

EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO CONCOMITANTE À DIETA HIPERCALÓRICA SOBRE O TECIDO HEPÁTICO E ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS C57BL/6

Mikaeli Vieira Ribeiro¹; Katherine Maria de Araújo Veras²; Miguel Luíz Batista Junior³; Karla Roberta de Oliveira Carvalho⁴

1. Estudante do curso de Nutrição; e-mail: ribeiromikaeli@yahoo.com.br
2. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: katherine.veras@umc.com
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: migueljr4@me.com
4. Professor da Universidade de São Paulo; e-mail: croc@icb.usp.br

Área de conhecimento: **Fisiologia de órgãos e sistemas**

Palavras-chaves: Obesidade; inflamação; treinamento.

INTRODUÇÃO

O *nicho* obesogênico envolve alimentação inadequada e sedentarismo como fatores de risco para o desencadeamento de doenças não transmissíveis como a obesidade e suas complicações metabólicas (WHO, 2014). A obesidade pode induzir resistência à insulina (IR), acentuada lipólise e liberação de ácidos graxos livres circulantes (AGL), em decorrência de mediadores pró-inflamatórios como o ligante 2 de quimiocina (CC) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), recrutados a partir do tecido adiposo (Ray et al.; 2016). Tais citocinas recrutam monócitos e os convertem em macrófagos e, como consequência, maior a secreção de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α , interleucina-1 β , IL-6, leucotrienos e óxido nítrico (NO). Essas substâncias podem atuar de forma autócrina e/ou parácrina e causar IR no tecido adiposo (Ray et al.; 2016). De forma similar, o armazenamento excessivo e crônico de lipídios (triglicérides) no tecido hepático, por exemplo, pode levar à inflamação e, até mesmo, formas avançadas da doença hepática não alcoólica ou doença do fígado gorduroso (NAFLD, do inglês, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*). Dentro desse contexto, o treinamento físico pode ser utilizado como ferramenta tanto para tratar (VIEIRA et al., 2009) como para prevenir (JORDY et al., 2015) danos metabólicos induzidos pela obesidade. Até agora, o mesmo se provou eficaz para diminuir a esteatose hepática e os efeitos diretos do treinamento físico no tratamento da inflamação permanecem desconhecidos.

OBJETIVO

Investigar os efeitos do treinamento aeróbio realizado simultaneamente à dieta hipercalórica sobre a sensibilidade periférica à insulina, bem como a expressão gênica das proteínas MCP-1/CCL2, ATM1, TNF- α , IL-6 e IL1 β no tecido adiposo e hepático de camundongos.

METODOLOGIA

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), sob o número de protocolo 65 nas fls. 07 do livro 03 para uso de animais em experimentação e aprovado pelo CEUA/UMC, protocolo n 010/2018. Foram utilizados camundongos machos, C57BL/6, com 8 semanas de idade, randomizados em 4 diferentes grupos (dieta e/ou exercício) e aclimatizados no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/USP, em condições de ciclo claro-escuro 12 h /12 h e temperatura controlada (23 ± 2 °C). Água e comida foram

administradas *ad libitum*. A dieta implementada foi a AIN-93M, controle e hiperlipídica (26% carboidratos, 59% de lipídios e 15% de proteína) + sacarose na água de beber, à 20% (açúcar refinado União, Brasil). Realizou-se o acompanhamento semanal da massa corporal dos animais. Foi quantificada a ingestão alimentar e hídrica por 24 horas durante o mesmo período. Tais medidas foram expressas em kcal. Foi determinado o coeficiente de eficiência alimentar (CEA). Ao longo da 9ª semana e, após 48 horas da última sessão de treino, os animais foram eutanasiados por decapitação precedida de narcose com mistura de gás carbônico e oxigênio na proporção de 70% e 30%, respectivamente (AVMA *Guidelines on Euthanasia*, 2007) para subsequente retirada dos tecidos alvo do estudo: tecido adiposo e hepático. Após 48 horas da última sessão de treino foi mensurada a atividade da enzima citrato sintase no músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos sedentários (C e HFDS) e submetidos ao treinamento físico (C e HFDSTR), conforme descrito por. O fígado foi fixado em solução de formaldeído 10%, durante 8 horas. Ao término do período de fixação, os fragmentos foram armazenados em cassetes (individuais) e mantidos em solução de álcool 70% overnight. Posteriormente, o material foi submetido a uma sequência de banhos com álcool 95%, álcool 100% e xilol. Ao término dos banhos, o material foi incluído em parafina, a uma temperatura de 60°C. Os cortes foram realizados em micrótomo (Zeiss), com espessura de 5µm. Após disposição em lâminas de microscopia, foi realizada a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação das gotículas de gordura. Foi realizada a qPCR para análise de expressão gênica dos genes IL1, MCP-1, TNF-α em duplicatas, baseado na detecção em tempo real de produtos do PCR medidos por fluorescência, quantificado com o detector de sequência ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Os dados foram analisados por meio de ANOVA (2 x 2; dieta vs treino) para medidas repetidas, ANOVA Two-way (2 x 2; dieta vs treino) foi utilizada para verificar o efeito da dieta e do treinamento sobre as demais variáveis. Resultados foram considerados significantes sempre que $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo C ganhou 5 vezes mais peso corpóreo quando comparado ao grupo CTR (C: $5 \pm 4,72g$ n=27 vs CTR: $1 \pm 1,56g$ n=20 $P < 0,001$, figura 1-A). O treino teve o papel de atenuar o ganho de peso através do *déficit* entre consumo alimentar e gasto energético. Os animais dos grupos CTR e HFDSTR tiveram valores da atividade da enzima citrato sintase maiores CTR: $0,32 \pm 0,10g$ n=8 vs HFDSTR: $0,14 \pm 0,10g$ n=8, $P = < 0,05$ quando comparados aos grupos sedentários (Figura 1-B) e, dessa forma, pode-se inferir que o protocolo de treinamento utilizado foi eficaz. Os animais do grupo CTR tiveram um valor glicêmico de jejum (Figura 1-C) menor quando comparados ao grupo C (CTR: 162 ± 31 mg/dl n=15 vs C: 171 ± 29 mg/dl n=20; $P = < 0,05$). O grupo HFDS apresentou uma glicemia superior comparado ao grupo HFDSTR (HFDS: 245 ± 29 mg/dl n= 25 vs HFDSTR 183 ± 29 mg/dl n=21, $P = < 0,0001$). Por meio da contagem de gotículas de gordura nas lâminas de tecido hepático notou-se que o grupo HFDS possuiu uma média maior que os animais HFDSTR (HFDS: $37,75 \pm 2,5\%$ n= 4 $P = < 0,002$ vs HFDSTR: $22,5 \pm 5,4\%$ n=8 $P = < 0,002$ Figura 1-D). Estes resultados sugerem que o treinamento pode induzir a diminuição do acúmulo de gordura no fígado.

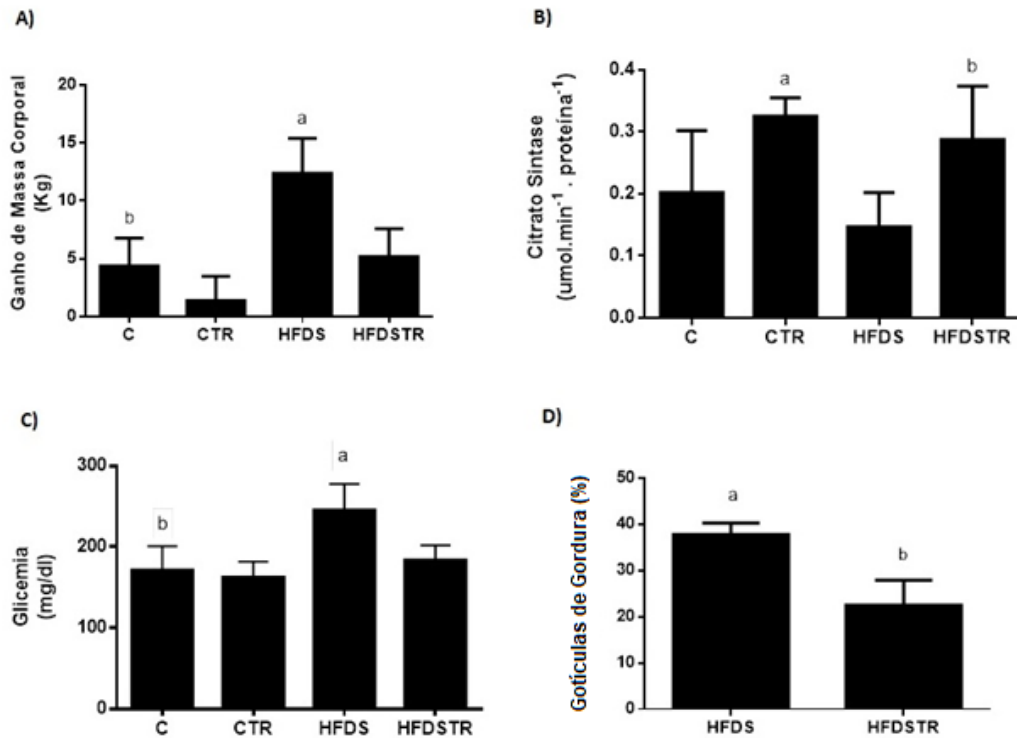


Figura 1: Efeitos da dieta hipercalórica e do treinamento aeróbio no ganho de massa, enzima citrato sintase, glicemia e gotículas de gordura - A) $ap < 0,0001$: HFDS é diferente de HFDSTR. $bp < 0,0001$: C é diferente de CTR. **B)** $ap < 0,05$: C vs CTR. $bp < 0,05$: HFDSTR é diferente de HFDS e C. **C)** $ap < 0,05$: HFDS é diferente de HFDSTR e C. $bp < 0,05$: C vs CTR. **D)** $ap < 0,002$: HFDS é diferente de HFDSTR.

Foram realizadas as qPCR com o objetivo de se dosar a presença de genes de proteínas inflamatórias no fígado e no músculo gastrocnêmio, no entanto, embora as análises de músculo para as proteínas IL 1 b, II, MCP-1, TNF-a tenham sido feitas, os dados atuais encontram-se incompletos, com um “n” insuficiente, neste sentido seria necessária a repetição e continuidade do ensaio. Já os dados de fígado das proteínas IL 1 b, II, MCP-1, TNF-a o “n” foi suficiente para uma ideia de representatividade e, portanto, serão abordados a seguir.

A)				B)			
IL1	Média	Desvio Padrão	N	TNF-a	Média	Desvio Padrão	N
C	83,76	± 51	6	C	3,9	± 2,3	7
CTR	124,95	± 86,71	3	CTR	8	± 5,2	3
HFDS	15,3	± 4,2	2	HFDS	2,5	± 1,1	3
HFDSTR	26	± 1	4	HFDSTR	1,9	± 0,4	4

C)			
MCP-1	Média	Desvio Padrão	N
C	2,3	± 2	5
CTR	1,1	± 9	7
HFDS	6,7	± 3,6	4
HFDSTR	4,7	± 1,7	6

Figura 2: expressão gênica no fígado – A) gene IL1. B) gene TNF-a. C) gene MCP-1.

Embora os dados da qPCR não tenham apresentado diferença estatística sugerem que com repetições deste teste seria possível inferir menor expressão de genes inflamatórios nos grupos treinados.

CONCLUSÃO

O presente estudo tem como limitação a ausência de qualquer conclusão referente à expressão gênica de alguns dos mediadores pró inflamatórios atuantes na obesidade: IL1, MCP-1 e TNF-alfa. Os resultados atuais são insuficientes e bastante heterogêneos, portanto, os novos resultados não serão contemplados no presente relatório. Neste contexto, observou-se que o treinamento pôde atenuar o ganho de peso, os níveis séricos de insulina e glicose e o acúmulo de gotículas de gordura no tecido hepático dos animais HFDSTR, efeitos esses induzidos pela dieta hipercalórica, contribuindo, portanto, para a prevenção da obesidade.

REFERÊNCIAS

NA, JOHNSON; SE, KEATING; J GEORGE. Exercise and the liver: implications for therapy in fatty liver disorders. **Semin Liver Dis.**, USA, p.65-79, fev. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=22418889>. Acesso em: 10 abr. 2019.

I, RAY; SK, MAHATA; RK, DE. Obesity: An Immunometabolic Perspective. *Front Endocrinol, USA*, p.127-157, dez. 2016.

VIEIRA, V. J. ET AL. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. E1164- E1171, May 2009. ISSN 0193-1849. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19276393>.

JORDY, A. B. ET AL. Analysis of the liver lipidome reveals insights into the protective effect of exercise on high-fat diet-induced hepatosteatosis in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 308, n. 9, p. E778-E791, May 2015. ISSN 1522-1555. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714675>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics**. Geneva: WHO; 2014; (MNH/PSF/95.1.B. Rev.1). Disponível em http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/en/. Acesso em 18 de marco de 2018.