

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

## **EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO EM PARÂMETROS LEUCITÁRIOS, GLICÊMICOS E DE EHSP70 EM RATOS RESISTENTES À INSULINA<sup>1</sup>**

### **EFFECTS OF EXERCISE ON LEUCOCITART, GLYCEMIC AND EHSP70 PARAMETERS IN INSULIN RESISTANT RATS**

**Wellington Felipe Althaus<sup>2</sup>, Lucas Machado Sulzbacher<sup>3</sup>, Luana Weizenmann<sup>4</sup>, Renan Daniel  
Bueno Basso<sup>5</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>6</sup>, Matias Nunes Frizzo<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> Trabalho de pesquisa realizado pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/UNIJUI)

<sup>2</sup> Acadêmico do curso de Farmácia - UNIJUI, Bolsista PIBIC/CNPq, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>3</sup> Acadêmico do curso de Enfermagem - UNIJUI, Bolsista PROBIC/FAPERGS, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>4</sup> Mestranda do Programa de de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS). Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>5</sup> Mestrando do Programa de de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS). Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>6</sup> Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>7</sup> Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF. Orientador.

## **INTRODUÇÃO**

A inatividade física, associada ao grande consumo de alimentos hipercalóricos vem tornando a população cada vez mais predisposta ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como a obesidade e o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (ABESO, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS (2016), o número estimado de pessoas no mundo vivendo com DM2 é de 415 milhões, e para o ano de 2040 os valores estimados são de 642 milhões, sendo o Brasil o 8º país com a maior prevalência desta doença.

A atividade física é reportada como uma estratégia na melhora do controle glicêmico e da resistência à insulina em pacientes com DM2 (YANG et al., 2014). O exercício físico, leva à diminuição de gordura corporal e conseqüentemente de citocinas pró inflamatórias desencadeando a diminuição da resistência à insulina (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Além disso, exercício físico aumenta a captação de glicose no músculo esquelético, por diferentes mecanismos moleculares, assim, auxiliando no controle glicêmico (HAYASHI, 1997).

Em situações de estresse celular, como no exercício físico, uma família de proteínas, as *Heat Shock Proteins* (HSP) tem um aumento em sua expressão, dentre as proteínas desta família podemos destacar a HSP de peso molecular 70kDa (HSP70), a qual possui função chaperona (MADDEN et al., 2008). A HSP70, quando localizada intracelularmente, desempenha um papel anti-inflamatório, auxiliando no controle da obesidade e resistência à insulina, entretanto, quando localizada no ambiente extracelular (eHSP70) tem sido relacionada a uma piora na sensibilidade à insulina (CHUNG et al., 2008).

O estresse fisiológico causado no organismo pelo exercício físico resulta em mudanças nos parâmetros hematológicos, que tem em resposta a este estressor o aumento de leucócitos e de eritrócitos (BHATTI; SHAIKH, 2007). Alterações hematológicas, como nas séries de células brancas (leucócitos) vem sendo associadas ao quadro imunoinflamatório da obesidade e o DM2 (MBATA et al., 2015). A relação entre a contagem de neutrófilos e de linfócitos (RNL) já foi avaliada como sendo

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

uma possível medida para a inflamação, sendo uma razão facilmente obtida (OKYAY et al., 2013). Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos do treinamento físico nas concentrações de eHSP70, na série leucocitária e na glicemia de animais resistentes à insulina.

**Palavras-chave:** Exercício Físico, Obesidade, Leucócitos, HSP70, Glicemia, RNL.

**Keywords:** Exercise, Obesity, Lekocyte, HSP70, Blood Sugar, NLR.

## MATERIAIS E METODOS

**Delineamento Experimental** - Foram utilizados 12 ratos machos da linhagem Wistar que tinham entre oito e nove semanas, provenientes do Biotério da UNIJUÍ. Este projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UNIJUI sob Protocolo N° 01/2015.

Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo Controle (C, n = 3), composto por animais que receberam dieta padrão, contendo 11,4% de gordura, que foram mantidos sedentários durante todo o experimento; Grupo dieta hiperlipídica (D, n = 6) composto por animais que receberam dieta hiperlipídica (DHL) contendo 58,3% de gordura que foram mantidos sedentários durante todo o período experimental, e grupo Dieta + Exercício (DE, n = 3) que recebeu DHL durante todo o experimento, e na 12ª semana foi iniciada a intervenção de Exercício Físico cinco vezes por semana, durante 8 semanas.

**Treinamento Físico:** O treinamento do grupo DE foi realizado a partir da 12ª semana, durante 8 semanas, 5 vezes por semana, com duração de 20 minutos por dia. Para isso, foi utilizada uma esteira rolante com uma inclinação de 7° e velocidade de 12 m/min, correspondendo a uma intensidade de exercício moderada.

**Teste de Tolerância à Glicose (GTT):** O GTT foi realizado antes do início das dietas, após 12 semanas de dieta (DHL e convencional), e após os tratamentos (20ª semana). Esse procedimento teve como objetivo verificar a resposta dos animais a uma sobrecarga de glicose. Para isso, os animais foram submetidos a um período de jejum de 12h e uma solução de glicose diluída em soro fisiológico foi administrada por via intraperitoneal (1g/kg). A glicemia dos animais foi verificada por punção venosa na parte distal da cauda e a concentração de glicose sanguínea foi verificada com glicosímetro antes da administração da solução de glicose (T=0), e 15 (T=15), 30 (T=30) e 120 (T=120) minutos após a administração da mesma. A glicemia foi apresentada em mg de glicose/dL de sangue.

**Dosagem de eHSP70:** As concentrações de HSP70 foram determinadas no plasma com o uso de kit específico ultrasensível Kit Enzo Life Sciences EKS-715 e RCYTO-80K-MILLIPIXEL MAP rat (MILLIPORE) (ELISA).

**Leucograma:** Para a realização do leucograma, o sangue dos animais foi coletado por punção caudal e acondicionado em tubo com anticoagulante (EDTA). Foi utilizado um analisador hematológico Micros 60 (HORIBA) para obter os parâmetros: Contagem de leucócitos (WBC) e contagem relativa de absoluta de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, basófilos e eosinófilos), sendo analisadas em triplicata. Após, foram realizadas distensões hematológicas em lâmina, corados com coloração Giemsa May Grunwald e avaliados por profissional com experiência na área hematológica.

**Relação Neutrófilo Linfócito (RNL):** Para a determinação da RNL, foram divididos a contagem absoluta de neutrófilos pela contagem absoluta de linfócitos.

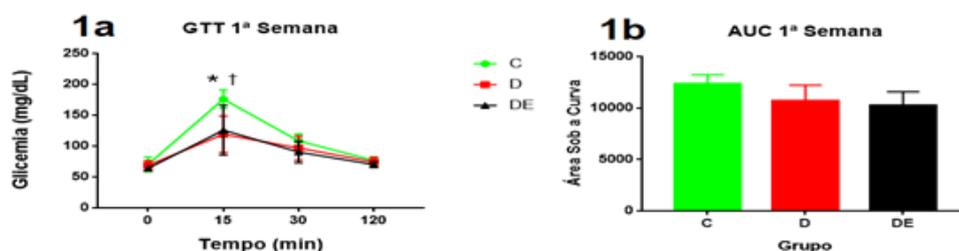
**Análise Estatística** - Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 7 e expressos

**Evento:** XXVIII Seminário de Iniciação Científica  
**ODS:** 3 - Saúde e Bem-estar

como média e desvio-padrão. Para as análises do GTT, da HSP, dos hemogramas e da razão neutrófilo linfócito foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de pós teste de Tukey. Foi considerado diferença estatística de 5% ( $p < 0,05$ ).

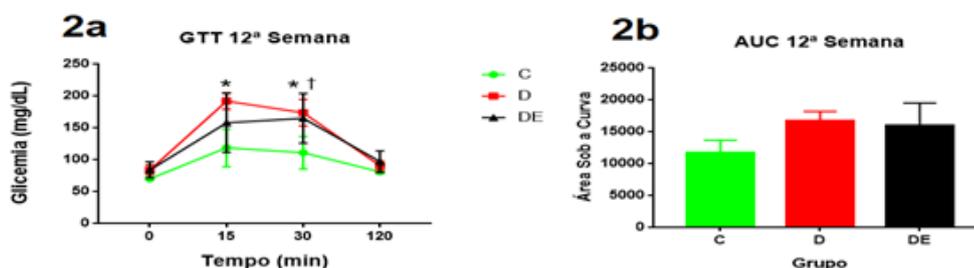
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abaixo podemos ver os gráficos do GTT da 1ª semana (Figura 1a) e AUC da 1ª semana (Figura 1b), ou seja, antes do início das dietas e intervenções nos animais. Foi verificado no GTT da 1ª semana que o grupo C teve um maior pico glicêmico 15 minutos após a administração de glicose, porém a resposta final de todos os animais foi semelhante, o que demonstra que todos os animais se encontravam com uma resposta final idêntica à sobrecarga de glicose. Na AUC da 1ª semana não foi encontrado diferenças entre os grupos.



**Figura 1.** GTT e AUC realizados antes de qualquer intervenção. Nos grupos C (n=3) D (n=6) DE (n=3). C vs D \*; C vs DE †.  $P < 0,05$ .

Na 12ª semana de experimento, após 12 semanas de consumo das dietas, foi encontrado no GTT (Figura 2a) um maior pico glicêmico nos animais do grupo D nos tempos 15 e 30 minutos após a administração de glicose, e também no grupo DE no tempo 30 min após a administração de glicose, porém esta diferença não foi evidenciada na AUC (Figura 2b).



**Figura 2.** GTT e AUC realizados após 12 semanas de consumo das dietas. Nos grupos C (n=3) D (n=6) DE (n=3). C vs D \*; C vs DE †.  $P < 0,05$ .

No GTT da 20ª Semana (Figura 3a), o grupo D apresentou diferença do grupo C 15 minutos após a administração de glicose, e dos grupos C e DE 30 minutos após a sobrecarga de glicose. Ainda, no gráfico da AUC (Figura 3b) é possível verificar que o grupo D mostrou-se diferente do grupo C, o que não ocorre com o grupo DE, demonstrando que o exercício físico foi capaz de reverter esta piora da resposta à sobrecarga de glicemia nos animais. O exercício físico como uma alternativa

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica  
ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

para a redução da glicemia já foi observado em diferentes estudos, principalmente pelo fato de o exercício físico aumentar a captação de glicose muscular (MARTIN et al., 1995).

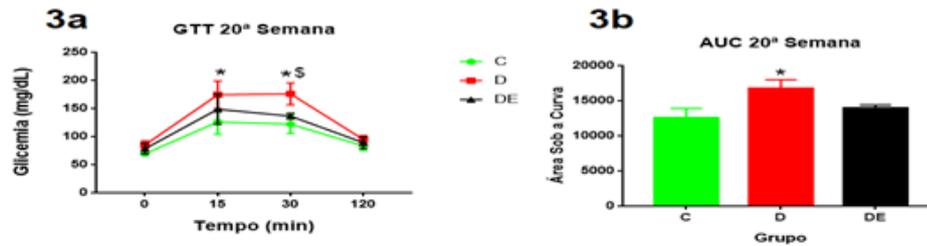


Figura 3. GTT e AUC realizados após 20 semanas de consumo das dietas e 8 semanas de intervenção no grupo DE. Nos grupos C (n=3) D (n=6) DE (n=3). C vs D \*; D vs DE §. P <0,05.

Na figura 4 é possível observar a expressão de HSP 70 extracelular (eHSP70) nos grupos Controle (C), Dieta (D) e Dieta + Exercício (DE), nos quais não houve diferença estatística entre os grupos.

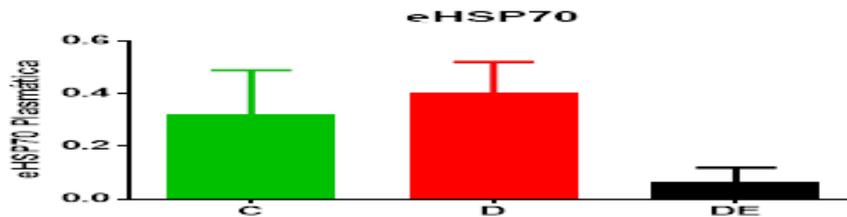


Figura 4. eHSP70 plasmática dos grupos experimentais: Controle (C) n=3, Dieta (D) n=6, e Dieta + Exercício (DE) n=3.

O leucograma realizados na 12ª semana (Tabela 1) apresentou diferença entre os grupos C e DE no parâmetro Neutrófilos.

Grupo	WBC	Neutrófilos	Monócitos	Linfócitos	Basófilos	Eosinófilos
C	5.2	0.264	0.167	4.743	0	0.026
D	5.46	0.567	0.2472	4.674	0	0.0474
DE	7.6	1.14†	0.37	6.024	0	0.066

Tabela 1. Leucogramas realizados na 12ª semana (Unidades  $10^3/\text{mm}^3$ ). Nos grupos C (n=3), D (n=6) e DE (n=3). C vs DE †. P <0,05.

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

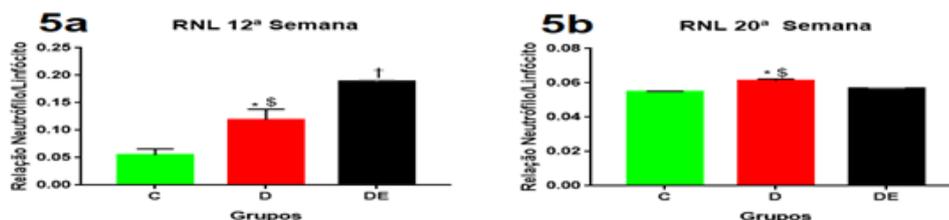
ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

Na 20ª Semana (Tabela 2) não houve diferença estatística nos parâmetros avaliados entre os grupos.

Grupo	WBC	Neutrófilos	Monócitos	Linfócitos	Basófilos	Eosinófilos
C	4.666	0.22	0.132	4.016	0	0.044
D	5.85	0.2925	0.204	4.784	0	0.0585
DE	6.666	0.3	0.19	5.298	0	0.06

**Tabela 2.** Leucogramas realizados na 20ª semana (Unidades  $10^3/\text{mm}^2$ ). Nos grupos C (n=3), D (n=6) e DE (n=3).  $P < 0,05$ .

Quando avaliada a RNL na 12ª semana (Figura 5a), observa-se que ambos os grupos que consumiram dieta hiperlipídica apresentaram este parâmetro inflamatório superior ao grupo C, evidenciando o estado próinflamatório causado pelo consumo desta dieta. De acordo com Sighieri (1999) quando realizada a RNL logo após uma sessão de exercício, estes, assim como encontrados no consumo de dieta hiperlipídica, também tem seus valores aumentados, mostrando um efeito agudo inflamatório gerado por este estressor.



**Figura 5.** Relação Neutrófilo Linfócito realizada na 12ª Semana (5a) e na 20ª Semana (5b). Nos grupos C (n=3), D (n=6) e DE (n=3). C vs D \*; D vs DE \$, C vs DE †.  $P < 0,05$ .

Porém, após 8 semanas de exercício (figura 5b) o grupo DE teve uma redução deste valor quando comparado ao grupo D, diferença também evidenciada entre os grupos C e D, mostrando que após um período de adaptação ao exercício, a RNL apresentou um menor valor, evidenciando o potencial antiinflamatório do exercício crônico frente a dieta hiperlipídica.

Desta forma, os resultados indicam que em resposta ao consumo da dieta hiperlipídica os animais desenvolveram resistência insulínica, assim como um aumento no quadro imunoinflamatório. A realização de 8 semanas de treinamento físico (grupo DE), demonstra que a intervenção foi capaz de reverter parcialmente este quadro inflamatório demonstrado pela RNL, além de melhorar a resposta à sobrecarga de glicose.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

Concluimos que o treinamento físico é benéfico para a melhora do estado inflamatório e diminuição da resistência à insulina causados pela dieta hiperlipídica.

## REFERÊNCIAS

ABESO. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade**, p. 1–188, 2016.

BHATTI, Rashida; SHAIKH, Din Muhammad. The effect of exercise on blood parameters. **Pakistan Journal of Physiology**, v. 3, n. 2, 2007.

CHUNG, Jason et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 5, p. 1739-1744, 2008.

HAYASHI, Tatsuya; WOJTASZEWSKI, Jørgen FP; GOODYEAR, Laurie J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 273, n. 6, p. E1039-E1051, 1997.

MADDEN, Leigh A. et al. Inducible heat shock protein 70 and its role in preconditioning and exercise. **Amino acids**, v. 34, n. 4, p. 511-516, 2008.

MARTIN, Iva K.; KATZ, Abram; WAHREN, John. Splanchnic and muscle metabolism during exercise in NIDDM patients. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 269, n. 3, p. E583-E590, 1995.

MBATA, Christian A. et al. Some Haematological Parameters in Diabetic Patients in Port Harcourt Nigeria. **Asian Journal of Multidisciplinary Studies ISSN:**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 21–25, 2015.

OKYAY, Gülay Ulusal et al. Neutrophil to lymphocyte ratio in evaluation of inflammation in patients with chronic kidney disease. **Renal failure**, v. 35, n. 1, p. 29-36, 2013.

PETERSEN, Anne Marie W.; PEDERSEN, Bente Klarlund. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of applied physiology**, v. 98, n. 4, p. 1154-1162, 2005.

SIGHIERI, C. et al. Neutrophil-lymphocyte ratio in horses performing standardized incremental treadmill exercise. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa**, v. 52, p. 77-83, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. 3 Mar. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em 01 de Jul. 2020.

YANG, Zuyao et al. Resistance exercise versus aerobic exercise for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Sports medicine**, v. 44, n. 4, p. 487-499, 2014.

**Parecer CEUA:** 01/2015