

## Efeitos do exercício resistido sobre o tecido adiposo marrom em camundongos C57BL/6

### Effects of resisted exercise on brown adipous tissue in C57BL/6 mice

Geovanna de Souza Andrade<sup>1</sup> 

João Vitor Nunes Lopes<sup>2</sup> 

Frederico Sander Mansur Machado<sup>3</sup> 

Berenilde Valéria de Oliveira Sousa<sup>4</sup> 

Vinicius Dias Rodrigues<sup>5</sup> 

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Montes Claros (Montes Claros). Minas Gerais, Brasil. geoandrade99@gmail.com,

<sup>2</sup>Autora para correspondência. Faculdade integradas do Norte de Minas (Montes Claros). Minas Gerais, Brasil. joaolopes@outlook.com.br

<sup>3,5</sup>Universidade Estadual de Montes Claros (Montes Claros). Minas Gerais, Brasil. machado.frederico@outlook.com, berenilde.valeria7@gmail.com, viniciuslabex@hotmail.com

**RESUMO | OBJETIVO:** Verificar os efeitos do treinamento de escada e atividade física na histomorfometria do tecido adiposo marrom em camundongos C57BL/6. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Amostra composta por 16 camundongos, divididos aleatoriamente: controle (n=4), exercício de escada com estímulo elétrico (n=4), exercício de escada (n=4) e atividade física em ambiente enriquecido (n=4). Grupo de atividade física em ambiente enriquecido foi realizada em caixa com brinquedos. Grupo exercício de escada e escada com estímulo elétrico foram realizadas com escada vertical. Com a utilização da escada os animais realizaram 6 séries, 8 repetições com intervalos de 90 segundos entre séries, sendo 10 sessões. No exercício de escada com estímulo elétrico, o animal foi estimulado a subir usando uma placa de aço na base da escada, com uma corrente elétrica de 20V de intensidade e 45 hz de frequência. A coleta de tecido adiposo marrom foi feita na região escapular e manchado em Hematoxilina-Eosina (HE). O nível de significância das análises era 95% ( $p < 0.05$ ). **RESULTADOS:** Não houve diferença significativa no comparativo do tamanho da célula de TAM em comparação com o tecido recolhido dos camundongos dos quatro grupos. **CONCLUSÃO:** A atividade física e o exercício resistido não promoveram diferenças morfométricas no TAM dos camundongos C57BL/6.

**PALAVRAS-CHAVE:** Treinamento resistido. Atividade física. Estímulo elétrico. Histologia. Metabolismo.

**ABSTRACT | OBJECTIVE:** To verify the effects of stair training and physical activity on brown adipose tissue histomorphometry in C57BL / 6 mice. **MATERIALS AND METHODS:** Sample composed of 16 mice, randomly divided: control (n = 4), stair exercise with electrical stimulus (n = 4), stair exercise (n = 4) and physical activity in an enriched environment (n = 4). A Group of physical activity in an enriched environment was performed in a box with toys. Ladder exercise group and ladder with electrical stimulus were performed with vertical ladder. With the ladder's use, the animals performed six sets, eight repetitions with 90-second intervals between sets, with ten sessions. In the stairway exercise with electrical stimulation, the animal was encouraged to climb using a steel plate at the base of the stairs, with an electric current of 20V intensity and 45Hz frequency. Brown adipose tissue collection was performed in the scapular region and stained with Hematoxylin-Eosin (HE). The level of significance of the analyzes was 95% ( $p < 0.05$ ). **RESULTS:** There was no significant difference when comparing the TAM cell size compared to the tissue collected from the mice in the four groups. **CONCLUSION:** Physical activity and resistance exercise did not promote morphometric differences in the TAM of C57BL/6 mice.

**KEYWORDS:** Resistance training. Physical activity. Electrical stimulus. Histology. Metabolism.

## Introdução

O treinamento resistido (TR) tem muitos adeptos em todo mundo, por apresentar um baixo índice de lesões e aumento de capacidades físicas importantes como força, potência e resistência muscular.<sup>1,2</sup> Por proporcionar um método de treinamento totalmente adaptável ao praticante, o TR é um procedimento bastante utilizado com os mais diversos objetivos e níveis de aptidão física, podendo ter efeitos importantes na manutenção da musculatura esquelética, no metabolismo e nas funções cardiovasculares, destacando-se por melhorar a composição corporal e aumentar a síntese proteica.<sup>1,2</sup>

O tecido multilocular, conhecido também como tecido adiposo marrom (TAM), exerce um papel central na termogênese e na regulação do gasto energético.<sup>3</sup> Ele tem a função primordial de oxidar lipídeos para a produção de calor, produção de substâncias anti-inflamatórias, hormônios que estão relacionados a melhora da sensibilidade a insulina e proteção cardiovascular.<sup>4</sup> Os depósitos de TAM acontecem nos mamíferos pequenos e humanos recém-nascidos. A razão evolutiva para a abundância de TAM ao nascimento, tanto em roedores quanto em humanos, está baseada na necessidade para manter a temperatura corporal após uma redução abrupta na temperatura ambiente depois do nascimento.<sup>5</sup>

O TAM pode variar de um marrom claro, podendo chegar até um marrom avermelhado, decorrente da vascularização abundante e da presença de mitocôndrias. Estas são ricas em citocromos que lhes conferem cor avermelhada.<sup>6</sup> O tecido conjuntivo forma septos entre os lóbulos de células adiposas; cada célula é sustentada por fibras reticulares e colágenos, tendo uma rica rede sanguínea, e são células mais intimamente ligadas entre si e com os capilares do que o tecido adiposo branco.<sup>7</sup> O principal sinal para ativação de adipócitos marrons é a redução da temperatura corporal abaixo da termoneutra (23°C). Os sinais térmicos são analisados por áreas específicas do sistema nervoso central (SNC), que promovem estimulação da inervação simpática do TAM.<sup>5</sup>

O modelo animal é amplamente utilizado para responder a questionamentos e explorar hipóteses frequentemente inviáveis em estudos com humanos, permitindo aprofundar nos conhecimentos acerca de neurobiologia das doenças.<sup>8</sup>

Pensando no TR, existem diversas metodologias que incluem exercício de escalada voluntária, aparato de escalada, escalada, treinamento isométrico, escavação e escada com estímulo elétrico.<sup>9-14</sup> Dado o possível impacto do TAM na balança energética, cresce o interesse por encontrar meios de aumentar a atividade termogênica deste tecido. Neste âmbito, o exercício físico começa a ser testado como um método não-farmacológico de ativação do TAM.<sup>15</sup>

A presença de TAM foi observada em humanos adultos sob circunstâncias de exposição crônica ao frio ou por hiperexcitação adrenérgica em indivíduos que apresentavam feocromocitoma (tumor da medula da glândula adrenal).<sup>5</sup> O estudo de Marken Lichtenbelt<sup>16</sup> mostrou que a atividade metabólica relativamente alta do TAM em homens jovens foi encontrada em 96% dos indivíduos expostos ao frio (16°C). A partir dos estudos de Virtanen<sup>17</sup>, sugeriu-se que a atividade do TAM em humanos poderia ser regulada da mesma forma que em roedores. A literatura demonstra que exercícios físicos de endurance praticados com regularidade estimulam o TAM *in vitro* e em humanos magros e animais controle.<sup>15</sup>

Tendo em vista a reconhecida influência do exercício e da dieta no TAM<sup>18,19</sup>, percebemos a necessidade de verificar a hipótese das diferentes propostas de atividade e exercício físico na morfologia do TAM; dessa forma, o objetivo desse estudo foi verificar os efeitos do treinamento de escada e atividade física na histomorfometria do tecido adiposo marrom em camundongos C57BL/6.

## Materiais e métodos

### Caracterização do estudo e cuidados éticos

O presente estudo foi experimental, analítico, prospectivo e de abordagem quantitativa. Foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal e bem-estar (CEEBA/Unimontes, número do processo 131/2017). Realizado com 16 animais fêmeas, saudáveis, idades entre 10 e 12 semanas, peso corporal médio de 20 ± 5g, foram alojados respeitando o ciclo de 12h claro/escuro, temperatura média de 22 ± 2 °C e com baixo nível sonoro. Todos os animais foram aleatoriamente distribuídos em grupo controle (n = 4), exercício de escada com estímulo elétrico (n = 4), exercício de escada (n = 4), atividade física (n = 4).

Os animais foram alojados em grupos de 4 animais em caixas de polipropileno autoclaváveis de dimensões de 414 x 344 x 168 mm, com tampa em aço galvanizado e contendo separadores de aço inoxidável (Zotech, modelo ZT 375). Todas as caixas foram forradas com maravalha, que foram trocados três vezes por semana.

### Formato experimental

Para evitar comprometimento dos protocolos experimentais, houve dois momentos de familiarização com as propostas de atividade e exercício físico. O grupo controle não realizou nenhum tipo de intervenção, estando nas mesmas condições de moradia no momento das intervenções nos demais grupos. A condição do grupo atividade física foi realizada em ambiente fechado e enriquecido (caixa plástica) com 60 cm de comprimento, 30 cm de largura e 45 cm de altura. Esse ambiente foi composto de gangorra, roda, bolas e túneis. A condição do grupo exercício de escada foi realizado em uma escada vertical de 110 cm de altura, 18 cm de largura, 2 cm entre os degraus e 80° de inclinação. A condição do grupo exercício de escada com estímulo elétrico foi realizado utilizando a escada com eletroestimulação. Nos grupos com utilização da escada, os animais realizaram seis séries de oito repetições com intervalos de noventa segundos entre os conjuntos, e a resistência obtida pelo exercício foi o próprio peso corporal do animal. A proposta foi adaptada de acordo com a literatura. No exercício de escada com estímulo elétrico, o animal foi estimulado a subir devido à presença de uma placa de aço na base da escada, na qual foi aplicada uma corrente elétrica de 20 volts de intensidade e 45 hz de frequência às quatro patas do animal.<sup>14</sup>

Foram realizadas 10 sessões de cada intervenção experimental. Após 24 horas da última sessão, os animais foram sacrificados, primeiramente anestesiados com ketamina/xilazina (75mg/kg e 5mg/kg de peso corporal, respectivamente) e, na sequência, eutanasiados por luxação cervical para realização da coleta de tecido adiposo marrom na região da escapular.<sup>14</sup>

### Histomorfometria do tecido adiposo marrom

Após a eutanásia dos animais, foi feita a coleta do tecido adiposo marrom na região escapular, em seguida, foram fixados em formol e incluídos em parafina, e depois foram submetidos a cortes de sete µm manchado em Hematoxilina-Eosina (HE). As secções foram então examinadas e fotografadas usando o microscópio Olympus BX50 (Olympus Optical). As áreas transversais do TAM foram determinadas usando o software Image J (Scion, Frederick, MD). As medidas foram realizadas em ao menos três campos distintos selecionados e de cada secção transversal.<sup>20</sup>

Foram analisadas 12 lâminas histológicas em coloração Hematoxilina-Eosina (HE) de cada grupo, foram realizadas 3 imagens de cada lâmina e uma lâmina de cada animal.

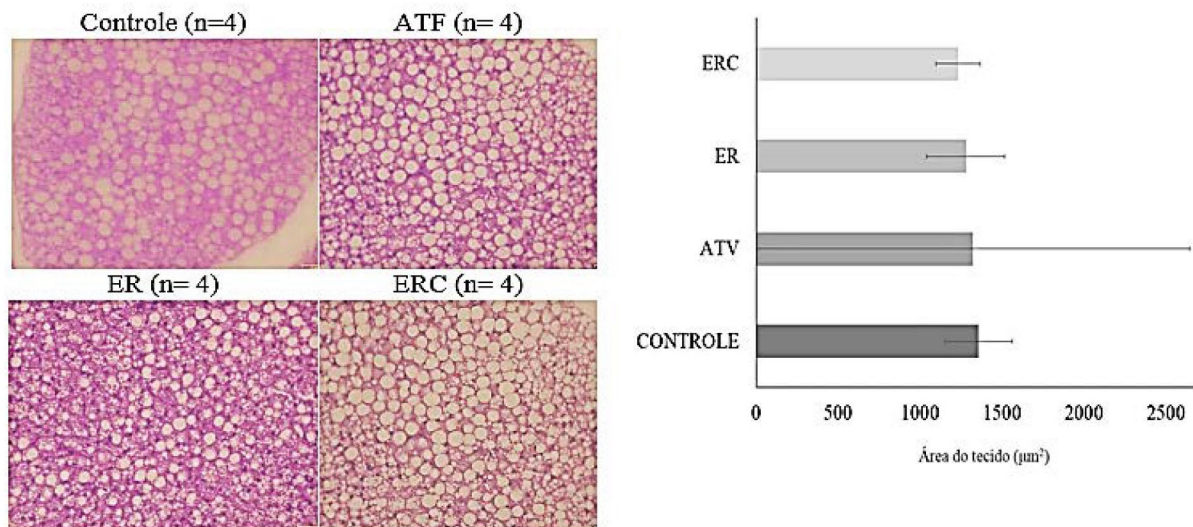
### Análise dos dados

Todos os dados são expressos com a média e desvio padrão. Para analisar as variáveis dependentes, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade, posteriormente foi selecionada a análise de variância (ANOVA) com ajuste de Bonferroni para verificação inferencial das variáveis dependentes. Todos os procedimentos estatísticos foram feitos no programa Statistic Package for the Social Sciences (SPSS) 20.0 for Windows. O nível de significância adotado em todas as análises foi fixado em 95% ( $p < 0.05$ ).

## Resultados

Na figura 1, temos a comparação entre as amostras de tecido adiposo marrom em camundongos do grupo controle, ATV (atividade física em ambiente enriquecido), ER (exercício resistido) e ERC (exercício resistido com choque). Não foi encontrado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na análise histomorfométrica do tecido adiposo marrom.

**Figura 1.** Análise histomorfométrica do tecido adiposo marrom da região escapular de camundongos C57BL/6. Não foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos



## Discussão

Evidências atuais apontam para a importância do TAM no controle do metabolismo em humanos e sua semelhança com o TAM de roedores e os estudos em modelos animais de obesidade, que mostram uma atividade defeituosa deste tecido e o consequente déficit no gasto energético.<sup>21</sup>

Estudo realizado por Slocum<sup>22</sup> com camundongos C57, submetidos à dieta hiperlipídica e corrida em esteira durante sete dias, verificou que o exercício foi capaz de promover perda de peso, redução da gordura corporal e a análise histológica do TAM mostrou que os adipócitos marrons apresentaram coloração mais forte e maior quantidade de mitocôndrias, quando comparados com os controles sedentários com dieta hiperlipídica.

Em um trabalho com camundongos submetidos a transplante de TAM, verificou-se que o aumento na massa desse tecido foi capaz de melhorar a homeostase da glicose e a sensibilidade a insulina, acompanhada de diminuição da massa de gordura. Além disso, o transplante também atenuou os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica, e observou-se que essas melhoras eram volumes dependentes, ou seja, quanto maior a massa de tecido transplantado, melhores eram as respostas analisadas.<sup>4</sup>

No estudo de Leite<sup>21</sup>, o exercício físico de oito semanas atenuou o desenvolvimento da massa de gordura e a expressão das proteínas de formação do tecido adiposo branco (TAB); apresentou efeito protetor contra a intolerância à glicose e resistência à insulina. Foi também observado a redução dos circulantes de LPS (Lipopolissacarídeo), TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) e ácidos graxos livres. Além disso, os dados demonstram ainda o efeito positivo do exercício na via de sinalização da insulina; aumento da massa do tecido adiposo marrom (TAM) e da expressão de proteínas envolvidas no processo de termogênese. Por fim, foi verificado que o exercício foi capaz de atenuar a infiltração de macrófagos no TAM e promover maior polarização de macrófagos do tipo M2 (Ativação alternativa de macrófago no TAM).<sup>21</sup>

Diante das evidências relacionadas a temática, percebemos que ainda não foi possível mostrar qual é o real impacto das diferentes formatações da atividade e exercício físico nas alterações morfométricas do tecido adiposo marrom. Outras propostas com desenhos experimentais diferentes e formatos de avaliação melhores poderão elucidar as dúvidas aqui deixadas.

## Conclusão

Neste estudo concluímos que a atividade física e o exercício resistido não promoveram diferenças morfológicas no tecido adiposo marrom dos camundongos C57BL/6 quando verificado no treinamento de escada com estímulo elétrico.

## Contribuições dos autores

Lopes JVN participou da coleta de dados e do manejo animal. Andrade GS participou do delineamento estatístico e da escrita do artigo. Machado FSM participou do manejo animal. Sousa BVO participou do delineamento estatístico e da análise de laboratório. Rodrigues VD orientou e coordenou a pesquisa.

## Conflitos de interesses

Nenhum conflito financeiro, legal ou político envolvendo terceiros (governo, empresas e fundações privadas, etc.) foi declarado para nenhum aspecto do trabalho submetido (incluindo, mas não se limitando a subvenções e financiamentos, participação em conselho consultivo, desenho de estudo, preparação de manuscrito, análise estatística, etc.).

## Referências

1. Gianolla F. Musculação – conceitos básicos. São Paulo: Manole; 2003.
2. Willardson JM, Burkett LN. The effect of rest interval length on bench press performance with heavy vs. light loads. J Strength Cond Res [Internet]. 2006;20(2):396-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16686570/>
3. Silveira GMM, Carvalho HS, Cordeiro AS. Efeitos da criolipólise sobre a produção de irisina e surgimento de Adipócitos Beges. Revista eletrônica Estácio Saúde [Internet]. 2016;5(2):138-49. Disponível em: <http://revistaadmmade.estacio.br/index.php/saudesantacatarina/article/viewFile/2335/1312>
4. Zhang G, Sun Q, Liu C. Influencing Factors of Thermogenic Adipose Tissue Activity. Front Physiol. 2016;7:29. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00029>
5. Broetto NF, Brito NM. Tecido adiposo marrom e obesidade em humanos. Saúde e pesquisa [Internet]. 2012;5(1):121-35. Disponível em: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/2083/1571>

6. Beu CCL, Guedes NLKO, De Quadros AAG. Tecido Conjuntivo Propriamente Dito Frouxo [Internet]. Programa Microscópio Virtual; 2017 [citado em: 2019 nov. 3]. Disponível em: [http://projetos.unioeste.br/projetos/microscopio/index.php?option=com\\_phocagallery&view=category&id=54:frouxo&itemid=68](http://projetos.unioeste.br/projetos/microscopio/index.php?option=com_phocagallery&view=category&id=54:frouxo&itemid=68)
7. Curi R, Pompéia C, Miyasaka CK, Procópio J. Entendendo a gordura: Os ácidos graxos. São Paulo: Manole; 2002.
8. Fries RG, Magalhaes PVS. A pesquisa básica na Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul. Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul. 2010;32(2):33-4. <https://doi.org/10.1590/S0101-81082010000200001>
9. Mori T, Okimoto N, Sakai A, Okazaki Y, Nakura N, Notomi T, et al. Climbing exercise increases bone mass and trabecular bone turnover through transient regulation of marrow osteogenic and osteoclastogenic potentials in mice. J Bone Miner Res. 2003;18(11):2002-9. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.11.2002>
10. Hornberger Junior TA, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. Can J Appl Physiol. 2004;29(1):16-31. <https://doi.org/10.1139/h04-002>
11. Cassilhas RC, Lee KS, Fernandes J, Oliveira MG, Tufik S, Meeusen R, et al. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. Neuroscience. 2012;202:309-17. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.029>
12. Krüger K, Gessner DK, Seimetz M, Banisch J, Ringseis R, Eder K, et al. Functional and muscular adaptations in an experimental model for isometric strength training in mice. PLoS One. 2013;8(11):e79069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079069>
13. Roemers P, Mazzola PN, De Deyn PP, Bossers WJ, van Heuvelen MJG, van der Zee EA. Burrowing as a novel voluntary strength training method for mice: A comparison of various voluntary strength or resistance exercise methods. J Neurosci Methods. 2018;300:112-26. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.05.027>
14. Rodrigues VD, Pimentel DM, Brito AS, Vieira MM, Santos AR, Machado AS, et al. Methodological validation of a vertical ladder with low intensity shock stimulus for resistance training in C57BL/6 mice: Effects on muscle mass and strength, body composition, and lactate plasma levels. J. Hum. Sport Exerc. 2019;14(3):608-31. <https://doi.org/10.14198/jhse.2019.143.12>
15. Almeida DL. Programação metabólica por superalimentação no início da vida, efeitos sobre o metabolismo e o tecido adiposo marrom: pode o exercício físico moderado ser um agente para desprogramação? [tese] [Internet]. Maringá: Universidade Federal de Maringá; 2017. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/1865>



16. Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1500-8. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0808718>
17. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1518-25. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0808949>
18. Dutra MT, Lima RM, Mota MR, Oliveira PFA, Veloso JHCL. Hipotensão pós-exercício resistido: uma revisão da literatura. *Rev. educ. fis. UEM* [Internet]. 2013;24(1):145-57. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/refuem/v24n1/15.pdf>
19. Sanvitto G. Treinando a gordura: como a atividade física pode tornar o tecido adiposo um aliado da saúde. da SAÚDE Informações Médicas Ltda; 25 de junho. 2013 [citado em: 2019 mar 02]. Disponível em: <https://www.abcdasaude.com.br/medicina-interna/entendendo-melhor-as-gorduras-beneficios-e-danos-a-saude/>
20. Himms-Hagen J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. *Prog Lipid Res*. 1989;28(2):67-115. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(89\)90009-x](https://doi.org/10.1016/0163-7827(89)90009-x)
21. Leite JP. O efeito do treinamento físico sobre a resistência à insulina em animais tratados com dieta hiperlipídica: modulações de fatores inflamatórios sobre o tecido adiposo branco e marrom de ratos Wistar [dissertação] [Internet]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2014. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/312926>
22. Rogatto GP, Luciano E. Perfil leucocitário de ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) submetidos ao exercício resistido crônico. *Biosci Jornal* [Internet]. 2002;18(1):51-63. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6405>