
1.4 Inflamação crônica de baixo grau.....	17
1.5 Adipocinas.....	20
1.5.1 TNF- $\alpha$ .....	21
1.5.2 Adiponectina.....	22
1.5.3 IL-6.....	22
1.5.4 IL-10.....	23
1.5.5 MCP-1.....	23
1.6 Via TLR4/NF- $\kappa$ B.....	24
1.7 Exercício Físico no controle da Inflamação.....	26
1.8 Treinamento Resistido no controle da inflamação.....	28
1.9 Reposição Hormonal no controle da inflamação.....	30
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>33</b>
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
<b>3. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>34</b>
<b>4. Manuscrito.....</b>	<b>42</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Menopausa e deficiência de estrogênio

O aumento da expectativa média de vida entre as mulheres nas últimas décadas tem sido o motivo principal da maior atenção dada para os aspectos envolvendo o período do climatério (WHO, 1990). A menopausa está associada a um declínio natural de estrogênio e por definição compreende a ausência permanente da menstruação por 12 meses consecutivos e a idade média para ocorrência da menopausa natural ocorre em torno de 50 anos (BURGER et al, 2002).

O termo perimenopausa inclui o período que antecede a menopausa (quando os sintomas endocrinológicos, biológicos e clínicos da menopausa se iniciam) e o primeiro ano após a menopausa. (WHO, 1990). A pós-menopausa envolve os estágios precoce e tardio. O estágio pós-menopáusico precoce inclui os cinco primeiros anos depois do último sangramento menstrual e a menopausa tardia, os anos posteriores (VIEIRA et al, 2012). O diagnóstico do climatério, particularmente a identificação da perimenopausa e do estado menopáusico, é essencialmente clínico (WHO, 1990; BURGER et al, 2002). Esses sintomas incluem fogachos e sudorese diurna e noturna, palpitações, insônia, depressão, ansiedade, irritabilidade, redução da libido, astenia, redução da memória, dificuldade de concentração (WOODS; MITCHELL, 2005).

Além disso, o período pós-menopáusico é caracterizado por intensas modificações hormonais, principalmente a diminuição na concentração de estrogênio (MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009). Além do papel clássico na reprodução, estrogênios regulam vias metabólicas incluindo a função e biogênese mitocondrial, transporte e oxidação de ácidos graxos, lipogênese e lipólise (JACKSON et al, 2013; VELARDE, 2013). O declínio e a eventual diminuição de estrogênio circulante especificamente 17- $\beta$ -estradiol, está associado ao acúmulo de gordura na região visceral, redução na oxidação lipídica, redução da secreção e da sensibilidade à ação da insulina, hiperinsulinemia compensatória e marcadores inflamatórios elevados tanto no tecido adiposo, bem como no fígado (ROGERS et al, 2009; MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; FERRARA et al, 2002).

Estudos prévios mostram que a deficiência de estrogênio aumenta o desenvolvimento de síndrome metabólica predispondo à, aterosclerose, esteatose hepática não alcoólica (EH), diabetes tipo 2 e obesidade (DOS REIS et al, 2003; SCHUSTER, 2010;

CARR et al, 2004). A mulher na pós-menopausa tem maior propensão a desenvolver adiposidade abdominal que está associada a concentrações sistêmicas aumentadas de citocinas inflamatórias, indicando que o estrogênio pode modular tanto a adiposidade corporal, bem como a inflamação sistêmica (SKURK et al, 2007).

O TA possui uma grande plasticidade, devido a sua rápida habilidade de se expandir ou de se reduzir. Tanto a hiperplasia quanto a hipertrofia dos adipócitos podem contribuir para a expansão do TA. Entretanto, a hipertrofia ocorre antes da hiperplasia para atender a necessidade de um maior estoque de gordura que ocorre com a progressão da obesidade (JO et al, 2009). Além disso, existe distinção entre uma expansão saudável e uma expansão patológica do tecido. A expansão saudável é o aumento da massa de gordura por meio do recrutamento de células precursoras que se diferenciam em pequenos adipócitos associados ao recrutamento de células estromais com subsequente vascularização, mínima indução da matriz extracelular (MEC) e mínima inflamação (SUN et al, 2011). Por outro lado, na expansão patológica do TA ocorre rápido crescimento da massa de gordura por meio do alargamento de células de gordura existentes, alto grau de infiltração de macrófagos M1, menor desenvolvimento de vasos sanguíneos e fibrose (SUN et al, 2011).

Há evidências que mulheres na pós-menopausa possuem maiores adipócitos (SKURK et al, 2007) e que a atividade lipolítica destes está aumentada, o que explicaria a maior concentração sistêmica de ácidos graxos livres (AGL) nestas mulheres (MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009). No fígado, a entrada aumentada de AGL pode promover esgotamento da oxidação mitocondrial, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo hepático. A peroxidação lipídica aumentada leva à produção de produtos intermediários pró-inflamatórios, favorecendo a fibrogênese. Além disso, o acúmulo de AGL no fígado, resulta em um ambiente inflamatório que predispõe o desenvolvimento de doenças como EH. (MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; SCHUSTER, 2010).

Os animais ovariectomizados são usados para investigar os mecanismos responsáveis pelas complicações relacionadas à menopausa em humanos (TURNER, 2001). A indução da ovariectomia (OVX) não reflete o processo da pós-menopausa tal como ocorre naturalmente, pois este é um processo longo e gradual em que a secreção de estrogênio não cessa abruptamente. Entretanto, a OVX possui uma grande aplicabilidade por conseguir em um curto período de tempo a maioria das características desejadas que se instalam pela deficiência de estrogênio (ROGERS et al, 2009; JACKSON et al, 2013; SKURK et al, 2007).

Portanto, inúmeros estudos utilizam ratas ovariectomizadas para investigar o efeito da deficiência de estrogênio no perfil metabólico e inflamatório, dentre outras

alterações (ROGERS et al, 2009; JACKSON et al, 2013). Neste contexto, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a OVX induziu aumento do conteúdo lipídico no fígado, músculos esqueléticos, coração e depósitos de gordura, bem como mudanças negativas no perfil lipídico, aumento do estresse oxidativo e alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico hepático (LEITE et al, 2009; RODRIGUES et al, 2013; STOTZER et al, 2015). Adicionalmente, evidências mostram que a OVX associada ao aumento da adiposidade promove aumento de quimioatraentes tais como proteína quimioatraente de monócito-1 (MCP-1) e RANTES, levando ao acúmulo de macrófagos M1 pró-inflamatórios no tecido adiposo. Por sua vez, este aumento promove um *up-regulation* de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6) culminando no desenvolvimento de resistência insulínica (ROGERS et al, 2009). Em um estudo conduzido por Vieira et al (2012), foi encontrado aumento de expressão gênica de IL12p40 e IFN- $\gamma$  e diminuição de arginase-1 no tecido adiposo abdominal. Este fenótipo inflamatório M1 encontrado nesses animais, sugere que alguns distúrbios metabólicos como a resistência insulínica podem ocorrer durante a menopausa, mesmo quando a obesidade não está presente.

## 1.2 Obesidade na menopausa

Atualmente, a obesidade, é considerada um dos principais problemas de saúde pública, constituindo-se epidemia mundial responsável por aumento substancial da morbimortalidade (WHO, 2015). Segundo a *World Health Organization*, o número de pessoas obesas praticamente dobrou desde 1980, sendo que 1,4 bilhões de pessoas estavam acima do peso em 2008 (WHO, 2015). Em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos, com 18 anos ou mais velhos, estavam acima do peso. Destes mais de 600 milhões eram obesos. Em 2014, 39% dos adultos com 18 anos ou com idade superior estavam acima do peso e 13% eram obesos. Em 2013, 42 milhões de crianças menores de 5 anos de idade estavam acima do peso ou obesos (WHO, 2015). Sendo assim, o excesso de peso tem aumentado de forma gradativa em todas as faixas etárias e está associado a algumas doenças crônico-degenerativas (ASHWELL et al, 1982; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

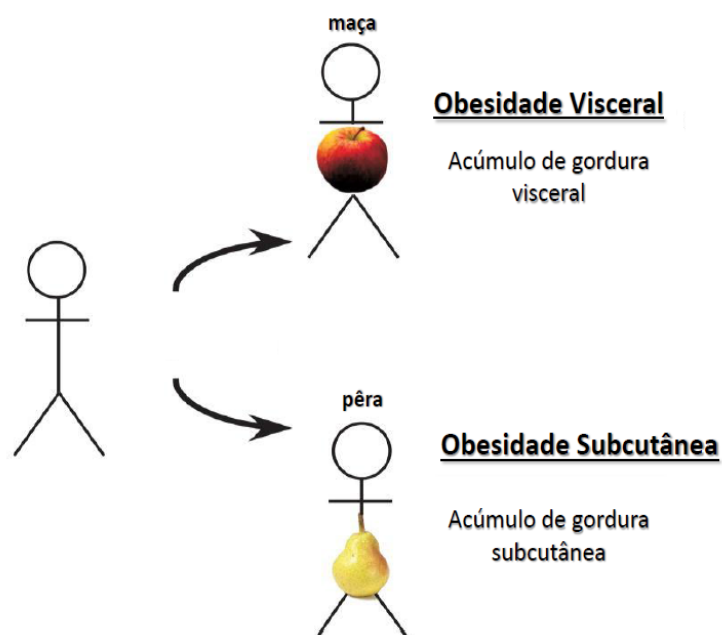
Na menopausa é frequente o aumento da massa corporal e modificações na distribuição de gordura (FERRARA et al, 2002; DOS REIS et al, 2003). No Brasil, a prevalência de sobrepeso e obesidade, (índice de massa corporal maior ou igual a 25 kg/m<sup>2</sup>) aumenta com a idade em mulheres, sendo de 37,85% na faixa etária de 30 a 44 anos e de 55% em mulheres entre 45 a 64 anos (WHO, 2015).



A etiologia da obesidade é bastante complexa, envolvendo uma gama de fatores, como históricos, políticos, biológicos, culturais, psicossocial e socioeconômicos (WHO, 2003; KOLOTKIN et al, 2001). A obesidade pode ser definida como o grau exacerbado de armazenamento de gordura no organismo associado a riscos para a saúde, devido a sua relação com várias complicações metabólicas (WHO, 1998). O determinante mais imediato do acúmulo excessivo de gordura e, por consequência, da obesidade, é o balanço energético positivo que pode ser definido como a diferença entre a quantidade de energia consumida e a quantidade de energia gasta na realização das funções vitais e de atividades em geral. Pode tornar-se positivo quando a quantidade de energia consumida é maior do que a quantidade gasta, resultando em ganho de peso (KOLOTKIN et al, 2001).

Além do grau do excesso de gordura, a sua distribuição regional no corpo são determinantes nos riscos relacionados ao excesso de peso (PALLOTTINI et al, 2008; ROGERS et al, 2009). O excesso de gordura abdominal representa maior risco do que o excesso de gordura corporal por si só. Essa condição é denominada de obesidade visceral (Fig1), ao passo que a distribuição periférica é denominada como obesidade subcutânea (Fig1), com menores implicações à saúde do indivíduo (ASHWELL et al, 1982). O aumento da obesidade entre as mulheres na pós-menopausa, principalmente a obesidade central (TOTH et al, 2000), constitui-se como fator de risco para enfermidades como dislipidemias, doenças cardiovasculares e diabetes melito tipo II (ROGERS et al, 2009).

**Figura 1 – Esquema que representa os tipos de obesidade**



### 1.3 Tecido adiposo

O tecido adiposo (TA) em um indivíduo normal representa cerca de 20% da massa corporal, (8-18% nos homens e 14-28% nas mulheres), sendo considerado como um dos maiores órgãos do corpo humano (CINTI, 1999). O TA é constituído por adipócitos, células que são especializadas no armazenamento de lipídeos na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma, sem comprometimento da integridade funcional (SAELY; GEIGER; DREXEL, 2012; CINTI, 1999). Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras para sintetizar ácidos graxos (lipogênese), estocar TAG em períodos de oferta abundante de energia e mobilizá-los quando há déficit calórico (lipólise) (AHIMA; FLIER, 2000).

Histologicamente, o TA além de adipócitos, é composto por pré-adipócitos (células precursoras de adipócitos), células endoteliais (que formam uma extensiva vasculatura), fibroblastos, pericitos (células mesenquimais que podem se tornar adipócitos), células do sistema imunológico (macrófagos e células T) (SAELY; GEIGER; DREXEL, 2012; KERN et al, 2001). Na visão clássica, o TA era reconhecido como reservatório passivo de energia. Entretanto, em 1994, com a descoberta da leptina, um hormônio produzido pelo tecido adiposo, passa-se a aceitar definitivamente o tecido adiposo como órgão endócrino metabolicamente ativo responsável pela secreção de várias substâncias chamadas de adipocinas dentre as quais, a adiponectina, leptina, resistina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), MCP-1, interleucina-6 (IL-6) entre outros (PRINS, 2002; FANTUZZI, 2005).

O TA é subdivido em tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). O TAB é localizado periféricamente nas regiões subcutânea e visceral e armazena energia na forma de triacilglicerol participando da regulação do balanço energético (FANTUZZI, 2005). De modo geral o tecido adiposo branco visceral (TABV), ou omental, é o mais ativo, ou seja, o mais sensível à lipólise via catecolaminas e  $\beta$ -adrenorreceptores, e o mais resistente à ação da insulina, liberando maior concentração de AGL, diretamente na veia porta hepática (SAELY; GEIGER; DREXEL, 2012; CINTI, 1999). O TABV, secreta maiores concentrações de adipocinas relacionadas à processos pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , angiotensina-I, resistina, IL-6 (TRZECIAK-RYCZEK, 2011). O acúmulo de tecido adiposo e o aumento da inflamação estão relacionados ao aumento na incidência de algumas doenças, tais como diabetes tipo II, hipertensão arterial, alguns tipos de câncer e alterações hepáticas (KERN et al, 2001).

Por sua vez, o TAM não é apenas encontrado em recém-nascidos como se acreditava anteriormente, concluindo que uma fração de adultos possui o TAM ativo (SAELY; GEIGER; DREXEL, 2012). Este tecido possui ação termogênica e é regulado pelo sistema nervoso simpático. Diferentemente do adipócito branco que possui um diâmetro médio de 90-100  $\mu\text{m}$  e armazena triacilglicerol em uma única e grande gota lipídica ocupando 85-90% do citoplasma, o adipócito marrom é uma célula menor e atinge em média 60  $\mu\text{m}$  de diâmetro, possui várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos, citoplasma relativamente abundante, núcleo esférico e um número grande de mitocôndrias (AHIMA; FLIER, 2000).

As células do TAM, não possuem o complexo enzimático necessário para a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e utilizam a energia liberada pela oxidação de metabólitos, principalmente ácidos graxos, para gerar calor (TIMMONS; PEDERSEN, 2009). Esse processo ocorre porque a proteína desacopladora-1 (UCP-1), uma proteína da membrana mitocondrial interna do adipócito marrom, atua como um canal de próton (TIMMONS; PEDERSEN, 2009) levando à interrupção do fluxo de elétrons da cadeia respiratória ou fosforilação oxidativa, resultando em geração de calor ao invés de ATP. Devido ao fato da UCP-1 funcionar consumindo os estoques de energia e liberando calor, surgiram grandes perspectivas em relação ao seu possível papel na etiologia da obesidade (VIRTANEN; LIDELL, 2009).

#### **1.4 Inflamação crônica de baixo grau**

A inflamação é uma resposta biológica dos tecidos vivos vascularizados à injúria local. Esta resposta do organismo a um estímulo lesivo (físico, químico ou biológico), pode ser considerada como um mecanismo de defesa que atua no controle local da lesão pelo aumento do metabolismo basal e por uma resposta rápida do sistema imunológico que geralmente promove resolução do quadro inflamatório (MEDZHITOV, 2008). A resposta inflamatória inclui a participação de diversos tipos de células, como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, células endoteliais e fibroblastos (TRAYHURN; WOOD, 2004; MEDZHITOV, 2008).

A resposta inflamatória que ocorre na obesidade é de natureza diferente ao paradigma clássico. Nesse caso, o fator que desencadeia a inflamação é o consumo excessivo de nutrientes o que leva ao aumento no tamanho do adipócito (hipertrofia), bem como do seu número (hiperplasia) (SKURK et al, 2007; TRAYHURN; WOOD, 2004). A adipogênese

observada está relacionada com a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros que secretam adipocinas, as quais possuem efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos (TRAYHURN; WOOD, 2004; STRISSEL et al, 2007).

Quando ocorre aumento da adiposidade corporal, uma desregulação na expressão gênica e secreção de adipocinas são observadas, resultando em disfunções metabólicas associadas à obesidade, tais como hipertensão, diabetes, dislipidemias (VIRTANEN; LIDELL, 2009; YAMAUCHI et al, 2002). A inflamação parece estar associada à etiologia destas doenças e o desenvolvimento de um estado inflamatório crônico de baixo grau é considerado um fator de risco para estas doenças (TRAYHURN; WOOD, 2004; HAUNER, 2005).

O processo de quimiotaxia é extremamente importante para recrutar as células ao local da inflamação. Os macrófagos possuem um papel vital nas diversas fases da resposta inflamatória (GORDON, 2001). Dentre suas funções está sua capacidade em fagocitar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T, angiogênese, remover fragmentos necróticos e reparo tecidual (ABBAS; JANEWA; Ç.A, 2000). Essas células secretam uma série de citocinas tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, Interleucina-10 (IL-10), Interleucina-12 (IL-12). Fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Interleucina-1 (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-18 (IL-18), espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre outras (TRAYHURN; WOOD, 2004), (HAUNER, 2005).

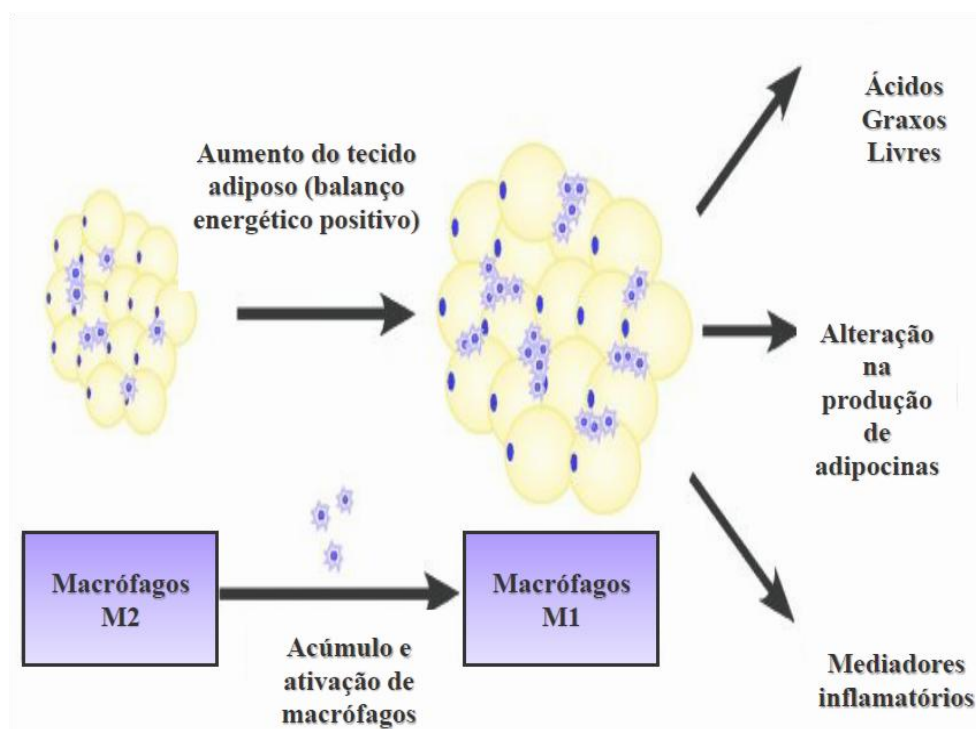
Os macrófagos iniciam a resposta imune por meio do reconhecimento de padrões moleculares, encontrados geralmente na superfície de microorganismos dentre eles os receptores transmembrânicos chamados de receptores *toll-like* (TLRs) (JACOBI; STANYA; LEE, 2012). Além disso, indivíduos obesos possuem uma concentração elevada na circulação de marcadores inflamatórios tais como Proteína C-Reativa (PCR), TNF- $\alpha$  e IL-6 (VIRTANEN; LIDELL, 2009; KERN et al, 2001).

No entanto, o tecido adiposo é uma fonte abundante de fatores anti-inflamatórios (JUGE-AUBRY et al, 2005). A adiponectina que é exclusivamente produzida pelo adipócito, é considerada uma adipocina que exerce proteção contra a aterosclerose e diabetes (YAMAUCHI et al, 2002). Em indivíduos obesos as concentrações de adiponectina estão reduzidas (ARITA et al, 1999). Estudos mostram que a hipoadiponectinemia está intimamente associada à resistência insulínica (WEYER et al, 2001). Já foi identificada também a liberação de IL-10 pelo tecido adiposo (JUGE-AUBRY et al, 2005) e estudos clínicos mostram uma estreita relação entre diminuição na concentração de IL-10 em mulheres obesas e a prevalência de síndrome metabólica (ESPOSITO et al, 2003).

Estudos demonstram que a hipertrofia dos adipócitos é o principal mecanismo para a expansão do tecido adiposo durante o desenvolvimento da obesidade (SKURK et al, 2007). Acredita-se também que com a hipertrofia nos adipócitos ocorra compressão dos vasos sanguíneos do TAB determinando um suprimento de oxigênio inadequado. Este quadro de hipóxia local pode levar à morte de alguns adipócitos estimulando a quimiotaxia de macrófagos e aumentando a expressão de genes pró-inflamatórios e de EROs (SKURK et al, 2007; HOTAMISLIGIL, 2006). Além disso, adipócitos hipertrofiados com grandes estoques de triglicérides possuem uma alta taxa lipolítica produzindo menos adiponectina (DYCK, 2009).

Outros trabalhos mostram que o tecido adiposo do obeso é caracterizado pela infiltração aumentada de macrófagos, o que representa uma importante fonte de inflamação nesse tecido (ROGERS et al, 2009). A polarização de macrófagos para os subtipos classicamente ativados (M1) ou alternativamente ativados (M2) (Fig 2), dentro do tecido adiposo determina o aumento do mesmo em modelos de obesidade (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). A obesidade induzida por dieta hiperlipídica aumenta a população de macrófagos M1 que produz  $TNF-\alpha$ , IL-6 e óxido nítrico. Em contrapartida, macrófagos M2 produzem citocinas anti-inflamatórias e arginase (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

**Figura 2** – Infiltração de macrófagos pró-inflamatórios M1 no tecido adiposo



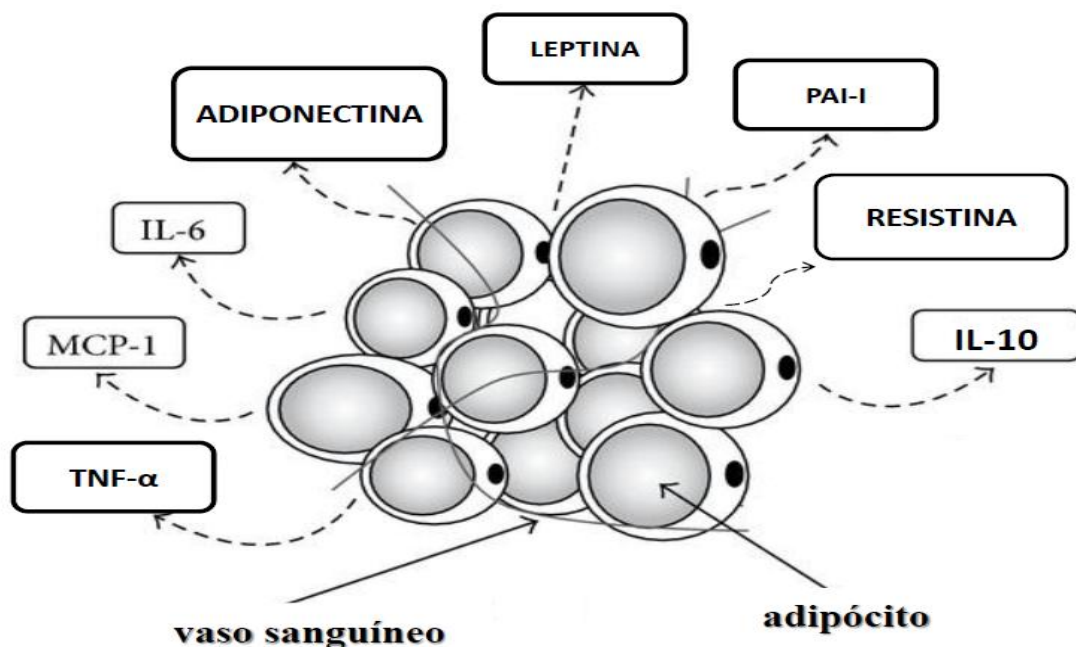
Fonte: adaptado de Jacobi et al, 2012.

Em ratos obesos é observada a presença predominantemente de macrófagos M1, principalmente como estruturas *cross-like* em torno de adipócitos que estão sofrendo apoptose (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). Adicionalmente, a análise temporal do tecido adiposo em obesos, revelou que o recrutamento de macrófagos M1 coincide com o aparecimento de adipócitos necróticos e o aparecimento da resistência insulínica (STRISSEL et al, 2007). Portanto, os macrófagos M1 induzem estados inflamatórios crônicos, e os M2 são considerados reguladores negativos desse processo (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

### 1.5 Adipocinas

As adipocinas são moléculas biologicamente ativas sintetizadas e secretadas pelo tecido adiposo (TRAYHURN; BEATTIE, 2001). As principais categorias funcionais das adipocinas encontram-se resumidas na (Fig 3). A diversidade das adipocinas tanto em termos de estrutura e função é considerável (TRAYHURN; BEATTIE, 2001).

**Figura 3** – Adipocinas secretadas pelo tecido adiposo



Fonte: adaptado de Sakurai et al., 2013.

O grupo inclui citocinas clássicas (ex., TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8), fatores de crescimento (ex., TGF- $\beta$ ), proteínas do sistema de complemento alternativo (ex., adiposina). O

grupo também inclui proteínas envolvendo a homeostase vascular (ex., inibidor do ativador de plasminogênio), da regulação da pressão sanguínea (ex., angiotensinogênio), homeostase da glicose (ex., adiponectina, resistina), angiogênese (fator de crescimento endotelial vascular), dentre outras (TRAYHURN; BEATTIE, 2001; TRAYHURN; WOOD, 2004). Sendo assim, em função da variedade de proteínas e fatores já identificados, o tecido adiposo branco é considerado um órgão endócrino de grande complexidade altamente integrado com sistemas de controle fisiológicos e metabólicos (TRAYHURN; WOOD, 2004).

### **1.5.1 TNF-alfa**

O TNF- alfa (TNF- $\alpha$ ) descoberto em 1975 é considerado uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diversas partes do corpo. Ele é secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos, sendo a presença de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos o principal estímulo para que isto ocorra (PRINS, 2002; TRAYHURN; WOOD, 2004). Weisberg et al. 2003, demonstraram que macrófagos da fração vascular estromal, são as principais fontes de TNF- $\alpha$  e que o aumento desta citocina na obesidade ocorre pela infiltração aumentada de M1 no tecido adiposo.

O TNF- $\alpha$  originalmente foi caracterizado como um fator indutor de caquexia (KAWAKAMI; PEKALA; LANE, 1982). Entretanto, a expressão de TNF- $\alpha$  está aumentada no tecido adiposo de indivíduos obesos (KAHN; FLIER, 2000). Sendo assim, altas concentrações desta adipocina na obesidade podem parecer paradoxais. No entanto, haja vista que tanto a caquexia bem como a obesidade são doenças inflamatórias, é compreensível o aumento da concentração de TNF- $\alpha$  em ambas as condições. Alguns estudos demonstraram que sua concentração plasmática possui correlação positiva com a obesidade e resistência insulínica por meio da fosforilação em serina do receptor de insulina, podendo inibir a sinalização insulínica (PRINS, 2002). Além disso, o tratamento crônico com TNF- $\alpha$  mostrou diminuir o estímulo da insulina e captação de glicose no músculo esquelético (PRINS, 2002). No tecido adiposo, o TNF- $\alpha$  diminui a expressão gênica de genes envolvidos na captação e armazenamento de ácidos graxos livres e glicose, inibe a lipogênese, aumenta a expressão de IL-6 e diminui a de adiponectina (TRAYHURN; WOOD, 2004; RAJALA; SCHERER, 2003).

### 1.5.2 Adiponectina

A adiponectina é uma adipocina produzida exclusivamente pelo tecido adiposo e possui diversas particularidades que a distinguem de outras adipocinas (WULSTER-RADCLIFFE et al, 2004). Os níveis de adipocinas circulantes estão diminuídos no indivíduo obeso, em diabéticos tipo II e pacientes com doença cardíaca coronariana (FANTUZZI, 2005). Possui várias ações benéficas, com efeitos metabólicos anti-inflamatórios e antiaterogênicos (FANTUZZI, 2005). Os efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênicos se devem principalmente pela redução da expressão de TNF- $\alpha$ , diminuição da quimiotaxia de macrófagos, aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, inibição da adesão de monócitos, aumento da produção de óxido nítrico, estimulação da angiogênese, inibição na produção de IL-6 e supressão da atividade da resistina que tem efeitos pró-inflamatórios (FANTUZZI, 2005; ABU-TAHA et al, 2009). A maior parte desses efeitos pode ser explicada pela inibição da atividade do fator nuclear Kappa B (NF-kB) (WULSTER-RADCLIFFE et al, 2004) que medeia as respostas imunes e inflamatórias e é regulado por uma família de proteínas inibidoras IKB. Na sua forma inativa, o NF-kB reside no citoplasma ligado à proteína inibitória Ikb $\alpha$  que deve ser fosforilada e degradada para liberar a atividade de NF- kB. O NF- kB ativado se transloca para o núcleo e induz a transcrição de inúmeros genes que medeiam diversos processador celulares, dentre eles a imunidade e inflamação.

Além disso, O TNF- $\alpha$  que está aumentado no tecido adiposo de indivíduos obesos pode exercer um *downregulation* na produção de adiponectina (WANG et al, 2004). Por outro lado, a adiponectina reduz a produção e a atividade de TNF- $\alpha$  (MASAKI et al, 2004). Os efeitos metabólicos se devem à melhora da sensibilidade insulínica, redução da secreção de glicose no fígado e aumento da captação de glicose. Observa-se também que os níveis de adiponectina são inversamente proporcionais à resistência insulínica (FANTUZZI, 2005), (MASAKI et al, 2004).

### 1.5.3 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina multipotente produzida por muitos tipos de células (células endoteliais, fibroblastos, monócitos), e muitos tecidos incluindo o tecido adiposo (FANTUZZI. G, 2005). Entretanto, no tecido adiposo, a maior quantidade de IL-6 não é produzida pelo adipócito maduro, mas pelas células da fração estromal vascular incluindo pré-adipócitos, células endoteliais e macrófagos. Possui uma variedade de funções como



regulação da hematopoiese, resposta imune e inflamatória. Semelhante ao TNF- $\alpha$ , a IL-6 está correlacionada à obesidade e à resistência insulínica (SPRANGER et al, 2003). A sua concentração plasmática está aumentada em obesos e diminuem com a perda de peso (COTTAM et al, 2004). A depleção de IL-6 em ratos obesos mostrou uma melhora da ação insulínica hepática, enquanto a infusão de IL-6 promoveu resistência insulínica no fígado de ratas (KLOVER et al, 2003). Tem sido estimado que o tecido adiposo branco é responsável por cerca de 30% da circulação de IL-6, com o tecido adiposo visceral produzindo níveis mais elevados se comparado ao subcutâneo (FRIED; BUNKIN; GREENBERG, 1998). Ambos, adipócitos e macrófagos contribuem para a síntese de IL-6 pelo tecido adiposo. Em indivíduos obesos, os níveis elevados de IL-6 estão relacionados com o aumento de proteínas de fase aguda, tal como PCR (FANTUZZI, 2005).

#### **1.5.4 Interleucina 10 (IL-10)**

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel crucial na modulação da resposta imunológica inata quanto adquirida, inibindo a atividade de macrófagos, linfócitos e a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6 (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2009). Além disso, concentrações diminuídas de IL-10 estão associados com a síndrome metabólica (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2009). ESPOSITO et al, (2003), demonstraram concentrações circulantes de IL-10 elevados em mulheres obesas e concluíram que isto se deu provavelmente como uma tentativa do organismo em inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ . (ESPOSITO et al, 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que a adiponectina induz a expressão de IL-10 em macrófagos de humanos (KUMADA et al, 2004) e que os efeitos anti-aterogênicos de adiponectina são mediados pela IL-10 (NISHIDA et al, 2007).

#### **1.5.5 MCP-1**

Proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP-1) são expressas e secretadas no TAB e estão aumentadas na obesidade (KANDA et al, 2006). São predominantemente produzidas por macrófagos e células endoteliais e possuem características quimioatrativas, atraindo monócitos, que, por sua vez, se diferenciam em macrófagos (WEISBERG et al, 2006). Os macrófagos aumentam a síntese e secreção de proteínas como TNF- $\alpha$  e IL-6 favorecendo a resposta inflamatória e a resistência insulínica (SARTIPY; LOSKUTOFF,

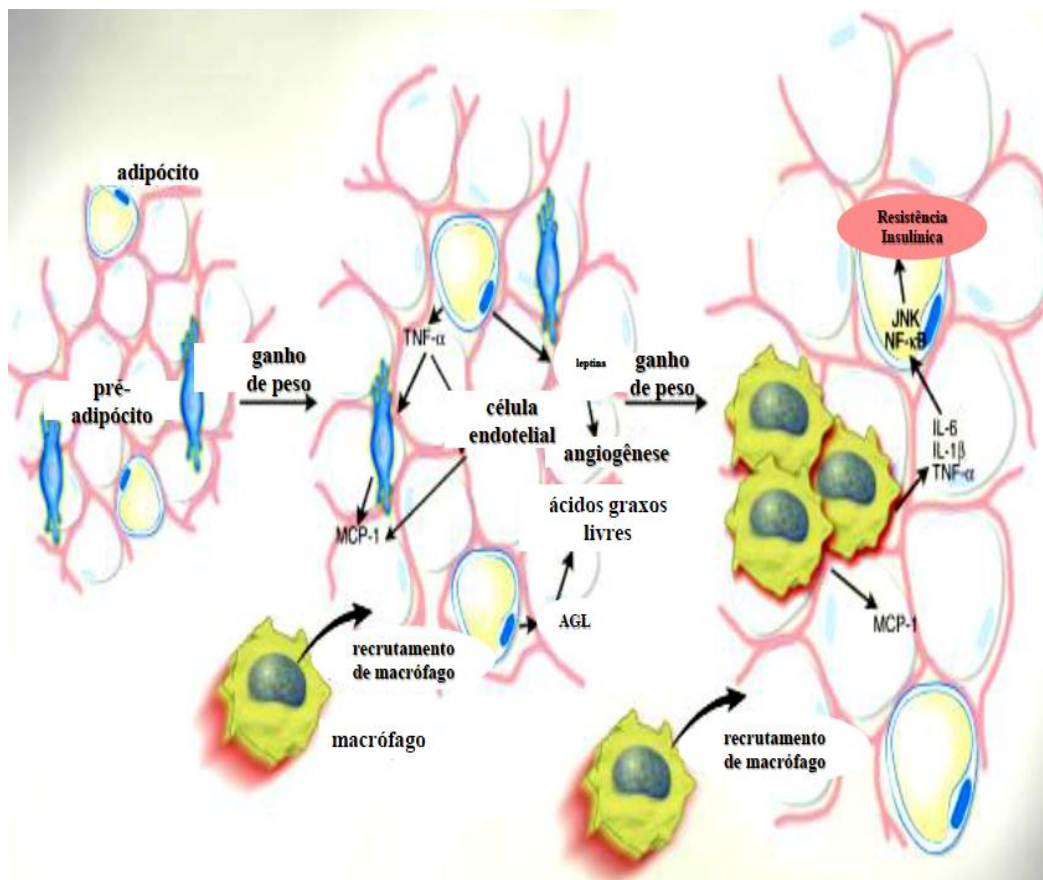
2003; HOTAMISLIGIL et al, 1995). Estudos mostraram que existe uma relação entre o desenvolvimento da resistência insulínica e a expressão aumentada de MCP-1 no TAB (SARTIPY; LOSKUTOFF, 2003; HOTAMISLIGIL et al, 1995). A inibição da expressão de MCP-1, em animais geneticamente modificados levou à uma diminuição da infiltração de macrófagos no TAB, melhorando assim a sensibilidade à insulina (KANDA et al, 2006).

### **1.6 Via TLR4/NF-kB**

O receptor *toll-like* 4 (TLR4) é membro de uma família de receptores de membrana que são expressos na superfície de várias células efetoras da resposta imune inata. (VITSEVA et al, 2008; BOSENBERG et al, 1988). Sua função é o reconhecimento do patógeno e a estimulação da resposta imunológica contra agentes patológicos. Cada tipo de TLR se liga a um microorganismo específico. No caso do TLR4 essa ligação pode se dar com uma endotoxina bacteriana composta de oligossacarídeos e ácidos graxos, o lipopolissacarídeo (LPS) (BOSENBERG et al, 1988). LPS é uma molécula altamente tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas. Sua liberação ocorre quando a bactéria é fagocitada e degradada pelas células de defesa (BOSENBERG et al, 1988).

Existem alguns fatores que podem desencadear a resposta inflamatória no tecido adiposo, dentre eles a hipóxia (SCHUSTER, 2010) e ácidos graxos saturados que estão comumente aumentados na obesidade (SCHUSTER, 2010; SONG et al, 2006). Evidências demonstram que os ácidos graxos saturados também podem ativar TLR4 (SCHUSTER, 2010). A estimulação de receptores TLR4 no tecido adiposo pelos níveis aumentados de ácidos graxos saturados pode levar a ativação do fator de transcrição NF- kB (Fig 4) (SONG et al, 2006; KARALIS et al, 2009), que controla a transcrição de genes da maioria dos fatores inflamatórios, dentre eles TNF- $\alpha$ , a IL-6, a MCP-1 (VITSEVA et al, 2008; BOSENBERG et al, 1988). Esse mecanismo de ativação tem sido considerado um importante fator de ligação entre inflamação e resistência à insulina em condições de obesidade.

**Figura 4** – Recrutamento de macrófagos no tecido inflamado



Fonte: adaptado de Wellen et al, 2003.

### 1.7 Exercício Físico no controle da Inflamação

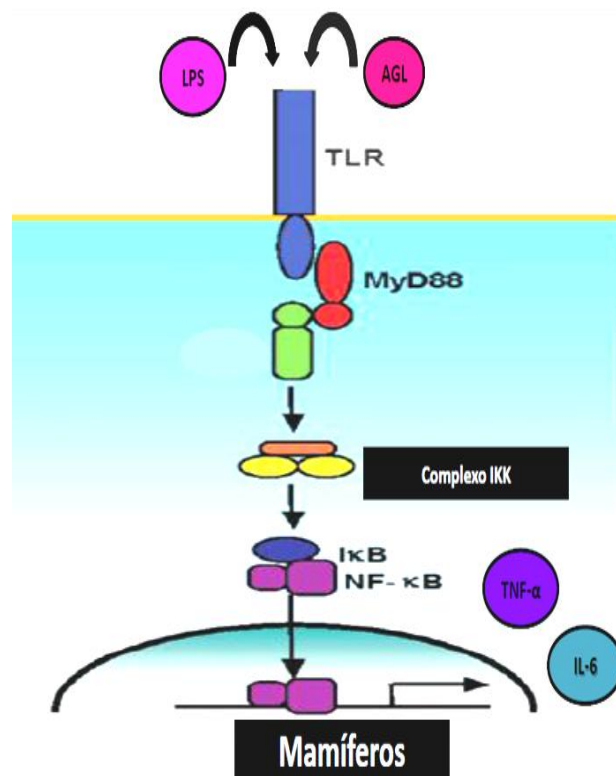
A inflamação crônica é uma das causas de doença cardiovascular e está fortemente associada com a obesidade e disfunções metabólicas (PRADHAN et al, 2001). A literatura atual fornece evidências de que a densidade de macrófagos no tecido adiposo aumenta com a obesidade, reduzindo a produção de adipocinas anti-inflamatórias e aumentando as citocinas pró-inflamatórias (ROGERS et al, 2009; VITSEVA et al, 2008; SAKURAI et al, 2013).

Diversos estudos mostraram que a perda de peso associada ao exercício pode promover uma melhora no status inflamatório (PRADHAN et al, 2001; ZANCHI et al, 2010; DAMIRCHI et al, 2010). Entretanto, este efeito benéfico parece ocorrer em exercícios com intensidade moderada, uma vez que o exercício extenuante aumenta os marcadores pró-inflamatórios no soro, tecido adiposo, e músculo esquelético. (ROSA et al, 2009; ROSA et al, 2011).

Estudos prévios indicam que o exercício exaustivo agudo promove uma resposta pró-inflamatória no tecido adiposo com elevação na concentração de TNF- $\alpha$  e IL-6 (AOI et al, 2004). Este aumento pode contribuir para a lipólise e liberação de ácidos graxos que fornecem energia para os músculos e outros tecidos após o exercício. ROSA et al (2009), mostraram que o exercício exaustivo na esteira aumentou a produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo visceral mesentérico e retroperitoneal de ratos machos e diminuiu a razão IL-10/ TNF- $\alpha$  em ambos os depósitos de gordura. Por sua vez, o mesmo protocolo de exercício promoveu um efeito anti-inflamatório no músculo esquelético desses animais, mostrando que o perfil inflamatório no tecido adiposo se opõe ao do músculo esquelético.

Lira et al (2010), mostraram aumento de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo de ratos machos frente a um protocolo de *overtraining* em esteira que foi realizado por 11 semanas. Um dos mecanismos envolvidos no aumento de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo seria a ativação do receptor TLR4 altamente expresso nas células do sistema imune inato (Fig 6) e também encontrado em vários outros tipos de células incluindo hepatócitos, adipócitos e miócitos (LIN et al, 2000). TLR4 pode ativar o fator de transcrição NFK- $\beta$  e aumentar a resposta inflamatória (VITSEVA et al, 2008) (Fig 5).

**Figura 5** – Via de sinalização do TLR4



Fonte: adaptado de Takeda et al, 2005.

A endotoxemia que ocorre após o exercício extenuante como resultado de LPS circulantes pode aumentar a ligação ao receptor TLR4 (LIRA et al, 2010).

A atividade física regular, especialmente o exercício aeróbico, diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias no plasma e tecidos (PRADHAN et al, 2001). Além disso, o treinamento pode ter um efeito positivo em modificar a razão IL-10/TNF- $\alpha$ , um indicador importante do status inflamatório e morbidade associada a doenças ao diminuir a sinalização TLR-4 que estimula a produção de citocinas inflamatórias (LIRA et al, 2009; ZANCHI et al, 2010). Lira et al (2009), encontraram aumento da concentração de de IL-10 nos depósitos de gordura visceral mesentérica após 8 semanas de exercício de *endurance* em ratos machos que consistiu em corrida em esteira (5 vezes/ semana, 60 minutos/dia, 55-65% do VO<sub>2</sub>máx).

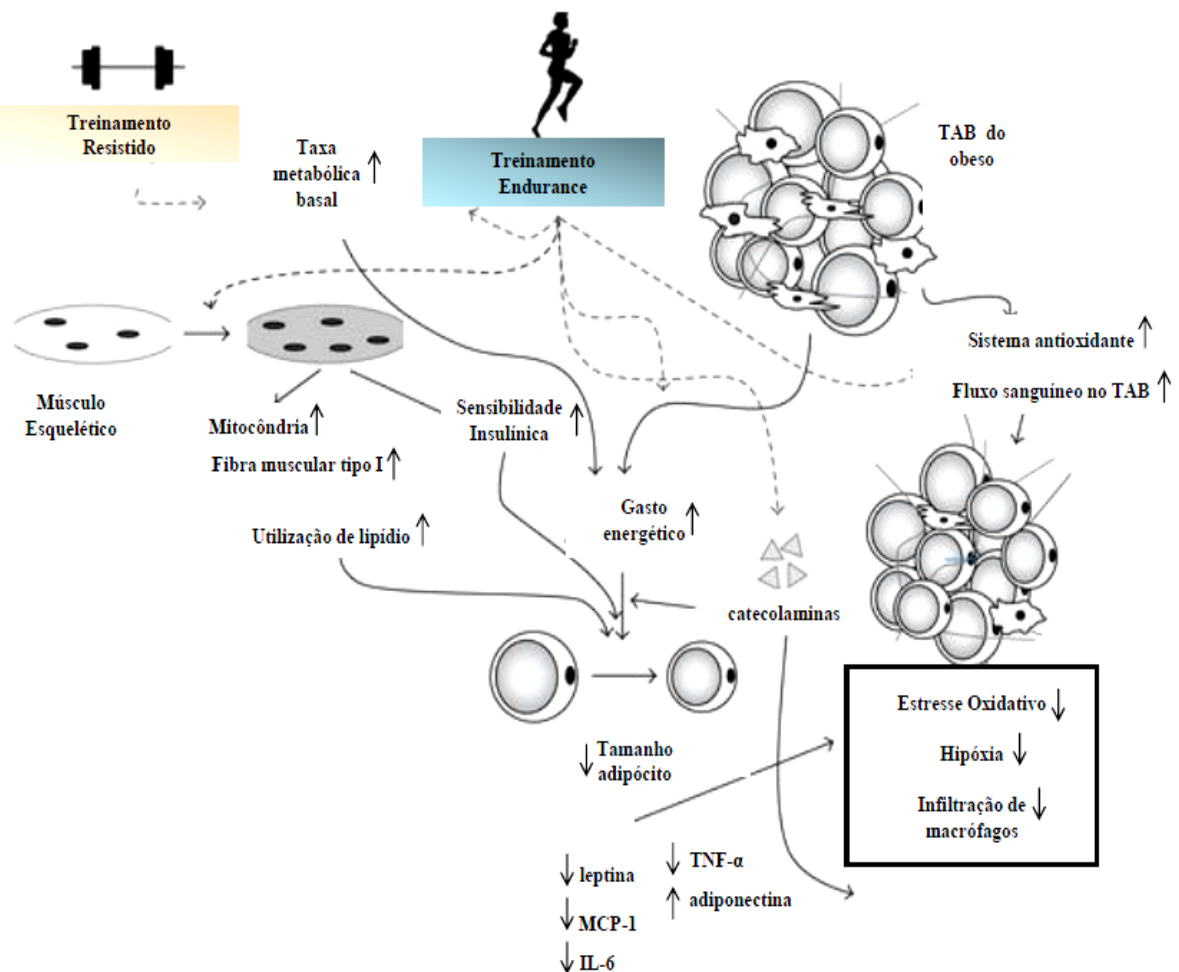
Kawanishi et al (2010), encontraram uma diminuição na expressão gênica de F4/80, um marcador da presença de monócitos e macrófagos no tecido adiposo epididimal de ratos machos após estes terem se submetido a um treinamento em esteira por 16 semanas que consistiu em (60 minutos/dia, velocidade de corrida/ 12-20m/min, 5 vezes/semana). Além disso, o protocolo empregado neste estudo promoveu *down-regulation* na expressão gênica de CD-11 um marcador de macrófagos M1 altamente pró-inflamatórios e um aumento de CD163 que reflete a presença de macrófagos M2 anti-inflamatórios, indicando que o treinamento crônico moderado induziu uma mudança no fenótipo de macrófagos M1 para M2 anti-inflamatórios. Apesar dos fatores envolvidos na inibição da infiltração de macrófagos por meio do exercício moderado não estarem ainda totalmente esclarecidos acredita-se que um dos mecanismos envolvidos seja um aumento da secreção de glicocorticoides promovida pelo exercício afetando assim a diferenciação macrofágica (JIN et al, 2009).

Os estudos mostram uma discrepância nos resultados dos treinamentos em relação aos níveis de adiponectina e uma das possíveis razões seria o volume do treinamento (KRAEMER; CASTRACANE, 2007; DAMIRCHI et al, 2010). KRAEMER et al, (2007) indicaram que para um treinamento ser eficaz em aumentar os níveis de adiponectina plasmáticos em animais, é necessário que este promova uma diminuição no peso corporal e melhore a sensibilidade insulínica (Fig 6). Entretanto, alguns estudos como o de DAMIRCHI et al (2010) não observaram correlação significativa entre os níveis de adiponectina e o peso corporal em animais ovariectomizados.

No tecido adiposo, a IL-6 aumenta a lipólise, diminui a atividade da lipase lipoprotéica, e aumenta a mobilização de ácidos graxos (TRUJILLO et al, 2004). A expressão de IL-6 está aumentada na obesidade e é um forte preditor de anormalidades no adipócito e

metabolismo sistêmico (TRUJILLO et al, 2004). REED et al (2010), mostraram que quatro semanas de treinamento em esteira (4 vezes/semana, 90 minutos/dia, 80% da Frequência Cardíaca Máxima (FCM)) associado à dieta hipocalórica diminuíram o peso corporal e os níveis de marcadores inflamatórios como IL-6 em mulheres na pré-menopausa, não obesas. Por sua vez, nenhuma alteração foi encontrada nos níveis de TNF- $\alpha$  e adiponectina. Portanto, a redução da adiposidade parece ser determinante na diminuição dos níveis de IL-6.

**Figura 6** – Modelo esquemático dos efeitos do exercício sobre a expressão de adipocinas no tecido adiposo branco (TAB)



Fonte: adaptado de Sakurai et al., 2013.

### 1.8 Treinamento Resistido no controle da inflamação

O envelhecimento natural ou a inatividade física pode levar a distúrbio metabólicos devido à consequências metabólicas da massa muscular reduzida (MALTAIS;

DESROCHES; DIONNE, 2009). Estudos transversais mostram que a força muscular é inversamente relacionada à síndrome metabólica (JURCA et al, 2005; RUIZ et al, 2009).

Na menopausa, entre outras alterações, existe um declínio na massa muscular e óssea, acúmulo de TAG nos hepatócitos, aumento na incidência de doença cardiovascular e obesidade (MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; VIEIRA et al, 2012).

O tratamento e/ ou recomendações para prevenir o sobrepeso e obesidade tem sido focada no treinamento aeróbio porque este está associado com um maior gasto de energia durante a sessão do treino se comparado com o treinamento resistido (TR) (DAMIRCHI et al, 2010; LIRA et al, 2009).

O TR pode ser definido como sendo a modalidade de exercícios físicos regulares, sistematizados e controlados que envolvem o recrutamento muscular (contração muscular) contra uma resistência (FARINATTI; VERAS, 2008) obedecendo alguns princípios do treinamento físico incluindo a consideração às necessidades específicas (princípio da individualidade), necessidade de variação do treinamento (princípio da sobrecarga crescente), especificidade na tarefa motora realizada (princípio da especificidade), adesão ao treinamento (princípio da continuidade) e regressão dos resultados obtidos (princípio da reversibilidade) (TUBINO, 1984; PRESTES et al, 2010).

Nos últimos anos, assumiu-se que o principal efeito do TR é o aumento significativo na força máxima, potência, resistência musculares, coordenação, velocidade, agilidade, equilíbrio e prevenção de lesões (PRESTES et al, 2010). Além disso, já foram observadas redução de gordura corporal e manutenção da massa muscular, prevenção da osteoporose, diminuição da pressão arterial, melhora do perfil lipídico e da composição corporal, reduzindo assim, fatores de risco relacionados à obesidade (POLLOCK et al, 1994; BARRY; CARSON, 2004; SPERETTA et al, 2016).

De acordo com Pollock et al (1994), indivíduos idosos que se mantiveram regularmente em um programa de TR mantiveram níveis altos de massa muscular em relação à indivíduos sedentários e indivíduos que realizaram treinamento de *endurance*. Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que o TR é capaz de reduzir o conteúdo lipídico hepático e muscular, bem como diminuir depósitos de gordura visceral (LEITE, 2009) de ratas ovariectomizadas. Além disso, encontramos uma influência benéfica do TR no metabolismo lipídico hepático de ratas (DOMINGOS et al, 2012).

A maioria dos estudos controlados e randomizados tem demonstrado que o TR aumenta os níveis de adiponectina e diminui os níveis séricos de leptina e PCR. (TUBINO, 1984; FATOUROS et al, 2005; AKBARPOUR, 2013). O efeito anti-inflamatório do TR

crônico pode ser mediado via redução da adiposidade visceral e a instalação de um ambiente anti-inflamatório a cada sessão de treino (FATOUROS et al, 2005; AKBARPOUR, 2013). Estudos mostram ainda que o TR associado ao treinamento aeróbico de *endurance* é superior em diminuir a adiposidade visceral resultando em um maior ganho de massa magra quando comparado apenas com o treinamento de *endurance* (BALDUCCI et al, 2010; PARK et al, 2003). Entretanto, PHILLIPS et al, 2012, observaram que mesmo na ausência de mudanças na composição corporal, ocorreram diminuições nos níveis de biomarcadores inflamatórios em mulheres pós menopausadas obesas participantes de um programa de TR com duração de 12 semanas. Os autores reforçam que este resultado é muito valioso porque mostra que alterações benéficas podem existir antes mesmo de mudanças observáveis na composição corporal.

Zanchi et al, 2010, demonstraram uma diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$  e aumento da razão IL-10/TNF- $\alpha$  no músculo esquelético, em ratas saudáveis, que realizaram um treinamento resistido por 12 semanas composto predominantemente por estímulos concêntricos e baixo volume e frequência. No entanto, a comparação direta entre o treinamento de *endurance* e o TR é problemática devido às diferenças metabólicas. Em uma revisão DE SALLES et al, 2010, os autores mostraram que a duração e intensidade do TR podem afetar as respostas da CRP e da adiponectina, concluindo que mudanças mais expressivas nos níveis dessas proteínas, ocorrem quando o TR possui duração maior ou igual a 16 semanas e intensidade igual ou maior a 80% de 1RM (DE SALLES et al, 2010).

Algumas características do protocolo de TR como intensidade e duração exercem respostas singulares e adaptações diferentes ao exercício, sendo necessários mais estudos principalmente em indivíduos obesos que possuem um risco elevado em desenvolver patologias relacionadas ao aumento da inflamação crônica de baixa intensidade. Entretanto, essa modalidade de exercício na maior parte das vezes se mostra eficaz em prevenir a obesidade abdominal e a inflamação (TUBINO, 1984; M. C. CALLE & M. L. FERNANDEZ, 2010).

### **1.9 Reposição Hormonal no controle da inflamação**

Estudos epidemiológicos indicam que mulheres na pré-menopausa possuem uma menor probabilidade de desenvolver inflamação quando comparadas a mulheres pós-menopausadas e homens da mesma faixa etária (ROZENBERG; VANDROMME; ANTOINE, 2013), comprovando os efeitos protetores do estrogênio contra doenças inflamatórias como EH e resistência insulínica (CARR, 2003; TCHERNOF; POEHLMAN,



1998). A reposição hormonal (RH) na menopausa tem sido alvo de muita discussão desde 1960, período este que se prescrevia estrogoterapia isolada para mulheres menopausadas, levando muitas vezes ao surgimento de complicações endometriais (ROZENBERG; VANDROMME; ANTOINE, 2013).

Porém, ensaios clínicos randomizados concluem que a RH de qualquer tipo proporciona alívio dos sintomas climatéricos angustiantes durante a pós-menopausa, não existindo tratamento alternativo que produza efeito semelhante (SKOUBY et al, 2004/2005). Estudos epidemiológicos mostraram que mulheres na pós-menopausa que fizeram uso de RE apresentaram risco diminuído para doenças coronarianas (STAMPFER; COLDITZ; WILLETT, 1991). Entretanto, sempre existiu a preocupação com os eventuais riscos da RH quando esta é realizada de forma prolongada, especialmente o risco aumentado para o tromboembolismo venoso e do câncer de mama (ROZENBERG; VANDROMME; ANTOINE, 2013; SKOUBY et al, 2004/2005).

O tratamento hormonal sistêmico inclui dois componentes principais, o estrogênio e o progestogênio e pode ser feito por via oral e não oral (ROZENBERG; VANDROMME; ANTOINE, 2013; TCHERNOF; POEHLMAN, 1998). Em relação aos estrogênios, vários são utilizados para tratar os sintomas do climatério dentre eles, o estradiol, valerato de estradiol, estriol, succinato de estriol, estrogênios conjugados (ROZENBERG; VANDROMME; ANTOINE, 2013; CARR, 2003). Os estrogênios frequentemente mais utilizados são valerato de estradiol natural ou 17 $\beta$ - estradiol micronizado e estrogênios equinos conjugados orais. Após ingestão oral, a dose equipotente de 2 mg de valerato de estradiol corresponde a aproximadamente 1,5 mg de 17 $\beta$ -estradiol micronizado, 0,625 mg de estrogênios conjugados, 50 mg liberados por adesivo, 1,5 mg aplicados como gel percutâneo ou 3,0 mg através de administração nasal (KIRAN et al, 2004). Outro aspecto a ser considerado é a da via de administração do estrogênio. A administração pode ser feita por via oral, transdérmica, intra-nasal ou intramuscular. A reposição estrogênica via transdérmica tem sido considerada a mais segura quanto aos efeitos tromboembólicos que a via oral (ROZENBERG; VANDROMME; ANTOINE, 2013).

A OVX em ratas, condição que mimetiza a menopausa em mulheres, leva a um aumento do peso corporal e massa gorda. Por sua vez, a RH diminui estes efeitos (BAILEY; AHMED-SOROUR, 1980). Alguns estudos mostram um aumento da resistência insulínica nesses animais e estes efeitos podem ser prevenidos pela RH (BAILEY; AHMED-SOROUR, 1980). ZOTH et al, 2010, mostraram que a combinação da terapia de reposição hormonal com a atividade física pode ser uma estratégia efetiva para prevenir o desenvolvimento da

síndrome metabólica induzida pela supernutrição. Stubbins et al, 2012, demonstraram que a ovariectomia promoveu um aumento significativo no tamanho do adipócito. Este aumento foi encontrado também nos adipócitos de ratos machos. Entretanto, a RE utilizada, que consistiu na implantação de *pellets* de estradiol contendo 0,72 mg (5µg/dia), atenuou estes efeitos, sugerindo que o estrogênio possui um papel protetor pela modulação do tamanho do adipócito.

O estrogênio pode prevenir o aumento do tamanho do adipócito por interferir na expressão de genes lipogênicos (LUNDHOLM et al, 2008; ROZENBERG; VANDROMME; ANTOINE, 2013). Corroborando com estes achados, ABUTAHA et al, 2009, verificaram que a ovariectomia gerou uma inflamação crônica de baixa intensidade no endotélio arterial de mulheres menopausadas e ratas ovariectomizadas constatada pelo aumento da expressão de moléculas de adesão e aumento nos níveis circulantes IL-8, MCP-1 e RANTES. Por sua vez, a RH que consistiu em *pellets* de estradiol com liberação de (5µg/Kg/dia) reverteu esses efeitos prevenindo a inflamação sistêmica, diminuindo assim o risco de doenças cardiovasculares. Apesar de vários estudos com modelos animais mostrarem efeitos benéficos da RH como uma menor incidência de doenças cardiovasculares, grandes ensaios clínicos em humanos demonstraram que a reposição estrogênica aumenta o risco de doenças cardiovasculares (ROZENBERG; VANDROMME; ANTOINE, 2013). PECHENINO et al, 2011, demonstraram que a administração de estrogênio muitos anos após a menopausa aumenta a expressão de genes inflamatórios como TNF- $\alpha$  e óxido nítrico sintase induzida (iNOs). Já a utilização de forma precoce logo após a menopausa previne estes efeitos negativos. O mecanismo envolvido nessa resposta não está totalmente esclarecido.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos farmacológicos e não farmacológicos sobre a função inflamatória do tecido adiposo visceral em ratas ovariectomizadas

### 2.2 Objetivos Específicos

Verificar os efeitos do TR e da RE no tecido adiposo branco visceral mesentérico sobre:

- Parâmetros métricos
- Carga de treino
- Histologia dos adipócitos
- Expressão gênica de marcadores anti-inflamatórios (adiponectina e IL-10) e pró-inflamatórios (MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ )
- Expressão gênica do receptor semelhante ao *Toll* 4 (TLR4)
- Quantificação das citocinas anti-inflamatórias (Adiponectina e IL-10) e citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) por ensaio Multiplex/Luminex.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A. K.; JANEWAY C.A J.R. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. *Cell*, v.100, p. 129-138, 2000

ABU-TAHA, M. et al. Menopause and ovariectomy cause a low grade of systemic inflammation that may be prevented by chronic treatment with low doses of estrogen or losartan. *J Immunol*, v. 183, p.1393-1402, 2009

AHIMA R.S.; FLIER J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*, v.11, p.327-3, 2000

AKBARPOUR M. The Effect of Resistance Training on Serum Levels of Adipokine and Inflammatory Markers of Cardiovascular Disease in Obese Men, [in Persian]. *Qom Univ Med Sci*, v.7(3), p.1-10, 2013

AOI, W. et al. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic Biol Med*, v. 37(4), p.480-7, 2004

ARITA, Y. et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 257, p. 9-83, 1999

ASHWELL M.; CHINN S.; STALLEY S.; GARROW J.S. Female fat distribution: a simple classification based on two circumference measurements. *Int J Obes*, v.6(2), p.143-52, 1982

BAILEY, C.J.; AHMED-SOROOR, H. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. *Diabetologia*, v. 19, p.475–481, 1980

BALDUCCI, S. et al. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, v. 20, p. 608–617, 2010

BARRY B.K.; CARSON R.G. The consequences of resistance training for movement control in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 59(7), p. 730-54, 2004

BOSENBERG, A.T. et al. Strenuous exercise causes systemic endotoxemia. *J Appl Physiol*, v. 65, p.106-8, 1988

BURGER, H.G. et al. Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Prog Horm Res*, v.57, p. 257-275, 2002

CALLE, M. C.; FERNANDEZ, M. L. Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutrition Research and Practice*, v. 4, p. 259-269, 2010

CARR, D.B. et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes*, v. 53, p. 2087-2094, 2004

- CARR, M.C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 88(6), p.2404-11, 2003
- CINTI, S. The Adipose Organ. *Nutrition and Health: Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*, p.3-19, 1999
- COTTAM, D.R. et al. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg*, v. 14, p.589-600, 2004
- DAMIRCHI, A., et al. Effects of aerobic exercise training on visceral fat and serum adiponectin concentration in ovariectomized rats. *Climacteric*, v.13, p.171-8, 2010
- DE SALLES, B.F. et al. Effects of resistance training on cytokines. *Int J Sports Med*, v.31, p.441-450, 2010
- DOMINGOS, M.M. et al. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. *Eur J Appl Physiol*. v.112(4), p.1437-44, 2012
- DOS REIS, C.M. et al. Body composition, visceral fat distribution and fat oxidation in postmenopausal women using oral or transdermal oestrogen. *Maturitas*, v. 46, p.59-68, 2003
- DYCK, D.J. Adipokines as regulators of muscle metabolism and insulin sensitivity. *Appl Physiol Nutr Metab*, v. 34, p. 396-402, 2009
- ESPOSITO et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 88, p.1055-1058, 2003
- FANTUZZI. G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immuno*. v. 115(5), p.911-919, 2005
- FARINATTI, P. T. V. Envelhecimento, promoção da saúde e exercício: bases teóricas e metodológicas. Volume 1. Barueri, SP: Manole, 2008
- FATOUROS, I.G. et al. Leptin and adiponectin responses in overweight inactive elderly following resistance training and detraining are intensity related. *J Clin Endocrinol Metab*. V. 90(11), p.5970-7, 2005
- FERRARA, C.M. et al. Differences in adipose tissue metabolism between postmenopausal and perimenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, p.4166-4170, 2002
- FRIED, S.K.; BUNKIN, D.A.; GREENBERG, A.S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 83, p. 847-50, 1998
- GALIC, S.; OAKHILL, J.S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. v. 316(2), p.129-39, 2010
- GORDON, S. Macrophage Function Disorders. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1: I-II, 2001

- HAUNER, H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc*, v. 64, p.163-169, 2005
- HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, v. 444, p.860-867, 2006
- HOTAMISLIGIL, G.S. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest*, v. 95, p. 2409-2415, 1995
- JACKSON, K.C. et al. Ectopic lipid deposition and the metabolic profile of skeletal muscle in ovariectomized mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*, v. 304, p. 206-217, 2013
- JACOBI, D.; STANYA, K.J.; LEE CH. Adipose tissue signaling by nuclear receptors in metabolic complications of obesity. *Adipocyte*, v. 1, p.4-12, 2012
- JIN, X. et al. Glucocorticoids inhibit the innate immune system of human corneal fibroblast through their suppression of toll-like receptors. *Mol. Vis*, v. 15, p.2435-2441, 2009
- JO, J.; GAVRILOVA, O.; PACK, S.; JOU, W.; MULLEN, S.; SUMNER, A.E.; CUSHMAN, S.W.; PERIWAL, V. Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Comput. Biol*, v. 5 (3), 2009
- JUGE-AUBRY, C.E. et al. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine*, v.29, p.270-274, 2005
- JUHAN-VAGUE, I. et al. Relationships between plasma insulin triglyceride, body mass index, and plasminogen activator inhibitor 1. *Diabetes Metab*, v. 13, p.331-336, 1987
- JUNG, R.T. Obesity as a disease. *Br Med Bull*, v. 53(2), p.307-21, 1997
- JURCA, R. et al. Association of muscular strength with incidence of metabolic syndrome in men. *Med Sci Sports Exerc*, v. 37,p.1849-1855, 2005
- KAHN, B.B.; FLIER, J.S. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, v.106(4), p.473-81, 2000
- KANDA, H. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*, v.116(6), p.1494-505, 2006
- KARALIS, K.P. et al. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS*, v. 276, p.5747-5754, 2009
- KAWAKAMI, M.; PEKALA, P.H.; LANE, M.D. Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L1 cells by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington*, v. 79, p. 912-916, 1982.
- 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. *Exerc. Immunol. Rev*, v. 16, p.105-118, 2010
- KERN, P.A. et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 280, p.745-751, 2001
- KIRAN, H. et al. Effects of intranasal estradiol treatment on serum lipoprotein(a) and lipids in hysterectomized women. *Gynecol Obstet Invest*, v. 57(4), p.191-5, 2004
- KLOVER, P.J. et al. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes*, v.52, p.2784-2789, 2003
- KOLOTKIN, R.L. et al. Development of a brief measure to assess quality of life in obesity. *Obes Res*, v. 9(2), p.102-11, 2001
- KRAEMER, R.R.; CASTRACANE, V.D. Exercise and humoral mediators of peripheral energy balance: ghrelin and adiponectin. *Exp Biol Med*, 232:184-94, 2007
- KUMADA, M. et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metallo-proteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation*, v. 109, p. 2046-9, 2004
- LEITE, R.D. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, vol. 34, p.1079-1086, 2009
- LIN, Y. et al. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem*, v. 275, p.24255-63, 2000
- LIRA, F.S. et al. Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF- $\alpha$  ratio in rat adipose tissue. *Cytokine*, vol. 45, p. 80-85, 2009
- LIRA, F.S. et al. Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: effect of exercise. *Cell Biochem Funct*, v. 27, p.71-75, 2009
- LIRA, F.S. et al. Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. *Lipids Health Dis*, v.9:109, 2010
- LUMENG, C.N.; BODZIN, J.L.; SALTIEL, A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, v. 117, p.175-84, 2007
- LUNDHOLM, L. et al. Key lipogenic gene expression can be decreased by estrogen in human adipose tissue. *Fertil Steril*, v. 90, p.44-48, 2008
- MALTAIS, M.L.; DESROCHES, J.; DIONNE IJ. Changes in muscle mass and strength after menopause. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, v. 9(4), p.186-197, 2009
- MASAKI, T. et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology*, v. 40, p.177-84, 2004

- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, p. 428-435, 2008.
- NISHIDA, M. et al. Interleukin-10 associates with adiponectin predominantly in subjects with metabolic syndrome. *Circ J*, v. 71, p. 1234-8, 2007
- PALLOTTINI, V. et al. Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms. *Infectious Disorders Drug Targets*, v. 8(1), p.52-60, 2008
- PARK, S.K. et al. The effects of combined aerobic and resistance exercise training on abdominal fat in obese middle-aged women. *J Physiol Anthropol*, v. 22, p. 129-135, 2003
- PECHENINO, A.S. et al. Impact of aging versus estrogen loss on cardiac gene expression: estrogen replacement and inflammation. *Physiological Genomics*, v. 43, p.1065-1073, 2011.
- PHILLIPS, M.D. et al. Resistance training reduces subclinical inflammation in obese, postmenopausal women. *Med Sci Sports Exerc*, v. 44, p. 2099-110, 2012
- POLLOCK, M.L. et al. Exercise training and prescription for the elderly. *South Med J*, v. 87(5), p.88-95, 1994
- PRADHAN, A.D. et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, v. 286, p.327-334, 2001
- PRESTES, J. et al. Prescrição e periodização do treinamento de força em academias. Barueri, SP: Manole, 2010
- PRINS, J.B. Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, v. 16(4), p.639-651, 2002
- RAJALA, M.W.; SCHERER PE. Minireview: the adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Neuroendocrinol*, v. 144( 9), p. 3765- 73, 2002
- REED, J.L.; DE SOUZA, M.J.; WILLIAMS, N.I. Effects of exercise combined with caloric restriction on inflammatory cytokines. *Appl Physiol Nutr Metab*, v. 35(5), p.573-582, 2010
- RODRIGUES, M.F. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on oxidative stress markers in the rat liver. *Clinics (Sao Paulo)*, v. 68, p.1247-1254, 2013
- ROGERS, N.H. et al. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology*, v. 150, p.2161-2168, 2009
- ROSA, N. et al. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. *Eur J Appl Physiol*, v. 106, p.697-704, 2009



- ROSA, J.C. et al. Exhaustive exercise increases inflammatory response via Toll like receptor-4 and NF- $\kappa$ Bp65 pathway in rat adipose tissue. *Journal of Cellular Physiology*, v. 226(6), p.1604-1607, 2011
- ROZENBERG, S.; VANDROMME, J.; ANTOINE C. Postmenopausal hormone therapy: risks and benefits. *Nat Rev Endocrinol*, v.9, p.216-27, 2013
- RUIZ, J.R. et al. Muscular strength and adiposity as predictors of adulthood cancer mortality in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 18, p.1468-1476, 2009
- SAELY, C.; GEIGER, K.; DREXEL H. Browns versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontol*, v. 58, p.120-2, 2012
- SAKURAI, T. et al. The effects of exercise training on obesity-induced dysregulated expression of adipokines in white adipose tissue. *Int J Endocrinol*, 2013: 801743, 2013
- SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D.J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, v. 100, p.7265-7270, 2003
- SCHOTTELIUS, A.J. Interleukin- 10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem*, v. 274 (45), p. 31868-74, 1999
- SCHUSTER, D.P. Obesity and the development of type 2 diabetes: the effects of fatty tissue inflammation. *Diabetes Metab Syndr Obes*, v.3, p. 253-262, 2010
- SKOUBY, S.O. et al. Climacteric medicine: European Menopause and Andropause Society (EMAS) 2004/2005 position statements on peri- and postmenopausal hormone replacement therapy. *Maturitas*, v. 51, p.8-14, 2005
- SKURK, T. et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 92, p. 1023-1033, 2007
- SONG, M.J. et al. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 346, p.739-745, 2006
- SPERETTA G.F. et al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. *Life Sci*, v.146, p.154-62, 2016
- SPRANGER J. et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, v. 52, p. 812-817, 2003
- STAMPFER, M.J. et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease: ten-year follow-up from the Nurses' Health Study. *N Engl J Med*, v. 325, p.756-62, 1991
- STOTZER US, RODRIGUES MF, DOMINGOS MM, SILVA GH, DUARTE FO, GATTO CV, et al. Resistance training suppresses intra-abdominal fatty acid synthesis in ovariectomized rats. *Int J Sports Med*, v. 36(3), p. 226-33, 2015

- STRISSEL, K.J. et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*, v.56, p.2910-8, 2007
- STUBBINS, R.E. et al. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obesity and Metabolism*, v. 14, p.58-66, 2012
- SUN K, KUSMINSKI CM, SCHERER PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*, v.121(6), p.2094-101, 2011
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol*, v. 17, p. 1-14, 2005
- TCHERNOF, A.; POEHLMAN, E.T. Effects of the menopause transition on body fatness and body fat distribution. *Obes Res*, v. 6, p.246-254, 1988
- TIMMONS, J.A.; PEDERSEN B.K. The importance of brown adipose tissue. *N Engl J Med*, v. 361, p.415-416, 2009
- TOTH, M. J. et al. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *International Journal of Obesity*, v. 24, p. 226-231, 2000.
- TRAYHURN, P.; BEATTIE J.H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*, v. 60, p.329-339, 2001
- TRAYHURN, P.; WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*, v. 92, p.347-355, 2004
- TRUJILLO, M.E. et al. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89, p.5577-5582, 2004
- TRZECIAK-RYCZEK, A. et al Adipose tissue – component of the immune system. *Centr Eur J Immunol*, v. 36, p.95-9, 2011
- TUBINO, M.J.G. Metodologia científica do treinamento desportivo. São Paulo: Ibrasa, 1984
- TURNER, A.S. Animal models of osteoporosis: necessity and limitations. *Eur Cell Mater*, v. 22(1), p. 66-81, 2011
- UHLAR, C.M.; WHITEHEAD, A.S. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem*, v. 265, p.501-523, 1999
- VELARDE, M. C. Pleiotropic actions of estrogen: a mitochondrial matter. *Physiol. Genomics*, v. 45, p. 106-109, 2013
- VIEIRA POTTER, V.J. et al. Adipose tissue inflammation and reduced insulin sensitivity in ovariectomized mice occurs in the absence of increased adiposity. *Endocrinology*, v. 153, p. 4266-4277, 2012

- VIRTANEN, K.A. et al. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N Engl J Med*, v. 360, p.1518-25, 2009
- VITSEVA, O.I. et al. Inducible toll-like receptor andNF-kappa B regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity*, v. 16, p.932-937, 2008
- WANG, W. et al. Role of leptin deficiency in early acute renal failure during endotoxemia in ob/ob mice. *J Am Soc Nephrol*, v. 15, p.645-9, 2004
- WEISBERG, S.P. CCR2modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest*, v. 116, p. 115-124, 2006
- WEYER, C. et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, p.1930-1935, 2001
- WHO. Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group. World Health Organ. Tech.Rep.Ser, v. 866, p. 1-107, 1990
- WHO. WHO FACT FILES: Obesity and overweight. Who, 2015
- WOODS, N.F.; MITCHELL, E.S. Symptoms during the perimenopause: prevalence, severity, trajectory, and significance in women's lives. *Am J Med*, 118 Suppl 12B:14-24, 2005
- WORLD HEALTH ORGANIZATION.. Global Infobase. NCD Indicators. BMI , 2003
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation on obesity. Geneva, 1998
- WORLD HEALTH ORGANIZATION/ FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO, 2003
- WULSTER-RADCLIFFE, M.C. et al. Adiponectin differentially regulate cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commu*, v.316, p.924-9, 2004
- YAMAUCHI, T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem*, v. 278(4), p.2461-8, 2003
- ZANCHI, N.E. et al. Chronic low frequency/low volume resistance training reduces proinflammatory cytokine protein levels and TLR4 mRNA in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, v.109, p. 1095-1102, 2010

## 4 MANUSCRITO

Inflamação no tecido adiposo visceral em ratas ovariectomizadas: Efeitos do treinamento resistido e da reposição de estrogênio

Maria Fernanda Cury Rodrigues<sup>a</sup>, Mateus Moraes Domingos<sup>a</sup>, Marina Rodrigues Barbosa<sup>a</sup>, Fabiano Candido Ferreira<sup>a</sup>, Markus Vinicius Campos Souza<sup>a</sup>, Gustavo Henrique Rigo Canevazzi<sup>a</sup>, Natália Santanielo Silva<sup>a</sup>, Heloísa Selistre de Araújo<sup>a</sup>, Sérgio Eduardo de Andrade Perez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, Brasil.

\*Autor correspondente: Maria Fernanda Cury Rodrigues, Laboratório de Fisiologia do Exercício (São Carlos, Brasil). Rodovia Washington Luis, km 235, cep: 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil. Telefone: (16) 33518386; (16) 97243669. **E-mail:** <mafe\_cury@hotmail.com>.

## RESUMO

A ovariectomia associada à diminuição de estrogênio está associada com o aumento na prevalência da obesidade, condição que aumenta o risco de síndrome metabólica. Em mulheres, evidências mostram que a inflamação induzida pela obesidade no tecido adiposo visceral (TAV) promove desregulação na expressão de citocinas inflamatórias. A reposição de estrogênio (RE) e o treinamento resistido (TR) possuem efeitos benéficos em mulheres pós menopausadas, porém não se sabe se estas intervenções são eficazes em minimizar a inflamação no TAV. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do TR e da RE em marcadores pró e anti-inflamatórios no tecido adiposo branco visceral mesentérico de ratas ovariectomizadas. Ratas fêmeas Sprague-Dowley foram divididas em 6 grupos: Sham-Sedentárias (Sham-Sed), Ovariectomizadas- Sedentárias (Ovx-Sed), Sham-Treinadas (Sham-TR), Ovx-TR, Ovx-Sed-RE e Ovx-TR-RE. A RE foi feita por meio de cápsulas silásticas, contendo  $17\beta$ -estradiol. O TR exigiu que os animais escalassem uma escada vertical de 1,1m com frascos cônicos contendo pesos atados em suas caudas e teve duração de 12 semanas. A morfologia foi avaliada por análise histológica. A expressão gênica foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase- Tempo Real (PCR-RT) e a concentração proteica por ensaios Multiplex/Luminex. A ovariectomia aumentou o tamanho do adipócito e reduziu a expressão de moléculas anti-inflamatórias no TAV, que foi restaurada parcialmente pela RE. Por sua vez, o TR, foi capaz de minimizar o aumento da inflamação no TAV das ratas Ovx. Concluímos que a RE, bem como o TR foram eficazes em atenuar a inflamação promovida pela Ovx no TAV.

**Palavras chave:** ovariectomia, treinamento resistido, reposição de estrogênio, citocinas, inflamação.

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença inflamatória crônica de etiologia multifatorial que aumenta o risco de diabetes tipo II, doença cardiovascular e síndrome metabólica [26]. A redução na produção de estrogênio que ocorre na menopausa está associada ao acúmulo de gordura visceral e atividade pró-inflamatória aumentada [56-57].

Assim, a menopausa está associada ao aumento da adiposidade predispondo mulheres à obesidade, o que contribui para inflamação sistêmica, uma vez que o tecido adiposo atua como órgão endócrino secretando uma variedade de proteínas chamadas adipocinas que atuam no sistema imune, cardiovascular, metabólico e endócrino [58]. Exemplos incluem TNF- $\alpha$ , leptina, adiponectina, resistina, IL-6 e IL-10 [7, 58].

Em indivíduos obesos, a infiltração de macrófagos, bem como a expressão de adipocinas pró-inflamatórias como MCP-1 e TNF- $\alpha$  no tecido adiposo normalmente está aumentada, culminando em um processo inflamatório de baixa intensidade [7]. A IL-10, uma citocina secretada principalmente por monócitos/macrófagos e linfócitos, bem como a adiponectina secretada pelos adipócitos possuem propriedades anti-inflamatórias que antagonizam os efeitos de TNF- $\alpha$  e IL-6 [5]. Baixas concentrações de IL-10 são relacionadas com a ocorrência de síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo II [10].

Recentes estudos sugerem que os adipócitos podem desempenhar um importante papel na regulação da resposta imune no tecido adiposo via sinalização do receptor semelhante ao *toll* (TLR), que representam uma família de receptores de reconhecimento padrão da resposta imune inata [60].

Receptores semelhantes ao Toll 4 (TLR4) exercem papel importante na regulação fisiológica da resposta imune [31], uma vez que estimulados ativam fatores transcricionais como o fator de transcrição kappa B (NFk-B), aumentando assim, a produção de citocinas pró-inflamatórias.

A IL-10 age inibindo o NFK-B por meio da preservação do fator inibitório kappa  $\beta$  (Ikk) [49]. A razão IL-10/TNF- $\alpha$  tem sido considerada um importante indicador do status inflamatório e valores baixos estão associados com maior risco de morbidade e mortalidade [32].

A reposição hormonal (RH) tem mostrado efeitos benéficos ao prevenir a obesidade [2]. Entretanto, alguns estudos demonstram que o uso da RH está relacionado com aumento na incidência de alguns tipos de cânceres [50].

Sendo assim, alternativas como o exercício físico tem sido consideradas como estratégia para promover efeitos anti-inflamatórios e diminuir a adiposidade visceral [13, 68]. Entretanto, situações relacionadas ao estresse como ocorre no exercício exaustivo, podem aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$  e IL-6 [20]. Estudos mostram que o exercício extenuante agudo aumenta a resposta pró-inflamatória no tecido adiposo [42]. Por sua vez, o treinamento de *endurance* induz uma resposta anti-inflamatória, com aumento nos níveis de IL-10 [32].

O tamanho do adipócito reduzido, o aumento da função mitocondrial e do fluxo sanguíneo, a facilitação na oxidação de ácido graxo e o estresse celular diminuído são mecanismos pelos quais o exercício físico atenua a inflamação no tecido adiposo branco visceral (TABV) [14].

A modulação do status inflamatório pela RE e pelo exercício físico em ratas ovariectomizadas (Ovx) tem sido investigada, porém o efeito do treinamento resistido (TR) em marcadores inflamatórios no tecido adiposo de ratas Ovx, não está totalmente elucidado. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da Ovx, RE e do TR em marcadores pró e anti-inflamatórios no TABV de ratas. Em vista dos questionamentos acima mencionados, nossa hipótese foi que o TR e a RE podem atenuar a inflamação promovida pela Ovx no TAV de ratas.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizadas 36 ratas Sprague-Dawley, provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de Araraquara, com massa corporal inicial de  $220 \pm 12$  g. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (três animais por gaiola), com o assoalho recoberto por serragem, e receberam água e ração *ad libitum*, sob condições constantes de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade e iluminação em ciclo invertido de 12 horas (início do claro às 08h00min).

Todos os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Protocolo no. 005/2013) e conduzido de acordo com o guia de cuidados e manuseios de animais

laboratoriais dos Estados Unidos da América NATIONAL RESEARCH COUNCIL'S, 1996 [39].

Após chegada ao biotério do laboratório de Fisiologia do Exercício, os animais permaneceram por três semanas em condição de aclimação ao biotério e ao ciclo invertido. Após este período os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais.

## **1.2 Grupos Experimentais**

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos experimentais (6 animais por grupo): (I) sham sedentárias (Sham-Sed), ovariectomizadas sedentárias (Ovx-Sed), sham treinamento resistido (Sham-TR), ovariectomizadas treinamento resistido (Ovx-TR), ovariectomizadas sedentárias reposição de estrogênio (Ovx-Sed-RE) e ovariectomizadas treinamento resistido e reposição de estrogênio (Ovx-TR-RE).

Os animais sedentários (Sham-Sed, Ovx-Sed, Ovx-Sed-RE) foram mantidos em suas caixas por todo o período experimental pós-cirúrgico (12 semanas), sem nenhum tipo de exercício ou atividade física, apenas o deslocamento dentro da gaiola. Os animais Ovx (Ovx-Sed, Ovx-TR, Ovx-Sed-RE e Ovx-TR-RE) tiveram os ovários removidos.

Os animais treinados (Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-RE) realizaram 12 semanas de treinamento resistido. O treinamento teve o mesmo início, para cada grupo e está descrito abaixo. Os animais que realizaram reposição hormonal (Ovx-Sed-TRH e Ovx-TR-RE) receberam implantes subcutâneos de cápsulas silásticas contendo 17  $\beta$ -estradiol.

## **1.3 Ovariectomia e operação Sham**

A ovariectomia e a operação sham foram realizadas quando os animais atingiram 250 g de massa corporal, segundo a técnica descrita por Kalu. [27]. Para tanto as ratas foram anestesiadas com uma mistura de ketamina-xilazina (61.5-7.6 mg/Kg intraperitoneal) e seus reflexos testados para dar início aos procedimentos cirúrgicos.

Posteriormente, foi feita uma pequena incisão bilateral de 1-1,5cm através da pele e da camada muscular, entre a última costela e a coxa, em paralelo com a linha corporal do animal. A cavidade peritoneal foi aberta, os ovários foram expostos e após uma ligadura abaixo da fimbria, foram removidos. Após a remoção dos ovários, o útero foi recolocado em seu local anatômico, pele e músculos suturados.



Nos animais Sham-Sed foi realizada a mesma cirurgia, no entanto não foi feita a ligadura nem a retirada dos ovários. Nas 24 horas seguintes da cirurgia Ovx e operação Sham as ratas foram mantidas em caixas individuais, tratadas com analgésico e aquecidas. Foi respeitado um período de sete dias de recuperação pós-cirurgia para dar início aos procedimentos do protocolo de treinamento resistido.

## **2.4 Protocolo de Treinamento**

O protocolo proposto por Hornerberger Jr. e Farrar. [21], foi adaptado para as necessidades e execução da pesquisa. Inicialmente as ratas foram familiarizadas ao treinamento resistido que consistiu em três sessões, nas quais os animais escalavam uma escada vertical (1,1x 0,18m, degrau de 2 cm, inclinação de 80°) apenas com uma carga de aparatos fixados em suas caudas. Tubos de polipropileno do tipo Falcon de 50 ml e chumbos para pesca de diferentes tamanhos e massas foram utilizados, como aparato de cargas. O aparato foi fixado à cauda envolvendo a parcela proximal da mesma com uma fita autoadesiva.

Posteriormente, as ratas foram colocadas na parte inferior da escada e adaptadas ao ato de escalar. Quando necessário um estímulo com pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento de escalada. No topo da escada, havia uma gaiola (20x 20x 20x cm) onde descansavam por 120 segundos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem a necessidade de estímulo.

A primeira sessão de treino se deu três dias seguintes à familiarização e teve como objetivo a determinação da carga máxima de carregamento (CMC). Nessa sessão, os animais escalaram de 4-9 vezes carregando cargas progressivamente mais pesadas. Na escalada inicial foi aplicada uma sobrecarga de 75% da massa corporal do animal. Após completar o carregamento dessa carga com sucesso, um peso adicional de 30 gramas foi adicionado ao aparato. Esse procedimento foi repetido sucessivamente, com um limite máximo de oito escaladas, até que a sobrecarga imposta não permitisse que o animal escalasse toda a escada. Assim, a maior carga carregada com sucesso até o topo da escada foi considerada a carga de carregamento máxima dos animais para aquela sessão.

As sessões subsequentes de treinamento consistiram em quatro a nove escaladas, com cargas progressivamente mais pesadas. Durante as primeiras quatro escaladas, as ratas carregaram 50%, 75%, 90% e 100% da CMC que foi determinada na sessão anterior.

Durante as escaladas subsequentes, um peso de 30 g era adicionado até que a rata obtivesse uma nova carga máxima de carregamento. O intervalo de recuperação entre as escaladas foi de 120 segundos. O treinamento foi realizado por 12 semanas, com 72 horas de intervalo entre uma sessão e outra, totalizando 27 sessões de treinamento.

#### **1.4 Reposição de estrogênio**

Os animais do grupo (Ovx-Sed-RE e Ovx-TR-RE) receberam a reposição de 17 $\beta$ -estradiol por implante subcutâneo de cápsulas Silastic\* com uma solução de 180 $\mu$ g de 17 $\beta$ -estradiol/ml de óleo de girassol. As cápsulas Silastic\* são segmentos de tubo hospitalar de silicone cortados em (comprimento de 30 mm, diâmetro interno de 1,02mm e externo de 2,16mm) (*Dow Corning, VWR Internacional, Buffalo Grove, IL, EUA*), vedados com cola Silastic\*.

A RE teve início uma semana após a cirurgia OVX e o reimplante das cápsulas Silastic\* foi realizado após seis semanas do primeiro implante. A metodologia utilizada na RE foi descrita segundo Strom et al. [54]. Os tubos Silastic\* foram medidos e cortados com o auxílio de uma régua. A solução do hormônio foi preparada com 17  $\beta$ -estradiol (código: E8875, 250 mg *Sigma Aldrich, St. Louis, EUA*) em óleo de girassol. Foram pipetados 10  $\mu$ l dessa solução em cada cápsula Silastic\* tendo cada animal recebido 1,8  $\mu$ g de 17 $\beta$ -estradiol.

As cápsulas foram vedadas nas duas extremidades com cola de silicone da marca Silastic®, o que resultou em uma coluna de óleo-17 $\beta$ -estradiol. Após a vedação das cápsulas, as mesmas foram armazenadas por 24 horas para secagem da cola. Após a secagem, foram mantidas em solução fisiológica salina esterilizada (NaCl 0,9%) por no mínimo 2 horas.

Com o auxílio de uma pinça, o implante da cápsula foi realizado. Para tanto, foi feita uma incisão no dorso do animal que estava anestesiado. Após a inserção da cápsula, foi realizada a sutura. Na recuperação pós-cirúrgica, os animais receberam Cloridrato de Tramadol (20 mg/Kg) e antibiótico por via subcutânea.

#### **2.6 Eutanásia dos animais, retirada e coleta dos tecidos**

Ao término do período experimental, os animais ficaram em jejum durante a noite e foram eutanasiados pela manhã por decapitação em guilhotina. Os grupos que realizaram o treinamento resistido foram sacrificados 48 horas após a última sessão de treino. O tecido adiposo visceral mesentérico foi rapidamente removido e pesado em balança de precisão.

Após a pesagem, parte do tecido adiposo visceral mesentérico foi imediatamente fixado em formalina tamponada 10%, para posteriores análises histológicas, e a maior parte foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e posteriormente armazenada em freezer -80°C para análises em qPCR e ensaios imunológicos.

## 2.7 Análises Histológicas

Como já descrito, parte do tecido adiposo visceral foi fixado em formalina tamponada (10%) por 24 horas. Após fixação os tecidos foram processados por meio de uma bateria de desidratação, em concentrações crescentes de etanol (80%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III, 100% IV), diafanização em banhos de xilol, impregnação, e por fim, inclusão em Paraplast (Histosec®Merck). O material parafinado foi incluído em blocos e permaneceu em temperatura ambiente. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Micron® HM360) com navalhas descartáveis. Os fragmentos com espessura de 6µm foram estendidos sobre as lâminas.

Posteriormente, as lâminas passaram por processo de desparafinização em xilol, seguida de alcoolização em álcool etílico e hidratação em água destilada e por fim, foram coradas por hematoxilina e eosina (HE). Após coloração, os cortes foram desidratados em álcool e diafanizados em xilol, e em sequência, foi feita a montagem das lâminas utilizando o PermOUNT (*Fisher Scientific*) para fixação da lamínula.

Após a secagem, as lâminas foram digitalizadas por inteiras com ampliação de 40 x em “Scanner” Panoramic Desk da 3D Histech. Para avaliação e mensuração da área (µm<sup>2</sup>) dos adipócitos utilizou-se o software Image-Pro®-Plus 6.0.

## 2.8 Análise de citocinas por ensaios Multiplex/Luminex

A tecnologia multiplex segue os mesmos princípios do ELISA, sendo que os anticorpos específicos para as citocinas são ligados covalentemente a marcadores fluorescentes que são detectados em um citômetro de fluxo modificado. Essa tecnologia permite, através de um pequeno volume de amostra, a avaliação simultânea de numerosas citocinas.

Para investigar se a expressão do RNAm era semelhante à concentração de proteína, a quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 e adiponectina foram realizadas por meio do método multiplex com os Kits MILLIPLEX<sup>®</sup>MAP (Cat #RECYTMAG-65k e RADPNMAG-81K-01) (Millipore Corporation, Billerica, MA).

Inicialmente para a extração da proteína total, 200 mg de tecido adiposo visceral, foi homogeneizado em um FastPrep<sup>®</sup>-24<sup>™</sup> em tampão para lise contendo 50 mM Tris, 150mM NaCL, 1Mm EDTA, 1% Triton X-100, 1%Deoxicolato e 0,1% SDS. O tampão foi sempre mantido no gelo e, no momento do uso, acrescentaram-se inibidores de proteases (1 mM PMSF, 5 $\mu$ g/ ml aprotinina e 1 $\mu$ g/ml Leupeptina) e inibidores de fosfatases (10,28mM ortovanadato de sódio, 10mM pirofosfato de sódio e 100mM Fluoreto de sódio). Todos os inibidores foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e temperatura de -4°C. Após a centrifugação, a amostra ficou separada em três camadas: fat cake (camada superior), proteínas extraídas (camada intermediária) e infranadante (camada inferior). A camada intermediária foi coletada delicadamente, com o auxílio de seringa e agulha e transferida para outro tubo. Foram feitas alíquotas de 100 $\mu$ l e acondicionado a -80°C até o momento das dosagens.

No dia da dosagem, o filtro da placa contendo 96 poços foi lavado com *Assay Buffer*. Para tanto, foi adicionado 200 $\mu$ L deste tampão de lavagem em cada poço e depois removido pela inversão da placa. Em seguida, foram adicionadas *beads* conjugadas com os anticorpos anti-citocinas e lavados novamente com *Assay Buffer*, sendo posteriormente adicionadas as amostras previamente preparadas.

As amostras ficaram incubadas por 24 horas e novamente foram lavadas com *Assay Buffer*. Em seguida, foi adicionado em cada poço o anticorpo biotilado para detecção do epítipo específico da citocina de interesse. Formou-se um “sanduíche” de anticorpos, que foi incubado por 01h. Após esse período, foram realizadas novas lavagens com *Assay Buffer*, sendo então adicionado a estreptavidina que se liga ao anticorpo biotilado. Após um período

de 30 minutos novas lavagens foram feitas e o “sanduíche” de anticorpos ressuspensionado com tampão de ensaio (Bio-Rad). As placas foram analisadas no programa *Bio-Plex Manager Software* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

## 2.9 Extração do RNA total e PCR em tempo real

Amostras de 100 mg de tecido adiposo visceral mesentérico foram homogeneizadas em um FastPrep®-24<sup>TM</sup> em TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, California). O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante e o grau de pureza do RNA foi determinado pela razão  $A_{260/280}$ , tendo como valores aceitáveis entre 1,8 e 2,0.

A integridade do RNA foi confirmada pela visualização em luz ultravioleta do padrão de eletroforese das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A quantificação do RNA mensageiro (RNAm) de todas as amostras de todos os grupos experimentais foi realizada em duplicata no sistema de detecção PCR em tempo real CFX 96 (Bio-Rad, San Francisco, USA) a partir de 20 ng de cDNA, 0,4μM de cada iniciador e 10μL de SsoFast<sup>TM</sup> Eva Green® (Bio-rad, San Francisco, USA) e água suficiente para completar um volume total de 20μL.

A sequência específica dos primers de cada gene está listada na Tabela 1. As amostras foram processadas no Termociclador Rotor-Gene, R 3000 (Robertt Research) e os ciclos consistiram de 95° por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 94°C por 15 segundos, Temperatura de anelamento (Tm) 57-61°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. As Tm dos primers foram previamente padronizadas. Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de MELT. Os valores de threshold cycle (Ct) e as curvas de MELT foram obtidos pelo *Software* Rotor Gene-6.

O Ct é o ponto onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com o menor número de ciclos durante a fase exponencial da amplificação. A variação do Ct ( $\Delta Ct$ ) é calculada através da subtração do Ct <sub>gene alvo</sub> pelo Ct <sub>gene constitutivo</sub>. O nível de expressão comparativa de cada condição foi calculado pelo método de delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) que é a subtração do  $\Delta Ct$  pela média do  $\Delta Ct$  <sub>grupo controle</sub>. O valor em unidades arbitrárias (UA) da expressão dos genes alvos foi calculado por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Livak; Schmittgen. [35]. O gene constitutivo utilizado foi o GAPDH e um controle negativo foi realizado para a verificação de possíveis contaminações com DNA genômico.

### **3.0 Determinação dos níveis de 17 $\beta$ - estradiol no soro**

O sangue foi coletado após eutanásia dos animais e o soro foi separado por meio de centrifugação (20 minutos, 13.000 rpm, 4°C). O sobrenadante foi coletado e armazenado na temperatura de -20°C. A dosagem de 17  $\beta$ -estradiol foi realizada por ELISA de acordo com as especificações do fabricante (kit comercial, ADI-900-174, Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, USA). A sensibilidade do ensaio foi de 10 pg/mL. Todas as amostras foram realizadas em duplicata. A quantificação foi dada em relação à curva padrão com utilização do modelo de regressão não linear de quatro parâmetros logística (4PL).

### **3.1 Análise dos Resultados**

Os ensaios foram analisados quanto à sua significância estatística utilizando o programa de estatística Statística 7.0, adotando-se um nível de significância estatística de  $p \leq 0,05$ . Todos os valores apresentaram distribuição normal, por isso foi usada a análise de variância ANOVA one-way. O post hoc de *Tukey* foi aplicado no caso de alguma significância. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Efeitos da ovariectomia, treinamento resistido e terapia de reposição hormonal sobre parâmetros métricos**

Os animais do grupo Ovx-Sed apresentaram maior peso corporal (23%;  $p \leq 0,05$ ), ingestão alimentar (11%;  $p \leq 0,05$ ) e massa dos depósitos de gordura retroperitoneal (52%;  $p \leq 0,05$ ) quando comparados aos animais do grupo Sham-Sed (Tabela 2). Além disso, a ovariectomia promoveu diminuição no peso do fêmur e útero (11% e 83%  $p \leq 0,05$ , respectivamente) (Tabela 2). No entanto, nos animais do grupo Ovx-Sed-RE foi observado menor peso corporal (12%;  $p \leq 0,05$ ) e maior peso do fêmur e útero (13% e 481%  $p \leq 0,05$ , respectivamente) quando comparados aos animais do grupo Ovx-Sed.

Adicionalmente, os animais do grupo Sham-TR tiveram maior peso do fêmur (12%;  $p \leq 0,05$ ) e diminuição na massa dos depósitos de gordura mesentérica e parametrial (43% e 23%;  $p \leq 0,05$ , respectivamente) em relação aos animais do grupo Sham-Sed. Além

disso, os animais do grupo Ovx-TR, apresentaram menor peso corporal (6%;  $p \leq 0,05$ ) e massa dos depósitos de gordura retroperitoneal (35%;  $p \leq 0,05$ ) quando comparados aos animais do grupo Ovx-Sed.

Nos animais do grupo Ovx-TR-RE foi observado redução no peso corporal quando comparados aos animais do grupo Ovx-Sed e Ovx-TR, (15% e 9%;  $p \leq 0,05$ , respectivamente). Ainda em relação à esse grupo foi encontrado maior peso do fêmur quando comparado aos animais do grupo Ovx-Sed e Ovx-TR (17% e 8%;  $p \leq 0,05$ , respectivamente), evidenciando que a associação do treinamento resistido (TR) e reposição de estrogênio (RE) é mais eficaz em manter a massa óssea do que a realização apenas do TR.

Nenhuma diferença foi observada entre os animais do grupo Ovx-Sed-RE e Ovx-TR-RE. Todos os resultados acima se encontram descritos na Tabela 2.

#### **4.2 Evolução da carga máxima de carregamento durante 12 semanas de treinamento**

Durante as 12 semanas de treinamento, não houve interação entre os grupos e tempo, indicando que os grupos Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-RE, aumentaram a capacidade máxima de carregamento de maneira similar durante o treinamento (Figura 1).

#### **4.3 Expressão de genes relacionados à inflamação no tecido adiposo mesentérico**

A análise do PCR- RT demonstrou que os animais do grupo Sham-TR apresentaram maiores níveis de RNAm de TNF- $\alpha$ , quando comparados aos animais do grupo Sham-Sed. (69%;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 2). Além disso, foi observado maiores níveis de RNAm de TNF- $\alpha$  nos animais do grupo Ovx-TR e Ovx-Sed-RE, quando comparados aos animais do grupo Ovx-Sed (29% e 60%;  $p \leq 0,05$ , respectivamente) (Figura 2).

Adicionalmente, foram encontrados maiores níveis de TNF- $\alpha$  nos animais do grupo Ovx-RT-RE em relação aos animais do grupo Ovx-Sed-RE (18%;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 2). Os níveis de RNAm de IL-10 foram menores nos animais do grupo Sham-TR e Ovx-Sed, quando comparados aos animais do grupo Sham-Sed (48% e 56%;  $p \leq 0,05$ , respectivamente (Figura 3).

Os níveis de adiponectina foram menores nos animais do grupo Sham-TR e Ovx-Sed, quando comparados aos animais do grupo Sham-Sed (57% e 52%;  $p \leq 0,05$ , respectivamente) (Figura 6). Ademais, foi observado aumento nos níveis de RNAm de adiponectina nos animais do grupo Ovx-Sed-RE em relação aos animais do grupo Ovx-Sed

(93%;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 6). No grupo Ovx-TR-RE foi encontrado resultado semelhante, uma vez que os animais desse grupo apresentaram maiores níveis de adiponectina em relação aos animais do grupo Ovx-TR (18%;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 6), demonstrando que a RE promoveu um aumento na expressão gênica de adiponectina..

Em relação à MCP-1, foi encontrado um aumento nos níveis de RNAm nos animais do grupo Sham-TR, quando comparados aos animais do grupo Sham-Sed (38%;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 5). A razão da expressão gênica de IL-10/TNF- $\alpha$ , um importante marcador do status inflamatório, foi menor nos animais do grupo Ovx-Sed e Sham-Tr em relação aos animais do grupo Sham-Sed (65% e 68%;  $p \leq 0,05$ , respectivamente) (Figura 7), evidenciando que tanto a ovariectomia bem como o treinamento resistido promoveram um aumento na inflamação no tecido adiposo mesentérico das ratas. Em adição, a expressão gênica de TLR4 foi consideravelmente maior nos animais do grupo Sham-TR em relação aos animais do grupo Sham-Sed (156%;  $p \leq 0,05$ ). Resultado similar, foi encontrado nos animais Ovx-TR, uma vez que tiveram uma maior expressão gênica de TLR4 quando comparados aos animais do grupo Ovx-Sed (124%;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 8). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de RNAm de IL-6 entre os grupos (Figura 4).

#### **4.4 Concentração de mediadores inflamatórios no tecido adiposo mesentérico**

A fim de avaliar a resposta inflamatória tecidual neste modelo experimental, as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 e as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e adiponectina foram dosadas. Os animais do grupo Sham-TR apresentaram maior concentração de adiponectina em relação aos animais Sham-Sed (50%;  $p \leq 0,05$ ). Além disso, foi encontrado menor concentração deste hormônio nos animais Ovx-Sed quando comparado aos animais Sham-TR (46%;  $p \leq 0,05$ ) e maior concentração de adiponectina nos animais Ovx-Sed-RE quando comparados aos animais Ovx-Sed (98%;  $p \leq 0,05$ ). Adicionalmente os animais do grupo Ovx-TR-RE, tiveram maior concentração de adiponectina quando comparado aos animais dos grupos Sham-Sed, Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-Sed respectivamente (121%, 46%, 48,5% e 173%;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 12), evidenciando um efeito da RE em aumentar os níveis dessa adipocina.

Por sua vez, a concentração de IL-10, foi maior nos animais do grupo Sham-TR, em comparação aos animais do grupo Sham-Sed (29%;  $p \leq 0,05$ ) e nos animais dos grupos Ovx-TR e Ovx-Sed-RE quando comparados aos animais do grupo Ovx-Sed (51% e 62%;  $p \leq 0,05$ , respectivamente). (Figura 10). Entretanto, a concentração de IL-10 foi menor nos animais



Ovx-Sed em relação aos animais Sham-Sed (48%;  $p \leq 0,05$ ). Em adição, os animais do grupo Ovx-TR-RE apresentaram maior concentração de IL-10 em relação aos animais dos grupos Sham-Sed, Ovx-Sed e Ovx-TR, respectivamente (50%, 4% e 37%;  $p \leq 0,05$ ). Adicionalmente, os animais do grupo Ovx-TR apresentaram menor concentração de TNF- $\alpha$  quando comparado aos animais dos grupos Sham-Sed e Ovx-Sed (22% e 28,5%;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 13). Adicionalmente, os animais dos grupos Ovx-Sed-RE e Ovx-TR-RE, tiveram menor concentração de IL-10 em comparação aos animais Ovx-Sed (18% e 23%;  $p \leq 0,05$ ), respectivamente.

Em relação à concentração de IL-6 foi observado uma menor concentração nos animais dos grupos Ovx-Sed-RE e Ovx-TR-RE em relação aos animais do grupo Sham-TR (31% e 30%;  $p \leq 0,05$ , respectivamente) (Figura 9 e 11, respectivamente).

#### **4.5 Morfologia do tecido adiposo mesentérico**

Os animais do grupo Ovx- Sed apresentaram aumento no tamanho do adipócito (hipertrofia) em relação aos animais do grupo Sham-Sed e Sham-TR (5% e 9%;  $p \leq 0,05$ ). Além disso, os animais do grupo Ovx-Sed-RE tiveram aumento no tamanho do adipócito (hipertrofia) quando comparados aos animais do grupo Ovx-Sed e Ovx-TR (35% e 60%;  $p \leq 0,05$ , respectivamente.) (Figura 13). Adicionalmente, um aumento no tamanho do adipócito foi encontrado nos animais do grupo Ovx-TR-RE, em relação aos animais do grupo Ovx-TR.

Entretanto, uma diminuição no tamanho do adipócito ocorreu nos animais do grupo Ovx-TR-RE quando comparados aos animais do grupo Ovx-Sed-RE (24%,  $p \leq 0,05$ ), demonstrando que o treinamento foi eficaz em minimizar os efeitos da RE.

#### **4.6 Níveis de 17 $\beta$ -estradiol no tecido adiposo mesentérico**

Os animais dos grupos Ovx-Sed, apresentaram níveis menores de 17 $\beta$ -estradiol quando comparados aos animais do grupo Sham-Sed (55%;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 14). Além disso, a ovariectomia promoveu diminuição nos níveis do hormônio nos animais do grupo Ovx-TR em relação aos animais do grupo Sham-Tr (56%;  $p \leq 0,05$ ).

No entanto, foi observado maior concentração de 17- $\beta$ -estradiol nos animais do grupo Ovx-Sed-RE em relação aos animais do grupo Ovx-Sed (180%;  $p \leq 0,05$ ), bem como

nos animais do grupo Ovx-TR-RE em relação ao seu controle Ovx-TR (173%;  $p \leq 0,05$ ). Esses resultados mostram o sucesso da ovariectomia e da reposição de estrogênio.

Entretanto, foi detectada uma maior concentração de  $17\beta$ -estradiol nos animais do grupo Ovx-Sed-RE em relação aos animais Sham-Sed (24%;  $p \leq 0,05$ ), assim como nos animais Ovx-TR-RE em relação aos animais do grupo Sham-TR (20%;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 14), mostrando que os animais que realizaram a reposição de estrogênio tinham uma concentração suprafisiológica de  $17\beta$ -estradiol na circulação.

## 5 Discussão

Na ausência de estrogênio devido à menopausa, observa-se aumento na incidência de obesidade e resistência insulínica [56-57]. A ovariectomia (Ovx) em ratas é usualmente utilizada para investigar os mecanismos responsáveis pelas complicações relacionadas à menopausa em humanos [59]. Há diversos estudos que mostram o efeito metabólico e inflamatório da ovariectomia no tecido adiposo visceral [9,23,29]. No entanto, estudos sobre os efeitos da reposição de estrogênio e do treinamento resistido como terapia anti-inflamatória são escassos. Sendo assim, o presente estudo investigou os efeitos combinados e isolados da reposição estrogênica e do treinamento resistido em ratas Sham e Ovx.

No presente estudo, os níveis de  $17\beta$ -estradiol, a massa do útero e fêmur foram consideravelmente diminuídos nas ratas Ovx, confirmando o sucesso da ovariectomia. Além disso, as ratas Ovx apresentaram maior massa corporal e hipertrofia do adipócito associado a um aumento do status inflamatório. Nossos dados estão de acordo com os de Stubbins et al [55], que mostraram um aumento na concentração de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo de ratas Ovx quando comparadas aos animais Sham. O aumento na concentração de TNF- $\alpha$  pode ser tolerado, desde que ocorra também um aumento nos níveis de IL-10 [32]. Entretanto, nossos dados demonstraram que a ovariectomia causou uma diminuição no conteúdo proteico de IL-10. Por sua vez, doze semanas de treinamento resistido de alta intensidade e reposição estrogênica atenuaram estes efeitos da Ovx no tecido adiposo visceral.

A adiposidade visceral, em particular, está associada à inflamação crônica de baixa intensidade no tecido adiposo, causa central de doenças metabólicas relacionadas à obesidade em humanos e roedores [58]. Evidências mostram que mulheres na pós-menopausa possuem maiores adipócitos e que a atividade lipolítica destes está aumentada, o que pode explicar os altos níveis sistêmicos de ácidos graxos [40]. Esse processo pode levar ao acúmulo de gordura

no fígado e músculo esquelético, aumentando o ambiente inflamatório, que favorece o desenvolvimento de esteatose hepática (EH) e resistência insulínica [40].

A condição de ovariectomia promove ganho de peso e aumento do tecido adiposo [56-57]. Todavia, estudos prévios mostram que a RH e o treinamento aeróbio podem ser adotados como estratégias terapêuticas paralelas, a fim de diminuir o ganho de peso e a inflamação no tecido adiposo visceral (TAV) [23, 55]. Neste contexto, Zoth et al. [68], demonstraram que a atividade física associada à reposição estrogênica promoveram efeito positivo na prevenção da obesidade em ratas Ovx. Além disso, está bem documentado, que o aumento da inflamação no TAV evidenciado pelo aumento na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , contribuem para o aumento da inflamação sistêmica [33]. Neste contexto, nossos resultados mostraram que a RE promoveu aumento da expressão gênica de TNF- $\alpha$ , entretanto, não foi observado o mesmo aumento do conteúdo proteico. Além disso, embora a RE não tenha atenuado o aumento da área do adipócito nos animais Ovx, a mesma promoveu diminuição da massa corporal, diminuição no conteúdo proteico de TNF- $\alpha$  e aumento no conteúdo proteico de IL-10, evidenciando um efeito anti-inflamatório no tecido adiposo visceral.

Adicionalmente a estes resultados, em nosso estudo, foi observado um aumento tanto na expressão gênica de adiponectina, bem como no conteúdo proteico desta proteína nos animais Ovx-Sed-RE. A adiponectina que é exclusivamente produzida pelo adipócito, é considerada uma adipocina que exerce proteção contra a aterosclerose e diabetes [41]. Em indivíduos obesos as concentrações de adiponectina estão reduzidas e estudos mostram que a hipoadiponectinemia está intimamente associada à resistência insulínica. Os efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênicos se devem principalmente pela redução da expressão de TNF- $\alpha$  e diminuição da quimiotaxia de macrófagos, sendo a maior parte desses efeitos recorrentes da inibição da atividade do fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B). Em adição, nossos dados mostraram que a associação do treinamento resistido e da reposição estrogênica levou à diminuição na concentração de TNF- $\alpha$  e aumento da expressão gênica e proteica de adiponectina. Entretanto, interessante a concentração de IL-10 estava reduzida nesses animais. Nós especulamos que este aumento importante na concentração proteica de adiponectina nos animais Ovx-TR-RE tenha ocorrido para compensar a diminuição da concentração de IL-10. Esta interpretação é suportada pelo fato de adiponectina ter a função de reduzir a produção e a atividade de TNF- $\alpha$  [37,41] que de fato se encontrava em menor concentração nos animais do presente estudo.

Em nosso estudo associado ao aumento do status inflamatório foi encontrado um aumento da área dos adipócitos nos animais Ovx. Dados prévios demonstram que a hipertrofia do adipócito leva à hiperperfusão do tecido adiposo, o que cria áreas de microhipóxia, ativando as vias IKK/NFkB e assim, aumentando a expressão de genes envolvidos na inflamação com maior liberação de citocinas e recrutamento de macrófagos para o tecido [31, 60]. A causa principal do influxo de macrófagos no TAV não é completamente compreendida, mas um aumento na expressão gênica de MCP-1 parece preceder a infiltração macrofágica sugerindo que esta citocina desempenha um papel importante no acúmulo de macrófagos no TAV [28]. Neste contexto, evidências indicaram que MCP-1 desempenha papel chave no desenvolvimento de perturbações metabólicas causadas pela diminuição da função ovariana [62]. É importante ressaltar que a maioria dos estudos mostram efeitos do exercício aeróbio em humanos e ratos obesos [8, 23, 48] dificultando comparações com o TR.

O protocolo de TR usado em nosso estudo promoveu a diminuição da expressão gênica de MCP-1 nos animais Sham-TR. Corroborando com nosso resultado, Bradley et al. [4] demonstraram uma diminuição nos níveis de RNAm de MCP-1 após seis semanas de corrida espontânea em ratas que consumiram dieta hiperlipídica. Entretanto, nenhuma mudança na expressão gênica de MCP-1 foi detectada no TAV e tecido adiposo subcutâneo (TAS) em ratos que realizaram corrida espontânea por quatro semanas [17]. Além disso, esta diminuição na expressão de MCP-1 foi acompanhada pela diminuição da concentração proteica de TNF- $\alpha$  e aumento da concentração proteica de IL-10, indicando que nosso protocolo de TR diminui o status inflamatório do VAT nos animais Ovx treinados. ROSA et al.[44], mostraram que o exercício exaustivo na esteira aumentou a produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo visceral mesentérico e retroperitoneal de ratos machos e diminui a razão IL-10/ TNF- $\alpha$  em ambos os depósitos de gordura. Por sua vez, o mesmo protocolo de exercício promoveu um efeito anti-inflamatório no músculo esquelético desses animais, mostrando que o perfil inflamatório no tecido adiposo se opõe ao do músculo esquelético. Diversos estudos mostraram que a perda de peso associada ao exercício pode promover uma melhora no status inflamatório [8,52,72]. Entretanto, este efeito benéfico parece ocorrer em exercícios com intensidade moderada, uma vez que o exercício extenuante aumenta os marcadores pró- inflamatórios no soro, tecido adiposo, e músculo esquelético [44,45]. Adicionalmente, o treinamento de *endurance* pode suprimir o estresse oxidativo (EO) e o estado hipóxico do TAV devido à *up regulation* no sistema de defesa antioxidante e aumento do fluxo sanguíneo, respectivamente, levando à redução da expressão gênica

desregulada de adipocinas relacionadas à inflamação, como TNF- $\alpha$  e MCP-1 [48]. à inflamação, como TNF- $\alpha$  e MCP-1 [48].

Existem poucos estudos que verificaram o efeito do TR na inflamação do tecido adiposo. Estudos anteriores realizados por nosso grupo revelaram que o TR é capaz de diminuir o acúmulo e deposição de gordura no fígado de ratas ovariectomizadas e reduzir a expressão gênica de moléculas relacionadas à lipogênese [9]. Mais recentemente, foi demonstrado que este mesmo protocolo, foi capaz de suprimir a síntese de ácidos graxos intra-abdominal em ratas ovariectomizadas [53].

Nesse sentido, nossos resultados mostraram que o treinamento resistido proposto além de melhorar o status inflamatório foi eficiente em diminuir a massa corporal e a área dos adipócitos nos animais Ovx. Nossos dados estão em concordância com os de Speretta et al. [52], que demonstraram que o mesmo modelo de TR utilizado em nosso estudo melhorou o perfil lipídico, diminuiu a adiposidade e obesidade associada à inflamação em ratos. Uma vez que o treinamento promove aumento do sistema nervoso simpático, uma das possíveis explicações para nosso achado é a maior estimulação da lipólise e liberação de ácidos graxos que fornecem energia para os músculos e outros tecidos após o exercício.

Adicionalmente, no presente estudo foi encontrado que o treinamento promoveu um aumento da expressão gênica de TLR4. Um dos mecanismos envolvidos no aumento de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo seria a ativação do receptor TLR4 altamente expresso nas células do sistema imune inato (Fig 6) e também encontrado em vários outros tipos de células incluindo hepatócitos, adipócitos e miócitos [31]. TLR4 pode ativar o fator de transcrição NFK- $\beta$  e aumentar a resposta inflamatória [60] (Fig 5). No presente estudo é possível que o aumento encontrado na expressão gênica de TLR4 tenha ocorrido em função do aumento da lipólise e de AGL circulantes que ativam a sinalização TLR4 [45]. Entretanto, acreditamos que a regulação ascendente de marcadores anti-inflamatórios que ocorreu nos animais treinados tenha promovido inibição da atividade do fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) que medeia as respostas imunes e inflamatórias. Não foi detectado nesse trabalho, mudanças na expressão gênica e proteica de IL-6. Corroborando com nossos resultados, Gomez-Merino et al. [16], relataram ausência de modificações na concentração de IL-6 no tecido adiposo branco de animais treinados. Adicionalmente, Gleeson et al. [15], não encontraram aumentos significativos nos níveis de IL-6 em ratos após treinamento intenso na esteira, com duração de sete semanas. Entretanto, em um estudo de Bruun et al. [5], os níveis de RNAm de IL-6 diminuíram no TAV e TAS de indivíduos obesos, que associaram restrição calórica e treinamento.

Em conclusão, o presente estudo indicou que o treinamento resistido, a reposição estrogênica e a associação de ambas as intervenções, são estratégias eficazes em reduzir a massa corporal e diminuir a inflamação do tecido adiposo visceral de ratas ovariectomizadas. Além disso, mostramos que a reposição estrogênica utilizada em nosso estudo, promoveu ação anti-inflamatória por mecanismos independentes da alteração do tamanho do adipócito que precisam ser melhores elucidados. Adicionalmente, estudos futuros terão como objetivo esclarecer se doses mais baixas de estrogênio promovem efeitos similares.

## 6 REFERÊNCIAS

- [1] Azoulay C. Hormone replacement therapy is not what it used to be anymore. *Rev Med Interne* 2004; v. 25(11), 806-15.
- [2] Bailey CJ, Ahmed-Sorour H. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Effects of insulin secretion. *Diabetologia* 1980; v.19, 475-481.
- [3] Bosenberg AT, Brock-Utne JG, Gaffin SL, Wells MT, Blake GT. Strenuous exercise causes systemic endotoxemia. *J Appl Physiol* 1988; v. 65, 106-8.
- [4] Bradley RL, Jeon JY, Liu FF, Maratos-Flier E. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 2008; v. 295, p. 586-594.
- [5] Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; v. 285, p.27-33.
- [6] Bruun JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 2006; v. 290, p. 961-967.
- [7] Coppack S. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2001; v. 60, p.349-56.
- [8] Damirchi A, Mehdizade R, Ansari M. M, Soltani B. and Babaei P. Effects of aerobic exercise training on visceral fat and serum adiponectin concentration in ovariectomized rats. *Climateric* 2010; v. 13, p.171-178.
- [9] Domingos MM, Rodrigues MF, Stotzer US, Bertucci DR, Souza MV, Marine DA, Gatto Cdo V, de Araújo HS, de Andrade Perez SE. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. *Eur J Appl Physiol* 2012; v. 112(4), p.1437-44.
- [10] Exel V, Gussekloo EJ, Craen AJ, Frölich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westendorp RG, Leiden 85 Plus Study. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the leiden 85-plus study. *Diabetes* 2002; v. 51, p. 1088-1092.
- [11] Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Pashke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; v. 290, p.1084-1089.
- [12] Fatouros IG, Tournis S, Leontsini D, Jamurtas AZ, Sxina M, Thomakos P, Manousaki M, Douroudos I, Taxildaris K, Mitrakou A. Leptin and adiponectin responses in overweight inactive elderly following resistance training and detraining are intensity related. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; v. 90, p. 5970-5977.

- [13] Fisher G, Hyatt TC, Hunter GR, Oster RA, Desmond RA, Gower BA. Effect of diet with and without exercise training on markers of inflammation and fat distribution in overweight women *Obesity* 2011; v. 19, p. 1131-1136.
- [14] Flynn MG, McFarlin BK, Markofski MM. State of the art reviews: the anti-inflammatory actions of exercise training *Am J Lifestyle Med* 2007; v. 1, p. 220-35.
- [15] Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* 2007; v. 103, p.693-9.
- [16] Gomez-Merino D, Drogou C, Guezennec CY, Chennaoui M. Effects of chronic exercise on cytokine production in white adipose tissue and skeletal muscle of rats. *Cytokine* 2007; v. 40 (1), p. 23-9.
- [17] Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, Goodyear LJ. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 2009; v. 297, p. 495–504.
- [18] Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 2006; v. 83, p.461-465.
- [19] Heredia F.P, S Gomez-Martinez, Marcos, and A. Obesity, Inflammation and immune system. *Proceedings of the Nutrition Society* 2012; v.71, p.332-38.
- [20] Hirose L, Nosaka K, Newton M, Laveder A, Kano M, Peake J, Suzuki K. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors *Exerc Immunol Rev* 2004; v. 10, p.75-90.
- [21] Hornberger Jr TA, Farrar RP. Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. *Can J Appl Physiol* 2004; v. 29, p.16-31.
- [22] Hulver MW, Zheng D, Tanner CJ, Houmard JA, Kraus WE, Slentz S, Sinha MK, Pories WJ, MacDonald KG, Dohm GL. Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action. *AmJ Physiol* 2002; v. 283, p. 861-865.
- [23] Jong Kui Jun, Wang Lok Lee, Hee Geun Park, Sang Ki Lee, Sun Hyo Jeong and Young Ran Lee. Moderate intensity exercise inhibits macrophage infiltration and attenuates adipocyte inflammation in ovariectomized rats. *J Exerc Nutr Biochem* 2014; v. 18 (1), p.119-127.
- [24] José C. Rosa Neto, Fábio S. Lira, Lila M. Oyama, Nelo E. Zanchi, Alex S. Yamashita, Miguel L. Batista Jr, Cláudia M. Oller do Nascimento, Marília Seelaender. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. *Eur J Appl Physiol* 2009; v. 106, p. 697-704.
- [25] Juge-Aubry C, Henrichot E, Meier C. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; v.19, p.547-66.



- [26] Jung RT. Obesity as a disease. *Br Med Bull.* 1997; v.53 (2), p.307-21.
- [27] Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; v. 15 (3), p.175-91.
- [28] Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK. Interplay of TNF- $\alpha$  and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2006; v. 41, p. 1023-30.
- [29] Kim WK, Choi EK, Sul OJ, Park YK, Kim ES, Yu R, Suh JH, Choi HS. Monocyte chemoattractant protein1 deficiency attenuates oxidative stress and protects against ovariectomy-induced chronic inflammation in mice. *PLoS One.* 2013; v. 19, p. 8 (8).
- [30] Kriketos AD, Gan SK, Pounten AM, Furler SM, Chisholm DJ, Campbell LV. Exercise increases adiponectin levels and insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care* 2004; v. 27, p. 629-630.
- [31] Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem* 2000; v. 275, p. 24255-24263.
- [32] Lira F. S, Rosa J. C, Yamashita A. S, Koyama C.H, Batista Jr M. L and. Seelaender M. Endurance training induces depot specific changes in IL-10/TNF- $\alpha$  ratio in rat adipose tissue. *Cytokine* 2009; v. 45, p. 80-85.
- [33] Lira FS, Rosa JC, Zanchi NE, Yamashita AS, Lopes RD, Lopes AC, Batista ML Jr, Maachi M, Pieroni L, Bruckert E, Jardel C, Fellahi S, Hainque B, Capeau J, Bastard JP. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF alpha, leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; v. 28, p. 993-997.
- [34] Lira FS, Rosa JC, Zanchi NE, Yamashita AS, Lopes RD, Lopes AC, Batista ML Jr, Seelaender M. Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: effect of exercise. *Cell Biochem Funct* 2009; v. 27(2), p.71-5, Review.
- [35] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; v.25(4), p.402-8.
- [36] Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006; v. 116, p. 1494-1505.
- [37] Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 2004; v. 40, p. 177-84.
- [38] Miyazaki S, Izawa T, Ogasawara JE, Sakurai T, Nomura S, Kizaki T, Ohno H, Komabayashi T. Effect of exercise training on adipocyte-size-dependent expression of leptin and adiponectin. *Life Sciences* 2010; v. 86, p. 691-698.

- [39] National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C.; National Academy Press, 1996, 140pp.
- [40] Nicklas BJ, Rogus EM, Colman EG, Goldberg AP. Visceral adiposity, increased adipocyte lipolysis, and metabolic dysfunction in obese postmenopausal women. *Am J Physiol* 1996; v. 270, p. 72-78.
- [41] Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 2003; v.14, p.561-6.
- [42] Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005; v. 98, p. 1154-62.
- [43] Pond C. Physiological specialisation of adipose tissue *Prog Lipid Res* 1999; v. 38, p. 225-48.
- [44] Rosa Neto JC, Lira FS, Oyama LM, Zanchi NE, Yamashita AS, Batista ML, Oller do Nascimento CM, Seelaender M. Exhaustive exercise causes an antiinflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. *Eur J Appl Physiol* 2009; v. 106 (5), p. 697-704.
- [45] Rosa JC, Lira FS, Eguchi R, Pimentel GD, Venâncio DP, Cunha CA, Oyama LM, De Mello MT, Seelaender M, do Nascimento CM. Exhaustive exercise increases inflammatory response via Toll like receptor-4 and NF- $\kappa$ Bp65 pathway in rat adipose tissue. *Journal of Cellular Physiology* 2011; v. 226 (6), p. 1604-1607.
- [46] Sakurai T1, Takei M, Ogasawara J, Watanabe N, Sanpei M, Yoshida M, Nakae D, Sakurai T, Nakano N, Kizaki T, Ohno H, Izawa T. Exercise training enhances tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced expressions of antiapoptotic genes without alterations in caspase-3 activity in rat epididymal adipocytes. *Japanese Journal of Physiology* 2005; v.55, p.181-189.
- [47] Sakurai T1, Izawa T, Kizaki T, Ogasawara JE, Shirato K, Imaizumi K, Takahashi K, Ishida H, Ohno H. Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; v. 379, p. 605-609.
- [48] Sakurai T, Ogasawara J, Kizaki T, Sato S, Ishibashi Y, Takahashi M, Kobayashi O, Oh-Ishi S, Nagasawa J, Takahashi K, Ishida H, Izawa T, Ohno H. The Effects of Exercise Training on Obesity-Induced Dysregulated Expression of Adipokines in White Adipose Tissue *Int J Endocrinol*. 2013; v. 2013, p. 801743.
- [49] Schottelius AJG, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin Jr AS. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of  $\text{jB}$  kinase activity and nuclear factor  $\text{jB}$  DNA binding. *J Biol Chem* 1999; v. 274, p. 31868-74.
- [50] Sites CK, L'Hommedieu GD, Toth MJ, Brochu M, Cooper BC, Fairhurst PA. The effect of hormone replacement therapy on body composition, body fat distribution, and insulin

sensitivity in menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; v. 90, p. 2701-7.

[51] Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; v. 346, p. 739-745.

[52] Speretta GF, Rosante MC, Duarte FO, Leite RD, Lino AD, Andre RA, Silvestre JG, Araujo HS, Duarte AC. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics (Sao Paulo)* 2012; v. 67 (12), p. 1469-77.

[53] Stotzer US, Rodrigues MFC, Domingos MM, Gatti GHS, Duarte, FO, Gatto CVG, Duarte ACGO, Shiguemoto GE, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS. Resistance Training Suppresses Intra-abdominal Fatty Acid Synthesis in Ovariectomized Rats. *International Journal of Sports Medicine* 2015; v. 36 (3), p. 226-33.

[54] Strom JO, Theodorsson E, Theodorsson A. Order of magnitude differences between methods for maintaining physiological  $17\beta$ -oestradiol concentrations in ovariectomized rats. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; v. 68 (8), p. 814-822.

[55] Stubbins RE., Najjar K., Holcomb VB., Hong J. & Nuñez NP. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2012; v.14, p. 58-66.

[56] Tchernof A, Desmeules A, Richard C, Laberge P, Daris M, Mailloux J, Rhéaume C, Dupont P. Ovarian hormone status and abdominal visceral adipose tissue metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; v. 89, p. 3425-30.

[57] Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *Int J Obes* 2000; v. 24, p. 226-31.

[58] Trayhurn P, Wood I. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue *Br J Nutr* 2004; v. 92, p.347-55.

[59] Turner AS. Animal models of osteoporosis: necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2011; v. 22(1), p. 66-81.

[60] Vitseva OI, Tanriverdi K, Tchkonina TT, Kirkland JL, McDonnell ME, Apovian CM, Freedman J, Gokce N. Inducible toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity* 2008; v. 16, p. 932-937.

[61] Wolf A. M, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, and Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; v. 323, p. 630-635.

[62] Woon-Ki K., Eun-Kyung C, Ok-Joo S, Yeon-Kyung P, Eun-Sook K, Rina Y, Jae-Hee S, Hye-Seon C. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Deficiency Attenuates Oxidative Stress and Protects against Ovariectomy-Induced Chronic Inflammation in Mice. *PLoS One* 2013; v. 19, p. 8 (8).

- [63] World Health Organization. Obesity and overweight (2013) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- [64] Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; v. 112 (12), p. 1821-30.
- [65] Yanai H., Tomono Y, Ito K, Furutani N., Yoshida H., and Tada N. The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. *Nutrition Journal* 2008; v. 7, p. 10-17.
- [66] Yatagai T, Nishida Y, Nagasaka S, Nakamura T, Tokuyama K, Shindo M, Tanaka H, Ishibashi S. Relationship between exercise training-induced increase in insulin sensitivity and adiponectinemia in healthy men. *Endocr J* 2003; v. 50, p. 233-238.
- [67] Zhang Y, Guo K.-Y, Diaz P. A, Heo M, Leibel RL. Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 2002; v. 282, p. 226-234.
- [68] Zoth N, Weigt C, Laudenbach-Leschowski U, Diel P. Physical activity and strogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; v. 122 (1-3), p. 100-5.

## TABELAS

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos primers usados para PCR-RT.

Genes	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')	N. de acesso
TNF- $\alpha$	CACCACGCTCTTCTGTCTAC	ATCTGAGTGTGAGGGTCTGG	NM_012675.2
IL-10	CTGGTAGAAGTGATGCC	TTGCTTTTATTCTCACAGGGGA	NM_012854.2
IL-6	TCCAGCCAGTTGCCTTCTT	TGTTGTGGTGGTATCCTCTGT	NM_012589.1
MCP-1	AGCCAGATGCAATTAATGCC	ACACCTGCTGCTGGTGTCTC	NM_031530.1
Adiponectina	CTCCTGTTCTCTTAATCCTGCC	TCCCTTCTCTCCCTTCTCTCCAG	NM_144744.3
TLR4	CATTGTCCCTTCTGCCTGAGA	TGAAGTTGTGAGAAATGGTGAAGC	NM_019178.1
GAPDH	GATGCTGGTCTGAGTATGTCG	GTGGTGCAGGATGCATGCTGA	NM_017008.3

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral- alfa; IL-10: Interleucina-10; IL-6: Interleucina-6; MCP-1: Proteína quimioatraente de monócitos 1; Adiponectina; TLR4: Receptor *Toll Like* 4; GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

**Tabela 2.** Efeitos da ovariectomia, treinamento resistido e terapia de reposição hormonal sobre parâmetros métricos.

	Sham-Sed	Sham-TR	Ovx-Sed	Ovx-TR	Ovx-Sed-RE	Ovx-TR-RE
Massa Corporal (g)	301,85 $\pm$ 6,56	320,42 $\pm$ 4,77	372,10 $\pm$ 11,08*	350,40 $\pm$ 10,44# $\delta$	328,94 $\pm$ 7,57*# $\$$	317,66 $\pm$ 8,12# $\$$
Ingestão alimentar (g/d)	21,05 $\pm$ 0,50	22,78 $\pm$ 0,58	23,39 $\pm$ 0,92*	23,25 $\pm$ 0,64*	22,28 $\pm$ 0,84	22,58 $\pm$ 0,75
Gordura Parametrial (g)	6,52 $\pm$ 0,74	5,05 $\pm$ 0,26*	6,93 $\pm$ 0,38	6,43 $\pm$ 0,42	8,13 $\pm$ 0,60 $\delta$	6,97 $\pm$ 0,69 $\delta$
Gordura Mesentérica (g)	3,68 $\pm$ 0,28	2,10 $\pm$ 0,12*	3,14 $\pm$ 0,27 $\delta$	3,38 $\pm$ 0,30 $\delta$	3,51 $\pm$ 0,28 $\delta$	3,35 $\pm$ 0,35 $\delta$
Gordura Retroperitoneal (g)	2,97 $\pm$ 0,37	2,25 $\pm$ 0,15	4,54 $\pm$ 0,26* $\delta$	2,96 $\pm$ 0,55#	4,35 $\pm$ 0,49* $\delta$ $\$$	3,39 $\pm$ 0,33 $\delta$
Massa do útero (g)	0,67 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,00* $\delta$	0,09 $\pm$ 0,0* $\delta$	0,64 $\pm$ 0,05# $\$$	0,62 $\pm$ 0,03# $\$$
Massa do fêmur (g/100 g MC)	0,26 $\pm$ 0,005	0,29 $\pm$ 0,004*	0,23 $\pm$ 0,006* $\delta$	0,25 $\pm$ 0,010	0,26 $\pm$ 0,007#	0,27 $\pm$ 0,004# $\$$

Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média; n = 6 ratas por grupo. MC indica massa corporal

\* , significativamente diferente de Sham-Sed: (p = 0,05).

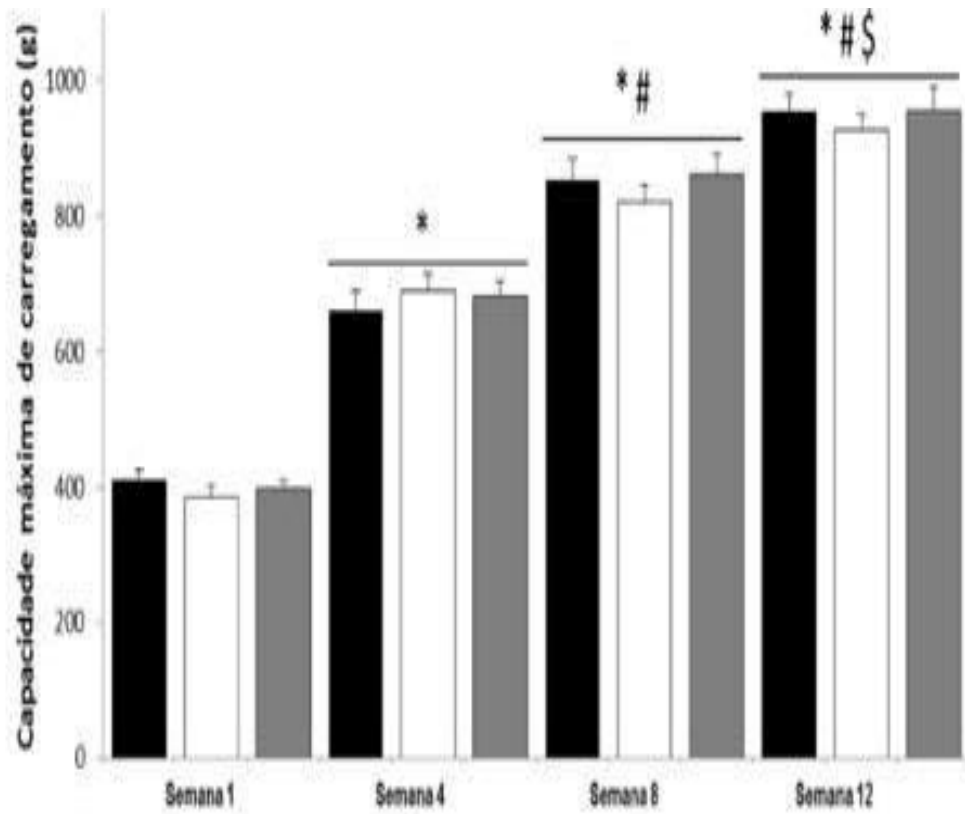
$\delta$ , significativamente diferente de Sham-TR: (p = 0,05).

#, significativamente diferente de Ovx-Sed: (p = 0,05).

$\$$ , significativamente diferente de Ovx-TR (p = 0,05).

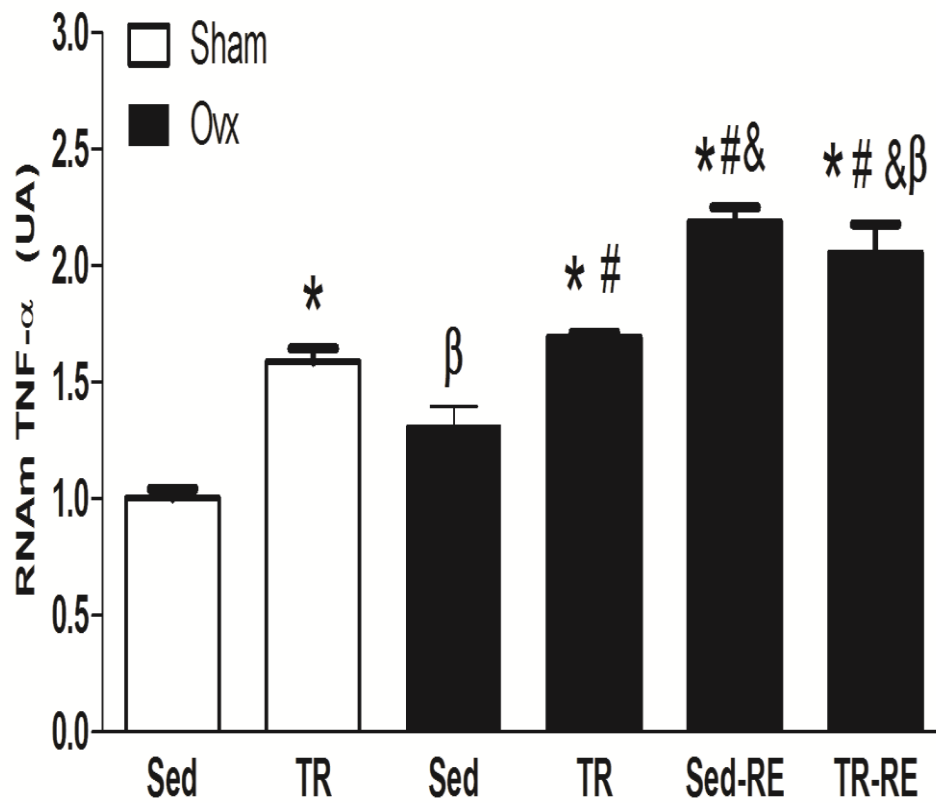
&, significativamente diferente de Ovx-Sed-RE (p = 0,05).

FIGURA 1



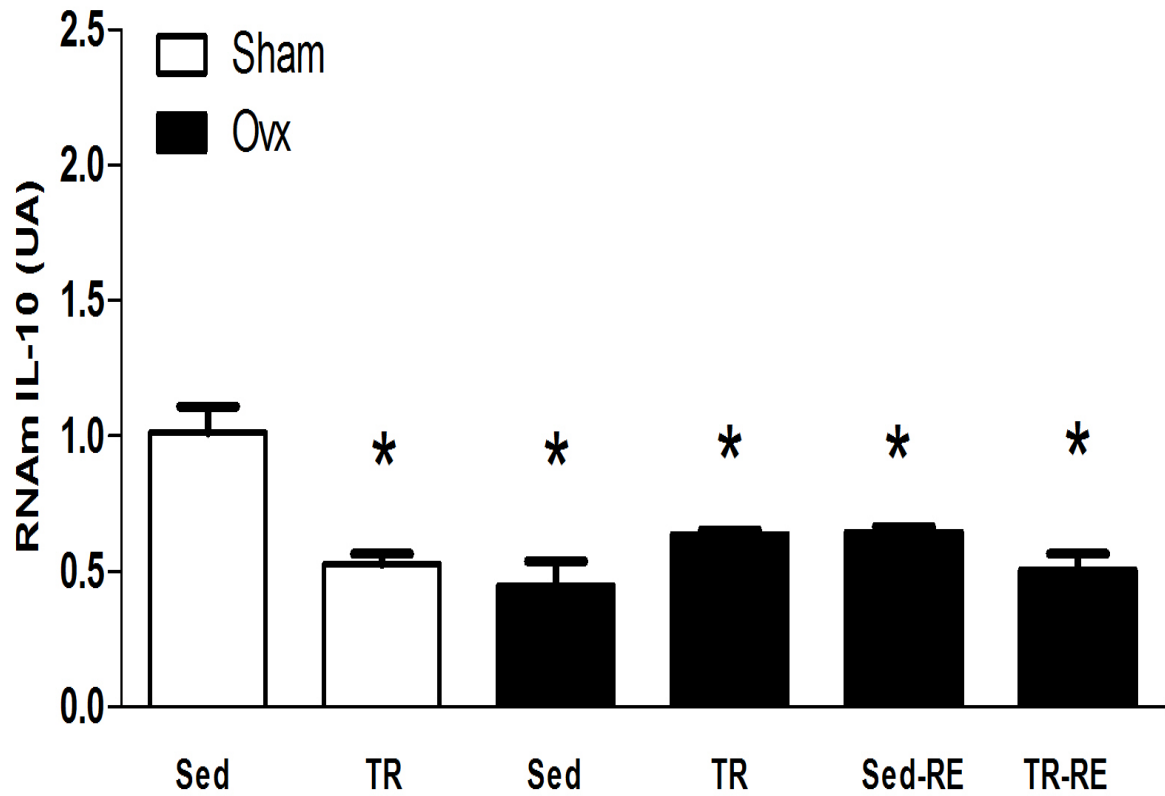
**Figura 1.** Carga máxima (g) dos grupos Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-RE nas semanas 1, 4, 8 e 12. Os valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média; (n=11 por grupo). \*, significativamente diferente da semana 1; # significativamente diferente da semana 4 ( $p \leq 0,05$ ); \$ significativamente diferente da semana 8 ( $p \leq 0,05$ ).

FIGURA 2



**Figura 2.** Expressão gênica de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo mesentérico de ratas. Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo). \*, significativamente diferente de Sham-Sed; #, significativamente diferente de Ovx-Sed; &, significativamente diferente de Ovx-TR;  $\beta$ , significativamente diferente de Sham-TR ( $p \leq 0.05$ ).

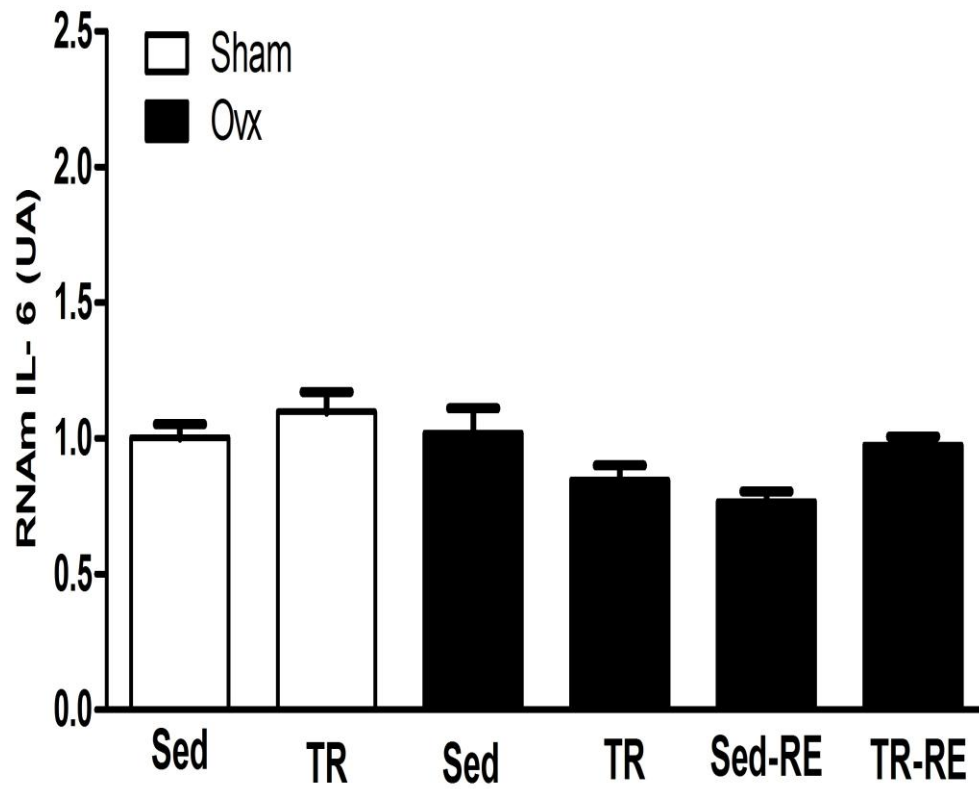
FIGURA 3



**Figura 3.** Expressão gênica de IL-10 no tecido adiposo mesentérico de ratas. Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo). \*, significativamente diferente de Sham-Sed ( $p \leq 0.05$ ).

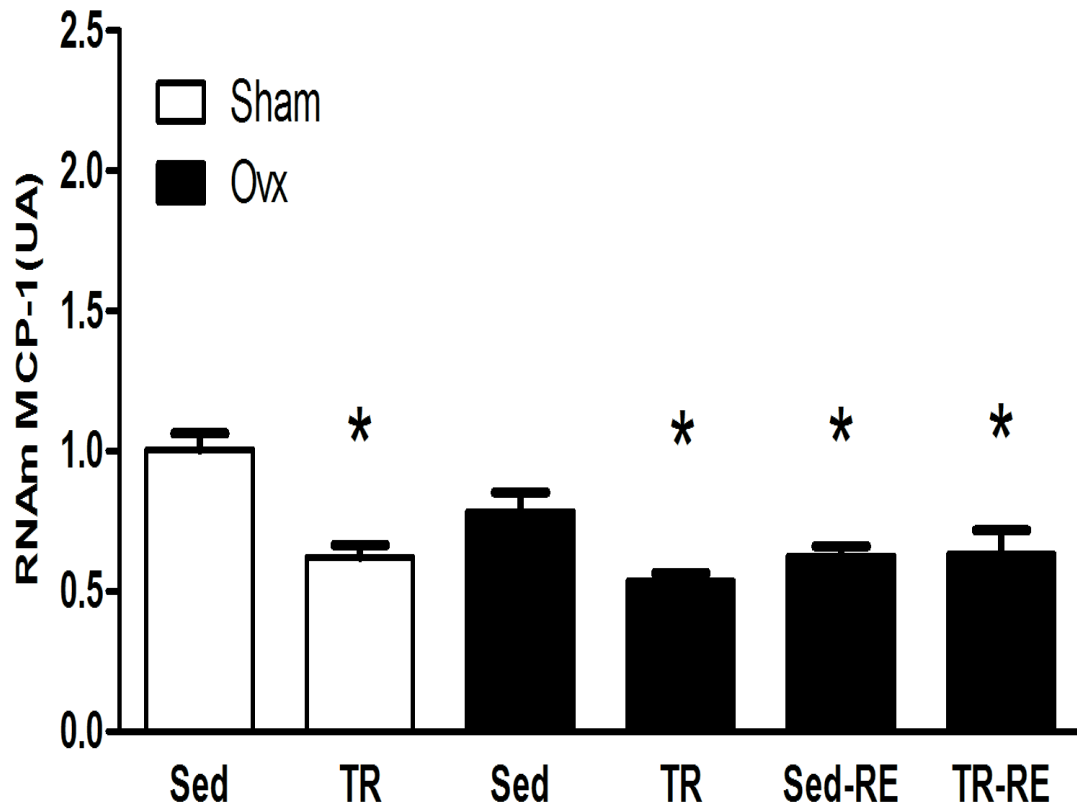


FIGURA 4



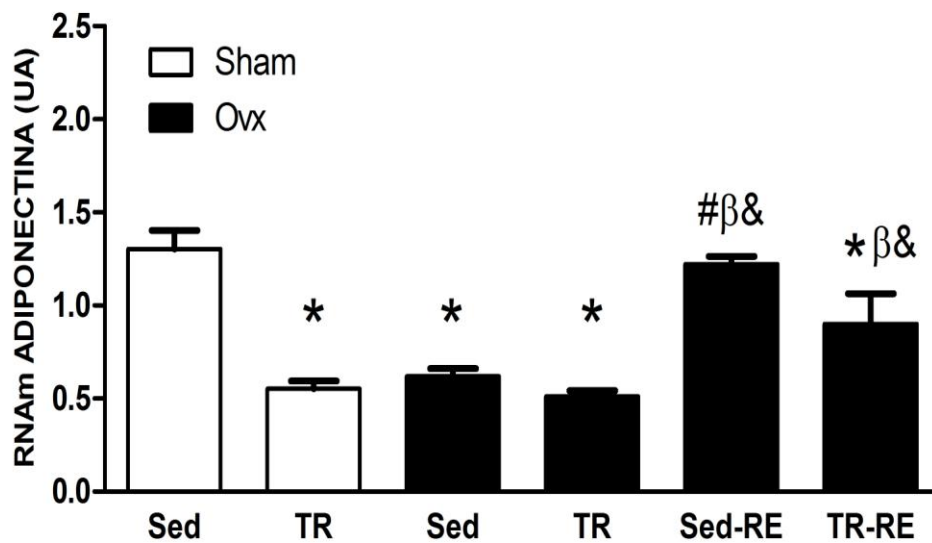
**Figura 4.** Expressão gênica de IL-6 no tecido adiposo mesentérico de ratas. Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo) ( $p \leq 0.05$ ).

FIGURA 5



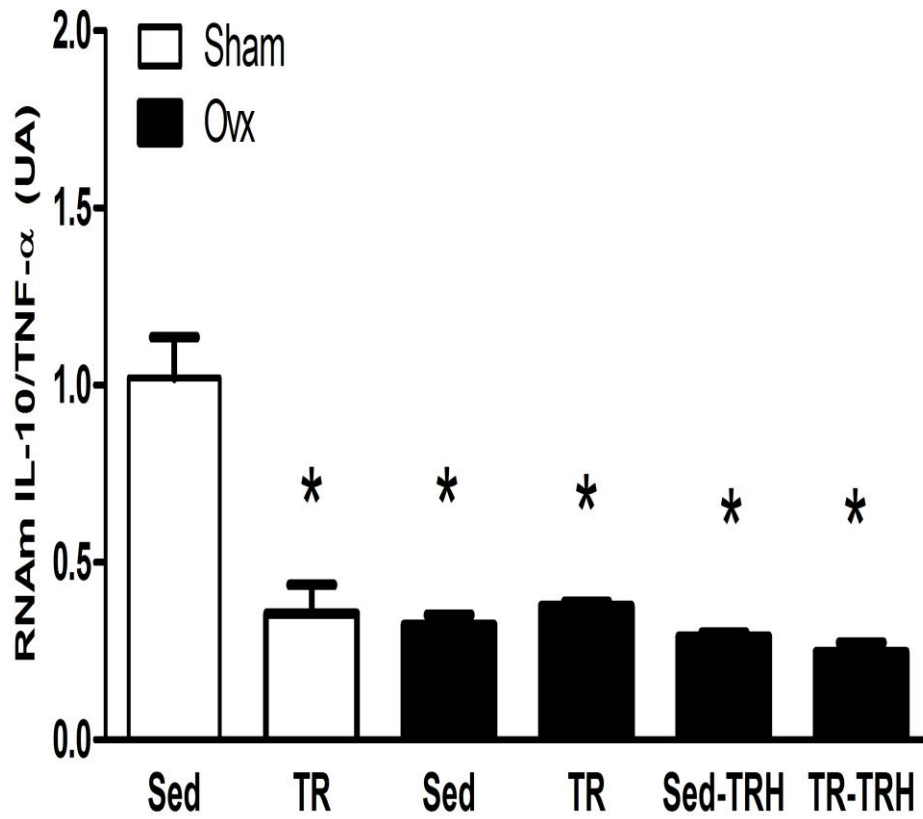
**Figura 5.** Expressão gênica de MCP-1 no tecido adiposo mesentérico de ratas. Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo). \*, significativamente diferente de Sham-Sed ( $p \leq 0.05$ ).

FIGURA 6



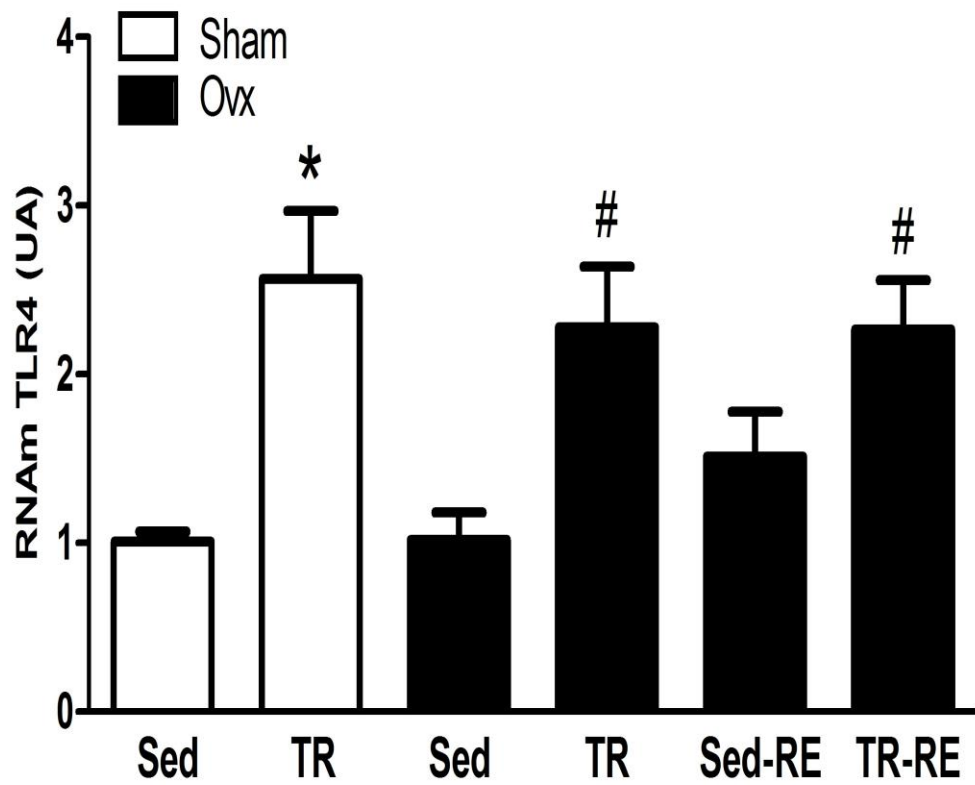
**Figura 6.** Expressão gênica de Adiponectina no tecido adiposo mesentérico de ratas. Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo). \*, significativamente diferente de Sham-Sed; #, significativamente diferente de Ovx-Sed; &, significativamente diferente de Ovx-TR;  $\beta$  significativamente diferente de Sham-TR ( $p \leq 0.05$ ).

FIGURA 7



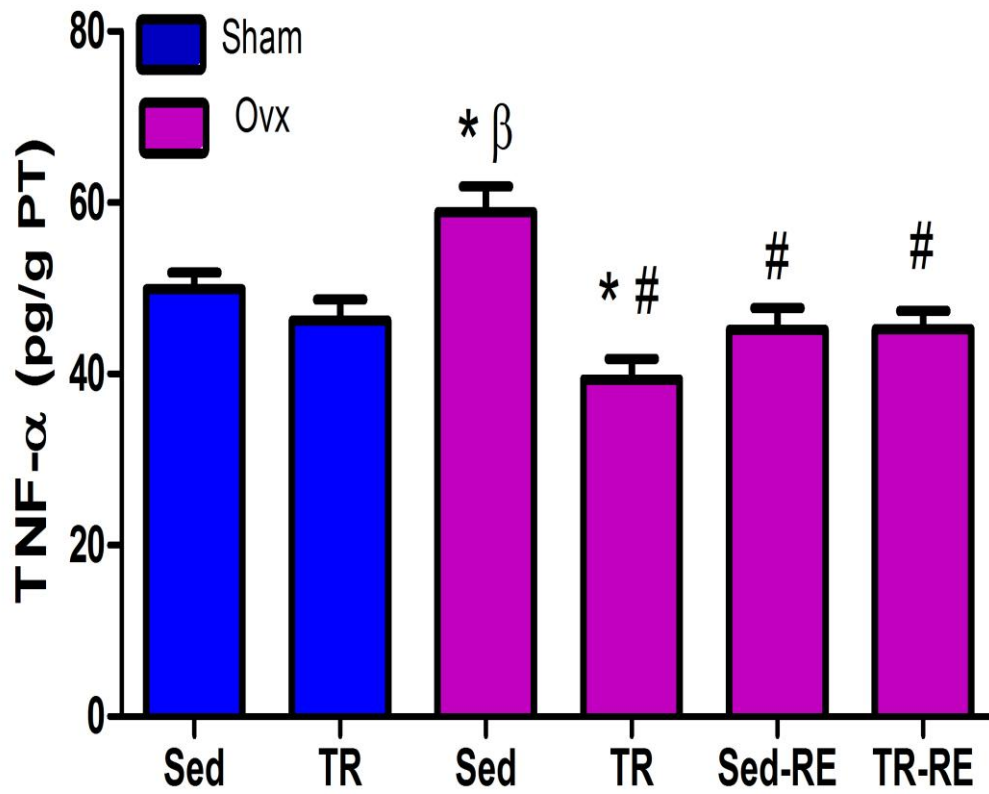
**Figura 7.** Expressão gênica de IL-10/TNF- $\alpha$  no tecido adiposo mesentérico de ratas. Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo). \*, significativamente diferente de Sham-Sed ( $p \leq 0.05$ ).

FIGURA 8



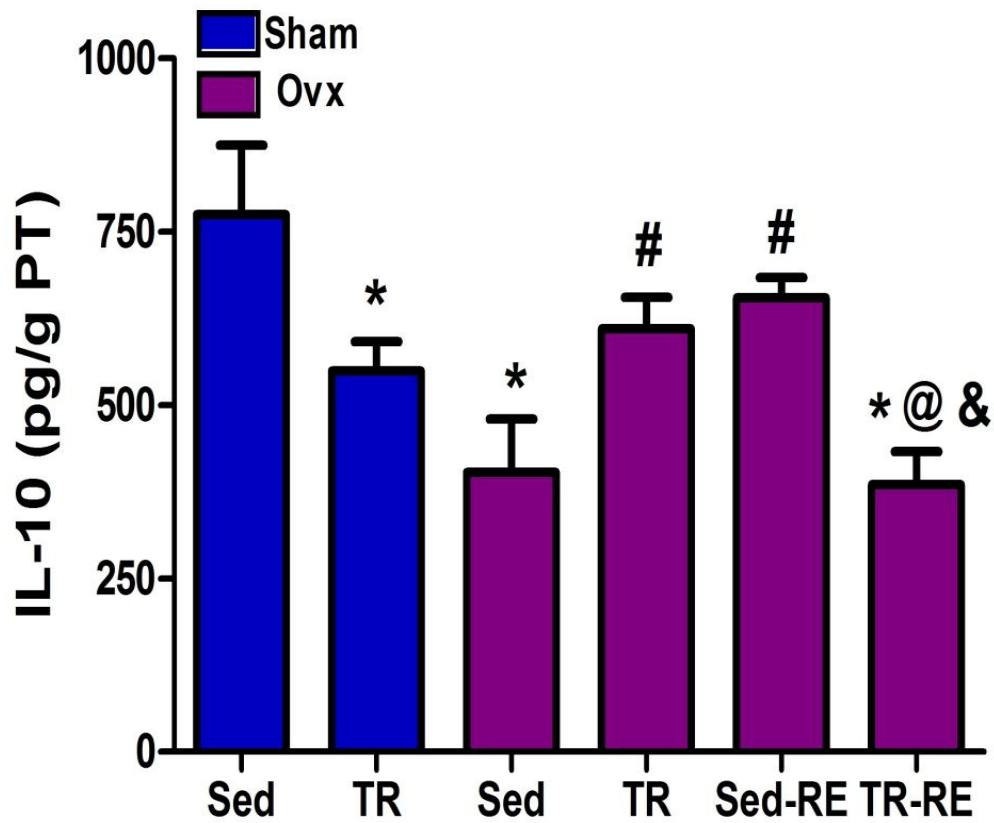
**Fig 8.** Expressão gênica de TLR4 no tecido adiposo mesentérico de ratas. Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo). \*, significativamente diferente de Sham-Sed; #, significativamente diferente de Ovx-Sed ( $p \leq 0.05$ ).

FIGURA 9



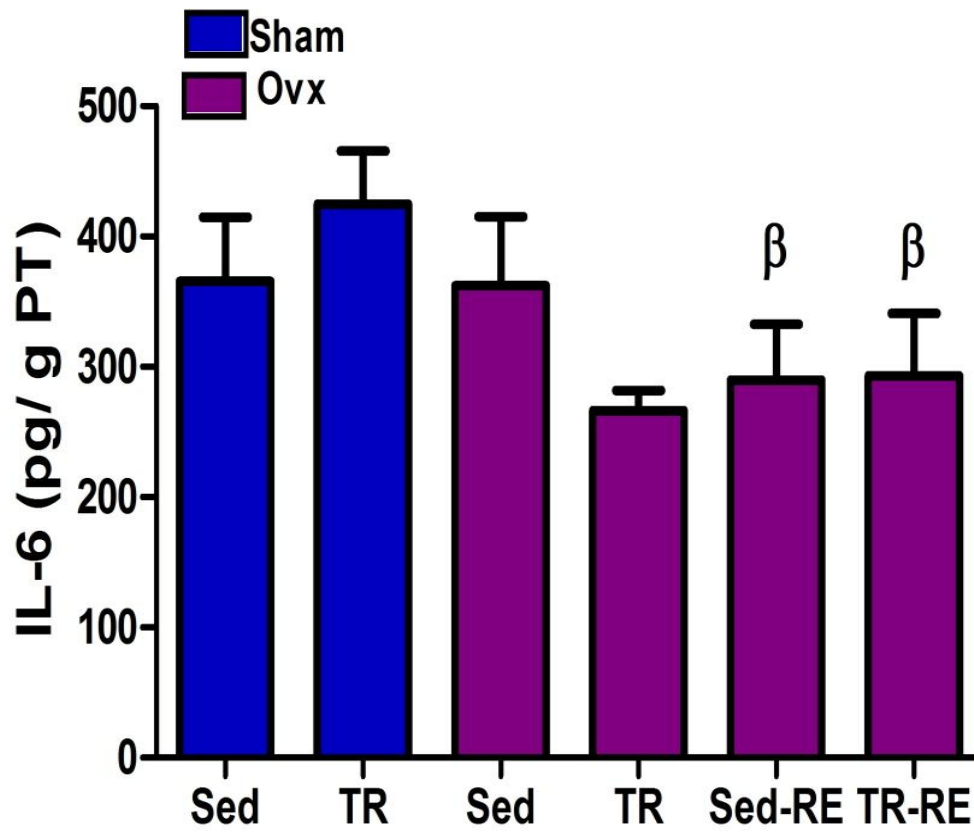
**Figura 9.** Concentração de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo mesentérico de ratas. Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo) ( $p \leq 0.05$ ).

FIGURA 10



**Figura 10.** Concentração de IL-10 no tecido adiposo mesentérico de ratas. Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo). \*, significativamente diferente de Sham-Sed ( $p \leq 0.05$ ).

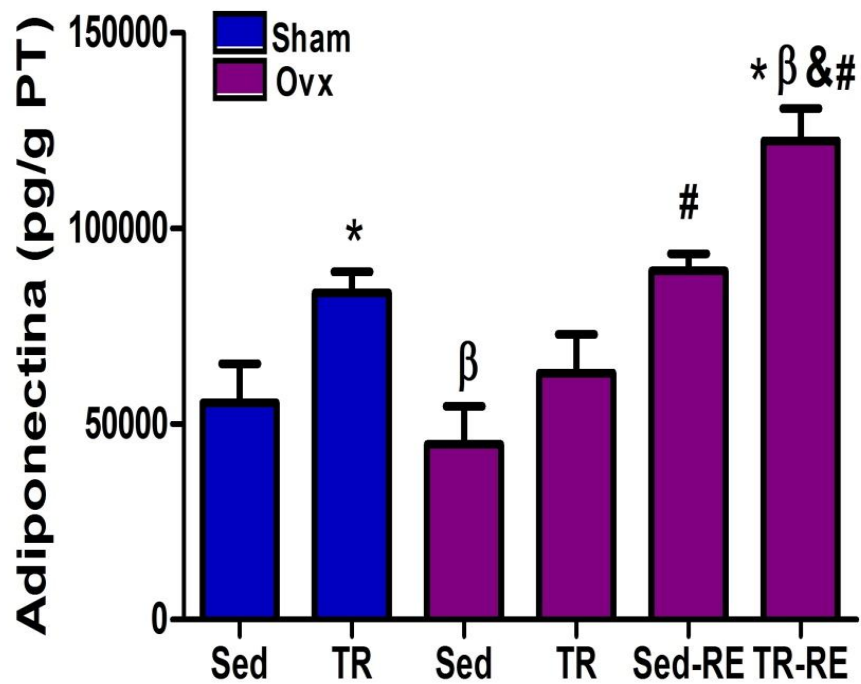
FIGURA 11



**Figura 11.** Concentração de IL-6 no tecido adiposo mesentérico de ratas. Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo) ( $p \leq 0.05$ ).

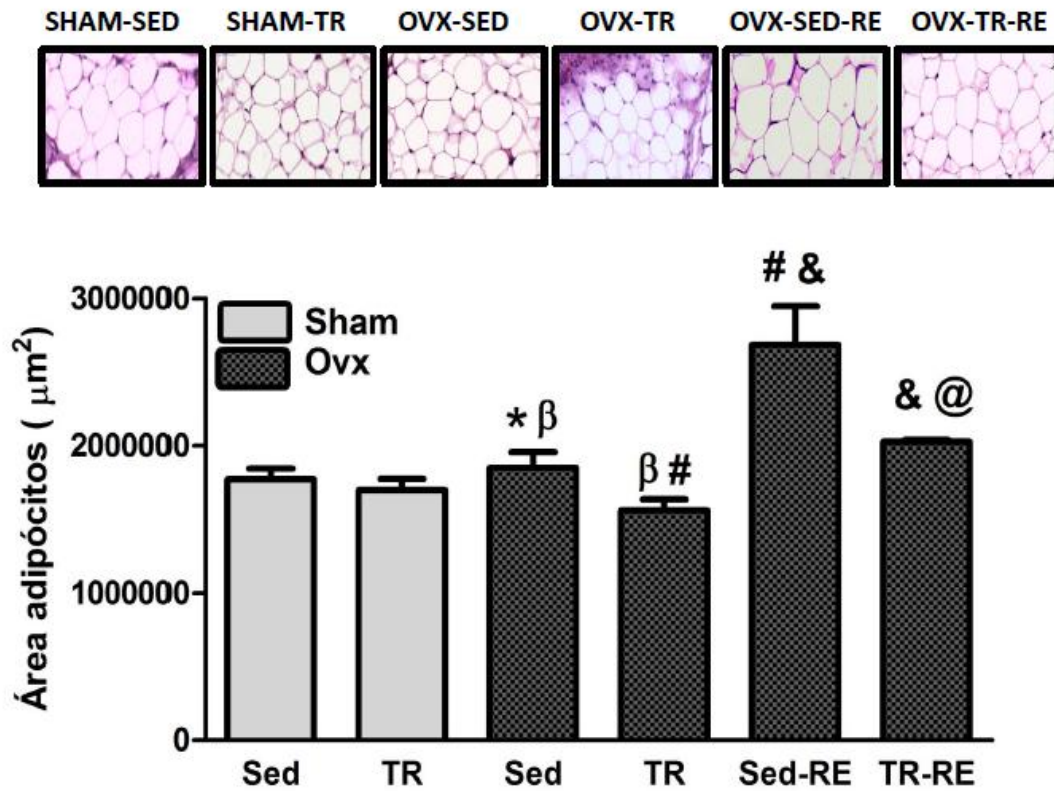


FIGURA 12



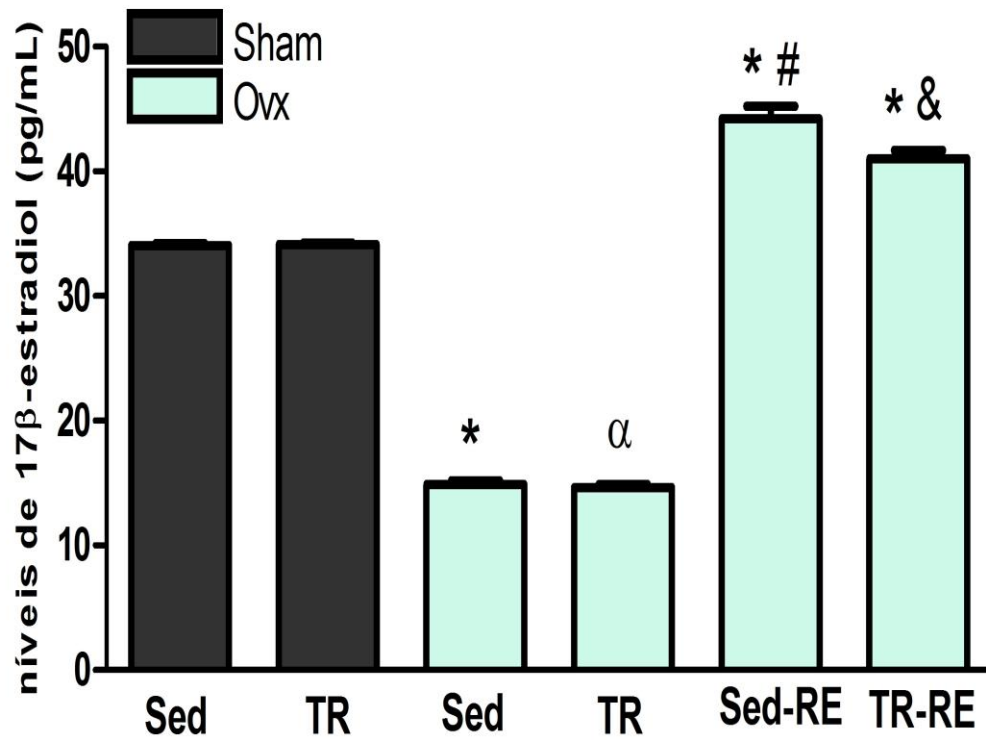
**Figura 12.** Concentração de Adiponectina no tecido adiposo mesentérico de ratas. Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo). \*, significativamente diferente de Sham-Sed; #, significativamente diferente de Ovx-Sed; &, significativamente diferente de Ovx-TR ( $p \leq 0.05$ ).

FIGURA 13



**Figura 14.** Morfologia do tecido adiposo mesentérico (área dos adipócitos). . Valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 por grupo). \*, significativamente diferente de Sham-Sed; #, significativamente diferente de Ovx-Sed; &, significativamente diferente de Ovx-TR; @ significativamente diferente de Ovx-Sed- RE; β, significativamente diferente de Sham-TR ( $p \leq 0.05$ ).

FIGURA 14



**Figura 15.** Concentração de 17β-estradiol no soro de ratas. Valores estão apresentados em média ± erro padrão da média (n=6 por grupo). \*, significativamente diferente de Sham-Sed; #, significativamente diferente de Ovx-Sed; &, significativamente diferente de Ovx-TR; α significativamente diferente de Sham-TR ( $p \leq 0.05$ ).