

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO GERADA PELA OBESIDADE NO PERFIL
NOCICEPTIVO DE RATOS E RATAS COM OSTEOARTRITE E O EXERCÍCIO DE
CURTO PRAZO COMO MODULADOR INFLAMATÓRIO PARA A ANALGESIA**

TESE DE DOUTORADO

RAFAEL TAMBORENA MALHEIROS

Uruguiana

2021

RAFAEL TAMBORENA MALHEIROS

**INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO GERADA PELA OBESIDADE NO PERFIL
NOCICEPTIVO DE RATOS E RATAS COM OSTEOARTRITE E O EXERCÍCIO DE
CURTO PRAZO COMO MODULADOR INFLAMATÓRIO PARA A ANALGESIA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanusa Manfredini

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Morgana Duarte da Silva

Uruguaiana

2021

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

M249i Malheiros, Rafael Tamborena
INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO GERADA PELA OBESIDADE NO PERFIL
NOCICEPTIVO DE RATOS E RATAS COM OSTEOARTRITE E O EXERCÍCIO DE
CURTO PRAZO COMO MODULADOR INFLAMATÓRIO PARA A ANALGESIA /
Rafael Tamborena Malheiros.
95 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 2021.
"Orientação: Vanusa Manfredini".

1. Obesidade. 2. Inflamação. 3. Dor. 4. Osteoartrite. 5.
Exercício. I. Título.

RAFAEL TAMBORENA MALHEIROS

**INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO GERADA PELA OBESIDADE NO PERFIL
NOCICEPTIVO DE RATOS E RATAS COM OSTEOARTRITE E O EXERCÍCIO DE
CURTO PRAZO COMO MODULADOR INFLAMATÓRIO PARA A ANALGESIA**

Tese apresentada ao Programa de
Multicêntrico de Pós-graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade
Federal do Pampa, como requisito
parcial para obtenção do Título de
Doutor em Ciências Fisiológicas

Tese defendida e aprovada em: 26 de novembro de 2021.
Banca examinadora:

Prof. Dr. Vanusa Manfredini
Orientador – UNIPAMPA

Prof. Dr. Guilherme F. F. Speretta - UFSC

Prof. Dr. Eloá F. Yamada - UNIAPMPA

Prof. Jacqueline C. E. Piccoli

UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por **Guilherme Fleury Fina Speretta, Usuário Externo**, em 29/11/2021, às 10:01, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **VANUSA MANFREDINI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 29/11/2021, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **ELOA FERREIRA YAMADA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 29/11/2021, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **JACQUELINE DA COSTA ESCOBAR PICCOLI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 29/11/2021, às 10:42, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0679273** e o código CRC **D1C26555**.

Este trabalho é dedicado à minha família que é a base que me proporciona seguir neste caminho de construção de conhecimento e evolução.

AGRADECIMENTO

Por alguns dias refleti como deveria iniciar meus agradecimentos e cheguei à conclusão que a melhor forma seria com um simples e sincero “obrigado”. Então, antes de iniciar meus agradecimentos quero justificar o “obrigado”, que do latim “obligare” significa ligar por todos os lados, ligar moralmente. Desta forma, expresso uma dívida que me liga em um laço moral, mas também de amor, amizade, parceria, coleguismo com todos aqueles que contribuíram para chegar até aqui.

Aos meus pais Sergio e Ada que de maneira incansável me proporcionaram a maior herança que poderiam me deixar que é o conhecimento. No doutorado vocês fizeram parte do nosso grupo de pesquisa, mais precisamente na equipe de produção de dieta de cafeteria, e mesmo sem saber ao certo para onde iria toda aquela razão sempre fizeram questão de ajudar. Tenham sempre que nunca esquecerei todo o esforço, trabalho e dedicação que tiveram desde aquele 27 de setembro de 89.

À Camila, minha esposa, companheira, melhor amiga, por me mostrar que a vida é melhor quando se tem alguém para comemorar as conquistas, chorar as derrotas e estender a mão para levantar e começar novamente quantas vezes forem necessárias. Nestes 12 anos em que nos reencontramos neste mundo, só tenho a agradecer a Deus por permitir mais uma vez ter você ao meu lado. Pouco depois da minha formatura nós nos casamos. Pouco depois do mestrado o Miguel chegou para completar a nossa vida com um amor inimaginável. Agora o que será que nos espera no pouco depois do doutorado? Sinceramente, que siga vindo muito amor! Eu não teria palavras suficientes para te agradecer por ter me dado à paz, o amor e a esperança necessária para seguir evoluindo e construindo juntos o nosso caminho.

A minha família de sangue e emprestada, em especial, ao Matheus, Carolina, Viviane e Raimundo, por sempre estarem ao nosso lado para apoiar, conversar, rir e fazer deste mundo um lugar melhor de se viver. Agradeço por me permitirem acreditar que ainda existem pessoas neste mundo que fazem o bem apenas por amar ao próximo.

As minhas orientadoras Prof^a. Dr^a Vanusa e Prof^a. Dr^a. Morgana, por terem me proporcionado uma visão nova quanto a este grande universo que é a pesquisa. Agradeço pela amizade, por todos os ensinamentos, conselhos e alguns puxões de orelha que permitiram que juntos construíssemos esta tese.

Aos meus colegas da família Gestox pela parceria, mas, principalmente pela amizade que construímos. Nestes anos de doutorado, em meio a pandemia, incertezas e mudanças, só tenho a agradecer por sempre estarem comigo mesmo quando nem eu poderia estar. Também agradecer ao eterno GPMorgs, a Caroline e ao Daniel (meu colega de hospital, amigo e compadre) que junto comigo embarcaram no mestrado, no doutorado e logo encontramos mais uma função por ai!

Por fim, a Universidade Federal do Pampa, nossa UNIPAMPA, que veio para esta fronteira oeste para mudar e transformar a vida da nossa comunidade. Obrigado por me oportunizar o acesso a mundo que eu nem imaginava existirem desde a graduação, o mestrado e agora o doutorado. Ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas por prezar pela construção do conhecimento.

“Educação não transforma o mundo.
Educação muda pessoas. Pessoas
transformam o mundo.”

Paulo Freire

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tempestade de citocinas gerada pelo acúmulo de tecido adiposo na obesidade.

Figura 2: Desenho experimental da tese dividida nos 3 estudos.

Figura 3: Avaliações da indução de obesidade nos grupos CD, CF, HF. A: peso corporal; B: índice de adiposidade (peso das gorduras viscerais/peso corporal x 100)

Figura 4: Avaliação do perfil nociceptivo ao longo das 9 semanas de indução de obesidade dos grupos CD, CAF e HF.

Figura 5: Avaliação do conteúdo de citocinas no soro ao final da indução de obesidade dos grupos CD, CAF e HF.

Figura 6: Teste de correlação de Pearson e Spearman com regressão linear.

Figura 7: Avaliações da indução de obesidade nos grupos CM, MP, OM, OMP e CF, FP, OF, OFP.

Figura 8: Avaliação do perfil nociceptivo e de dor espontânea ao longo dos 65 dias nos grupos machos CM, MP, OM e OMP, e dos grupos fêmeas CF, FP, OF, OFP.

Figura 9: Avaliação das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias presentes no soro, após 65 dias, dos grupos (machos): CM, MP, OM e OMP.

Figura 10: Avaliação das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias presentes no soro, após 65 dias, dos grupos (fêmeas): CF, FP, OF e OFP.

Figura 11: Avaliação das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias presentes no tecido adiposo, após 65 dias, dos grupos (machos): CM, MP, OM e OMP.

Figura 12: Avaliação das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias presentes no tecido adiposo, após 65 dias, dos grupos (fêmeas): CF, FP, OF e OFP.

Figura 13: Avaliações do peso corporal dos grupos estudados ao longo dos 65 dias.

Figura 14: Avaliações do índice de adiposidade dos grupos estudados ao longo dos 65 dias.

Figura 15: Avaliação do perfil nociceptivo e de dor espontânea ao longo dos 65 dias nos machos dos grupos CM, CM-EX, MP, MP-EX, OM, OM-EX, OMP e OMP-EX.

Figura 16: Avaliação do perfil nociceptivo e de dor espontânea ao longo dos 65 dias das fêmeas dos grupos CF, CF-EX, FP, FP-EX, OF, OF-EX, OFP e OFP-EX.

Figura 17: Avaliação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro dos animais machos, grupos CM, CM-EX, MP, MP-EX, OM, OM-EX, OMP e OMP-EX, após 65 dias de estudo.

Figura 18: Avaliação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro dos animais fêmeas, grupos CF, CF-EX, FP, FP-EX, OF, OF-EX, OFP e OFP-EX, após 65 dias de estudo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informação nutricional das dietas controle, HF e CAF para cada 45g de ração.

Tabela 2 - Comparação das variáveis bioquímicas entre o grupo controle (DC) e os grupos de animais que receberam as dietas cafeteria (CAF) e Hiperlipídica (HF).

Tabela 3 - Comparação das variáveis celulares entre o grupo controle e os grupos de animais que receberam dieta cafeteria (CAF) e Hiperlipídica (HF).

Tabela 4 - Comparação das variáveis bioquímicas entre os grupos controle macho (CM), machos com dor por OA (MP), obesos (OM), obesos com dor por OA (OMP) e controle fêmeas (CF), fêmeas com dor por OA (FP), obesas (OF) e obesas com dor por OA (OFP).

Tabela 5 - Comparação das variáveis celulares entre os grupos os grupos controle macho (CM), machos com dor por OA (MP), obesos (OM), obesos com dor por OA (OMP) e controle fêmeas (CF), fêmeas com dor por OA (FP), obesas (OF) e obesas com dor por OA (OFP).

Tabela 6 – Correlação entre o índice de adiposidade e as citocinas inflamatórias

Tabela 7 –Correlação entre as citocinas no soro e a nocicepção mecânica e térmica dos grupos machos (CM, MP, OM, OMP) e fêmeas (CF, FP, OF, OFP).

Tabela 8 – Correlação entre as citocinas no soro e a nocicepção mecânica e térmica dos grupos machos e fêmeas.

SUMÁRIO

1. Resumo	13
1.1 Abstract	16
I. Introdução	18
2. Revisão	19
2.1 Formato padrão de revisão	19
2.2 Obesidade e inflamação	19
2.3 Obesidade e nocicepção	23
2.4 Obesidade e AO	25
2.5 Obesidade, OA e exercício físico	27
2.6 Análise crítica	29
3. Justificativa	29
3.1 Objetivos	32
4. Materiais e métodos	33
4.1 Princípios éticos	33
4.1.1 Estudo 1: A obesidade e seus níveis de TNF- α na alteração do perfil nociceptivo de ratos	34
4.1.2 Estudo 2: A obesidade e sua inflamação crônica como fator de potencialização algica em ratos e ratas com osteoartrite	37
4.1.3 Estudo 3: A modulação do processo inflamatório pelo exercício físico como fator de analgesia em ratos e ratas obesos com osteoartrite	41
5. Resultados	47
5.1 Estudo 1: A obesidade e seus níveis de TNF- α na alteração do perfil nociceptivo de ratos	47
5.2 Estudo 2: A obesidade e sua inflamação crônica como fator de potencialização algica em ratos e ratas com osteoartrite	52
5.3 Estudo 3: A modulação do processo inflamatório pelo exercício físico como fator de analgesia em ratos e ratas obesos com osteoartrite	63
6. Discussão	73
6.1 A obesidade per se pode alterar o perfil nociceptivo? Se sim, o processo inflamatório está ligado a esta alteração?	73
6.2 Em uma condição de doença inflamatória, como a OA, a obesidade seria um fator de potencialização da inflamação e da dor?	76
6.3 O exercício físico pode ser um possível tratamento para a associação de obesidade e OA?	78
7. Considerações finais	82
7.1 Perspectivas futuras	82
8. Referencias	83
Apêndice	93
Anexo 1: Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) 039/2017	93
Anexo 2: Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) 039/2019	94

1. RESUMO

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo, o qual, acarreta em um processo inflamatório crônico devido a liberação de citocinas inflamatórias de forma sistêmica. Da mesma forma a osteoartrite (OA), também apresenta-se como um distúrbio inflamatório. Com isso, estudos de indução de obesidade devem ser utilizados para compreender os efeitos da obesidade na OA, assim como, identificar possíveis tratamentos como o exercício físico que possui características anti-inflamatórias. Assim, o objetivo desta tese foi verificar o papel inflamação gerada pela obesidade sobre o perfil nociceptivo de ratos e ratas com OA e avaliar os efeitos do exercício físico agudo na inflamação. Para tanto, a tese foi dividida em 3 estudos iniciando pela indução de obesidade, onde os animais receberam dietas hiperlipídica (HF) e de cafeteria (CAF), durante 60 dias. Na etapa 2, os machos e as fêmeas foram divididos em grupos controle (CM e CF), não obesos com OA (MP e FP), obesos (OM e OF) e obesos com OA (OMP e OFP). Os grupos MP, OMP, FP e OFP foram submetidos, no 59º dia, a indução de OA por injeção intra-articular no joelho direito de monoiodoacetato de sódio (MIA) (1,5mg/50µL) e acompanhados até o dia 65. Na terceira etapa, novamente machos e fêmeas foram divididos em grupos iguais aos da etapa 2, entretanto, nesta fase acrescentou-se os grupos tratados com exercício de natação (por 5 dias consecutivos, 24h após a indução de OA): controle (CM-EX e CF-EX), não obesos com OA (MP-EX e FP-EX), obesos (OM-EX e OF-EX) e obesos com OA (OMP-EX e OFP-EX). Os animais foram avaliados quanto ao seu peso corporal e ao perfil nociceptivo mecânico, térmico e de dor espontânea. Além disso, para mensuração da obesidade utilizou-se o índice de adiposidade. Ao final dos 60 dias (estudo 1) e 65 dias (estudo 2 e 3) foi realizada a eutanásia e coletado sangue total por punção cardíaca para avaliação de parâmetros hematológicos, bioquímico, e de citocinas inflamatórias. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias com múltiplas comparações com post hoc de Tukey, test T pareado e correlação com regressão linear, e os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$. Os resultados obtidos mostram que os grupos de indução de obesidade por dieta CAF apresentaram aumento do peso corporal e do índice de adiposidade em relação ao controle. Além disso, observou-se que os animais obesos

apresentaram alteração no perfil nociceptivo térmico e mecânico. Ainda, os resultados apontam que os grupos obesos tiveram aumento significativo da liberação sistêmica de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, leptina) e redução das anti-inflamatórias (IL-10 e adiponectina). Quando associada a OA nos grupos OMP e OFP houve uma potencialização do processo inflamatório e da dor. No estudo 3 após o protocolo de exercício verificou-se uma redução das citocinas inflamatórias que foi relacionada a diminuição da dor. Com isso, pode-se concluir que a obesidade gera alterações do perfil nociceptivo em função do processo inflamatório, que, por sua vez, está relacionado a retenção de tecido adiposo. Em condições de associação da obesidade com a OA, este processo inflamatório é exacerbado e com isso também ocorre o aumento da dor. Neste contexto, o exercício físico agudo demonstrou ser capaz de modular a inflamação de forma positiva e com isso acarretou na redução da dor. Apesar dos animais OMP-EX e OFP-EX apresentarem redução dos níveis inflamatórios e da dor, quando, comparados aos grupos MP-EX, FP-EX, OM e OF, estes permaneceram com índices mais elevados de inflamação e dor. Assim, demonstra-se a necessidade de terapias específicas para indivíduos obesos com doenças inflamatórias associadas.

Palavras chaves: Obesidade, Inflamação, Dor, Osteoartrite, Exercício.

1.1 Abstract

Obesity is a disease characterized by the accumulation of adipose tissue, which leads to a chronic inflammatory process due to the systemic release of inflammatory cytokines. Likewise osteoarthritis (OA) also presents itself as an inflammatory disorder. Thus, obesity induction studies should be used to understand the effects of obesity on OA, as well as to identify possible treatments such as physical exercise that have anti-inflammatory characteristics. Thus, the aim of this thesis was to verify the role of inflammation generated by obesity on the nociceptive profile of rats and rats with OA and to evaluate the effects of acute physical exercise on inflammation. Therefore, the thesis was divided into 3 studies starting with the induction of obesity, where the animals received high-fat (HF) and cafeteria (CAF) diets for 60 days. In step 2, males and females were divided into control groups (CM and CF), non-obese with OA (MP and FP), obese (OM and OF) and obese with OA (OMP and OFP). The MP, OMP, FP and OFP groups were submitted, on the 59th day, to OA induction by intra-articular injection of sodium monoiodoacetate (MIA) in the right knee (1.5mg/50 μ L) and followed up until day 65. Na third stage, again males and females were divided into groups equal to those of stage 2, however, in this stage, the groups treated with swimming exercise were added (for 5 consecutive days, 24h after OA induction): control (CM-EX and CF-EX), non-obese with OA (MP-EX and FP-EX), obese (OM-EX and OF-EX) and obese with OA (OMP-EX and OFP-EX). The animals were evaluated for their body weight and mechanical, thermal and spontaneous pain nociceptive profile. In addition, to measure obesity, the adiposity index was used. At the end of 60 days (study 1) and 65 days (study 2 and 3), euthanasia was performed and whole blood was collected by cardiac puncture to

assess hematological, biochemical, and inflammatory cytokine parameters. Statistical analysis was performed using one- or two-way analysis of variance (ANOVA) with multiple comparisons with Tukey post hoc, paired t-test and correlation with linear regression, and the results were considered statistically significant at $p < 0.05$. The results obtained show that the groups with obesity induction by the CAF diet showed an increase in body weight and adiposity index compared to the control group. In addition, it was observed that obese animals showed changes in the thermal and mechanical nociceptive profile. Furthermore, the results show that the obese groups had a significant increase in the systemic release of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, leptin) and a reduction in anti-inflammatory ones (IL-10 and adiponectin). When associated with OA in the OMP and OFP groups, there was an increase in the inflammatory process and pain. In study 3, after the exercise protocol, there was a reduction in inflammatory cytokines that was related to a decrease in pain. Thus, it can be concluded that obesity causes changes in the nociceptive profile due to the inflammatory process, which, in turn, is related to the retention of adipose tissue. In conditions of association of obesity with OA, this inflammatory process is exacerbated and with it, there is also an increase in pain. In this context, acute physical exercise has been shown to be able to positively modulate inflammation and thus resulted in pain reduction. Although the OMP-EX and OFP-EX animals presented reduced levels of inflammation and pain, when compared to the MP-EX, FP-EX, OM and OF groups, they remained with higher levels of inflammation and pain. Thus, the need for specific therapies for obese individuals with associated inflammatory diseases is demonstrated.

Keywords: Obesity, Pain, Inflammation, Osteoarthritis, Exercise.

I. INTRODUÇÃO

A tese a ser apresentada neste trabalho segue a estruturação normativa do programa de pós graduação do doutorando. Onde, a formulação da tese em capítulos individuais só pode ser apresentada em caso de no mínimo dois artigos terem sido aceitos para publicação em periódico *Qualis A* segundo a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Desta forma, como optamos primeiramente pela apresentação do trabalho a banca, para posterior encaminhamento à publicação, seguimos o regimento onde a tese deve ser estruturada em seções iniciando pela apresentação do problema e a proposta de estudo. Como forma de embasamento segue a revisão literária a partir de trabalhos publicados, relativos ao tema, com relevância na área científica. Os métodos estão apresentados em três etapas, onde cada tópico é referente a um dos três estudos. Ainda, os resultados também seguem a estruturação dos métodos, logo, estão divididos pelos três estudos. A discussão, para melhor compreensão das diferentes etapas, está dividida nas diferentes questões levantadas pelos pesquisadores. As considerações finais da tese abordam de forma geral os diferentes objetivos dos estudos. Por fim adicionamos a lista de referências utilizadas e o anexou-se o certificado de aprovação do trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Formato padrão de revisão

A revisão da literatura para a tese foi embasada nos dados da interface *PubMed da da National Library of Medicine – NLM*. Pra fins da pesquisa foi adotado o idioma inglês com as seguintes palavras chaves: “obesidade” que foi combinada separadamente com “inflamação”, “dor”, “doenças inflamatórias” e “osteoartrite”. Os artigos foram selecionados inicialmente pelo título, após houve uma nova seleção por resumo e por fim pelo estudo completo. Os estudos que não abordavam o tema central da pesquisa foram excluídos. Ainda, estudos mais antigos foram utilizados ao longo do texto quando considerados importantes cientificamente para o embasamento da tese.

Esta revisão literária objetiva embasar de forma clara, objetiva, critica e resumida o conhecimento quanto a obesidade e a inflamação crônica, bem como, de que forma a obesidade influencia no perfil nociceptivo em casos de uma doença inflamatória associada.

2.2 Obesidade e inflamação

A obesidade é uma doença crônica, multifatorial, considerada uma epidemia mundial, responsável por danos sistêmicos e associada à uma série de comorbidades. Estes indivíduos apresentam um desequilíbrio metabólico relacionado, em parte, a ingestão de alimentos hipercalóricos, que geram o excesso de tecido adiposo com conseqüente ganho de peso (Organização Mundial de Saúde, 2015). No Brasil, segundo levantamento realizado em 2019 pelo

Ministério da Saúde, estima-se que 55,7% da população está acima do peso e que 20% já apresenta algum grau de obesidade. Ainda, o estudo revela que o excesso de peso está presente em 57,8% dos homens e em 54% das mulheres, sendo que, no sexo feminino a obesidade apresentou maiores taxas (20,7% contra 18,7% no sexo masculino) (Brasil, Ministério da Saúde, 2019).

Embora a taxa de obesidade seja maior no sexo feminino, quando comparados homens com mulheres, verifica-se diferença quanto ao risco de desenvolver: (1) doenças cardiovasculares (Maas & Appelman, 2010); (2) diabetes tipo 2 (Kautzky-Willer, Harreiter, & Pacini, 2016); e (3) resistência à insulina (Kim & Reaven, 2013; Lee & et al, 2016). Todas essas comorbidades estão associadas principalmente à deposição de gordura abdominal favorecida parcialmente por diferenças hormonais masculinas (Karpe & Pinnick, 2014; Henstridge & et al, 2019). Este depósito de gordura abdominal, contribui substancialmente para uma inflamação crônica de baixo grau (Henstridge & et al, 2019; Schmidt & et al, 2015).

Neste sentido, a inflamatório crônico de baixo grau tem efeitos sistêmicos, logo, diferenciando-se da inflamação gerada por uma lesão tecidual ou por infecções onde observam-se sinais clássicos como dor, calor, rubor, edema e perda da função (Hotamisligil, Inflammation and metabolic disorders, 2006; Maskrey & et al, 2011; Roger & Calder, 2018). Entretanto, o processo inflamatório acarretado pela obesidade também está relacionado, inicialmente, a uma resposta imune ao excesso de metabólitos gerados pelo acúmulo de tecido adiposo. Isso ocorre pois apesar dos adipócitos apresentarem uma capacidade de expansão, esta habilidade é limitada, passando a apresentar uma lipogênese contínua em detrimento da alta carga calórica. Com isso, a partir de células mortas ocorre a

geração de ATP e ácido úrico que ativam receptores pró-inflamatórios (Franchi & et al, 2010; Kanneganti & Dixit, 2012)

Vários fatores estão relacionados a produção de citocinas inflamatórias, dentre estes podemos citar: ativação de células endoteliais, estresse oxidativo e, em especial, a infiltração de macrófagos no tecido adiposo ((Elkis & Francis, 2012; Maury & Brichard, 2010). Estudos demonstram que a retenção de um quilograma de gordura representa um acúmulo de 20 a 30 milhões de macrófagos no tecido adiposo (Lumeng, 2013; Lumeng & Saltiel, 2011). Esta infiltração de macrófagos tem origem na migração de monócitos circulatórios para o tecido adiposo, onde, posteriormente podem se diferenciar em macrófagos ativos M1 e M2. Em indivíduos magros os macrófagos, essencialmente do fenótipo M2, apresentam um papel de reparação tecidual, sensibilidade a insulina e de efeito anti-inflamatório (Ouchi & et al, 2011). Entretanto, em indivíduos obesos ocorre um aumento exacerbado na concentração de macrófagos M1 devido ao recrutamento de monócitos circulantes que se diferenciam neste fenótipo. Tal mudança na concentração de macrófagos M2 para M1 representa um dos principais fatores pró-inflamatórias na obesidade. A partir destes macrófagos M1 ocorre a produção de citocinas, como o TNF- α , IL-1 β , IL-6, e de ROS que são responsáveis por diversos distúrbios metabólicos (Balistreri, Caruso, & Candore, 2010; Osborn & Olefsky, 2012; Mraz & Haluzik, 2014).

Desta forma pode-se inferir que o excesso de tecido adiposo é responsável pela produção de uma série de citocinas inflamatórias denominadas adipocinas, das quais podemos citar o TNF- α , IL-1 β , a IL-6, proteína C reativa (PCR), leptina (Mathis & Shoelson, 2011). Tal conceito, foi inicialmente estabelecido a partir do

estudo de Hotamisligil e colaboradores que em 1993 observaram que o tecido adiposo era capaz de secretar TNF- α (Hotamisligil, Shargill, & Spiegelman, 1993). Com o tempo outras adipocinas foram identificadas, porém, até os dias atuais o TNF- α em conjunto a outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, a leptina e de ação anti-inflamatória, como a adiponectina, seguem sendo amplamente estudadas devido a sua associação com as mais diversas doenças. Com isso, em condições de obesidade verifica-se o aumento na síntese destas proteínas inflamatórias e redução de adipocinas de efeito anti-inflamatórias como a adiponectina e a IL-10 (Shah, Mehta, & Reilly, 2008). Assim, os efeitos da retenção de adipócitos, gerados pela consequente ativação de um processo inflamatório crônico, atuam de forma local e sistêmica afetando outros órgãos (fígado, cérebro, coração, pâncreas, músculos) (Goossens, 2008).

Os níveis de TNF- α estão intimamente ligados a obesidade e ao desenvolvimento de resistência insulínica e diabetes (Fernández-Sanchez & et al, 2011). A expressão desta citocina ocorre principalmente por macrófagos, no entanto, outros tipos de células podem produzi-lo como monócitos e adipócitos (Popa & et al, 2007). Na obesidade o TNF- α tem um papel central na inflamação crônica de baixo grau, uma vez que, o aumento da sua concentração no tecido adiposo é responsável pela indução da IL-6, a qual, desencadeia maior produção de PCR (Veigas, Pereira, Vicente, & Mesquita, 2012). Devido à grande família de receptores de TNF- α estarem presentes na membrana de praticamente todas as células (exceto em eritrócitos), independente de localização, o TNF é capaz de mediar respostas biologicamente ativas nas mais variadas estruturas. Por estas características o TNF- α é considerado como uma das principais citocinas pró-

inflamatória e o seu papel segue sendo fonte de diferentes estudos (Bradley, 2008; Horiuchi & et al, 2010).

Ainda, é preciso destacar alguns estudos que fundamentaram o tecido adiposo não apenas como armazenador de energia, mas, o colocaram como um órgão multifuncional (Zhang & et al, 1994; Maeda & et al, 1996; Fernández & Kaski, 2002). Em 1994 Zhang e colaboradores identificaram a leptina, que é um polipeptídeo produzido no tecido adiposo, que tem como função regular a ingestão alimentar e o gasto energético por meio do sistema nervoso central (Zhang & et al, 1994). Desde então vários estudos como o de Moeda e colaboradores em 1996 e de Fernandez e Kaski em 2002 demonstraram que o tecido adiposo está relacionado com a secreção de hormônios, peptídeos, citocinas. Onde podemos destacar a expressão de: adiponectina e IL-10 que apresentam papel protetor de ação anti-inflamatória (Maeda & et al, 1996; Fernández & Kaski, 2002); IL-6 que é uma citocina que pode agir como pró-inflamatória, entretanto no exercício tem uma ação anti-inflamatória, de ação tanto no tecido periférico quanto a níveis centrais e tem influência sobre o peso corporal, a sensibilidade a insulina e a homeostase energética (Mohamed-Ali, Pinkney, & Coppack, 1998); IL-1 β de ação inflamatória é um dos principais marcadores de indução da inflamação (Ferrero-Miliani, Nielsen, Andersen, & Girardini, 2006); IL-8 que é considerada um importante fator em doenças imunológicas e inflamatórias por promover a migração de células imunes (Harada & et al, 1994)

Desta forma, estima-se que o processo inflamatório desencadeado pelo excesso de tecido adiposo é responsável pela produção de mais de 50 adipocinas, citocinas e quimiocinas. As quais, acarretam em disfunções sistêmicas, periféricas

e centrais, no controle do metabolismo energético, da glicose e lipídios, na resistência à insulina, na pressão arterial, no perfil nociceptivo (Ramos-Nino, 2013). Ainda, este acúmulo de tecido adiposo associado a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β , o fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-6 o que caracteriza a presença da inflamação crônica de baixo grau nestes indivíduos obesos (Lumeng, Innate immune activation in obesity, 2013; Mancuso, 2013). Tal alteração na morfologia dos adipócitos está relacionada a vários distúrbios fisiológicos, como a resistência à insulina que está ligada ao aumento de adipocinas pró-inflamatórias e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como, com a redução das adipocinas anti-inflamatórias (adiponectina) (Osborn & Olefsky, 2012). Ainda, neste contexto inflamatório, a literatura aponta uma possível relação entre obesidade e doenças músculo-esqueléticas, como a osteoartrite (OA) (Sun & et al, 2016).

2.3 Obesidade e nocicepção

Inicialmente, torna-se importante caracterizar que a nocicepção é uma sinalização sensorial especializada que se ativada a partir de um estímulo nocivo que exceda o limiar fisiológico (Baranauskas & Nistri, 1998). Com base nesta revisão, verificou-se que a obesidade está relacionada a alterações nociceptivas sendo considerada um fator funcional para presença de dor (Okifuji & Hare, The association between chronic pain and obesity, 2015). Neste contexto, McCarthy e colaboradores realizaram um estudo com 840 humanos obesos, onde a presença de obesidade foi definida por um IMC >30 kg/m², como resultado os autores

verificaram que estes indivíduos relataram duas ou quatro vezes mais queixa e dor em comparação a pessoas não obesas (Mccarthy & et al, 2009).

Com isso, a inflamação crônica de baixo grau presente na obesidade teria uma possível associação com a dor, tendo em vista que, a ingestão de uma dieta hipercalórica aumenta a retenção de gordura corporal o que provoca a secreção de mediadores pró-inflamatórios desde tecidos periféricos até encefálicos (Okifuji & Hare, 2015; Jais & Brüning, 2017). Como supracitado o tecido adiposo é responsável pela produção de mais de 50 adipocinas e citocinas, assim, acredita-se que o processo inflamatório sensibiliza os mediadores hipernociceptivos através de uma cascata de citocinas ou, para usar um termo mais atual, uma “tempestade” de citocinas (Figura 1) (Verri & et al, 2006).

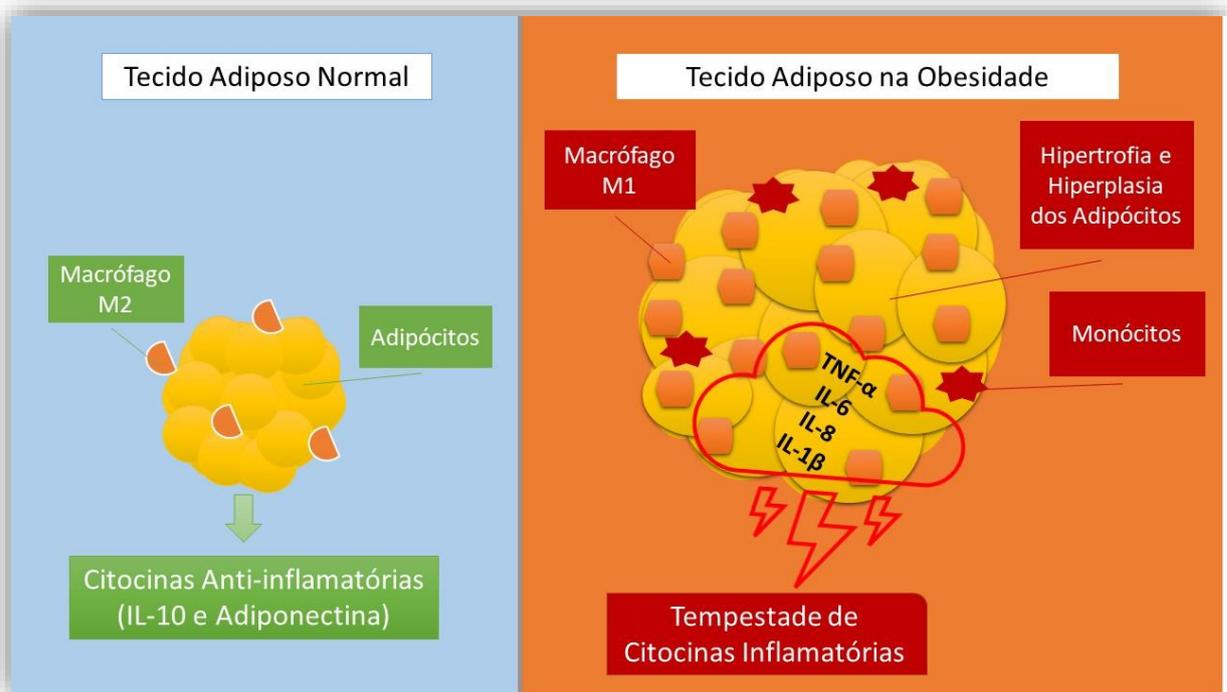


Figura 1: Tempestade de citocinas gerada pelo acúmulo de tecido adiposo na obesidade. Fonte: Próprio autor.

Neste contexto, o TNF- α é considerado o arquétipo desta tempestade inflamatória, em parte por ser a primeira citocina a ser liberada, mas, também, pela sua capacidade de induzir diversos processos na perpetuação da inflamação. Em sequência ocorre a liberação de IL-6 e IL1 β que em conjunto ao TNF- α são responsáveis por promover a estimulação da síntese de prostaglandinas e a liberação de aminas simpáticas sensibilizando as fibras nociceptivas (Lorenzetti & et al, 2002; Zhang & An, 2017). Tal o efeito, que acarreta em um perfil hiperálgico e de desenvolvimento da alodinea está ligado a ativação dos receptores destas as citocinas pró-inflamatórias, os quais, estão presentes nas fibras nervosas. Em adição, a inibição desta cascata de citocinas provoca analgesia demonstrando o papel fundamental destas citocinas no perfil nociceptivo (Sommer & Kress, 2004). Logo, este padrão de aumento de mediadores inflamatórios, de forma sistêmica, pode modular mecanismos centrais que interferem no limiar de dor (RICHTER & et al, 2010; Andrade & et al, 2011).

Quando associada a uma doença dolorosa a obesidade aparenta ter um papel de potencialização da dor (Mccarthy & et al, 2009). Este efeito foi verificado em estudos com diferentes doenças, como: dores musculoesqueléticas (Cooper & et al, 2018); artrite reumatoide (Yoo, Cho, Lim, & Kim, 2014); fibromialgia (Okifuji & et al, 2010); dores de cabeça (Chai & et al, 2014); osteoartrite (Vuolteenaho, Koskinen, & Moilanen, 2014). Em todas estas doenças a associação com a obesidade gerou o aumento do perfil de dor o que pode ser explicado, ao menos em parte, pela teoria inflamatória e seus mecanismos fisiológicos (Crissey & et al, 2014). Assim, a inflamação crônica de baixo grau, provocada pelo acúmulo de tecido adiposo em obesos, representa uma área que ainda precisa ser explorada

por estudos controlados de obesidade com potencial para elucidar essas questões (Chin, Huang, Akter, & Binks, 2020).

2.4 Obesidade e OA

A OA é uma doença caracterizada pela degeneração da cartilagem articular, o que contribui não apenas para uma sobrecarga articular, mas também, em uma série de alterações, também relacionadas ao processo inflamatório, como o aumento das taxas glicêmicas, da produção de adipocinas e, em especial, da presença de hiperalgia (Sun & et al, 2016). A dor é um dos principais sintomas da OA e segundo a Associação Internacional para o Estudos da Dor (IASP) pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a, dano real ou potencial ao tecido” (Raja & et al, 2020). Este distúrbio está ligado tanto a OA quanto a obesidade e representa uma piora da funcionalidade e da capacidade laboral, além de ser responsável por doenças comportamentais como a ansiedade e depressão (Andersson, Svensson, & Bergman, 2013; Rice, 2016).

Com isso, a OA considerada uma doença multifatorial causa alterações inflamatórias nas articulações e danos a cartilagem. Esta doença é uma das principais causas de dor e com isso de incapacidade funcional, afastamento laboral e de perda de qualidade de vida (de Lange-Brokaar & et al, 2012; Rosales Ade & et al, 2014). A literatura aponta uma possível relação entre a obesidade e a OA, sugerindo que esta associação contribui não apenas na sobrecarga articular, mas também, em uma série de alterações metabólicas com aumento nas taxas de insulina plasmática, citocinas e hormônios (Sun & et al, 2016).

Dentre as articulações o joelho é mais comumente afetado e parece ter relação com o índice de massa corporal (Landsmeer & et al, 2019). De fato, a obesidade e valores baixos de HDL (lipoproteína de alta densidade) estão associados à degeneração da cartilagem do joelho e a lesão óssea (Pan & et al, 2019). Estas alterações afetam significativamente a mobilidade do indivíduo, com aumento da dor e do ganho de peso, caracterizando assim um sistema retroalimentar (Bliddal & Christensen, 2006).

Com isso, embora a obesidade se apresente como um dos principais fatores de risco para OA, o uso de modelos animais obesos é raro e a relação entre esses distúrbios ainda é obscura (Son & et al, 2019). Em indivíduos obesos, o tecido adiposo é caracterizado pela liberação de macrófagos M1, resultando em ambiente inflamatório (Vieira-Potter, 2014). Nestas condições, ocorre o aumento nos níveis de adipocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 (Gleeson & et al, 2011). Além disso, o tecido adiposo na obesidade é conhecido por secretar adipocinas, como a leptina e a adiponectina, que estão associadas a alterações patológicas da OA (Yamamoto & et al, 2005). Com isso, o melhor entendimento de como o tecido adiposo afeta a OA a longo prazo, especialmente em uma perspectiva inflamatória, pode fornecer uma compreensão adicional a várias doenças (Frye, Shmalberg, & Wakshlag, 2016).

2.5 Obesidade, OA e exercícios

Em um amplo estudo transversal, realizado em 6 países de 4 continentes, que envolveu 42 mil humanos, os autores observaram que o sedentarismo está

fortemente associado ao desenvolvimento de dor crônica e obesidade. Ainda, neste estudo, os pesquisadores apontam o exercício físico como um dos principais meios de tratamento não farmacológico para a prevenção e o tratamento de diversas doenças como a obesidade e a dor (Koyanagi, Stubbs, & Vancampfort, 2018). Ainda, segundo diretrizes do *American College of Sports Medicine (ACSM)*, um adulto deveria praticar pelo menos 150 min de exercícios aeróbicos, de intensidade moderada, por semana podendo ser dividido em 5 dias de 30 min, a fim de, obter os efeitos benéficos da atividade física (ACSM, 2011).

Os efeitos do exercício físico no perfil nociceptivo estão descritos em vários estudos, dos quais podemos citar: Almeida e colaboradores (2015) que demonstraram que a natação, considerado um exercício aeróbico de média intensidade, foi capaz de reduzir a resposta álgica em roedores submetidos a indução de dor crônica; Sharma e colaboradores (2010) que estudaram os efeitos do exercício aeróbico de esteira em roedores, com dor induzida por solução ácida no musculo gastrocnêmio, onde demonstraram que a atividade física foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica de forma significativa em comparação a um grupo sedentário; Galdino e colaboradores (2014), que observaram que uma sessão aguda de exercícios aeróbicos foi capaz de gerar um efeito analgésico em roedores submetidos a um protocolo de indução de dor. Várias vias estão sendo estudadas quanto ao aumento do limiar de dor gerado pelo exercício, dentre estas, uma potencial área é a da teoria da modulação inflamatória.

Neste contexto, pode-se considerar que o exercício físico possui um efeito anti-inflamatório e o seu papel no tratamento da obesidade e da dor pode ser explicado pela regulação inflamatória: (1) a redução da concentração de tecido

adiposo que gera uma redução na expressão de citocinas inflamatórias; (2) o aumento na liberação de citocinas anti-inflamatórias ligadas a contração muscular (Gleeson & et al, 2011). Ainda, estudos demonstram que uma sessão aguda de exercícios é suficiente para aumentar os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias apresentando um efeito de redução da inflamação sistêmica (Pedersen & Febbraio, 2012; Galdino & et al, 2014).

Como mencionado anteriormente, o exercício apresenta uma resposta inflamatória, no entanto, diferente da inflamação gerada pela obesidade onde a primeira citocina a ser elevada é o TNF- α , na atividade física a citocina primária é a IL-6 produzida pela contração muscular. Tal diferenciação entre os processos inflamatórios é fundamental para compreensão de que a IL-6 muscular age por uma via independente do TNF- α , assim, favorecendo a expressão de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (Diepen & et al, 2013; Pereira & et al, 2013). Neste sentido, a atividade física aparenta interferir no perfil nociceptivo através da redução da concentração de tecido adiposo, que por si só tem um efeito regulatório sobre o processo inflamatório sistêmico, e também por sua ação anti-inflamatória ligada a contração muscular. Assim, a prática de exercícios torna-se um importante aliado no tratamento da obesidade e da dor ou, ainda, da associação destas (Paley & Johnson, 2016; Cooper & et al, 2018).

2.6 Análise Crítica

Esta revisão de literatura buscou fundamentar a evidente importância de pesquisas envolvendo a obesidade e a teoria inflamatória. Neste contexto, torna-

se necessária a busca pela compreensão do papel da obesidade e da resposta inflamatória crônica de baixo grau nas alterações do perfil nociceptivo, na ação potencializadora quando associada a condição de dor e na resposta do limiar de dor ao tratamento por exercício físico.

3. Justificativa

Apesar da obesidade apresentar uma inflamação crônica, com altos níveis de citocinas, o seu papel nos distúrbios nociceptivo ainda está sendo caracterizado. Ainda assim, com base em na literatura pode se inferir que a associação da OA com a obesidade afeta significativamente a vida dos indivíduos, em especial, pela presença da dor que reduz a mobilidade e auxilia no ganho de peso (Bliddal & Christensen, 2006; Conaghan, Cook, Hamilton, & Tak, 2019).

Estudos de indução de obesidade por dieta hipercalórica estão sendo utilizados para compreender os efeitos da obesidade na OA e identificar possíveis tratamentos. Neste contexto, o exercício físico representa uma alternativa terapêutica que visa o aumento da força muscular, do controle articular, além da redução da dor e do peso corporal (Ageberg & Roos, 2015). Estudos demonstram que um programa de exercícios voltados para o tratamento da OA apresenta efeitos positivos na redução da dor e na melhora da qualidade de vida (Brosseau & et al, 2017; Regnaud & et al, 2015). Este efeito pode estar ligado a capacidade do o exercício físico em modular o processo inflamatório através do aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, que por sua vez inibem uma série de funções pró-inflamatórias (Allen, Sun, & Woods, 2015; Ringseis, Eder, Mooren, & Krüger, 2015). Com isso, podemos compreender que o exercício consiste em uma

forma de tratamento com efeitos positivos tanto para a obesidade quanto para a OA.

Entretanto, alguns questionamentos precisam ser levantados e são bases desta tese, como: A obesidade per se pode alterar o perfil nociceptivo? Se sim, o processo inflamatório está ligado a esta alteração? Em uma condição de doença inflamatória, como a OA, a obesidade seria um fator de potencialização da inflamação e da dor? O exercício físico pode ser um possível tratamento para a OA, a obesidade e a associação entre as doenças? Desta forma, este estudo justifica-se na busca por responder a estas questões que representam um impacto importante na vida dos indivíduos obesos com OA. Como hipótese, estima-se que a inflamação gerada pela obesidade apresenta potencial para gerar alterações nociceptivas periféricas e centrais. Ainda, quando associada a uma doença como OA, a obesidade, é um fator de exacerbação inflamatória e de dor. Por sua vez, o exercício físico pode se apresentar como uma forma de tratamento em ambas as doenças pelo seu efeito na redução de tecido adiposo e anti-inflamatório.

3.1 Objetivos

Diante do exposto, o objetivo desta tese foi verificar os efeitos da obesidade no perfil nociceptivo; avaliar a relação entre tecido adiposo, as citocinas inflamatórias e a nocicepção; aferir se a obesidade associada a uma doença inflamatória, como a OA, pode ser um fator de potencialização da inflamação e da dor; comparar os efeitos do exercício no tratamento de ratos e ratas obesos e não obesos com e sem OA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nos métodos apresentamos os procedimentos realizados nesta tese, os quais, para melhor compreensão, estão apresentados subdivididos nos três estudos (Figura 2).

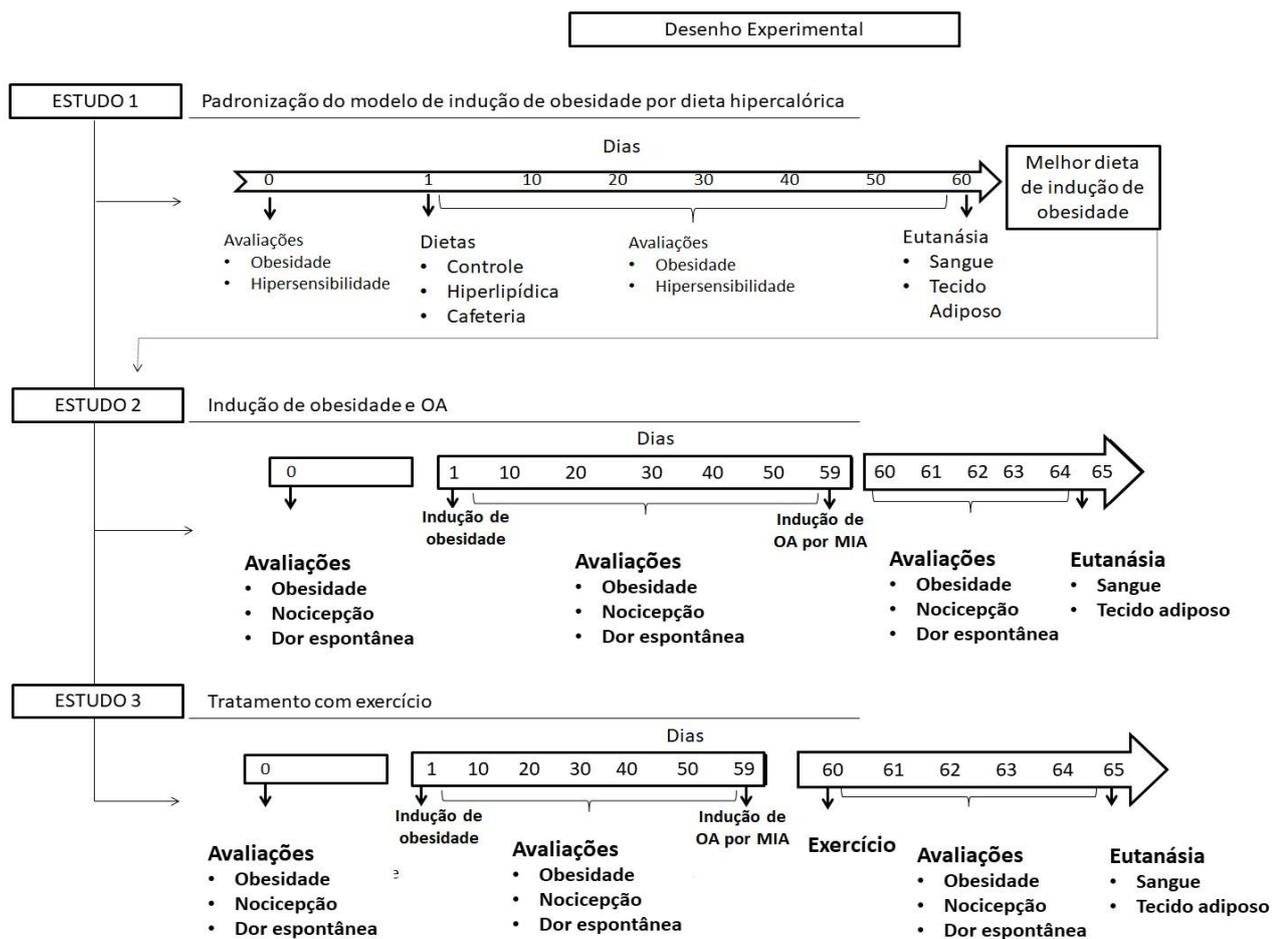


Figura 2: Desenho experimental da tese dividida nos 3 estudos.

4.1 Princípios éticos

Todos os procedimentos realizados nesta tese foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa

(CEUA-Unipampa) sob número de protocolo 039/2017 (anexo 1) e 039/2019 (anexo 2).

4.1.1 Estudo 1: A obesidade e seus níveis de TNF- α na alteração do perfil nociceptivo de ratos

Animais

Foram utilizados 36 ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), com peso aproximado de 200 g, mantidos em número de quatro animais por caixa, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, e em condições de temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Indução de obesidade

Os animais foram divididos em três grupos:

Grupo 1 (n=12) – Dieta controle (CD): ração industrial balanceada (NUVITAL,NUVILAB-CR,PR, Brasil), protocolo com duração de 9 semanas.

Grupo 2 (n=12) – Dieta hiperlipídica (HF): ração industrial acrescida de amendoim, chocolate ao leite e biscoitos na proporção de 3:2:2:1, protocolo com duração de 9 semanas (Estadela & al, 2004).

Grupo 3 (n=12) – Dieta de cafeteria (CAF): ração industrial acrescida de chocolate, patê, batatas fritas, bacon e biscoitos numa proporção de 2:1:1:1:1:1, protocolo com duração de 9 semanas (Lopez & et al, 2003).

Na tabela 1 apresentamos os valores nutricionais para 45g de ração das dietas utilizadas.

Tabela 1 – Informação nutricional das dietas controle, HF e CAF para cada 45g de ração.

	Controle	CAF	HF
Valor Calórico	152,55 Kcal	183,67 Kcal	195,47 Kcal
Proteínas	9,9g	5,39g	7,7g
Carboidratos	24,3g	18,60g	25,27g
Gorduras totais	1,8g	10,76g	9,87g

Avaliações metabólicas e de perfil nociceptivo

Avaliação da Obesidade - As avaliações consistiram na mensuração do peso corporal, circunferência torácica, e comprimento naso-anal, as quais, foram realizadas antes de iniciar as dietas experimentais (avaliação basal) e após o início da indução da obesidade a cada sete dias. Ao final do estudo, após a eutanásia dos animais, foi removido e mensurado o tecido adiposo visceral e realizado o cálculo do índice de adiposidade, soma do peso da gordura visceral/peso corporal x 100 (Taylor & Phillips, 1996).

Avaliação do perfil nociceptivo - uma vez por semana os animais foram aclimatizados, 1 hora antes do teste, em uma gaiola transparente com piso de malha, após foram realizados: teste de nocicepção mecânica de Von Frey – onde a hiperalgesia mecânica foi avaliada através dos filamentos de Von Frey, a fim de determinar a pressão máxima necessária para que o animal demonstre

sensibilidade ao contato na superfície plantar das patas traseiras (Chaplan & et al, 1994); Teste de acetona – a sensibilidade térmica ao frio foi mensurada após a instilação de 0,05 ml de acetona nas patas traseiras do animal, a avaliação é quantificada pela resposta de retirada (0 = sem retirada, 1 = retirada única, 2 = retiradas múltiplas, 3 = lambar a pata) onde quanto maior a pontuação mais elevada será a sensibilidade térmica (Flattersa & Bennett, 2004).

Parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios

Contagem total de leucócitos – foi realizada pelo equipamento KX-2N (Roche®) e o diferencial de leucócitos do sangue periférico foi realizado através de esfregaço sanguíneo em lâmina e corado com panótico. Os leucócitos do sangue periférico foram contados e suas subpopulações expressas em %.

Perfil glicêmico, lipídico e os marcadores bioquímicos de função hepática (ALT e AST) – foram quantificados no soro através de kits específicos para o equipamento Chem Well T da Labtest®.

Perfil inflamatório – as citocinas (interleucina IL-1 β , TNF- α e IL-6) no soro foram quantificadas pelo método ELISA usando alíquotas das amostras obtidas (100 μ L) (Oliveira & et al, 2013).

Análise estatística

Os dados foram expressos como média + erro padrão da média e o nível de significância em todos os casos foi considerado $p < 0,05$, sendo utilizado Software GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). A análise estatística dos grupos experimentais foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA de uma ou

duas vias) com múltiplas comparações com post hoc de Tukey. Ainda, foram realizados os testes de correlação de Pearson e Spearman com regressão linear das variáveis de interesse.

4.1.2 Estudo 2: A obesidade e sua inflamação crônica como fator de potencialização algica em ratos e ratas com osteoartrite

Foram utilizados 72 ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar, provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), com peso aproximado de 200 g, mantidos em número de quatro ou cinco animais por caixa, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, e em condições de temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), tendo o estudo duração de 65 dias.

Indução de obesidade

Para indução de obesidade foi utilizada a dieta de cafeteria (CAF), composta por: ração industrial acrescida de chocolate, patê, batatas fritas, bacon e biscoitos numa proporção de 2:1:1:1:1:1 (Lopez & et al, 2003). Os animais que não passaram por indução de obesidade receberam ração industrial balanceada (NUVITAL,NUVILAB-CR,PR, Brasil).

Indução de osteoartrite

Para induzir a dor articular, no 59º dia do protocolo de obesidade, os ratos foram anestesiados, com cetamina (80 mg/kg i.p.) e xilasina (10 mg/kg i.p.) e receberam uma injeção intra-articular no joelho direito de monoiodoacetato de sódio (MIA) na dose de 1,5mg em 50µL de salina estéril. Os grupos que não passaram pela indução de dor articular passaram pelo mesmo protocolo, porém,

receberam uma injeção intra-articular de salina estéril (50µL) (Yamada & et al, 2018).

Divisão dos grupos experimentais

Os grupos foram compostos por um número de 9 animais.

Grupo 1 – machos controle (CM): ratos não obesos com injeção de salina estéril no joelho direito;

Grupo 2 – fêmeas controle (CF): ratas não obesas com injeção de salina estéril no joelho direito;

Grupo 3 – machos obesos (OM): ratos obesos com injeção de salina estéril no joelho direito;

Grupo 4 – fêmeas obesas (OF): ratas obesas com injeção de salina estéril no joelho direito;

Grupo 5 – machos com dor por osteoartrite (MP): ratos não obesos com injeção de MIA no joelho direito;

Grupo 6 – fêmeas com dor por osteoartrite (FP): ratas não obesas com injeção de MIA no joelho direito;

Grupo 7 – machos obesos com dor por osteoartrite (OMP): ratos obesos com injeção de MIA no joelho direito.

Grupo 8 – fêmeas obesas com dor por osteoartrite (OFP): ratas obesas com injeção de MIA no joelho direito.

Avaliações de consumo da dieta e metabólicas

Avaliação do consumo diário - Para mensuração do consumo das dietas foi adotada uma oferta diária de 180g de ração para caixas com 4 animais e 225g de ração para caixas com 5 animais, do primeiro a o último dia de indução, em horário padrão (8:00 a.m.), o débito presente das 24h, do dia anterior, foi pesado com balança digital para determinar o consumo diário.

Avaliação da Obesidade - As avaliações consistiram na mensuração do peso corporal e comprimento naso-anal, as quais foram realizadas antes de iniciar a indução de obesidade (avaliação basal), após a cada 10 dias e no 65° dia. Ao final do estudo, após a eutanásia dos animais, foi removido e mensurado o tecido adiposo visceral e realizado o cálculo do índice de adiposidade, soma do peso da gordura visceral/peso corporal x 100 (Taylor & Phillips, 1996).

Avaliações da dor espontânea do joelho e de perfil nociceptivo

Os animais foram avaliados antes do início da indução de obesidade (avaliação basal), a cada 10 dias e, após indução de dor por osteoartrite de joelho, diariamente até 65° dia.

Avaliação de dor espontânea – o posicionamento de proteção do animal foi registrado usando uma escala subjetiva de comportamento, de intervalo entre 0 (zero) e 5 (cinco), no qual 0 equivale à normalidade e 5 evita qualquer contato com o membro (Gopalkrishnan & Sluka, 2000; Da Silva & et al, 2017).

Avaliação do perfil nociceptivo - os animais foram aclimatizados, 1 hora antes do teste, em uma gaiola transparente com piso de malha e após foram realizados: teste de nocicepção mecânica de Von Frey – onde a hiperalgesia mecânica foi avaliada através dos filamentos de Von Frey, a fim de determinar a pressão máxima necessária para que o animal demonstre sensibilidade ao contato na superfície plantar da pata traseira direita (Chaplan & et al, 1994); Teste de acetona – a sensibilidade térmica ao frio foi avaliada após a instilação de 0,05 ml de acetona na pata traseira direita do animal e quantificada pela resposta de retirada (0 = sem retirada, 1 = retirada única, 2 = retiradas múltiplas, 3 = lambe a pata), onde quanto maior a pontuação mais elevada será a sensibilidade térmica (Flattersa & Bennett, 2004).

Parâmetros hematológicos e inflamatórios

Contagem total de leucócitos – foi realizada pelo equipamento KX-2N (Roche®) e o diferencial de leucócitos do sangue periférico foi realizado através de esfregaço sanguíneo em lâmina e corado com panótico. Os leucócitos do sangue periférico foram contados e suas subpopulações expressas em %.

Perfil inflamatório – a partir de amostras do soro e do tecido adiposo foram quantificados os níveis das citocinas de ação pró-inflamatória das interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, do TNF- α , da leptina e da PCR e ação anti-inflamatória da IL-10 e adiponectina utilizando kits da Thermo Fisher Scientific®. As quantificações foram realizadas pelo método ELISA utilizando alíquotas das amostras obtidas (100 μ L) (Oliveira & et al, 2013).

Análise estatística

Os dados foram expressos como média + erro padrão da média e o nível de significância em todos os casos foi considerado $p < 0,05$, sendo utilizado Software GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). A análise estatística dos grupos experimentais foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA de uma ou duas vias) com múltiplas comparações com post hoc de Tukey. Ainda, foram realizados os testes de correlação de Pearson e Spearman com regressão linear das variáveis de interesse.

4.1.3 Estudo 3: A modulação do processo inflamatório pelo exercício físico como fator de analgesia em ratos e ratas obesos com osteoartrite

Foram utilizados 144 ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar, provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), com peso aproximado de 200 g, mantidos em número de quatro ou cinco animais por caixa, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, e em condições de temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), tendo o estudo duração de 65 dias.

Para indução de obesidade foi utilizada a dieta de cafeteria (CAF), composta por: ração industrial acrescida de chocolate, patê, batatas fritas, bacon e biscoitos numa proporção de 2:1:1:1:1:1 (Lopez & et al, 2003). Os animais que não passaram por indução de obesidade receberam ração industrial balanceada (NUVITAL,NUVILAB-CR,PR, Brasil).

Indução de osteoartrite

Para induzir a dor articular, no 59º dia do protocolo de obesidade, os ratos foram anestesiados, com cetamina (80 mg/kg i.p.) e xilasina (10 mg/kg i.p.) e

receberam uma injeção intra-articular no joelho direito de monoiodoacetato de sódio (MIA) na dose de 1,5mg em 50µL de salina estéril. Os grupos que não passaram pela indução de dor articular passaram pelo mesmo protocolo, porém, receberam uma injeção intra-articular de salina estéril (50µL) (Yamada & et al, 2018).

Exercício físico

O protocolo de exercício físico de curta duração teve início no 60° dia e final no 64° dia (duração de 5 dias consecutivos) e consistiu em um programa de natação adaptado ao de Nakao e colaboradores (Nakao & et al, 2000). O curto prazo foi utilizado para verificar os efeitos do exercício em uma situação de inflamação aguda gerada pela indução de OA por MIA.

Ambientação – Como adaptação ao meio líquido, 5 dias antes do início do protocolo de natação, os animais foram colocados por 10 minutos em um cilindro de superfície lisa, medindo 50 cm de diâmetro por 100 cm de altura, com água mantida em temperatura de 30°C e nível em 10 cm de profundidade. O objetivo da adaptação foi reduzir o estresse dos animais, porém, sem causar adaptações fisiológicas ao exercício.

Programa de natação – Os animais foram colocados durante 5 dias consecutivos por 30 minutos em um cilindro de superfície lisa, medindo 50 cm de diâmetro por 100 cm de altura, com água mantida em temperatura de 30°C e nível em 75 cm de profundidade.

Divisão dos grupos experimentais

Os grupos são compostos por um número de 9 animais.

Grupo 1 – machos controle (CM): ratos não obesos com injeção de salina estéril no joelho direito;

Grupo 2 – fêmeas controle (CF): ratas não obesas com injeção de salina estéril no joelho direito;

Grupo 3 – machos obesos (OM): ratos obesos com injeção de salina estéril no joelho direito;

Grupo 4 – fêmeas obesas (OF): ratas obesas com injeção de salina estéril no joelho direito;

Grupo 5 – machos com dor por osteoartrite (MP): ratos não obesos com injeção de MIA no joelho direito;

Grupo 6 – fêmeas com dor por osteoartrite (FP): ratas não obesas com injeção de MIA no joelho direito;

Grupo 7 – machos obesos com dor por osteoartrite (OMP): ratos obesos com injeção de MIA no joelho direito.

Grupo 8 – fêmeas obesas com dor por osteoartrite (OFP): ratas obesas com injeção de MIA no joelho direito.

Grupo 9 – machos controle com exercício (MEX): ratos não obesos com injeção de salina estéril no joelho direito que realizaram exercício físico de natação;

Grupo 10 – fêmeas controle com exercício (FEX): ratas não obesas com injeção de salina estéril no joelho direito que realizaram exercício físico de natação;

Grupo 11 – machos obesos com exercício (OMEX): ratos obesos com injeção de salina estéril no joelho direito que realizaram exercício físico de natação;

Grupo 12 – fêmeas obesas com exercício (OFEX): ratas obesas com injeção de salina estéril no joelho direito que realizaram exercício físico de natação;

Grupo 13 – machos com dor por osteoartrite e exercício (MPEX): ratos não obesos com injeção de MIA no joelho direito que realizaram exercício físico de natação;

Grupo 14 – fêmeas com dor por osteoartrite e exercício (FPEX): ratas não obesas com injeção de MIA no joelho direito que realizaram exercício físico de natação;

Grupo 15 – machos obesos com dor por osteoartrite e exercício (MOPEX): ratos obesos com injeção de MIA no joelho direito que realizaram exercício físico de natação.

Grupo 16 – fêmeas obesas com dor por osteoartrite e exercício (FOPEX): ratas obesas com injeção de MIA no joelho direito que realizaram exercício físico de natação.

Avaliações de consumo da dieta e metabólicas

Avaliação do consumo diário - Para mensuração do consumo das dietas foi adotada uma oferta diária de 180g de ração para caixas com 4 animais e 225g de ração para caixas com 5 animais, do primeiro a o último dia de indução, em horário padrão (8:00 a.m.), o débito presente das 24h, do dia anterior, foi pesado com balança digital para determinar o consumo diário.

Avaliação da Obesidade - As avaliações consistiram na mensuração do peso corporal e comprimento naso-anal, as quais foram realizadas antes de iniciar a indução de obesidade (avaliação basal), após a cada 10 dias e no 65º dia. Ao final do estudo, após a eutanásia dos animais, foi removido e mensurado o tecido adiposo visceral e realizado o cálculo do índice de adiposidade, soma do peso da gordura visceral/peso corporal x 100 (Taylor & Phillips, 1996).

Avaliações da dor espontânea e de perfil nociceptivo

Os animais foram avaliados antes do início da indução de obesidade (avaliação basal), a cada 10 dias e, após indução de dor por osteoartrite de joelho, diariamente até 65º dia.

Avaliação de dor espontânea – o posicionamento de proteção do animal foi registrado usando uma escala subjetiva de comportamento, de intervalo entre 0

(zero) e 5 (cinco), no qual 0 equivale à normalidade e 5 evita qualquer contato com o membro (Gopalkrishnan & Sluka, 2000; Da Silva & et al, 2017).

Avaliação do perfil nociceptivo - os animais foram aclimatizados, 1 hora antes do teste, em uma gaiola transparente com piso de malha e após foram realizados: teste de nocicepção mecânica de Von Frey – onde a hiperalgesia mecânica foi avaliada através dos filamentos de Von Frey, a fim de determinar a pressão máxima necessária para que o animal demonstre sensibilidade ao contato na superfície plantar da pata traseira direita (Chaplan & et al, 1994); Teste de acetona – a sensibilidade térmica ao frio foi avaliada após a instilação de 0,05 ml de acetona na pata traseira direita do animal e quantificada pela resposta de retirada (0 = sem retirada, 1 = retirada única, 2 = retiradas múltiplas, 3 = lamber a pata), onde quanto maior a pontuação mais elevada será a sensibilidade térmica (Flattersa & Bennett, 2004).

Parâmetros hematológicos e inflamatórios

Contagem total de leucócitos – foi realizada pelo equipamento KX-2N (Roche®) e o diferencial de leucócitos do sangue periférico foi realizado através de esfregaço sanguíneo em lâmina e corado com panótico. Os leucócitos do sangue periférico foram contados e suas subpopulações expressas em %.

Perfil inflamatório – a partir de amostras do soro e do tecido adiposo foram quantificados os níveis das citocinas de ação pró-inflamatória das interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, do TNF- α , da leptina e da PCR e ação anti-inflamatória da IL-10 e adiponectina utilizando kits da Thermo Fisher Scientific®. As quantificações foram

realizadas pelo método ELISA utilizando alíquotas das amostras obtidas (100µL) (Oliveira & et al, 2013).

Análise estatística

Os dados foram expressos como média + erro padrão da média e o nível de significância em todos os casos foi considerado $p < 0,05$, sendo utilizado Software GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). A análise estatística dos grupos experimentais foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA de uma ou duas vias) com múltiplas comparações com post hoc de Tukey e, quando necessário, teste T Student pareado. Ainda, foram realizados os testes de correlação de Pearson e Spearman com regressão linear das variáveis de interesse.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo 1: A relação entre obesidade e inflamação na alteração do perfil nociceptivo de ratos

Na figura 1 são apresentados os resultados quanto o peso corporal e o índice de adiposidade dos grupos controle, CAF e HF. Onde, pode-se verificar que a dieta CAF foi a única a apresentar aumento significativo do peso corporal com relação ao grupo CD. No entanto, todas as dietas de indução de obesidade aumentaram significativamente o índice de adiposidade (Figura 3A e 3B).

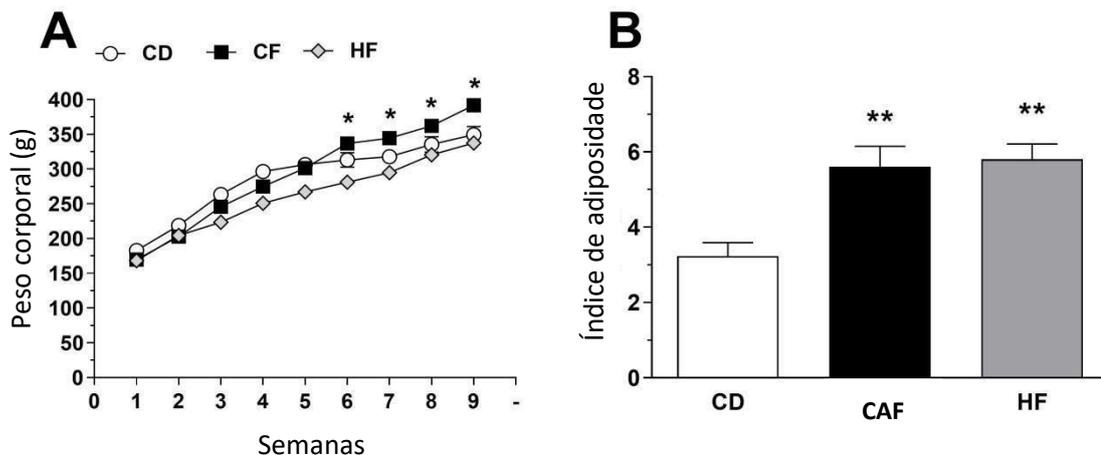


Figura 3: Avaliações da indução de obesidade nos grupos CD, CF, HF. A: peso corporal; B: índice de adiposidade (peso das gorduras viscerais/peso corporal x 100). (*) Figura 2A análise estatística usando ANOVA de duas vias com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey (* $p < 0,05$ comparado o grupo CF ao grupo CD). (*) Figura 3B análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey (** $p < 0,001$ comparados ao grupo CD).

Na tabela 2 são apresentados o perfil glicêmico, lipídico e marcadores de função hepática. Quanto a estas avaliações verificou-se um aumento significativo nos níveis de colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos, proteínas, ALT e AST nos grupos CAF e HF em comparação ao CD (tabela 2).

Tabela 2 - Comparação das variáveis bioquímicas entre o grupo controle (DC) e os grupos de animais que receberam as dietas cafeteria (CAF) e Hiperlipídica (HF).

Variáveis	CD	CAF	HF
Glicose (mg/dL)	193,70 ± 14,94	284,90 ± 8,81*	326,10 ± 31,62**
Colesterol Total (mg/dL)	58,25 ± 4,96	81,50 ± 4,50*	78,42 ± 5,71*
LDL (mg/dL)	19,70 ± 2,08	61,33 ± 11,22*	76,88 ± 17,77*
HDL (mg/dL)	30,73 ± 6,50	21,93 ± 13,27	19,02 ± 8,56
Triglicerídeos (mg/dL)	38,00 ± 6,63	124,40 ± 17,98**	95,45 ± 14,09*
ALT (u/L)	45,17 ± 3,47	88,09 ± 10,41	115,10 ± 22,07*
AST (u/L)	93,67 ± 4,12	204,20 ± 17,81*	353,80 ± 83,59*

(*) Análise estatística por ANOVA de duas vias com múltiplas comparações com post hoc Tukey (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$) em comparação ao grupo controle.

Na análise do diferencial dos leucócitos do sangue, os resultados demonstram um aumento no número de neutrófilos, segmentados, monócitos e plaquetas nos grupos CAF e HF em relação ao CD. Ainda, foi observado diferença estatística significativa no quantitativo de leucócitos e contagem de plaquetas entre os grupos de indução de obesidade CF e HF (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação das variáveis celulares entre o grupo controle e os grupos de animais que receberam dieta cafeteria (CAF) e Hiperlipídica (HF).

Variáveis	CD	CAF	HF
Leucócitos totais (10 ³ /uL)	6,63 ± 0,17	14,75 ± 0,51###	8,54 ± 0,20 ***
Segmentados (%)	17,33 ± 1,52	78,75 ± 1,67 ***	83,42 ± 1,69 ***
Linfócitos (%)	81,67 ± 1,64	17,38 ± 2,03 ***	14,33 ± 1,45 ***
Monócitos (%)	0,166 ± 0,16	2,12 ± 0,74 *	1,16 ± 0,29
Eosinófilos (%)	0,166 ± 0,16	0,250 ± 0,16	0,333 ± 0,14
Basófilos (%)	0,500 ± 0,22	0,375 ± 0,26	0,916 ± 0,35
Plaquetas (10 ⁶ /uL)	189,8 ± 20,37	692 ± 18,23###	546,8 ± 22,24 ***

(*) Análise estatística por ANOVA de duas vias de múltiplas comparações com post hoc Tukey (* p <0,05, ** p <0,001, *** p <0,0001), em comparação com o CD. (#) Análise estatística por ANOVA de duas vias de múltiplas comparações com post hoc Tukeyt (### p <0,0001), em comparação com o grupo CD e HF.

Durante o período de indução os animais foram avaliados semanalmente quanto a nocicepção térmica e mecânica (Figura 4A, 4B e 4C). Verificou-se nos grupos HF e CAF o aumento da sensibilidade térmica, a partir da segunda semana até o final do protocolo, de forma significativa em comparação ao controle (Figura 4A). Ainda, o grupo CAF apresentou maior sensibilidade mecânica quando comparado ao grupo CD o que foi observado com significância na nona semana de estudo em ambas as patas (Figura 4B, 3C).

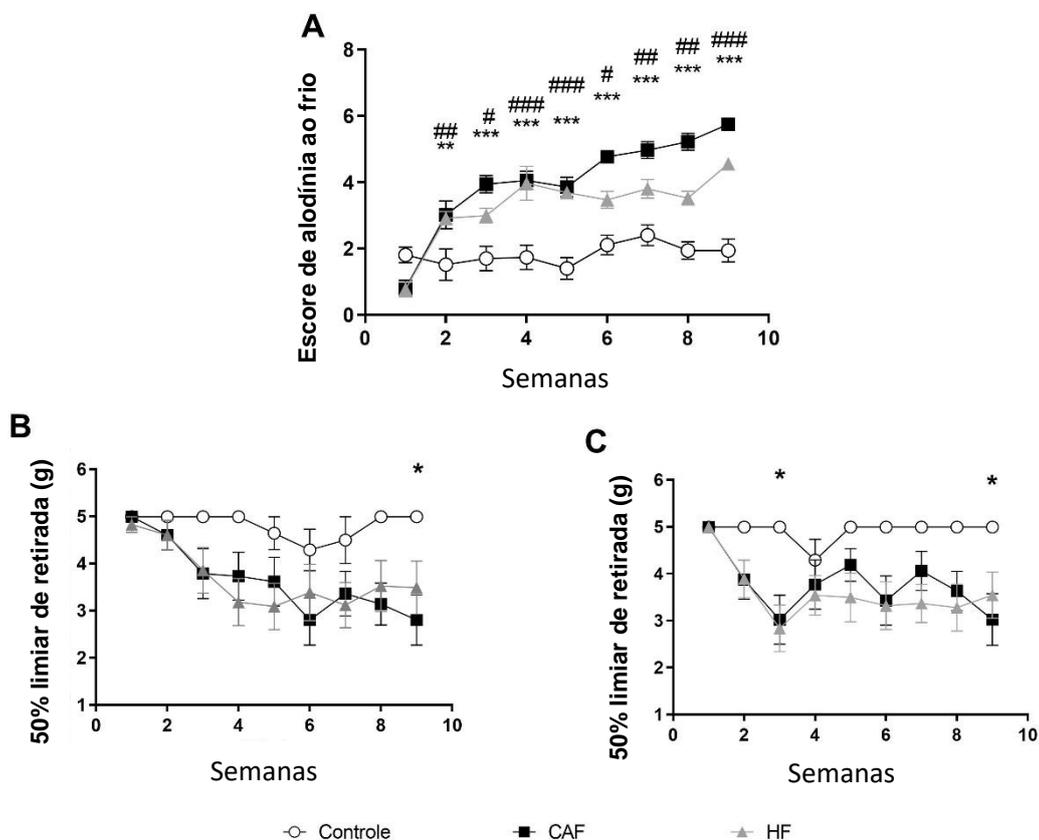


Figura 4: Avaliação do perfil nociceptivo ao longo das 9 semanas de indução de obesidade dos grupos CD, CAF e HF. A: nocicepção térmica pelo teste da acetona dos grupos CD, CAF e HF. B: nocicepção mecânica da pata direita dos grupos CD, CAF e HF pelo teste de Von Frey. C: nocicepção mecânica da pata esquerda dos grupos CD, CF e HF pelo teste de Von Frey. (*) Figuras 4 A, B, C análise estatística usando ANOVA de duas vias com pos hoc de Tukey para o grupo CAF (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$) comparado ao grupo CD. (#) Figuras 4 A análise estatística usando ANOVA de duas vias com pos hoc de Tukey do grupo HF (# $p < 0,05$, ## $p < 0,001$ e ### $p < 0,0001$) comparado ao grupo CD.

Ao analisar os níveis séricos de citocinas inflamatórias observou-se o aumento do TNF- α de forma significativa no grupo CAF em comparação ao controle, o que não ocorreu no grupo HF. No entanto, não houve diferença

estatística quanto à concentração de IL-1 β e IL-6 (Figura 5A, 5B e 5C).

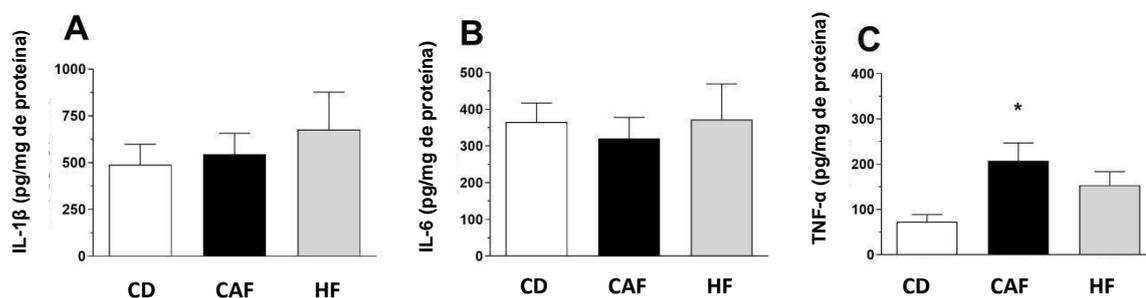


Figura 5: Avaliação do conteúdo de citocinas no soro ao final da indução de obesidade dos grupos CD, CAF e HF. A: concentração sérica de IL-1 β ; B: concentração sérica de IL-6; C: concentração sérica de TNF- α . (*) Figuras 5 C análise estatística usando ANOVA de uma via com pos hoc de Tukey (* $p < 0,05$ comparando com grupo CAF ao CD).

A fim de demonstrar a relação entre a concentração de tecido adiposo, TNF- α e dor, realizamos o teste de correlação de Pearson e Spearman com regressão linear, onde, observamos que o índice de adiposidade apresentou correlação com a alteração da nocicepção mecânica (Figura 6A) e térmica (Figura 6B), bem como, com os níveis de TNF- α (Figura 6C), assim como, encontramos uma correlação entre o TNF- α com a sensibilidade mecânica (Figura 6D) e térmica (Figura 6E). Ainda, na avaliação do modelo de regressão linear verificamos uma relação de 85%, 78% e 59% da variância entre o índice de adiposidade e respectivamente as alterações nociceptivas mecânicas, térmicas e dos níveis de TNF α . Já na

regressão linear do TNF- α , observamos uma relação desta variável de 58% para a nocicepção mecânica e 54% para térmica.

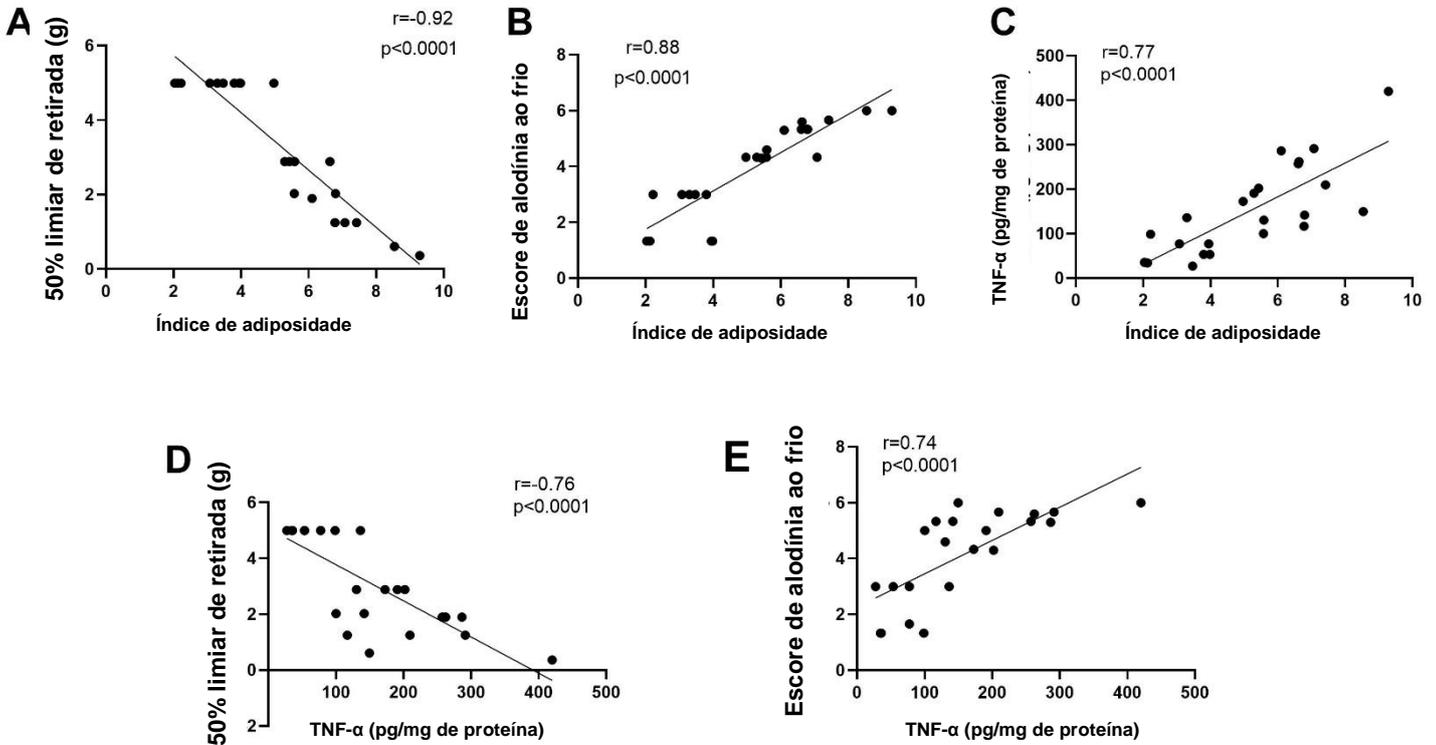


Figura 6: Teste de correlação de Pearson e Spearman com regressão linear. A: índice de adiposidade x nocicepção mecânica pelo teste de Von Frey. B: índice de adiposidade x sensibilidade térmica pelo teste de acetona. C: índice de adiposidade x níveis de TNF- α . D: níveis de TNF- α x nocicepção mecânica pelo teste de Von Frey. E: níveis de TNF- α x sensibilidade térmica pelo teste de acetona.

5.2 Estudo 2: A obesidade e sua inflamação crônica como fator de potencialização algica em ratos e ratas com osteoartrite

Ao longo do período os animais dos grupos OM e OMP apresentaram maior consumo diário de dieta (CAF) em comparação aos grupos CM e MP que receberam dieta padrão ($p < 0.0001$), da mesma forma, os grupos OF e OFP (CAF) também diferenciaram-se de forma significativa, quanto ao consumo diário, dos grupos CF e FP que receberam dieta padrão ($p < 0.0001$). Na figura 5 apresentamos

os resultados quanto o peso corporal e o índice de adiposidade dos grupos estudados. Onde, verificamos que o peso corporal dos animais OM, OMP, OF E OFP diferenciou-se significativamente dos controles (CM e CF) ao longo do período de indução de obesidade (Figura 7A e 7B). Com igualdade, na avaliação do índice de adiposidade observou-se que os grupos de indução de obesidade, machos e fêmeas, apresentaram maiores índices em relação aos controles (7C e 7D).

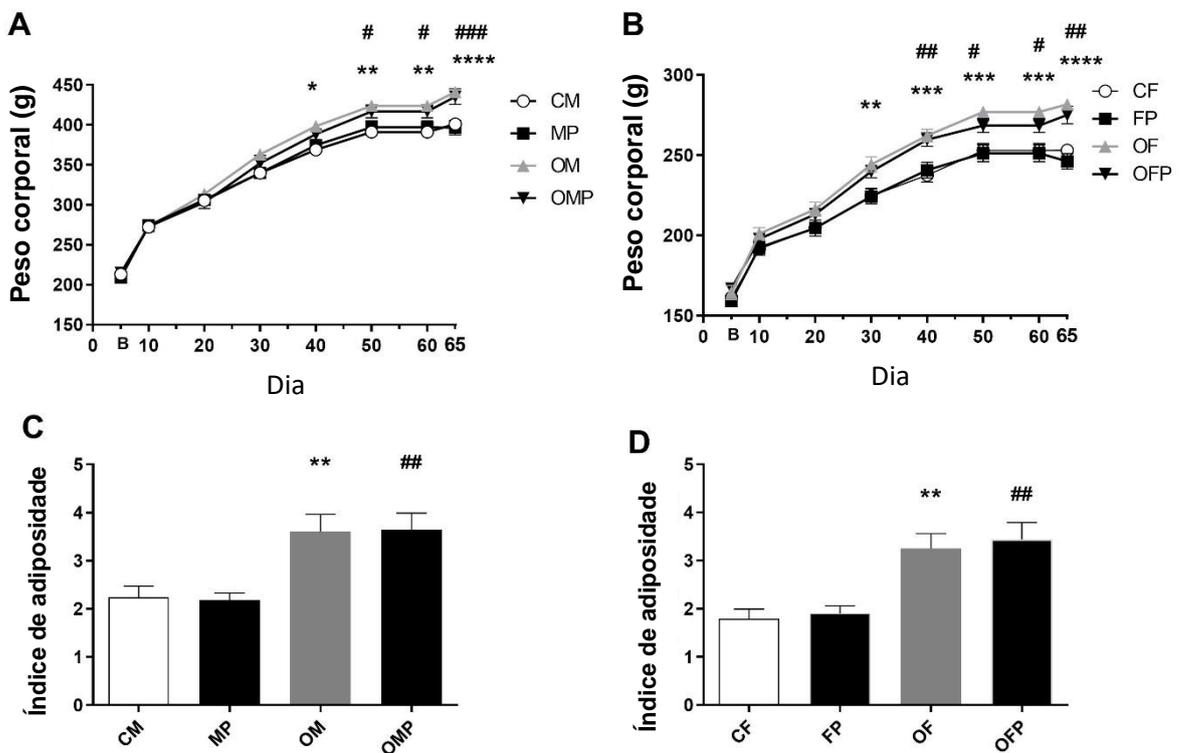


Figura 7: Avaliações da indução de obesidade nos grupos CM, MP, OM, OMP e CF, FP, OF, OFP. A: peso corporal dos machos; B: peso corporal das fêmeas; C: índice de adiposidade dos machos. D: índice de adiposidade das fêmeas. (*) Figura 7A e 7B análise estatística usando ANOVA de duas vias com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparando o grupo OM com CM e OF com CF) / (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ comparando o grupo OMP com CM e OFP com CF). (*) Figura 7C e 7D análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey (** $p < 0,01$, comparando o grupo OM com CM e OF com CF / (## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ comparando o grupo OMP com CM e OFP com CF).

Na tabela 4 são apresentados o perfil glicêmico e lipídico dos grupos machos e fêmeas, onde, verificou-se um aumento significativo nos níveis de

glicose, colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos no grupos de indução de obesidade em comparação aos controles CM e CF (tabela 4).

Tabela 4 - Comparação das variáveis bioquímicas entre os grupos controle macho (CM), machos com dor por OA (MP), obesos (OM), obesos com dor por OA (OMP) e controle fêmeas (CF), fêmeas com dor por OA (FP), obesas (OF) e obesas com dor por OA (OFP).

Variáveis	CM	MP	OM	OMP
Glicose (mg/dL)	96,0 ± 2,55	92,0 ± 2,43	120,0 ± 2,65*	124,0 ± 2,12*
Colesterol Total (mg/dL)	188,0 ± 2,16	188,0 ± 2,44	230,0 ± 3,66*	237,0 ± 3,57*
LDL (mg/dL)	132,0 ± 2,07	134,0 ± 2,37	192,0 ± 3,57*	204,0 ± 3,79*
HDL (mg/dL)	52,0 ± 1,52	52,0 ± 1,56	38,0 ± 1,07*	37,0 ± 0,92*
Triglicerídeos (mg/dL)	87,0 ± 4,13	86 ± 4,75	125 ± 2,14*	134,0 ± 2,34*
Variáveis	CF	FP	OF	OFP
Glicose (mg/dL)	99,0 ± 1,86	99,0 ± 1,44	122,0 ± 2,80#	119,0 ± 1,79#
Colesterol Total (mg/dL)	188,0 ± 2,47	187,0 ± 2,34	219,0 ± 4,25#	223,0 ± 2,74#
LDL (mg/dL)	131,0 ± 2,28	135,0 ± 2,75	183,0 ± 4,12#	184,0 ± 2,96#
HDL (mg/dL)	51,0 ± 2,14	49,0 ± 1,44	38,0 ± 1,21#	38,0 ± 1,11#
Triglicerídeos (mg/dL)	91,0 ± 3,56	90,0 ± 3,23	120,0 ± 3,24#	133,5 ± 2,51#

Análise estatística utilizando ANOVA de uma via com múltiplas comparações e com post hoc de Tukey (*p<0,0001 comparação do grupo OM e OMP para o grupo CM / #p<0,0001 comparação do grupo OF e OFP para o CF).

Na análise do diferencial dos leucócitos do sangue, os resultados demonstram um aumento no número de leucócitos e segmentados nos grupos MP, OM e OMP, bem como, nos grupos FP, OF e OFP em comparação aos seus controles. Também, foi observado diferença estatística significativa de monócitos nos grupos OM, OMP, OF e OFP em comparação ao controle. Ainda, os grupos

OMP e OFP diferenciaram-se do grupo MP e FP no quantitativo de leucócitos e monócitos (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação das variáveis celulares entre os grupos os grupos controle macho (CM), machos com dor por OA (MP), obesos (OM), obesos com dor por OA (OMP) e controle fêmeas (CF), fêmeas com dor por OA (FP), obesas (OF) e obesas com dor por OA (OFP).

Variáveis	CM	MP	OM	OMP
Leucócitos Totais (10 ³ /uL)	6,24 ± 0,2	11,75 ± 0,61*	12,65 ± 0,21 *	14,32 ± 0,34 *#
Sementados (%)	18 ± 0,57	26 ± 0,61*	25 ± 1,50 *	30 ± 0,71 *
Linfócitos (%)	82 ± 0,64	74 ± 0,65*	75 ± 1,48*	70 ± 0,75*
Monócitos (%)	0 ± 0,11	0 ± 0,28	2 ± 0,4*	2 ± 0,6*#
Eosinófilos (%)	0 ± 0,11	0	0	0
Basófilos (%)	0 ± 0,14	0 ± 0,16	0 ± 0,11	0,916 ± 0,11

Variáveis	CF	FP	OF	OFP
Leucócitos Totais (10 ³ /uL)	5,78 ± 0,32	10,54 ± 0,51*	11,98 ± 0,18 *	14,44 ± 0,54 *#
Sementados (%)	18 ± 0,56	31 ± 1,10*	23 ± 1,17*	34 ± 0,50 *
Linfócitos (%)	82 ± 0,64	69 ± 1,13*	77 ± 1,48*	66 ± 0,44*
Monócitos (%)	0 ± 0,11	0 ± 0,24	2 ± 0,37*	2 ± 0,62*#
Eosinófilos (%)	0 ± 0,14	0 ± 0,14	0 ± 0,11	0 ± 0,11
Basófilos (%)	0 ± 0,11	0	0	0

Análise estatística utilizando ANOVA de uma via com múltiplas comparações e com post hoc de Tukey (*p<0,001 comparação do grupo MP, OM e OMP para o grupo CM / #p<0,001 comparação do grupo FP, OF e OFP para o CF).

Na figura 8 são apresentados os resultados quanto a avaliação da nocicepção térmica, mecânica e da dor espontânea dos machos (Figura 8A, 8B e 8C) e das fêmeas (Figura 8D, 8E e 8F). Onde verificou-se alteração da nocicepção

térmica (Figura 8A e 8D) e mecânica (Figura 8B e 8E) nos grupos de indução de obesidade (OM, OMP, OF e OFP), em comparação aos controles, de forma respectiva, a partir do 20º e 40º dia nos machos e do 30º e 50º dia nas fêmeas. Ainda, no dia 60 (24h após indução de AO) os grupos MP, OMP, FP e OFP apresentaram aumento da sensibilidade térmica, mecânica e da dor espontânea (Figura 8C e 8F). Sendo que, vale ressaltar, os grupos OMP e OFP que já apresentavam mudança significativa da nocicepção em relação ao controle, diferenciaram-se após a indução de OA inclusive dos grupos MP e FP que passaram pelo mesmo procedimento.

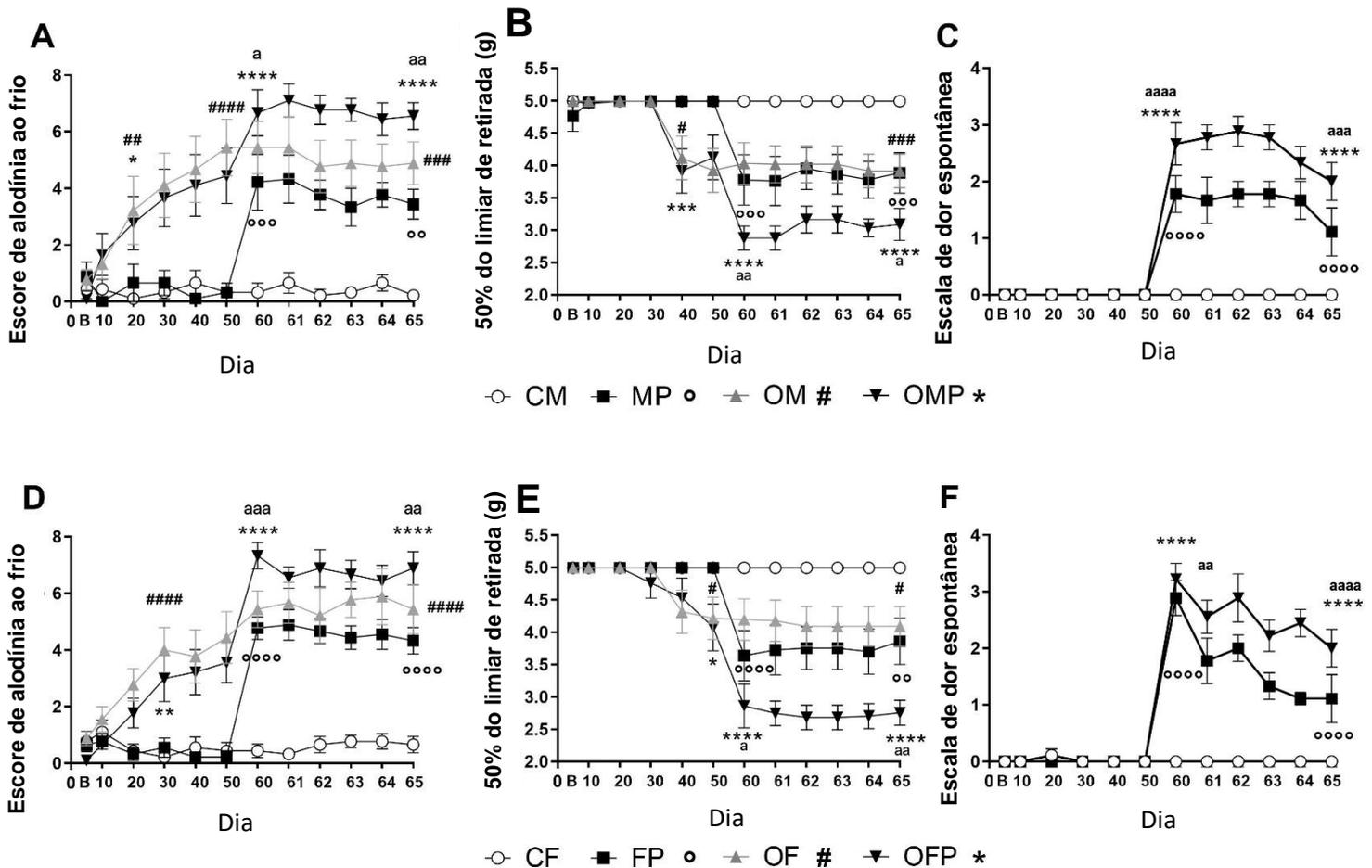


Figura 8: Avaliação do perfil nociceptivo e de dor espontânea ao longo dos 65 dias nos grupos machos CM, MP, OM e OMP, e dos grupos fêmeas CF, FP, OF, OFP. A: nocicepção térmica pelo teste da

acetona dos grupos CM, MP, OM e OMP. B: nocicepção mecânica da pata direita dos grupos CM, MP, OM e OMP pelo teste de Von Frey. C: avaliação da escala de dor espontânea dos grupos CM, MP, OM e OMP. D: nocicepção térmica pelo teste da acetona dos grupos CF, FP, OF, OFP. E: nocicepção mecânica da pata direita dos grupos CF, FP, OF, OFP pelo teste de Von Frey. F: avaliação da escala de dor espontânea dos grupos CF, FP, OF, OFP. (*) Análise estatística usando ANOVA de duas vias com pos hoc de Tukey do grupo OMP comparado ao CM e do grupo OFP para o grupo CF (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $P < 0,0001$). (ª) Análise estatística usando ANOVA de duas vias com pos hoc de Tukey do grupo OMP comparado ao MP e do grupo OFP para o grupo FP (ª $p < 0,05$, ªª $p < 0,01$, ªªª $p < 0,001$ e ªªªª $p < 0,0001$). (#) Análise estatística usando ANOVA de duas vias com pos hoc de Tukey do grupo OM comparado ao CM e do grupo OF para o grupo CF (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $P < 0,0001$). (°) Análise estatística usando ANOVA de duas vias com pos hoc de Tukey do grupo MP comparado ao CM e do grupo FP para o grupo CF (° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$, °°° $p < 0,001$ e °°°° $P < 0,0001$).

Ao analisar o perfil inflamatório dos grupos estudados verificou-se um aumento significativo dos níveis séricos (Figura 9, 10) e no tecido adiposo (Figura 11 e 12) das citocinas pró-inflamatórias e redução das anti-inflamatórias nos grupos MP, OM, OMP, FP, OF e OFP. Além disso, os grupos OMP e OFP diferenciaram-se dos demais grupos em todas as análises pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

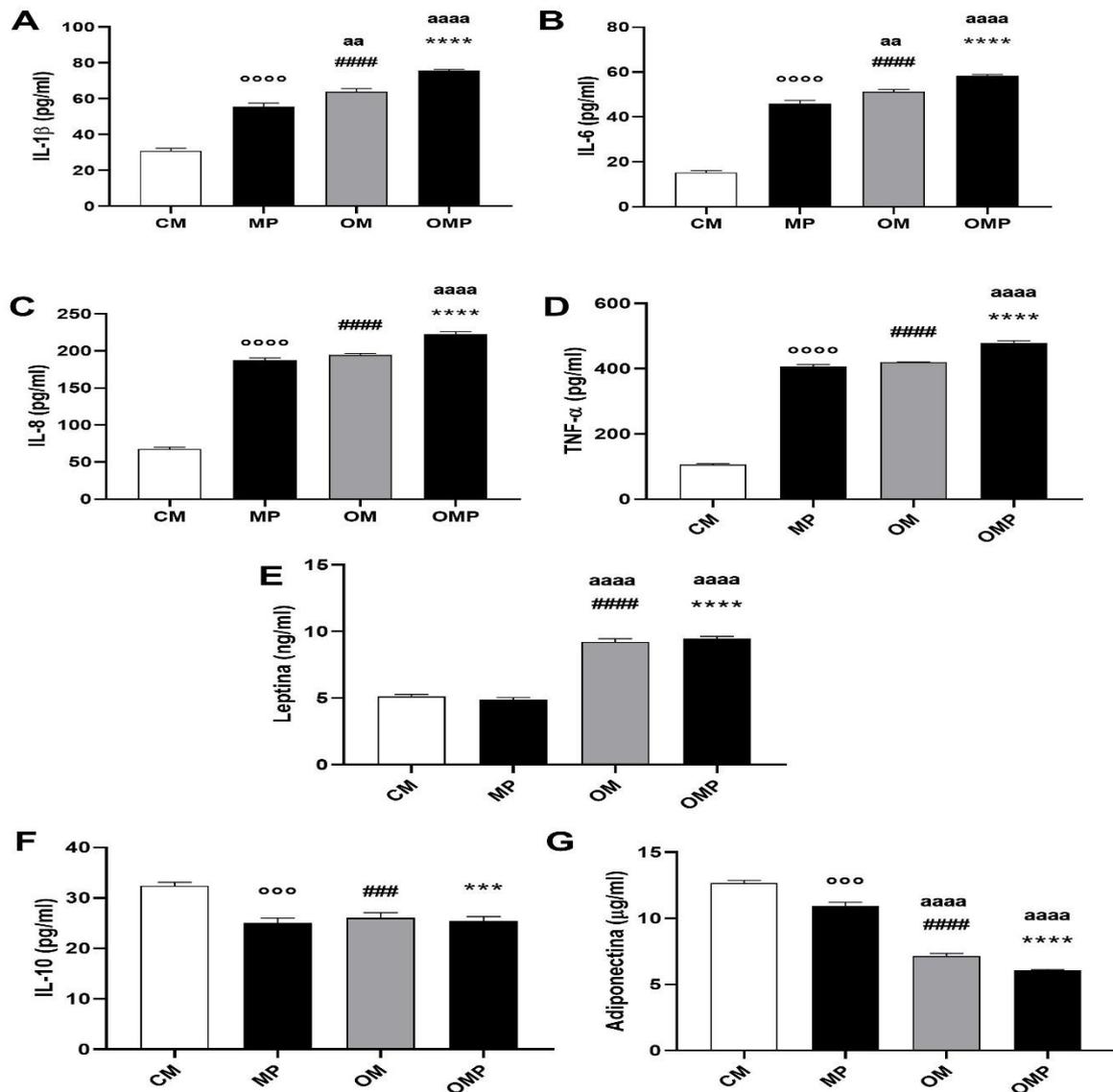


Figura 9: Avaliação das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias presentes no soro, após 65 dias, dos grupos (machos): CM, MP, OM e OMP. A: níveis séricos de IL-1 β . B: níveis séricos de IL-6. C: níveis séricos de IL-8. D: níveis séricos de TNF- α . E: níveis séricos de leptina. F: níveis séricos de IL-10. G: níveis séricos de adiponectina. (*) Análise estatística usando ANOVA de uma via com pos hoc de Tukey. (*) Grupo OMP comparado ao CM (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****P<0,0001). (ª) comparação dos grupos OM e OMP comparado ao MP (ªp<0,05, ªªp<0,01, ªªªp<0,001 e ªªªªp<0,0001). (#) Grupo OM comparado ao CM (#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 e ####P<0,0001). (º) Grupo MP comparado ao CM (ºp<0,05, ººp<0,01, ºººp<0,001 e ººººP<0,0001).

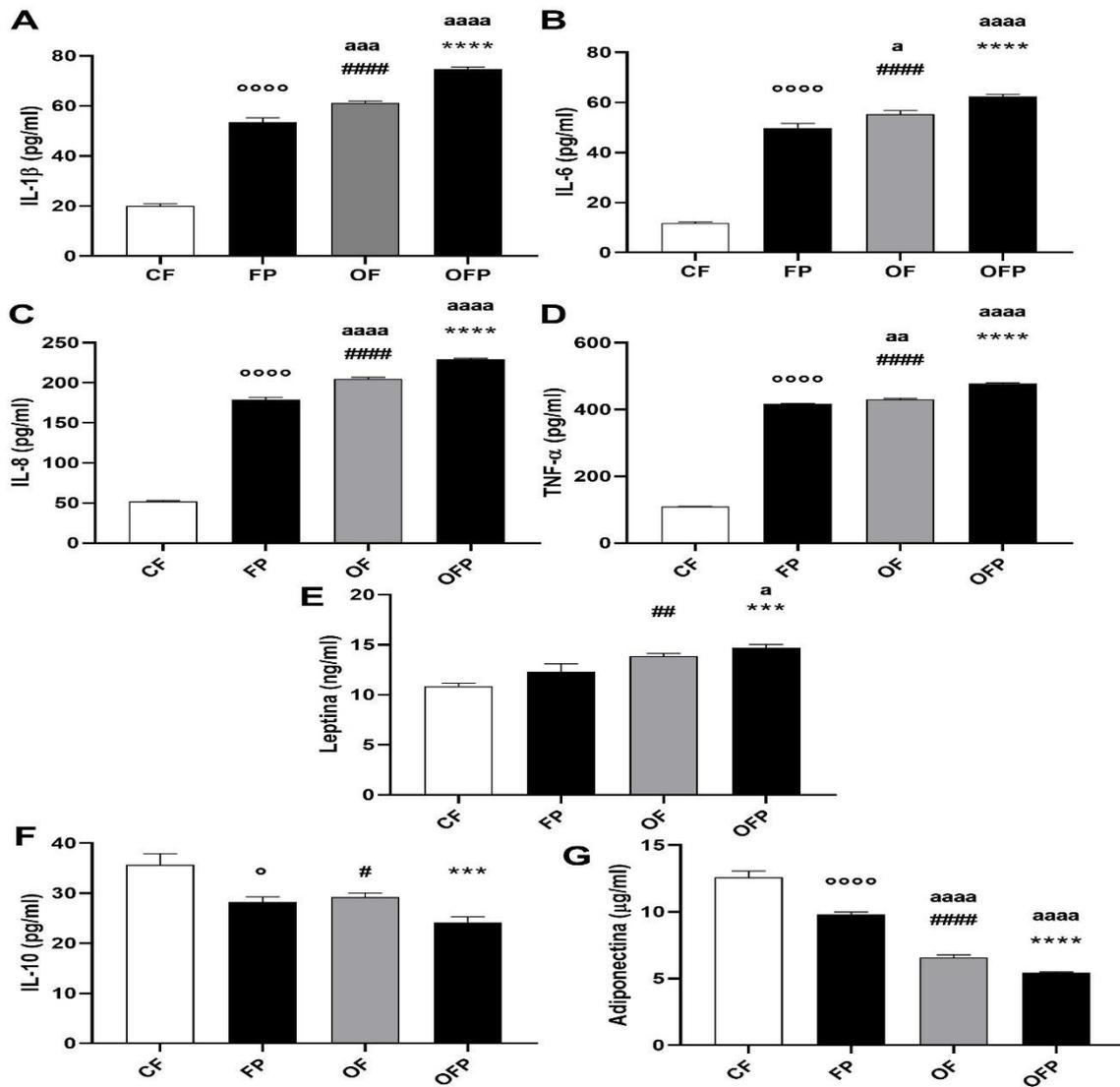


Figura 10: Avaliação das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias presentes no soro, após 65 dias, dos grupos (fêmeas): CF, FP, OF e OFP. A: níveis séricos de IL-1 β . B: níveis séricos de IL-6. C: níveis séricos de IL-8. D: níveis séricos de TNF- α . E: níveis séricos de leptina. F: níveis séricos de IL-10. G: níveis séricos de adiponectina. (*) Análise estatística usando ANOVA de uma via com pos hoc de Tukey. (*) Grupo OFP comparado ao CF (***p<0,001 e ****p<0,0001). (°) comparação dos grupos OF e OFP comparado ao FP (°°°°p<0,0001 e °°°°°p<0,00001). (#) Grupo OF comparado ao CF (#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 e ####p<0,0001). (°) Grupo MP comparado ao CM (°p<0,05 e °°°°P<0,0001).

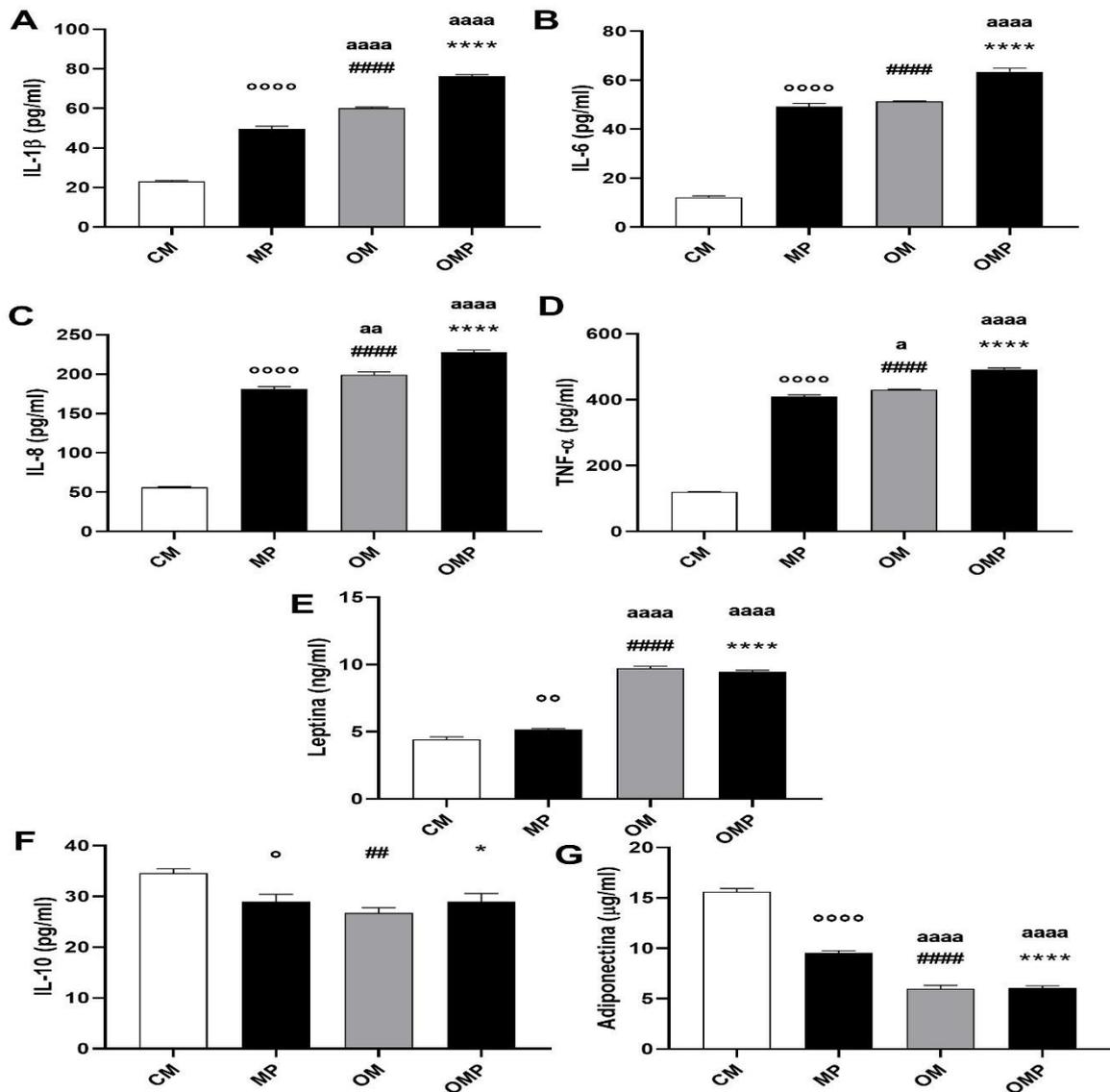


Figura 11: Avaliação das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias presentes no tecido adiposo, após 65 dias, dos grupos (machos): CM, MP, OM e OMP. A: níveis de IL-1 β no tecido adiposo. B: níveis de IL-6 no tecido adiposo. C: níveis de IL-8 no tecido adiposo. D: níveis de TNF- α no tecido adiposo. E: níveis de leptina no tecido adiposo. F: níveis de IL-10 no tecido adiposo. G: níveis de adiponectina no tecido adiposo. (*) Análise estatística usando ANOVA de uma via com pos hoc de Tukey. (*) Grupo OMP comparado ao CM (*p<0,05 e ****P<0,0001). (ª) comparação dos grupos OM e OMP comparado ao MP (ªªp<0,01 e ªªªªp<0,0001). (#) Grupo OM comparado ao CM (##p<0,01 e ####P<0,0001). (°) Grupo MP comparado ao CM (°p<0,05, °°p<0,01 e °°°°P<0,0001).

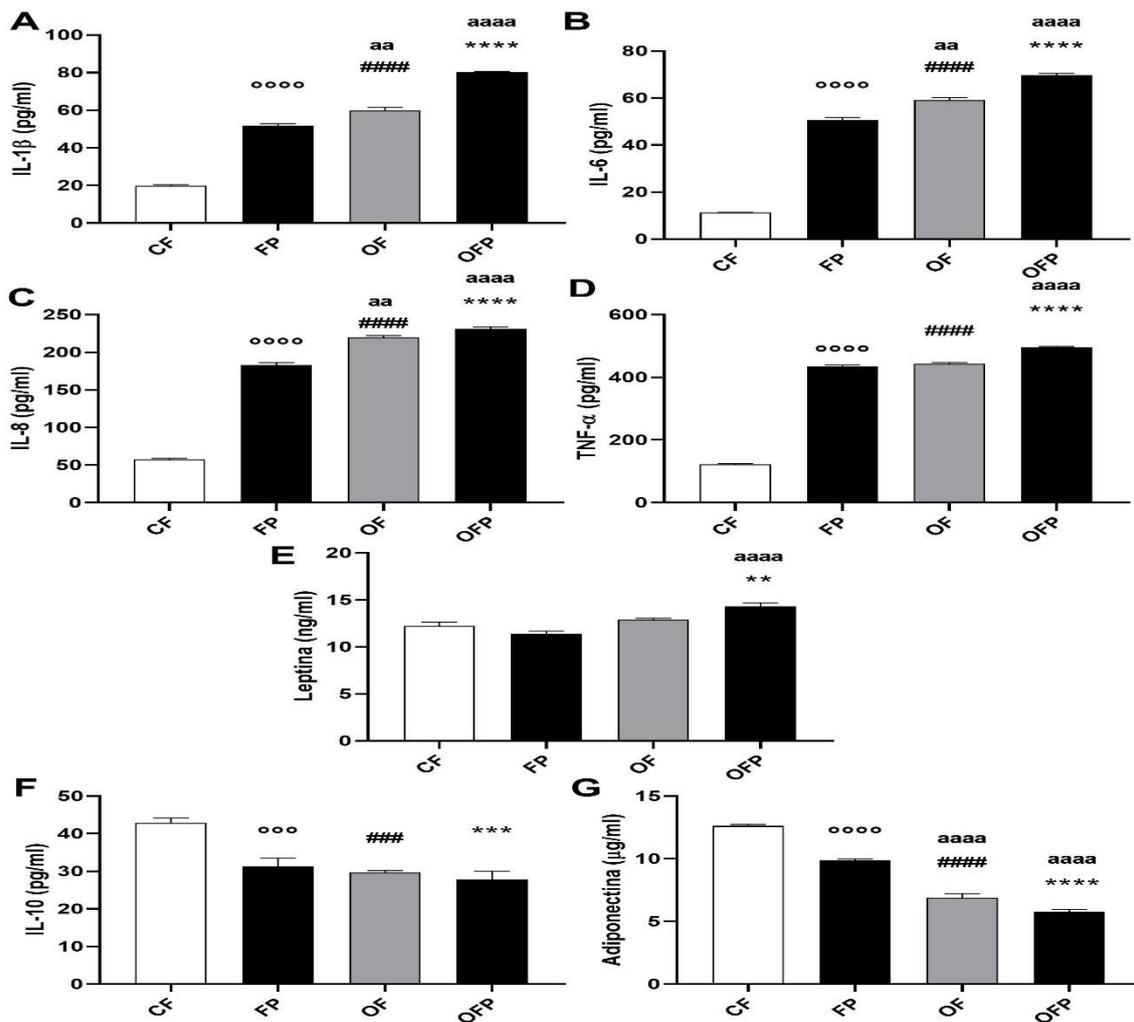


Figura 12: Avaliação das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias presentes no tecido adiposo, após 65 dias, dos grupos (fêmeas): CF, FP, OF e OFP. A: níveis de IL-1β no tecido adiposo. B: níveis de IL-6 no tecido adiposo. C: níveis de IL-8 no tecido adiposo. D: níveis de TNF-α no tecido adiposo. E: níveis de leptina no tecido adiposo. F: níveis de IL-10 no tecido adiposo. G: níveis de adiponectina no tecido adiposo. (*) Análise estatística usando ANOVA de uma via com pos hoc de Tukey. (*) Grupo OFP comparado ao CF (**p<0,01, ***P<0,001 e ****P<0,0001). (ª) comparação dos grupos OF e OFP comparado ao FP (ªªp<0,01 e ªªªªp<0,0001). (#) Grupo OF comparado ao CF (###p<0,001 e #####P<0,0001). (°) Grupo FP comparado ao CF (°°°p<0,001 e °°°°P<0,0001).

Na sequência são apresentadas na tabela 6 a correlação entre o índice de adiposidade e os níveis das citocinas presentes no soro nos grupos obesos (OM e OF) e controles (CM e CF). Assim, demonstrando que o aumento na concentração de tecido adiposo está associado a presença do processo inflamatório nos obesos. Ainda, na mesma tabela demonstra-se que os grupos com indução de OA (MP,

OMP, FP e OFP) também apresentaram relação entre índice de adiposidade e a inflamação. Dentre as citocinas estudadas a IL-10 foi a única a não apresentar correlação com o índice de adiposidade.

Tabela 6 – Correlação entre o índice de adiposidade e as citocinas inflamatórias.

Citocinas	Machos (CM + OM)			Fêmeas (CF + OF)		
	R	R ²	P	R	R ²	P
IL-1 β	0,93	0,87	<0,0001	0,89	0,79	0,0002
IL-6	0,90	0,82	<0,0001	0,89	0,80	0,0002
IL-8	0,86	0,74	0,0007	0,82	0,70	0,0012
TNF α	0,86	0,74	0,0006	0,85	0,73	0,0007
Leptina	0,85	0,72	0,0009	0,85	0,72	0,0009
Adiponectina	-0,81	0,66	0,0024	-0,90	0,81	<0,0001

Citocinas	Machos (MP+OMP)			Fêmeas (FP+OFP)		
	R	R ²	P	R	R ²	P
IL-1 β	0,89	0,79	0,0012	0,85	0,73	0,0016
IL-6	0,87	0,76	0,0020	0,87	0,76	0,0009
IL-8	0,94	0,88	<0,0001	0,90	0,81	0,0004
TNF α	0,89	0,80	0,0011	0,92	0,85	<0,0001
Leptina	0,84	0,70	0,0045	0,74	0,55	0,0132
Adiponectina	-0,81	0,66	0,0075	-0,87	0,76	0,0009

Por fim, são apresentadas a correlação entre as citocinas inflamatórias e a nocicepção (mecânica e térmica), com os animais divididos por sexo, a partir dos dados dos grupos estudados (Tabela 7). As citocinas IL-10, adiponectina e leptina não apresentaram valor significativos de correlação e por isso não estão presentes na tabela.

Tabela 7 – Correlação entre as citocinas no soro e a nocicepção mecânica e térmica dos grupos machos (CM, MP, OM, OMP) e fêmeas (CF, FP, OF, OFP).

Citocinas	Nocicepção	Machos			Fêmeas		
		R	R ²	P	R	R ²	p
IL-1 β	Mecânica	-0,87	0,76	<0,0001	-0,82	0,68	<0,0001
	Térmica	0,90	0,82	<0,0001	0,95	0,91	<0,0001
IL-6	Mecânica	-0,81	0,66	<0,0001	-0,80	0,65	<0,0001
	Térmica	0,90	0,81	<0,0001	0,91	0,84	<0,0001
IL-8	Mecânica	-0,87	0,76	<0,0001	-0,85	0,72	<0,0001
	Térmica	0,90	0,82	<0,0001	0,89	0,79	<0,0001
TNF α	Mecânica	-0,87	0,75	<0,0001	-0,84	0,70	<0,0001
	Térmica	0,89	0,79	<0,0001	0,86	0,74	<0,0001

5.3 Estudo 3: A modulação do processo inflamatório pelo exercício físico como fator de analgesia em ratos e ratas obesos com osteoartrite

Ao longo do período os grupos machos e fêmeas não apresentaram diferença no consumo diário de dieta. Na figura 13 são apresentados os resultados quanto o peso corporal e na figura 14 o índice de adiposidade dos grupos estudados. Onde, verificou-se que o peso corporal dos animais OM, OMP, OF E OFP diferenciou-se significativamente dos controles (CM e CF) ao longo do

período de indução de obesidade (Figura 13A e 13C). Com igualdade, os grupos OM-EX, OMP-EX, OF-EX e OFP-EX diferenciaram-se significativamente dos grupos CM-EX e CF-EX, respectivamente, na avaliação do peso corporal (Figura 13B e 13D). Ainda, quanto a avaliação do índice de adiposidade observou-se que os grupos OM, OMP e OF, OFP apresentaram maior concentração de tecido adiposo em comparação aos controles CM e CF, da mesma forma, os grupos OM-EX, OMP-EX e OF-EX, OFP-EX diferenciaram-se significativamente dos grupos CM-EX e CF-EX (Figura 14A e 14B). Na figura é possível observar que os grupos OM-EX, MP-EX e OF-EX, OFP-EX apresentaram, não de forma significativa, menor índice de adiposidade do que os grupos OM, OMP e OF, OFP de forma respectiva.

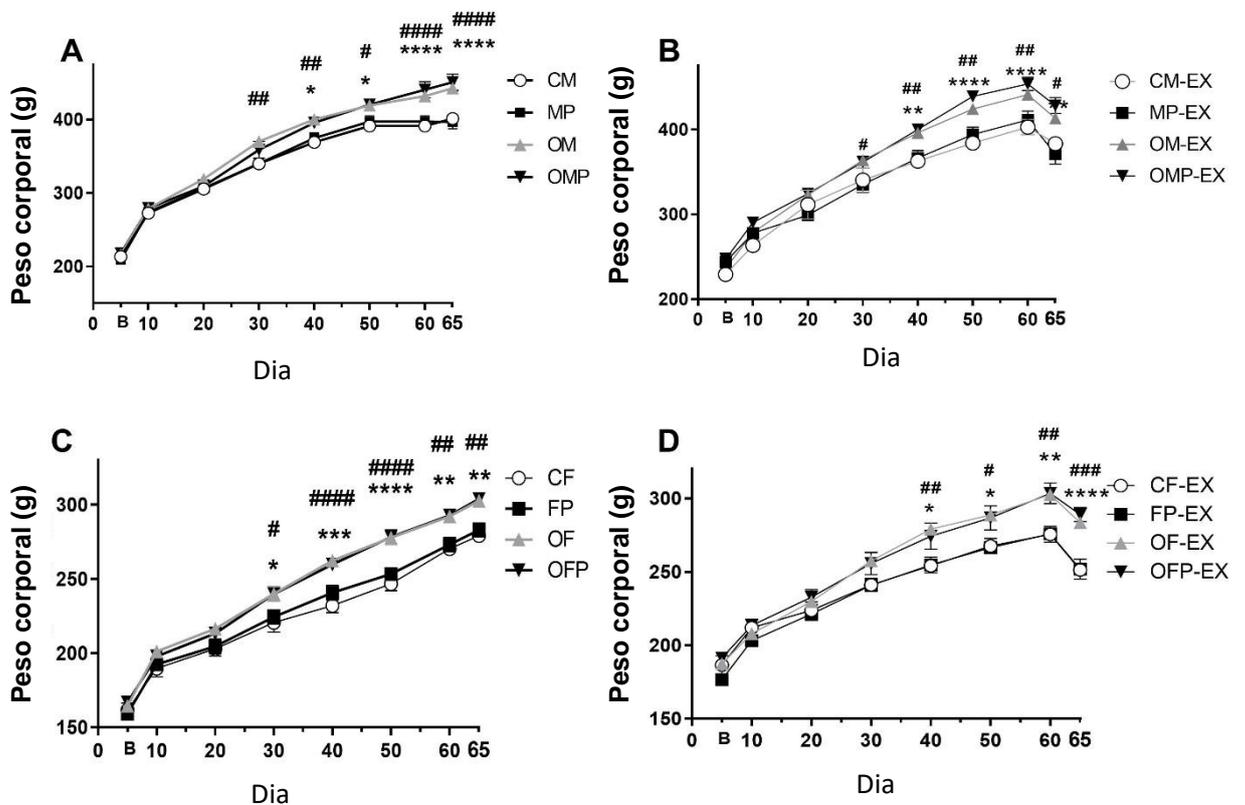


Figura 13: Avaliações do peso corporal dos grupos estudados ao longo dos 65 dias. A: peso corporal dos machos; B: peso corporal dos machos que realizaram exercício físico; C: peso corporal das fêmeas; D: peso corporal das fêmeas que realizaram exercício físico: (*) análise estatística usando ANOVA de duas vias com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey (* $p < 0,05$,

p<0,01, *p<0,001 e ****p<0,0001) comparando o grupo OMP com CM, OMP-EX com CM-EX, OFP com CF e OFP-EX com CF-EX / (#) análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey (#p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001) comparando o grupo OM com CM, OM-EX com CM-EX, OF com CF e OF-EX com CF-EX.

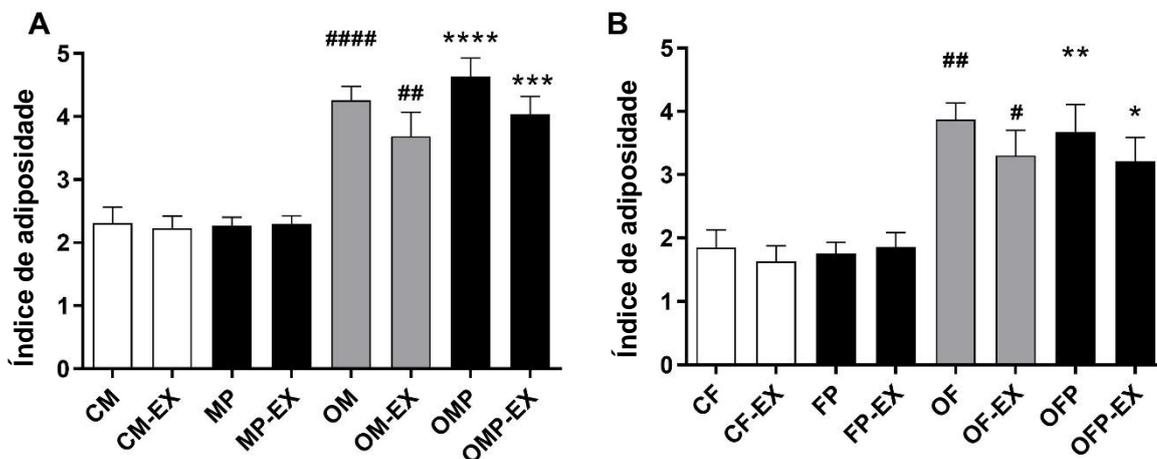


Figura 14: Avaliações do índice de adiposidade dos grupos estudados ao longo dos 65 dias. A: índice de adiposidade dos machos e dos machos que realizaram exercício físico (grupos EX); B: índice de adiposidade das fêmeas e das fêmeas que realizaram exercício físico (grupos EX). (*) análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001) comparando o grupo OMP com CM, OMP-EX com CM-EX, OFP com CF e OFP-EX com CF-EX / (#) análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey (#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 e ####p<0,0001) comparando o grupo OM com CM, OM-EX com CM-EX, OF com CF e OF-EX com CF-EX.

Na figura 15 e 15 são apresentados os resultados quanto a avaliação da nocicepção térmica, mecânica e da dor espontânea dos machos (Figura 15A, 15B e 15C) e das fêmeas (Figura 16A, 16B e 16C). Verificou-se alteração da nocicepção térmica e mecânica nos grupos de indução de obesidade, em comparação aos controles, antes mesmo da indução de OA (Figuras 15A, 15B, 16A e 16B). No dia 60 os grupos que passaram pela indução de OA apresentaram aumento da sensibilidade térmica, mecânica e da dor espontânea diferenciando-se significativamente dos demais grupos (Figuras 15 e 16). Por fim, no dia 65, após 5 dias consecutivos de exercício físico, os animais dos grupos MP-EX, OM-EX e OMP-EX apresentaram redução da dor térmica e mecânica em comparação aos grupos MP, OM e OMP (Figura 15A e 15B), bem como, os grupos FP-EX, OF-EX

e OFP-EX também apresentaram a mesma resposta comparados aos grupos FP, OF e OFP (Figura 16A e 16B). Quanto a dor espontânea, observamos que os grupos que sofreram indução de OA e foram tratados com exercício apresentaram menor dor espontânea em comparação aos grupos que apenas passaram pela indução de OA (Figuras 15C e 16C). Porém, mesmo com a redução da dor após o exercício físico os grupos OMP, OMP-EX, OFP e OFP-EX permaneceram diferenciados dos grupos não obesos MP, MP-EX, FP e FP-EX.

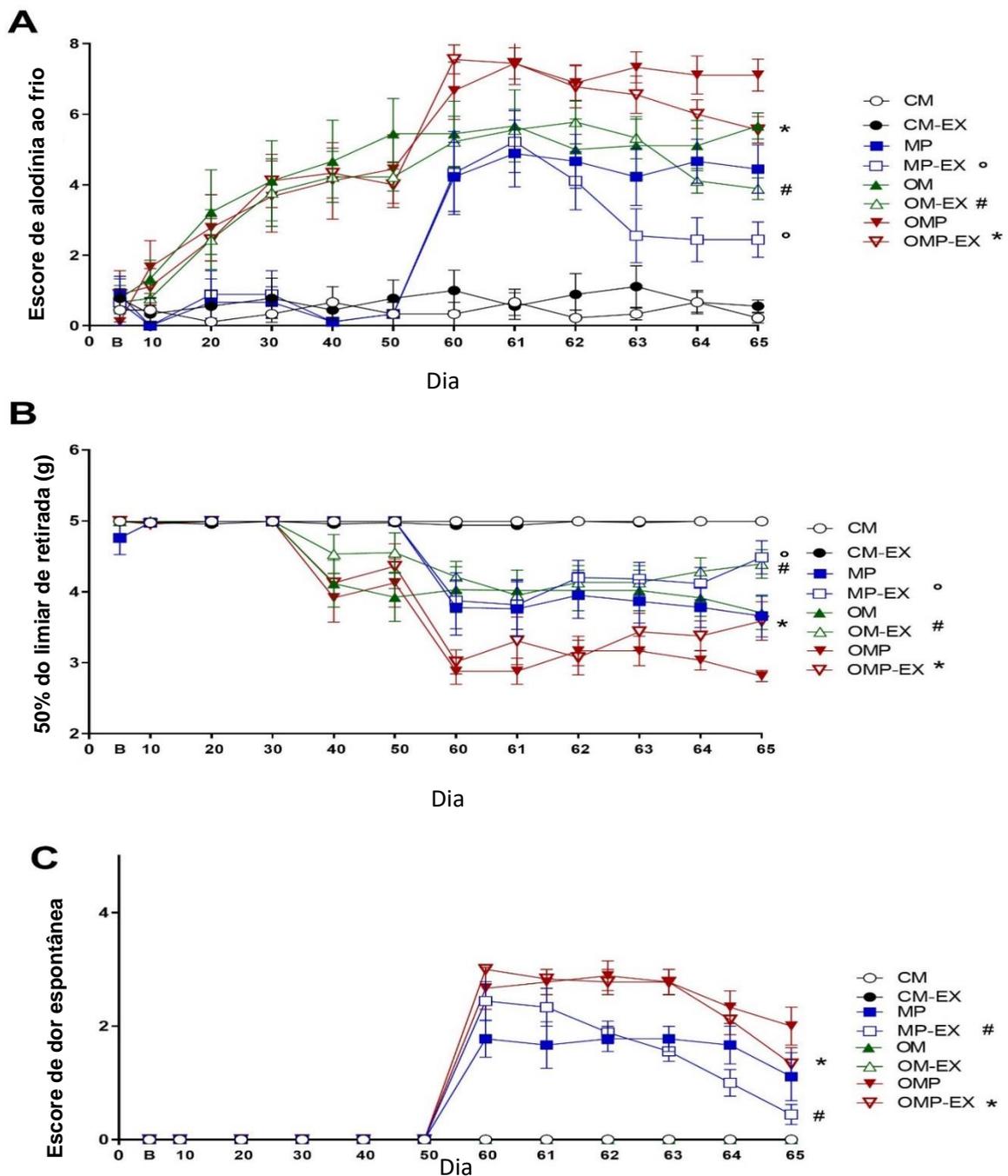


Figura 15: Avaliação do perfil nociceptivo e de dor espontânea ao longo dos 65 dias nos machos dos grupos CM, CM-EX, MP, MP-EX, OM, OM-EX, OMP e OMP-EX. A: nocicepção térmica pelo teste da acetona. B: nocicepção mecânica da pata direita pelo teste de Von Frey. C: avaliação da escala de dor espontânea (*) Análise estatística usando teste T Student pareado do grupo OMP comparado ao OMP-EX (* $p < 0,05$). (#) Análise estatística usando teste T Student pareado do grupo OM comparado ao OM-EX (# $p < 0,05$). (°) Análise estatística usando teste T Student pareado do grupo MP comparado ao MP-EX (° $p < 0,05$).

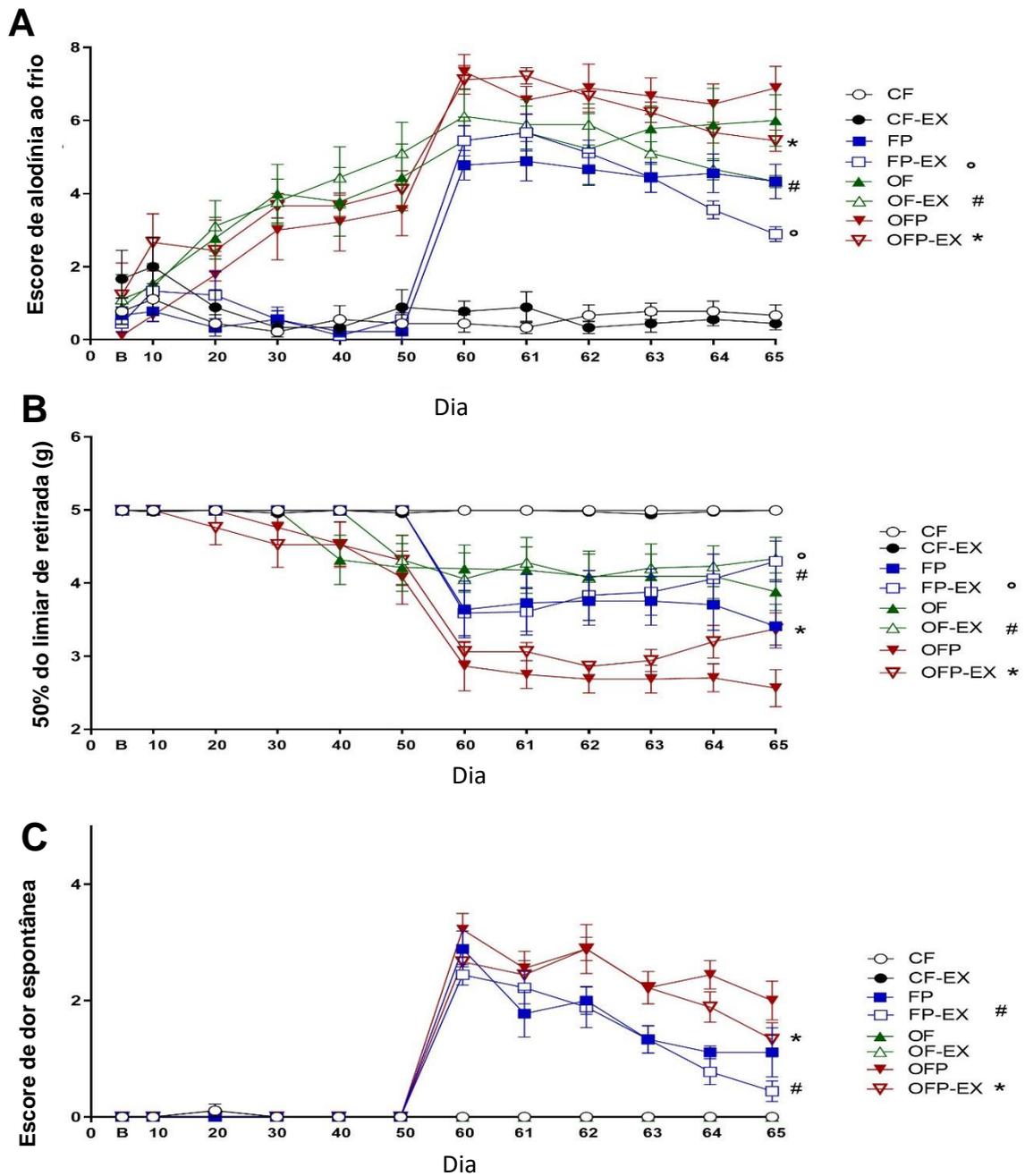


Figura 16: Avaliação do perfil nociceptivo e de dor espontânea ao longo dos 65 dias das fêmeas dos grupos CF, CF-EX, FP, FP-EX, OF, OF-EX, OFP e OFP-EX. A: nocicepção térmica pelo teste da acetona. B: nocicepção mecânica da pata direita pelo teste de Von Frey. C: avaliação da escala de dor espontânea (*) Análise estatística usando teste T Student pareado do grupo OMP comparado ao OMP-EX (* $p < 0,05$). (#) Análise estatística usando teste T Student pareado do grupo OM comparado ao OM-EX (# $p < 0,05$). (°) Análise estatística usando teste T Student pareado do grupo MP comparado ao MP-EX (° $p < 0,05$).

Ao analisar o perfil inflamatório dos grupos estudados verificou-se um aumento significativo dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e redução das anti-inflamatórias nos grupos obesos e/ou com indução de OA. Entretanto, os

grupos que realizaram exercício físico apresentaram menores níveis de citocinas pró-inflamatórias e maiores de anti-inflamatórias quando comparados aos seus pares que não realizaram exercício. Ainda, mesmo com a redução do processo inflamatório os grupos OMP-EX e OFP-EX permaneceram com maior concentração de citocinas em relação aos demais grupos que realizaram atividade física (Figuras 17 e 18). Os grupos que realizaram exercício, em comparação aos que não praticaram, não apresentaram diferença quanto aos níveis de leptina.

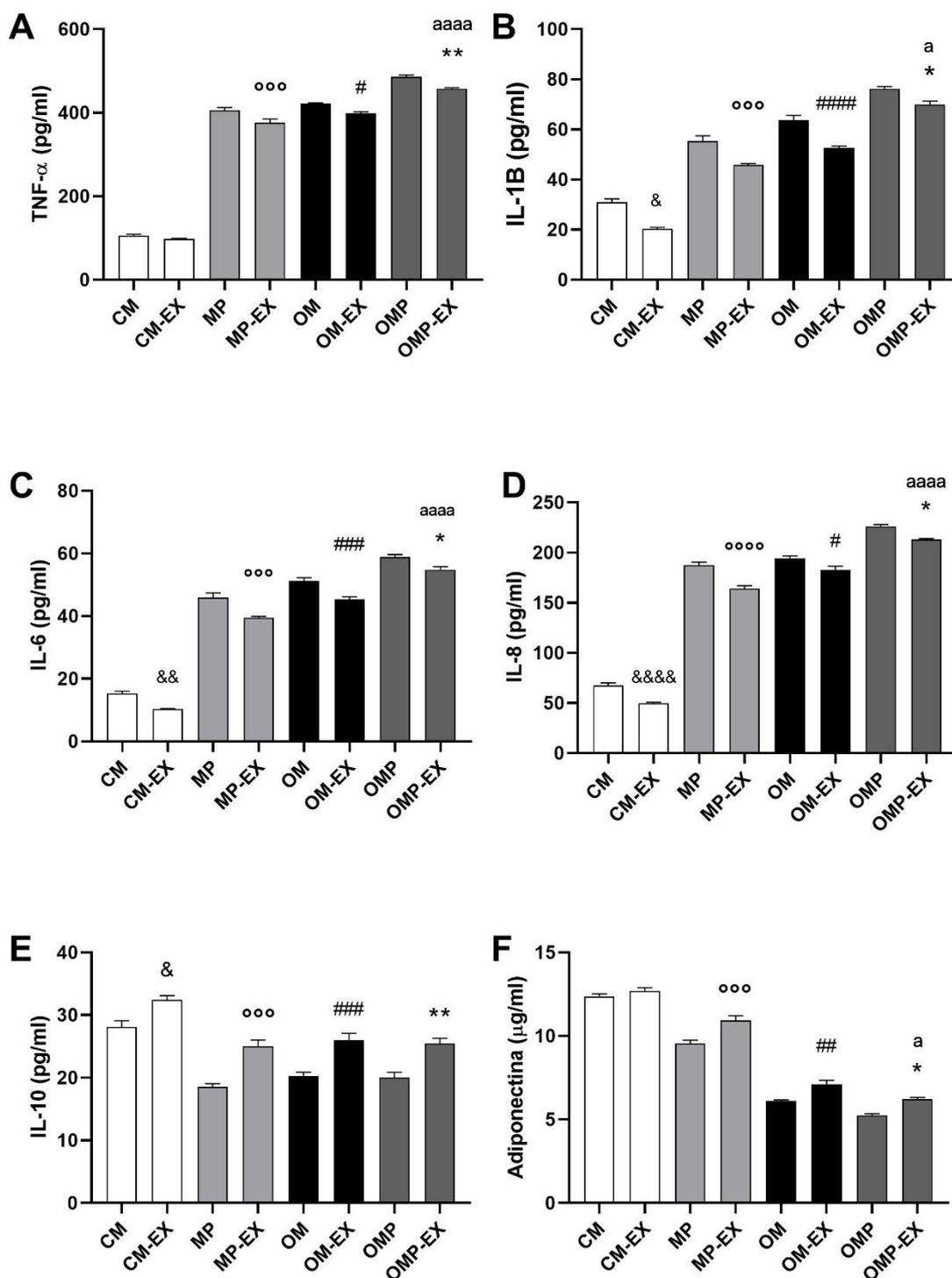


Figura 17: Avaliação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro dos animais machos, grupos CM, CM-EX, MP, MP-EX, OM, OM-EX, OMP e OMP-EX, após 65 dias de estudo. A: Níveis de TNF- α . B: Níveis de IL-1 β . C: Níveis de IL-6. D: Níveis de IL-8. E: Níveis de IL-10. F: Níveis de adiponectina. (*) análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pós hoc de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$) comparando o grupo OMP com OMP-EX. (ª) análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey (ª $p < 0,05$, aa $p < 0,01$, aaa $p < 0,001$ e aaaa $p < 0,0001$) comparando o grupo OMP-EX com MP-EX. (#) análise

estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey ($\#p<0,05$, $\#\#p<0,01$, $\#\#\#p<0,001$ e $\#\#\#\#p<0,0001$) comparando o grupo OM com OM-EX. ($^{\circ}$) análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey ($^{\circ}p<0,05$, $^{\circ\circ}p<0,01$, $^{\circ\circ\circ}p<0,001$ e $^{\circ\circ\circ\circ}p<0,0001$) comparando o grupo MP com MP-EX. (&) análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey ($\&p<0,05$, $\&\&p<0,01$, $\&\&\&p<0,001$ e $\&\&\&\&p<0,0001$) comparando o grupo CM com CM-EX.

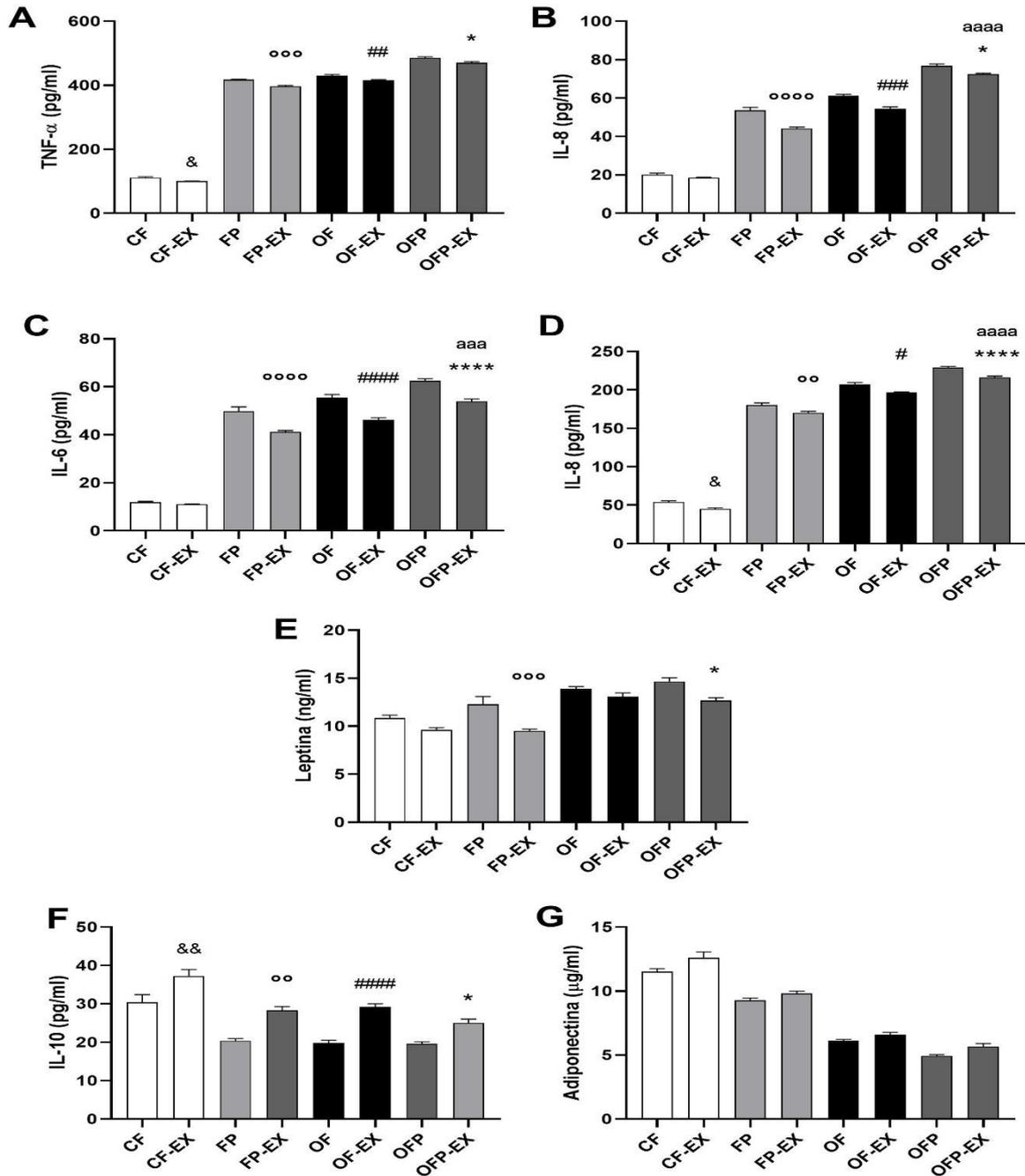


Figura 18: Avaliação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro dos animais fêmeas, grupos CF, CF-EX, FP, FP-EX, OF, OF-EX, OFP e OFP-EX, após 65 dias de estudo. A: Níveis de TNF- α . B: Níveis de IL-1 β . C: Níveis de IL-6. D: Níveis de IL-8. E: Níveis de IL-10. F: Níveis de adiponectina. (*)análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pós hoc de Tukey ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ e $****p<0,0001$) comparando o grupo OFP com OFP-EX. (a) análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey ($^ap<0,05$,

^{aa}p<0,01, ^{aaa}p<0,001 e ^{aaaa}p<0,0001) comparando o grupo OFP-EX com FP-EX. (#) análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey ([#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 e ^{####}p<0,0001) comparando o grupo OF com OF-EX. (°) análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey ([°]p<0,05, ^{°°}p<0,01, ^{°°°}p<0,001 e ^{°°°°}p<0,0001) comparando o grupo FP com FP-EX. (&) análise estatística usando ANOVA de uma via com múltiplas comparações com pos hoc de Tukey ([&]p<0,05, ^{&&}p<0,01, ^{&&&}p<0,001 e ^{&&&&}p<0,0001) comparando o grupo CF com CF-EX.

Por fim, são apresentadas a correlação entre as citocinas inflamatórias e a nocicepção (mecânica e térmica), com os animais divididos por sexo, a partir dos dados dos grupos estudados (Tabela 8). Mais uma vez, apenas a IL-10 não apresentou correlação significativa entre as citocinas inflamatórias e o perfil nociceptivo.

Tabela 9 – Correlação entre as citocinas no soro e a nocicepção mecânica e térmica dos grupos machos e fêmeas.

Citocinas	Nocicepção	Machos			Fêmeas		
		R	R ²	P	R	R ²	p
IL-1 β	Mecânica	-0,92	0,85	<0,0001	-0,90	0,82	<0,0001
	Térmica	0,93	0,88	<0,0001	0,94	0,88	<0,0001
IL-6	Mecânica	-0,82	0,68	<0,0001	-0,87	0,75	<0,0001
	Térmica	0,82	0,68	<0,0001	0,80	0,65	<0,0001
IL-8	Mecânica	-0,91	0,83	<0,0001	-0,84	0,71	<0,0001
	Térmica	0,89	0,80	<0,0001	0,80	0,64	<0,0001
TNF α	Mecânica	-0,92	0,86	<0,0001	-0,78	0,62	<0,0001
	Térmica	0,83	0,67	<0,0001	0,86	0,74	<0,0001
Adiponectina	Mecânica	0,65	0,43	<0,0001	0,81	0,65	<0,0001
	Térmica	-0,78	0,61	<0,0001	-0,91	0,83	<0,0001

6 DISCUSSÃO

6.1 A obesidade per se pode alterar o perfil nociceptivo? Se sim, o processo inflamatório está ligado a esta alteração?

No estudo 1 verificou-se que os animais dos grupos de indução de obesidade (HF e CAF), com destaque para a dieta de CAF, apresentaram aumento significativo do índice de adiposidade e de todos os marcadores bioquímicos. Estes resultados caracterizam a elevação da concentração de tecido adiposo visceral, bem como, a presença de dislipidemia, hiperglicemia e provável dano

hepático nos animais obesos em comparação ao grupo controle. Pesquisas demonstram que pode haver diferença de peso corporal com 2 semanas de indução por dieta hipercalórica, no entanto, alguns modelos não acarretam no aumento do peso corporal (Buettner, Schölmerich, & Bollheimer, 2007; Ferreira & et al, 2018). A utilização do peso corporal como único fator de sucesso para indução de obesidade não é recomendada, para tanto, deve-se empregar estimativas mais sensíveis, como o índice de adiposidade que considera a concentração de adiposidade e a composição corporal (Hariri & Thibault, 2010). Desta forma, a partir dos resultados do estudo 1 determinou-se que a dieta de CAF seria utilizada como meio de indução de obesidade para os estudos 2 e 3.

Quanto ao perfil nociceptivo verificou-se o aumento significativo da sensibilidade mecânica e térmica nos grupos alimentados com CAF em comparação ao controle. Ainda, no estudo 1 o aumento significativo no número de leucócitos, plaquetas e da elevação da expressão de TNF- α foi observada no grupo CAF, evidenciando um processo inflamatório nestes animais. Em sequência nos estudos 2 e 3 foi observada a elevação das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e leptina) e a redução das anti-inflamatórias (IL-10 e adiponectina) nos grupos obesos (OM e OF) em comparação aos controles (CM e CF) e, até mesmo, por vezes, aos animais com dor por OA (MP e FP). Sendo que em todas as etapas observou-se uma forte correlação entre o tecido adiposo e a produção de citocinas, bem como, a relação entre as citocinas inflamatórias e as alterações nociceptivas. Com isso, demonstrando que a concentração de tecido adiposo, está relacionada a um processo inflamatório que, por sua vez, está ligado a alteração nociceptiva.

O processo inflamatório relacionado à expansão do tecido adiposo está associado à infiltração de leucócitos no sistema como forma de adaptação a remodelação metabólica (Strissel & et al, 2010). Em estudo realizado por Raghavan et al (2016), os autores descrevem que as contagens de leucócitos e neutrófilos são relativamente altas em obesos. Outros modelos com animais, também observaram a relação entre a leucocitose e concentração de tecido adiposo (Raghavan, Gunasekar, & Rao, 2016; Julius & et al, 2014; Nanji & Freeman, 1985). Neste contexto, estes estudos corroboram com nossos resultados (estudos 1 e 2) e demonstram que o tecido adiposo apresenta uma alta infiltração de macrófagos M1 que são responsáveis pela liberação de citocinas inflamatórias. Além disso, assim como observado em nossos resultados, a obesidade também está relacionada com a elevação na contagem de plaquetas e a liberação de interleucinas que aumentam a trombopoetina (TPO) (Farhangi & et al, 2013). O conjunto destas alterações levam ao desenvolvimento de várias doenças crônico-sistêmicas e em nosso estudo propomos que tais distúrbios também são responsáveis pela alteração nociceptiva (Vibha & et al, 2016).

Ao avaliar o perfil nociceptivo verificou-se que os animais que passaram por indução de obesidade (CAF, OM e OF) apresentaram de forma significativa maior sensibilidade térmica e mecânica em comparação ao grupo controle. A literatura aponta que a obesidade é um fator de predisposição a presença de dor (Okifuji & Hare, 2015). Como visto em nossos resultados o tecido adiposo representa um potencial retentor de citocinas pró-inflamatórias que se reflete nos níveis séricos de inflamação (estudo 2). Neste contexto, estudos em humanos e em modelos animais (roedores) relatam que os níveis elevados de citocinas na circulação estão

relacionados a presença de hiperalgesia (Fonseca-Alaniz & et al, 2007; Fernández-Sanchez & et al, 2011). Este estado de dor, pode ser promovido pelo TNF- α que em conjunto com a IL1 β , IL-6 e IL8 promovem a síntese de prostaglandinas e aminas que estão ligadas a sensibilização das fibras nociceptivas acarretando em um estado de hiperalgesia (J & An, 2017). Em nossos 3 estudos, as alterações no perfil nociceptivo dos animais obesos foram correlacionadas a retenção de tecido adiposo, pelo índice de adiposidade, e a concentração de citocinas pró-inflamatórias. Especificamente no estudo 2 e 3 demonstramos a correlação entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e as alterações nociceptivas. Desta forma, este é o primeiro trabalho a relacionar que os altos níveis de citocinas inflamatórias na obesidade influenciam as alterações no perfil nociceptivo.

6.2 Em uma condição de doença inflamatória, como a OA, a obesidade seria um fator de potencialização da inflamação e da dor?

Nos estudos 2 e 3, como visto no estudo 1, os animais obesos (OM e OF) apresentaram maior sensibilidade térmica e mecânica em relação ao grupo controle (CM e CF). Por sua vez, os grupos obesos com dor por OA (OMP e OFP) apresentaram maior sensibilidade térmica, mecânica e dor espontânea em comparação ao controle, aos obesos e, em especial, aos não obesos com OA (MP e FP). Além disso, os animais OMP e OFP diferenciaram-se dos demais com maiores níveis de citocinas inflamatórias e menores de anti-inflamatórias tanto no tecido adiposo quanto no sangue. Assim, nossos resultados evidenciam que em uma condição de associação entre obesidade e OA, a eleva concentração de tecido adiposo, nos animais OMP e OFP, potencializou a resposta inflamatória

que, por sua vez, está ligada ao estado de hiperalgia observado nestes animais. Tal afirmativa esta embasada na forte correlação observada entre o índice de adiposidade e as citocinas estudadas, bem como, na relação entre as citocinas inflamatórias e a nocicepção térmica e mecânica.

A concentração de tecido adiposo observada nos animais OM, OF, OMP e OFP está relacionada a grande produção de mediadores inflamatórios que estão associados a patologia da OA. Dentre as adipocinas estudadas, verificamos um aumento nos níveis séricos de leptina e redução da adiponectina nos grupos OM, OF, OMP e OFP. Estudos demonstram que a leptina tem um papel central na OA pela degradação da cartilagem (Fowler-Brown & et al, 2016; Koskinen & et al, 2011). A leptina é produzida principalmente pelo tecido adiposo e tem função fundamental na resposta imune através da regulação dos macrófagos M1. Com isso, ocorre grande produção de citocinas pró-inflamatórias que afetam os condrócitos articulares favorecendo a OA. Por outro lado, a adiponectina, apresenta uma ação inversa a leptina, estimula a proliferação de macrófagos M2 e a expressão de marcadores anti-inflamatórios. Desta forma, a adiponectina tem um papel protetor na OA, no entanto, em pacientes obesos seus níveis encontram-se reduzidos pois são inversamente proporcionais ao acúmulo de tecido adiposo o que é um fator para a associação destas doenças inflamatórias (Luo & Liu, 2016; Tilg & Moschen, 2006). Assim, com base nos resultados (estudo 2 e 3) o processo inflamatório gerada pela obesidade tem relação com os altos níveis leptina e baixos de adiponecitna, com isso, poderíamos justificar a resposta inflamatória exacerbada dos animais obesos com OA e as alterações no limiar de dor.

Em nosso estudo, observamos que os animais OMP e OFP apresentaram níveis mais elevados de dor térmica, mecânica e espontânea em comparação aos demais grupos. Ainda, é importante ressaltar que os OM e OF apresentaram níveis de sensibilidade próximos aos MP e FP, demonstrando assim, que a obesidade gera um estado de hiperalgesia comparável ao de uma doença como a OA. Estudos demonstram que a obesidade associada a OA é um fator agravante na hiperalgesia (Cooper & et al, 2018; Vuolteenaho, Koskinen, & Moilanen, 2014). Na OA a dor está relacionada com o processo inflamatório crônico articular que gera um aumento na liberação de mediadores inflamatórios (Nees & et al, 2019). Nosso estudo propõe que as alterações nociceptivas presentes na obesidade também são relacionadas a inflamação crônica. Através da correlação apresentada em nossos resultados, entre citocinas inflamatórias e as alterações nociceptivas, acrescentamos que o estado inflamatório presente na obesidade corroborou para uma exacerbação da resposta inflamatória na OA o que gerou um estado hiperálgico nos animais OMP e OFP.

6.3O exercício físico pode ser um possível tratamento para a associação de obesidade e OA?

No estudo 3 verificou-se que o exercício reduziu peso corporal e o índice de adiposidade dos animais após 5 dias consecutivos de treinamento. Ainda, observamos que os grupos que realizaram exercícios (MP-EX, OM-EX, OMP-EX, FP-EX, OF-EX e OFP-EX) apresentaram, ao final do protocolo, redução significativa da dor espontânea e maior sensibilidade mecânica e térmica. Assim, quando comparados aos seus pares (MP, OM, OMP, FP, OF e OFP), que não

realizaram exercício, os animais exercitados diferenciaram-se significativamente quanto a redução da dor. Ademais, também foi observado que o protocolo de exercício agudo foi capaz de reduzir os níveis das citocinas pró-inflamatórias e aumentar as citocinas anti-inflamatórias. A partir da análise de correlação demonstramos mais uma vez a relação entre o índice de adiposidade, a expressão de citocinas e a resposta nociceptiva.

Vários estudos demonstram que a obesidade e a OA estão relacionadas a um quadro inflamatório, logo, estas desempenham efeitos fisiológicos sobre o limiar de dor (Huh, Park, Ham, & Kim, 2014; Hotamisligil, Inflammation and metabolic disorders, 2006). Por sua vez, o exercício físico é o tratamento não farmacológico mais indicado para o tratamento da obesidade (Koyanagi, Stubbs, & Vancampfort, 2018) e da OA (Vuolteenaho, Koskinen, & Moilanen, 2014). Em nossos resultados verificamos que os animais que passaram por indução de OA e que foram exercitados apresentaram redução da dor. O efeito analgésico do exercício pode ocorrer por três fatores: redução da concentração de tecido adiposo, redução da liberação de citocinas pró e aumento das anti-inflamatórias e redução do recrutamento de monócitos e macrófagos M1 (Gleeson & et al, 2011). Assim, o exercício físico aparenta modular os níveis de citocinas inflamatórias o que resulta em uma resposta de analgesia.

No estudo verificou-se que os grupos OM-EX, OMP-EX, OF-EX e OFP-EX apresentaram redução do peso corporal e quando comparados aos obesos que não praticaram atividade (OM, OMP, OF e OFP) tiveram menor índice de adiposidade. Estudos com humanos e animais apontam que o exercício aeróbico demonstra resultados positivos quanto a redução da gordura corporal, da dor e dos

marcadores inflamatórios (Almeida & et al, 2015; Wang & et al, 2012; Hong & et al, 2014). Ainda, em uma revisão recente os autores observaram que indivíduos obesos apresentam redução da dor após perderem em média 4,9 kg de peso corporal (Cooper & et al, 2018). Assim, corroborando com a relação entre a concentração de tecido adiposo, processo inflamatório e estado de dor.

Em consonância a redução do índice de adiposidade, citado no parágrafo anterior, observamos nos grupos exercitados a redução dos níveis das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 e aumentos das anti-inflamatórias IL-10 e adiponectina. Outros estudos verificaram que a treinamento aeróbico reduziu a concentração adiposa e o processo inflamatório, assim, demonstrando a ligação entre o tecido adiposo e a inflamação (Wanderley & et al, 2013; Abd El-Kader & Al-Shreef, 2018). Com isso o exercício físico agudo apresenta uma relação entre a modulação inflamatória e o efeito analgésico, uma vez que, verificamos uma correlação entre os níveis de citocinas inflamatórias e a resposta nociceptiva mecânica e térmica. Vários estudos de coorte, apoiam esta relação entre níveis elevados de atividade física e baixos níveis de marcadores inflamatórios o que pode justificar a redução da dor (Brox & et al, 2005; Huijnen & et al, 2010; Chin, Huang, Akter, & Binks, 2020).

Após 5 dias consecutivos de exercício aeróbico foi observado que os animais apresentaram redução do TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (pró-inflamatório) com aumento dos níveis de IL-10 e adiponectina (anti-inflamatório). O efeito anti-inflamatório do exercício físico pode estar ligado a produção aguda e transitória da IL-6, que é uma citocina pró-inflamatória, entretanto, quando produzida pela contração muscular tem a capacidade de agir por uma via independente do TNF-

α. Assim, a IL-6 estimula citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 o que representa uma possível explicação para o efeito anti-inflamatório do exercício físico (Castellano, Patel, & White, 2008; Pedersen & Febbraio, 2012). Outros estudos sugerem que o exercício poderia estimular o aumento dos níveis de IL-10 de forma independente da IL-6 (Lira, Painssa, & JULIO, 2015). Ainda, a regulação dos níveis de leptina e adiponectina pelo exercício também podem representar um fator anti-inflamatório tanto para a obesidade quanto para a OA e a associação destas (Fowler-Brown & et al, 2016; Koskinen & et al, 2011). Com base em nossos resultados, observa-se que o exercício físico acarretou na redução do índice de adiposidade e do processo inflamatório, com isso, relacionamos o efeito analgésico a modulação inflamatória com redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento das anti-inflamatórias.

Estudos demonstram a relação da obesidade com a dor e com a OA (Vuolteenaho, Koskinen, & Moilanen, 2014; Guneli, Gumustekin, & Ates, 2010; Yu & et al, 2013). Neste sentido, em nossos resultados, apesar do exercício físico ter apresentado efeitos positivos quanto a redução de adiposidade, do processo inflamatório e da dor, os animais OMP e OFP permaneceram com níveis mais elevados de citocinas inflamatórias e de dor quando comparados aos OM, OF e os MP, FP. Com isso, fica claro que a retenção de tecido adiposo é um fator potencial de inflamação quando associado a uma doença como a OA. Assim, os indivíduos obesos necessitam de uma abordagem específica, voltada ao controle da inflamação, quando se pensa na redução da dor. Por fim, é importante ressaltar que este trabalho é o primeiro a comparar a resposta inflamatória e de dor entre

animais obesos e não obesos com AO, bem como, a sua resposta aguda a um protocolo de exercício aeróbico.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos 3 estudos apresentados é possível sugerir que o processo inflamatório presente na obesidade está relacionado com as alterações no perfil nociceptivo. Ademais, tal alteração no limiar de dor, provocada pela obesidade, é comparável a uma doença como a OA. Quando associada a uma doença inflamatória, como a OA, a obesidade devido à alta concentração de tecido adiposo age como um fator de potencialização inflamatória e com isso acarreta em um estado de hiperalgesia.

Ainda, o exercício físico agudo é uma possível forma de tratamento para obesidade e OA. Entretanto, em condições de associação entre obesidade e OA o exercício, apesar de apresentar resposta positiva na redução da inflamação e da dor, não foi capaz de reduzir estas estimativas a níveis próximos aos animais com obesidade ou OA. Desta forma, o tratamento de indivíduos obesos com doenças inflamatórias associadas exige uma atenção específica através de terapias combinadas para a redução da inflamação e controle da dor.

7.1 Perspectivas futuras

A partir dos resultados desta tese verificou-se uma diferenciação do limiar de dor e da resposta inflamatória dos animais obesos, assim como, na associação de uma doença inflamatória como a OA. Ainda, também observou-se que a resposta para o mesmo tratamento, no caso o exercício físico, também foi

proporcional aos níveis inflamatórios. Com isso, em uma perspectiva futura o nosso grupo dará continuidade na busca pela compreensão dos efeitos da obesidade e da associação desta a doenças inflamatórias, visando possíveis meios de tratamento que proporcionem a modulação do processo inflamatório e o alívio da dor nestes indivíduos.

8. REFERENCIAS

- Abd El-Kader, S. M., & Al-Shreef, F. M. (2018). nflammatory cytokines and immune system modulation by aerobic versus resisted exercise training for elderly. *Afr Health Sci*, 18(1), 120-131.
- ACSM. (2011, Agosto 01). *ACSM Issues New Recommendations on Quantity and Quality of Exercise*. Retrieved from <http://www.acsm.org/>: <http://www.acsm.org/about-acsm/mediaroom/news-releases/2011/08/01/acsm-issues-new-recommendations-onquantity-and-quality-of-exercise>.
- Ageberg, E., & Roos, E. M. (2015). Neuromuscular exercise as treatment of degenerative knee disease. *xercise and Sport Sciences Reviews*, 43(1):14–22.
- Allen, J., Sun, Y., & Woods, J. A. (2015). Exercise and the Regulation of Inflammatory Responses. . *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 337-354 .
- Almeida, C., & et al. (2015). Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. *Pain*, 156(3), 504–513.
- Andersson, M. L., Svensson, B., & Bergman, S. (2013). Chronic widespread pain in patients with rheumatoid arthritis and the relation between pain and disease activity. *J Rheumatol*, 40 (12): 1977–1985.
- Andrade , P., & et al. (2011). Role of TNF-alpha during central sensitization in preclinical studies. *Neurol Sci.*, 32(5), 757–771.
- Balistreri, C. R., Caruso, C., & Candore, G. (2010). The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation*.
- Baranauskas, G., & Nistri, A. (1998). Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Progress in Neurobiology*, 54, 349-365.

- Bliddal, H., & Christensen, R. (2006). The management of osteoarthritis in the obese patient: practical considerations and guidelines for therapy. *Obes Rev*, 7: 323–331.
- Bradley, J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*, 214(2), 149-160.
- Brasil, Ministério da Saúde. (2019). *Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças*. Brasília, DF.
- Bressan, E., Cunha, F. Q., & Tonussi, C. R. (2006). Contribution of TNFalpha, IL-1beta and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS induced reactive arthritis. *Cytokine*, 36, 83-89.
- Brosseau, L., & et al. (2017). The Ottawa panel clinical practice guidelines for the management of knee osteoarthritis. Part two: strengthening exercise programs. *Clinical Rehabilitation*, 31(5): 596–611.
- Brox, J. L., & et al. (2005). Disability, pain, psychological factors and physical performance in healthy controls, patients with sub-acute and chronic low back pain: a case control study. *J Rehabil Med.*, 39, 95-99.
- Buettner, R., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*, 15, 798–808.
- Castellano, V., Patel, D. I., & White, L. J. (2008). Cytokines responses to acute and chronic exercise in multiple sclerosis. *J Appl Physiol*, 104(6), 1697-1702.
- Chai, N. S., & et al. (2014). Obesity and headache: part I—a systematic review of the epidemiology of obesity and headache. *Headache*, 54, 219-234.
- Chaplan, S. R., & et al. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.*, 53(1), 55-63.
- Chin, S. H., Huang, W. L., Akter, S., & Binks, M. (2020). Obesity and pain: a systematic review. *International Journal of Obesity*, 44(5), 969-979.
- Conaghan, P. G., Cook, A. D., Hamilton, J. A., & Tak, P. P. (2019). Therapeutic options for targeting inflammatory osteoarthritis pain. *Nat Rev Rheumatol*, 15(6):355-363.
- Cooper, L., & et al. (2018). Weight loss interventions for adults with overweight/obesity and chronic musculoskeletal pain: a mixed methods systematic review. *Obesity Reviews*, 19(7), 989–1007.

- Crissey , J. M., & et al. (2014). Adipose tissue and vascular phenotypic lation by voluntary physical activity and dietary restriction in obese insulin-resistant OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 306, 596–606.
- Da Silva, M. D., & et al. (2017). Diacerein reduces joint damage, pain behavior and inhibits transient receptor potential vanilloid 1, matrix metalloproteinase and glial cells in rat spinal cord. *International Journal of Rheumatic Diseases.*, 20(10), 1337-1349.
- de Lange-Brokaar, B. j., & et al. (2012). Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage.*, 20(12), 1484-1499.
- Diepen , S. V., & et al. (2013). Prognostic relevance of baseline pro-and-anti-inflammatory markers in STEMI: An APEX AMI substudy. *International Journal of Cardiology*.
- Elkis, C. M., & Francis, J. (2012). Central adiposity, sistemic inflammation, and the metabolic syndrome. *Current hypertension reports*, 12(2), 99-104.
- Estadela, D., & al, e. (2004). Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*, 20(2), 218-224.
- Farhangi , M. A., & et al. (2013). White blood cell count in women: relation to inflammatory biomarkers, haematological profiles, visceral adiposity, and other cardiovascular risk factors. *J Health Popul Nutr*, 31(1), 58- 64.
- Fernández, R. P., & Kaski, J. C. (2002). Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol*, 55(7), 738-750.
- Fernández-Sanchez, A., & et al. (2011). Inflammation, oxidative stress and obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 3117-3132.
- Ferreira, A., & et al. (2018). Cafeteria-diet effects on cognitive functions, anxiety, fear response and neurogenesis in the juvenile rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155, 197–207.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, O. S., & Girardini, S. E. (2006). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1² generation. *Review. British Society for Immunology*, 147, 227-235.
- Flattersa, S. J., & Bennett, G. J. (2004). Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain*, 109, 150–116.
- Fonseca-Alaniz, M. H., & et al. (2007). Adipose tissue as an endocrine organ: From theory to practice. *J Pediatr*, 83, 192-203.

- Fowler-Brown, A., & et al. (2016). The mediating effect of leptin on the relationship between body weight and knee osteoarthritis in older adults. *Arthritis & rheumatology*, *67*(1), 169-175.
- Franchi, L., & et al. (2010). Inflammasomes as microbial sensors. *Eur J Immunol*, *40*, 611-615.
- Frye, C. W., Shmalberg, J. W., & Wakshlag, J. J. (2016). Obesity, Exercise and Orthopedic Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, *46*(5), 831-841.
- Galdino, G., & et al. (2014). The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. *Neuropharmacology*, *77*, 313–324.
- Gleeson, M., & et al. (2011). The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature*, *11*, 607-615.
- Goossens, G. H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & behavior*, *94*(2), 206-218.
- Gopalkrishnan, P., & Sluka, K. A. (2000). Effect of varying frequency, intensity, and pulse duration of transcutaneous electrical nerve stimulation on primary hyperalgesia in inflamed rats. *Arch Phys Med Rehabil.*, *81*(7), 984–990.
- Guneli, E., Gumustekin, M., & Ates, M. (2010). Possible involvement of ghrelin on pain threshold in obesity. *Med Hypotheses*. *Med Hypotheses*, *74*, 452-545.
- Harada , A., & et al. (1994). Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol*, *56*, 559-564.
- Hariri, N., & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*, *23*, 270–299.
- Henstridge, D. C., & et al. (2019). Metabolic control and sex: A focus on inflammatory-linked mediators. *Br J Pharmacol*, 114-128.
- Hong, S., & et al. (2014). Benefit of physical fitness against inflammation in obesity: role of beta adrenergic receptors. *Brain Behav Immun*, *39*, 113-120.
- Horiuchi, T., & et al. (2010). Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *The British Society for Rheumatology*, *49*(7), 1215-1228.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, *27*(8), 860-867.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, *259*(5091), 87-91.

- Huh, J. Y., Park, Y. J., Ham, M., & Kim, J. B. (2014). Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Molecules and cells*, 37(5), 365-371.
- Huijnen, I. P., & et al. (2010). Do depression and pain intensity interfere with physical activity in daily life in patients with chronic low back pain? *Pain*, 50-62.
- J, Z., & An, J. (2017). Cytokines. inflammation and pain. *Int Anesthesiol*, 47, 27-37.
- Jais, A., & Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation*, 127(1), 24-32.
- Julius, S., & et al. (2014). In prehypertension leukocytosis is associated with body mass index but not with blood pressure or incident hypertension. *J Hypertens*, 32(2), 251-259.
- Kanneganti, T. D., & Dixit, V. D. (2012). Immunological complications of obesity. *Nat Immunol*, 13(8), 707-712.
- Karpe, F., & Pinnick, K. E. (2014). Biology of upper-body and lower-body adipose tissue--link to whole body phenotypes. *Nat Rev Endocrinol*, 11, 90-100.
- Kautzky-Willer, A., Harreiter, J., & Pacini, G. (2016). Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Rev*, 37, 278-316.
- Kim, S. H., & Reaven, G. (2013). Sex differences in insulin resistance and cardiovascular disease risk. *J Clin Endocrinol Metab*, 98, 1716-1721.
- Koskinen, A., & et al. (2011). Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from OA patients. *Clinical and experimental rheumatology*, 29(1), 57-64.
- Koyanagi, A., Stubbs, B., & Vancampfort, D. (2018). Correlates of sedentary behavior in the general population: A cross-sectional study using nationally representative data from six low- and middle-income countries. *Plos One*, 13(8), 202-222.
- Landsmeer, M. L., & et al. (2019). Predicting Knee Pain and Knee Osteoarthritis Among Overweight Women. *J Am Board Fam Med.*, 32(4), 575-584.
- Lee, S., & et al. (2016). Gender differences in metabolic syndrome components among the Korean 66-year-old population with metabolic syndrome. *BMC Geriatr*, 16-27.
- Lira, F. S., Painssa, V. L., & JULIO, U. F. (2015). Differences in metabolic and inflammatory responses in lower and upper body high-intensity intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol.*, 115, 1467-1474.

- Lopez, I. P., & et al. (2003). DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes Res.*, *11*(2), 188-194.
- Lorenzetti, B. B., & et al. (2002). Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. *s. Eur. Cytokine Network*, *13*(4), 456–461.
- Lumeng, C. N. (2013). Innate immune activation in obesity. *Mol Aspects Med*, *34*(1), 12-29.
- Lumeng, C. N., & Saltiel, A. R. (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*, *12*(62), 2111-2117.
- Luo, Y., & Liu, M. (2016). Adiponectin: a versatile player of innate immunity. *Journal of molecular cell biology*, *8*(2), 120-128.
- Maas, A. H., & Appelman, Y. E. (2010). Gender differences in coronary heart disease. *Neth Heart J*, *18*, 598- 602.
- Maeda, K., & et al. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagenlike factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *BBRC*, *221*(2), 286-289.
- Mancuso, P. (2013). Obesity and respiratory infections: does excess adiposity weigh down host defense? *Pulm Pharmacol Ther*, 412-419.
- Maskrey, B. H., & et al. (2011). Mechanisms of resolution of inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *31*, 1001-1006.
- Mathis, D., & Shoelson, S. E. (2011). Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol*, *11*(2), 81.
- Maury, E., & Brichard, S. M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*, *314*(1), 1-16.
- Mccarthy, L. H., & et al. (2009). Chronic pain and obesity in elderly people: Results from the einstein aging study. *Journal of the American Geriatrics Society*, *57*(1), 115-119.
- Mohamed-Ali, V., Pinkney, J. H., & Coppack, S. W. (1998). Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *22*(12), 1145-1158.
- Mraz, M., & Haluzik, M. (2014). The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *Journal of Endocrinology*, *222*(3), 113-127.
- Nakao, C., & et al. (2000). Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *J Appl Physiol*, *88*(2), 649-654.

- Nanji, A. A., & Freeman, J. B. (1985). Relationship between body weight and total leukocyte count in morbid obesity. *Am J Clin Pathol.*, *84*(3), 346-347.
- Nees, T. A., & et al. (2019). Die Rolle der Inflammation bei Arthroseschmerzen [Inflammation and osteoarthritis-related pain]. *Schmerz*, *33*(1), 4-12.
- Okifuji, A., & et al. (2010). Relationship between fibromyalgia and obesity in pain, function, mood, and sleep. *Journal of Pain*, *11*(12), 1329–1337.
- Okifuji, A., & Hare, B. (2015). The association between chronic pain and obesity. *Journal of Pain Research*, *8*, 399.
- Oliveira, P., & et al. (2013). Effects of phototherapy on cartilage structure and inflammatory markers in an experimental model of osteoarthritis. *Journal of Biomedical Optics*, *18*(12), 128-134.
- Organizaçao Mundial de Saúde. (2015). *Obesity and overweight. Facts about overweight and Obesity*. Fact sheet.
- Osborn, O., & Olefsky, J. M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med*, *18* (3): 363-374.
- Ouchi, N., & et al. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, *11*(2), 85-97.
- Paley, C. A., & Johnson, M. I. (2016). Physical Activity to Reduce Systemic Inflammation Associated With Chronic Pain and Obesity. *The Clinical Journal of Pain*, *32*(4), 365–370.
- Pan, F., & et al. (2019). Association between metabolic syndrome and knee structural change on MRI. *Rheumatology (Oxford)*., 266.
- Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2012). Muscle as a endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*, *88*(4), 1379-1406.
- Pereira , G. B., & et al. (2013). Acute Effects of Resistance Training on Cytokines and Osteoprotegerin in Women with Metabolic Syndrome. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, *48*, 122-130.
- Popa, C., & et al. (2007). The role of TNF- alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research*, *48*(4), 751-762.
- Raghavan, V., Gunasekar, D., & Rao, K. (2016). relevance of haematologic parameters in obese women with or without metabolic syndrome. *J Clin Diagn Res*, *10*(5), 11- 16.

- Raja, S. N., & et al. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9):1976-1982.
- Ramos-Nino, M. E. (2013). The role of Chronic Inflammation in obesity-Associated. *ISRN Oncology*.
- Regnaud, J. P., & et al. (2015). High-intensity versus low-intensity physical activity or exercise in people with hip or knee osteoarthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10.
- Rice, S. e. (2016). Psychological Distress in Out Patients Assessed for Chronic Pain. *Pain Res. Manag*, 7.
- Richter, F., & et al. (2010). Tumor necrosis factor causes persistent sensitization of joint nociceptors to mechanical stimuli in rats. *Arthritis and Rheumatism*, 62(12), 3806-3814.
- Ringseis, R., Eder, K., Mooren, F. C., & Krüger, K. (2015). Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 21:58–68.
- Roger, M. M., & Calder, P. C. (2018). Obesity, inflammation, Toll-like receptor 4 and fatty acids. *Nutrients*, 10.
- Rosales Ade , L., & et al. (2014). Obesity, osteoarthritis and clinical treatment. *Acta Ortop Bras.*, 22(3), 136-139.
- Schmidt, F. M., & et al. (2015). Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. *PLoS One*.
- Shah, A., Mehta, N., & Reilly, M. P. (2008). Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 32(6), 638-644.
- Sharma , N. K., & et al. (2010). Aerobic Exercise Alters Analgesia and Neurotrophin-3 Synthesis in an Animal Model of Chronic Widespread Pain. *Physical Therapy*, 90(5), 714–725.
- Sommer, C., & Kress, M. (2004). Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*, 184–187.
- Son , K. M., & et al. (2019). Development of a mouse model of knee osteoarthritis based on obesity and bipedal walking. . *J Orthop Res.*, 8.
- Strissel, K. J., & et al. (2010). T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obesity (Silver Spring)*, 18(10), 1918–1925.

- Sun, A. R., & et al. (2016). Is Synovial Macrophage Activation the Inflammatory Link Between Obesity and Osteoarthritis? *Current rheumatology reports*, 18(9):1-14.
- Taylor, B. A., & Phillips, S. J. (1996). Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics*, 34(3), 389-398.
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology*, 6(10), 772-783.
- Veigas, L. P., Pereira, P. C., Vicente, F., & Mesquita, M. F. (2012). Overweight, obesity and abdominal adiposity effects in inflammatory proteins: C-reactive protein and fibrinogen. *Journal of Medical Sciences*, 12(3), 70-77.
- Verri, W. A., & et al. (2006). Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics*, 112, 116–138.
- Vibha, R., & et al. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci*, 148, 183-193.
- Vieira-Potter, V. J. (2014). Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. *Cellular microbiology*, 16(10), 1484-1492.
- Vuolteenaho, K., Koskinen, A., & Moilanen, E. (2014). Leptin—a link between obesity and osteoarthritis. Applications for prevention and treatment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 114, 103-108.
- Wanderley, F. A., & et al. (2013). Differential responses of adiposity, inflammation and autonomic function to aerobic versus resistance training in older adults. *Experimental Gerontology*, 48, 326-333.
- Wang, J., & et al. (2012). Effect of exercise training intensity on murine T regulatory cells and vaccination response. *Scand J Med Sci Sports*, 22(5), 643–652.
- Yamada, E. F., & et al. (2018). Evaluation of monosodium iodoacetate dosage to induce knee osteoarthritis: Relation with oxidative stress and pain. *International journal of rheumatic diseases.*, 22, 399-410.
- Yamamoto, K., & et al. (2005). Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gut*, 54(6), 789-796.
- Yoo, J. J., Cho, N. H., Lim, S. H., & Kim, H. A. (2014). Relationships between body mass index, fat mass, muscle mass, and musculoskeletal pain in community residents. *Arthritis Rheumatol*, 66, 3511-3520.

Yu, M., & et al. (2013). Galanin receptors possibly modulate the obesity-induced change in pain threshold. *Peptides*, 44, 55–59.

Zhang, J., & An, J. (2017). Cytokines. inflammation and pain. *Int Anesthesiol*, 47, 27-37.

Zhang, Y., & et al. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.

APÊNDICE

Anexo 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

039/2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
Fone: (55)3911-0200. E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 039/2017

Título: Investigação de diferentes dietas hipercalóricas sobre o perfil nociceptivo de ratos com obesidade.

Data da aprovação: 25/09/2017

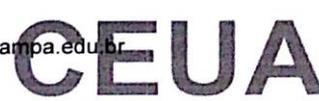
Período de vigência do projeto: 25/09/2019

Pesquisadores(a): Morgana Duarte da Silva

Campus: Uruguiana

Telefone: (48) 9956-0610

E-mail: morganasilva@unipampa.edu.br



Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	48
Peso/Idade	300 g / 2 a 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria.


Prof. Dr. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA

Anexo 2 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

039/2019



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 039/2019

Título: Efeito do exercício físico de curta duração em ratos obesos com osteoartrite

Data da aprovação: 10/10/2019

Período de vigência do projeto: 31/07/2021

Pesquisadores(a): Morgana Duarte da Silva

Campus: Uruguaiana

Telefone: (48) 99956-0610

E-mail: morganasilva@unipampa.edu.br

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	207
Peso/idade	200 g/ 8 semanas
Sexo	117 Machos 90 fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Cátia Aline Veiverberg
Coordenadora substituta CEUA/UNIPAMPA