



INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO TREINAMENTO COMBINADO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE SENESCÊNCIA CELULAR EM INDIVÍDUOS DE MEIA-IDADE OBESOS

Palavras-Chave: Treinamento combinado, Imunossenescência, obesidade, diabetes tipo 2, Inflamação.

Autores:

Pedro Scolfaro, Diego T. Brunelli, Vinicius O. Boldrini, Raphael Fatori, Geovanna de Aro, Leonardo R. Costa, Ivan Bonfante, Keryma Mateus, Renata Duft, Mara P. T. Chacon-Mikahil, Alessandro S. Faria, Cláudia R. Cavaglieri. - Universidade Estadual de Campinas

INTRODUÇÃO:

Sabe-se que uma resposta defensiva apropriada do sistema imunológico requer baixos níveis de oxidação e inflamação, que são dois processos interligados com muitos ciclos de realimentação (VIDA et al., 2014). No entanto na obesidade e do envelhecimento, as células da imunidade inata, como os macrófagos, exibem uma produção sobre-ativada de compostos oxidativos e inflamatórios, que ocorre principalmente na ausência de estímulo antigênico, levando a um estado crônico de estresse oxidativo e inflamatório (VIDA et al., 2014). Assim, tanto no contexto da comunicação neuro-imune-endócrina e comprometimento do sistema imunológico, tem-se criado a hipótese de que a obesidade promove a imunossenescência precoce, que pode contribuir para o aumento da taxa de morbidade e risco de morte relacionada a essa doença (De LA FUENTE & CASTRO, 2012). Diversos estudos mostram que indivíduos obesos apresentam maior prevalência de infecções virais persistentes como, o vírus da herpes simples tipo 1 – (HSV1) (KARJALA et al., 2011), maior suscetibilidade a casos graves de covid-19 (COSTA et al., 2020) e menor resposta vacinal. Poucos estudos investigaram a imunossenescência precoce associada à obesidade. Hunsche et al. (2016) observaram redução da quimiotaxia/capacidade fagocitária de macrófagos e da atividade de células NK, menor resposta proliferativa de linfócitos e secreção de citocinas em culturas em ratos obesos. Spielmann et al. (2014) verificaram que o excesso de gordura corporal apresentou correlação significativa com a diferenciação de células T associada à imunossenescência em adolescentes obesos, concluindo que a obesidade pode acelerar o envelhecimento do sistema imunológico e aumentar o risco de doenças relacionadas com a idade adulta. Por outro lado, evidências têm demonstrado que o exercício físico regular reduz o risco de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e depressão (GLEESON et al., 2011), e tem efeitos anti-inflamatórios (GLEESON et al., 2011; BRUNELLI et al., 2015). Além disso, o exercício físico regular pode melhorar a resposta imune e atrasar a imunossenescência em idosos (SIMPSON et al., 2012). Nesse sentido, o objetivo desta pesquisa foi investigar os efeitos de 16 semanas de TC na expressão gênica de marcadores relacionados à senescência do sistema imunológico em indivíduos obesos de meia-idade com diabetes do tipo 2.

Sujeitos

A amostra foi composta por indivíduos obesos (IMC entre 30 -35 kg/m²) de meia-idade de ambos os sexos diabéticos do tipo 2, que foram distribuídos em grupo treinamento combinado (TC; n=16; 9 mulheres e 7 homens) ou grupo controle (GC; n=14; 8 mulheres e 6 homens). Adicionalmente, indivíduos de meia idade eutróficos (IMC entre 20-25 kg/m²) foram

recrutados (E; n=15; 7 mulheres e 8 homens) e tiveram seus dados coletados apenas para comparação das variáveis no momento Pré do estudo. o projeto foi aprovado pelo CEP (CAAE: 55952516.6.0000.5404) .

Desenho experimental

Os indivíduos foram submetidos a uma avaliação física inicial constituída de anamnese, exame físico geral e teste ergométrico. Após, foi coletada a atividade física habitual através do questionário de Baecke (FLORINDO, LATORRE, 2003). Todos os grupos (TC, GC e E) realizaram as análises funcionais (força muscular e aptidão cardiorrespiratória), composição corporal (Pletismografia) e coletas de sangue para as análises moleculares (análise da expressão gênica de p16^{INK4a} e CD28 dos leucócitos circulantes) no momento inicial (Pré) do desenho experimental. Após, os grupos TC e GC foram submetidos a 16 semanas de período controle (sem exercício físico) ou de treinamento combinado e realizaram as avaliações no momento após (Pós) o período experimental. Já o grupo E realizou apenas as avaliações do momento inicial para a comparação das variáveis no momento Pré da pesquisa.

A força muscular foi determinada por meio do teste de uma repetição máxima (1-RM). A aptidão cardiorrespiratória foi realizada através do protocolo de esforço em esteira ergométrica com coleta contínua dos gases expirados respiração a respiração, sendo o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) determinado pelos valores médios dos últimos 30 segundos do teste (BRUNELLI et al., 2015). A glicemia de jejum foi realizada através do método GOD-Trinder. As análises da expressão gênica do p16^{INK4a} (sequência 5' e 3': forward: GGGGGCACCAGAGGCAGT; reverse: GGTTGTGGCGGGGCAGTT) e CD28 (sequência 5' e 3': forward:GAGAAGAGCAATGGAACCATATC; reverse: TAGCAAGCCAGGACTCCACCAA) dos leucócitos circulantes foram realizadas através da separação dos leucócitos do sangue por gradiente de densidade (Histopaque® - 1077, Sigma, MO, USA) seguido da técnica Real Time – PCR. O primer HPRT (sequência 5' e 3': forward: GACCAGTCAACAGGGGACAT, reverse: AACACTTCGTGGGGTCTTTTC) humano foi usado como gene de referência da reação (controle endógeno), servindo para normalizar a expressão dos genes alvos nas amostras.

O protocolo de TC foi composto pela realização do treinamento de força (TF) e o treinamento aeróbio (TA) na mesma sessão, realizados em 3 dias alternados com duração aproximada de 35 min cada. Os exercícios do TF foram realizados através de uma periodização linear com 10 exercícios (leg press, extensão do joelho, flexão do joelho, supino reto, puxador alto, rosca direta, tríceps na polia, desenvolvimento de ombros, extensão/flexão de panturrilha e abdominal) realizados com 2-3 séries de 10-12 repetições submáximas e pausa de 1-1'30". Em seguida, os participantes se deslocaram para a esteira ergométrica e realizavam 35 minutos de TA, envolvendo caminhada ou corrida com variação da intensidade entre 45% - 65% do VO_{2max}. Reajustes a cada 2 semanas foram realizados nas cargas utilizadas no TF. Já o ajuste do TA, ocorreu através do re-teste cardiorrespiratório máximo.

Análise estatística

Inicialmente, os dados foram organizados de acordo com os grupos (TC, GC e E) e em seguida foi testada a distribuição dos dados através do teste de Shapiro-Wilk. A partir da distribuição dos dados (paramétricos ou não-paramétricos), verificação da normalidade e presença de *outliers*, foram aplicadas as estatísticas para verificar as diferenças entre os grupos estudados no momento inicial (Pré) do estudo, sendo: Análise de Variância (ANOVA) *one-way* para as variáveis paramétricas, e quando uma interação foi apontada, aplicou-se o teste post-hoc de *Tukey*; Teste de *Kruskal-Wallis* para as variáveis não-paramétricas, e quando uma interação foi apontada, aplicou-se o post-hoc de *Dunn-Bonferroni*. Para

verificar as diferenças entre os grupos TC e GC ao longo do tempo e grupos x momento foi utilizado o método de Equações de Estimativa Generalizada (GEE) com teste post-hoc de Bonferroni. Todos os dados foram analisados com o software IBM® SPSS® Statistics 20.0 (IBM Corp. © Copyright IBM Corporation, EUA). O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$. Todos os dados são apresentados em valores de média \pm DP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

No questionário Baecke, observamos que ambos os voluntários (obesos diabéticos do tipo 2 e eutróficos) não realizavam atividade física sistemática no período anterior ao estudo, sendo a média de atividade física semanal correspondente a $60,45 \pm 4,04$ minutos. A Tabela 1 apresenta os valores da composição corporal, força máxima, aptidão cardiorrespiratória e glicemia em jejum dos grupos TC, GC e E no momento inicial (Pré) do desenho experimental. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes no peso ($p < 0,0001$), IMC ($p < 0,0001$), massa de gordura ($p < 0,0001$), VO_{2max} ($p < 0,0001$) e glicemia em jejum ($p < 0,0001$) no momento Pré dos grupos TC e GC em comparação ao E.

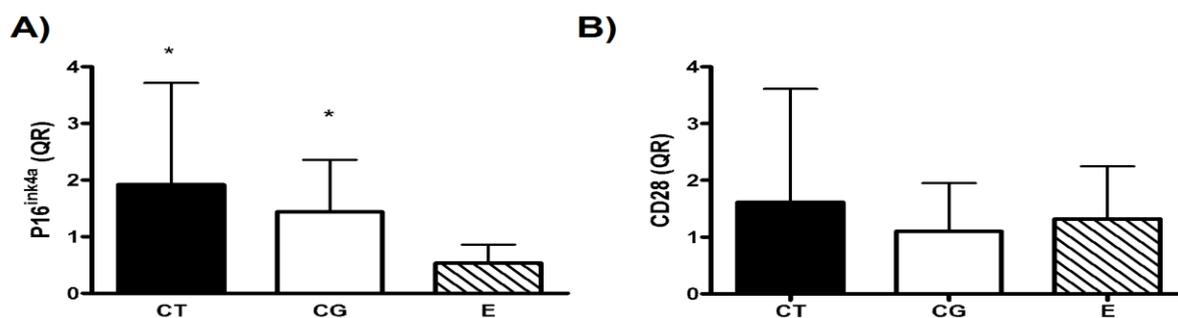
Tabela 1. Composição corporal, força máxima, aptidão cardiorrespiratória e glicemia em jejum em indivíduos obesos diabéticos do Tipo 2 (TC e GC) ou eutróficos (E) de meia-idade idade no momento inicial do desenho experimental.

VARIÁVEL	TC	GC	E
	(n = 16)	(n = 14)	(n = 15)
	Pré	Pré	Pré
Idade (anos)	52 \pm 5	51 \pm 4	52,5 \pm 4,4
Altura (m)	1,67 \pm 0,07	1,68 \pm 0,08	1,69 \pm 0,11
Peso (kg)	86,2 \pm 11,8 *	87,5 \pm 6,1 *	68,6 \pm 8,2
IMC (kg/m²)	31,42 \pm 2,15 *	32,33 \pm 2,36 *	23,9 \pm 1,1
Massa livre de gordura (kg)	53,4 \pm 5,2	53,1 \pm 6,3	51,2 \pm 10,1
Massa de gordura (%)	31,8 \pm 6,1 *	33,5 \pm 6,9 *	25,8 \pm 8,2
VO_{2max} (ml/kg/min)	22,34 \pm 4,47 *	21,75 \pm 5,91 *	28,91 \pm 4,82
1RM - Supinoreto (Kg)	29,1 \pm 13,4	34,9 \pm 15,3	26,7 \pm 13,9
1RM - Leg Press (kg)	205,3 \pm 65,6	217,3 \pm 56,8	172,9 \pm 41,8
Glicemia em Jejum (mg/dL)	142 \pm 25 *	128 \pm 25 *	87.5 \pm 7.6

IMC = índice de massa corpórea; *Diferença significativa comparado ao grupo E; $p \leq 0,05$.

A Figura 1 apresenta os valores das quantificações relativas (QR) ao controle endógeno (HPRT) da expressão gênica do p16^{INK4a} e CD28 dos leucócitos circulantes nos grupos TC, GC e E no momento inicial (Pré) do desenho experimental. Foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de p16^{INK4a} ($p = 0,041$) dos leucócitos circulantes no momento Pré dos grupos TC e GC em comparação ao E.

Figura 1. Expressão gênica de marcadores relacionados à imunossenescência em indivíduos obesos diabéticos do Tipo 2 (TC e GC) ou eutróficos (E) de meia-idade idade no momento inicial do desenho experimental.



*Diferença significativa comparado ao grupo E; $p \leq 0,05$.

A Tabela 2 apresenta os valores da composição corporal, força máxima, aptidão cardiorrespiratória e glicemia em jejum dos grupos TC e GC no momento inicial (Pré) e após (Pós) as 16 semanas do desenho experimental. Foram observados aumentos estatisticamente significantes no VO_{2max} ($p = 0,0001$), 1RM do supino reto ($p = 0,001$) e 1RM do *leg press* ($p < 0,0001$) do grupo TC no momento Pós comparado ao Pré.

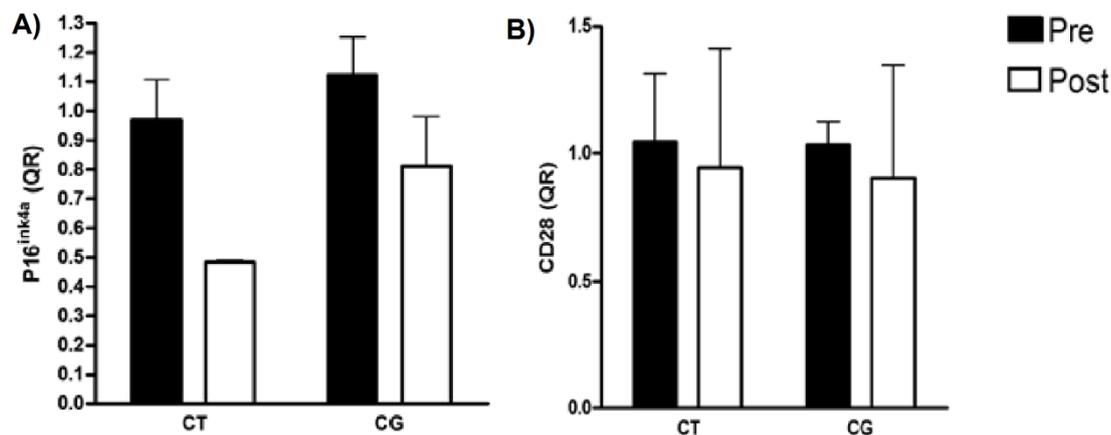
Tabela 2. Composição corporal, força máxima, aptidão cardiorrespiratória e concentração sérica de leptina em indivíduos obesos de meia-idade com diabetes do Tipo 2 antes e após o desenho experimental.

Variável	TC (n = 16)		GC (n = 14)	
	Pré	Pós	Pré	Pós
Idade (anos)	52 ± 5	-	51 ± 4	-
Altura (m)	1,67 ± 0,07	1,67 ± 0,07	1,68 ± 0,08	1,68 ± 0,08
Peso (kg)	86,2 ± 11,8	85,6 ± 12,2	87,5 ± 6,1	88,3 ± 6,3
IMC (kg/m ²)	31,42 ± 2,15	31,16 ± 2,23	32,33 ± 2,36	32,72 ± 2,45
Massa livre de gordura (kg)	53,4 ± 5,2	53,7 ± 6,5	53,1 ± 6,3	53,9 ± 9,6
Massa de gordura (%)	31,8 ± 6,1	30,8 ± 6,0	33,5 ± 6,9	33,5 ± 4,9
VO_{2max} (ml/kg/min)	22,34 ± 4,47	25,33 ± 5,46 #	21,75 ± 5,91	22,35 ± 5,87
1RM - Supinoreto (Kg)	29,1 ± 13,4	37,8 ± 15,2 #	34,9 ± 15,3	33,7 ± 14,6
1RM - Leg Press (kg)	205,3 ± 65,6	252,0 ± 75,3 #	217,3 ± 56,8	220,0 ± 55,9
Glicemia em Jejum (mg/dL)	142 ± 25	129 ± 26	128 ± 25	134 ± 28

IMC = índice de massa corpórea; # Diferença significativa comparado ao Pré; $p \leq 0,05$.

A figura 2 apresenta os valores das quantificações relativas (QR) ao controle endógeno (HPRT) da expressão gênica dos marcadores analisados no presente estudo nos grupos TC e GC nos momentos Pré e Pós o desenho experimental. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para p16^{INK4a} (Figura 2A) e CD28 (Figura 2B) após o período de intervenção nos grupos e momentos estudados.

Figura 2. Expressão gênica de marcadores relacionados à imunossenescência em indivíduos obesos de meia-idade com diabetes do Tipo 2 antes e após o desenho experimental.



CONCLUSÕES:

Concluimos que a obesidade associada à diabetes do tipo 2 pode induzir um aumento da expressão gênica em leucócitos circulantes de marcadores associados a imunossenescência em indivíduos obesos de meia-idade em comparação a um grupo eutrófico da mesma idade. Adicionalmente, nossos resultados demonstraram que o treinamento combinado de moderada intensidade proposto foi efetivo para promover mudanças significativas na força máxima e na aptidão cardiorrespiratória de indivíduos obesos diabéticos do tipo 2 na meia idade. Por outro lado, 16 semanas de exercício não reduziu a gordura corporal e a expressão gênica de $P16^{INK4a}$ e CD28 nos voluntários obesos diabéticos. Mais estudos que investiguem os efeitos do treinamento de moderada a alta intensidade por períodos mais prolongados tornam-se necessários para verificar os benefícios advindos do TC na imunossenescência precoce associada à obesidade.

AGRADECIMENTOS: Os autores gostariam de agradecer ao CNPq (bolsa PIBIC e Processo 303571/2018-7), a FAPESP (2017/06643-1; 2016/08751-3) pelo apoio financeiro para desenvolvimento da pesquisa e a todos os voluntários que participaram do presente projeto.

BIBLIOGRAFIA:

De LA FUENTE, M.; CASTRO, N.M. Obesity as a model of premature immunosenescence. **Current Immunology Reviews**, v.8,p.63-75, 2012.

FLORINDO, A.F.; LATORRE, M.R.D.O. Validação e reprodutibilidade do questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitual em homens adultos. **Rev Bras Med Esporte**, v.9, n.3, 2003.

GLEESON, M.; BISHOP, N.C.; STENSEL, D.J.; LINDLEY, M.R.; MASTANA, S.S.; NIMMO, M.A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p.607-661, 2011.

HUNSCHE, C.; HERNANDEZ, O.; De LA FUENTE, M. Impaired Immune Response in Old Mice Suffering from Obesity and Premature Immunosenescence in Adulthood. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.71, n.8, 983–991, 2016.

SPIELMANN, G.; JOHNSTON, C.A.; O'CONNOR, D.P.; FOREYT, J.P.; SIMPSON, R.J. Excess body mass is associated with T cell differentiation indicative of immune ageing in children. **Clinical and Experimental Immunology**, v.176, n.246–254, 2014.

VIDA, C.; GONZÁLEZ, E.M.; DE LA FUENTE, M. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. **Curr Pharm Des**, v.20, p.4656–4678, 2014.