

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL

LUIZ FELIPE MARTUCCI

**Efeitos do treinamento físico intervalado de alta intensidade
(HIIT) nas características morfológicas e funcionais do tecido
adiposo branco e marrom**

São Paulo
2022

LUIZ FELIPE MARTUCCI

**Efeitos do treinamento físico intervalado de alta intensidade
(HIIT) nas características morfológicas e funcionais do tecido
adiposo branco e marrom**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de
Sant'Anna Evangelista

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Martucci, Luiz Felipe

Efeitos do treinamento físico intervalado de alta intensidade (HIIT) nas características morfológicas e funcionais do tecido adiposo branco e marrom / Luiz Felipe Martucci. -- São Paulo, 2022.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Fabiana de Sant'Anna Evangelista.

Descritores: 1.Tecido adiposo 2.Treinamento intervalado de alta intensidade 3.Tamanho de adipócitos 4.Matriz extracelular 5.Termogênese

USP/FM/DBD-008/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

“If you have built castles in the air, your work need not be lost; that is where they should be. Now put the foundations under them” (Thoreau). Meus pais sempre foram a estrutura que permitiu a realização dos meus sonhos. Portanto, esse trabalho é dedicado a você, Ana e a você, Carlos. Nunca conseguirei expressar o quão grato sou pelo apoio e amor que sempre me deram. Tenho muito orgulho de tê-los como meus pais.

Agradecimentos

À minha excelentíssima orientadora, Fabiana de Sant'Anna Evangelista, por toda dedicação, oportunidades, ensinamentos, paciência, amizade e conselhos. Sempre a terei como um exemplo de perseverança, de como orientar e tratar as pessoas com delicadeza.

À Dra. Miriam H. Fonseca Alaniz por todo ensinamento, incentivo, apoio e especialmente, por ser um modelo do que é ser um pesquisador.

Aos meus queridos amigos de grupo de pesquisa: Anna Laura V. Américo, Bruno Vecchiatto, Cynthia R. Muller e Marília M. Ferreira, por sempre estarem presentes nos momentos bons e ruins. O suporte de vocês foi indispensável ao longo desses anos.

Aos amigos que fiz no laboratório: Acaris Benetti, Danúbia Santos, Fabio Takeo, Flavia Martins, Leonardo Cauduro, Luiz F. Zuleta, Pamella Malagrino, Rafael Nascimento, Renata Pereira, Renato Crajoinas e Thiago Rentz, pelo apoio e por tornarem a minha vida mais leve.

À minha irmã, Ana Carla Martucci, por ter sempre acreditado em mim, me apoiado e por toda a paciência e dedicação para revisar meus textos.

Ao Laboratório de Genética e Cardiologia do Instituto do Coração (LGCM) e ao professor José Eduardo Krieger pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho em seu laboratório.

À toda equipe do LGCM, alunos e funcionários, pela ajuda e discussões enriquecedoras.

Aos técnicos da Escola de Artes, Ciências e Humanidades e da Patologia do Instituto do Coração: Adriana, Antônio, Fernanda, Isabel e Solange, pela assistência, paciência e todos os ensinamentos, que permitiram elevar a qualidade do meu trabalho.

À CAPES pelo apoio e incentivo à pesquisa

Enfim, a todos que contribuíram para a realização desse trabalho e para o meu crescimento como ser humano e profissional.

RESUMO

Martucci LF. *Efeitos do treinamento físico intervalado de alta intensidade (HIIT) nas características morfológicas e funcionais do tecido adiposo branco e marrom* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Aumentar a capacidade aeróbia com o treinamento físico intervalado de alta intensidade (HIIT) é uma maneira eficaz de reduzir o risco de morte por todas as causas. Esse efeito pode estar associado com o que acontece no tecido adiposo (TA). No entanto, são escassas as informações sobre como o HIIT afeta a morfologia, a capacidade termogênica e especialmente a matriz extracelular (MEC) do TA. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do HIIT nas características morfológicas e funcionais dos depósitos de TA branco subcutâneo (TAB-SC), branco periepididimal (TAB-PE) e TA marrom (TAM). Para isso, camundongos C57BL/6J machos foram separados em dois grupos: sedentário (S; n=15) e treinado (T; n=12). O grupo T foi submetido a um protocolo de HIIT com corrida, 5 vezes/semana, durante 8 semanas. O HIIT aumentou a capacidade aeróbia e promoveu menor ganho de massa corporal e do TAB-PE. Tanto no TAB-PE quanto no TAB-SC do grupo T houve uma redução no tamanho dos adipócitos. Além do mais, no TAB-SC foi observado um aumento na frequência de adipócitos pequenos, no número de adipócitos, na razão entre colágeno tipo I e colágeno tipo III e na expressão do TGF-beta-1. E, no TAB-PE, um aumento da expressão do FGF-21. Em nenhum dos depósitos de TA avaliados houve diferenças entre os grupos para os marcadores de capacidade termogênica UCP-1 e PGC-1-alfa. Como conclusão, o HIIT aumentou a capacidade aeróbia e reduziu o ganho de massa corporal, independente de alterações na capacidade termogênica dos depósitos de TA avaliados. Ademais, o HIIT reduziu o tamanho dos adipócitos no TAB-SC e TAB-PE, enquanto os efeitos nos componentes da MEC aconteceram apenas no TAB-SC. O HIIT não modificou nenhuma variável morfofuncional no TAM.

Descritores: Tecido adiposo; Treinamento intervalado de alta intensidade; Tamanho de adipócitos; Matriz extracelular; Termogênese.

ABSTRACT

Martucci LF. *Effects of high-intensity interval training (HIIT) on morphological and functional characteristics of white and brown adipose tissue* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Improving cardiorespiratory fitness with high-intensity interval training (HIIT) is an effective way to reduce the risk of death by all causes. This effect may be associated with what happens on adipose tissue (AT). However, information is scarce about how HIIT affects the AT morphology, thermogenic capacity, and especially the extracellular matrix (ECM). Thus, the objective of this work was to study how HIIT affects morphological and functional characteristics of subcutaneous white AT (scWAT), epididymal white AT (epWAT), and brown AT (BAT). For this, male C57BL/6J mice were separated into two groups: sedentary (S; n=15) and trained (T; n=12). T group performed for eight weeks, five times/week, of a running HIIT protocol. The HIIT protocol improved cardiorespiratory fitness and promoted less gain in body mass and epWAT mass. Both scWAT and epWAT showed a reduction in adipocyte size. Beyond that, on scWAT there was an increase in small adipocytes frequency, the number of adipocytes, the ratio between collagen type I and collagen type III, and the expression of TGF-beta-1. And in the epWAT, there was an increase in the FGF-21 expression. None of the AT depots showed differences in thermogenic capacity markers UCP-1 and PGC-1-alpha. In conclusion, the HIIT improved cardiorespiratory fitness and reduced body mass gain, independently of changes in AT thermogenic capacity. Besides, the HIIT reduced adipocyte size on scWAT and epWAT. But the effects on ECM were only on scWAT. The HIIT did not modify any morphofunctional variable on BAT.

Descriptors: Adipose tissue; High-intensity interval training; Adipocyte size; Extracellular matrix; Thermogenesis.

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismo de ação da UCP1.....	5
Figura 2. Representação do tecido adiposo branco, bege e marrom.....	6
Figura 3. Composição do tecido adiposo.....	7
Figura 4. Representação do desenho experimental.....	16
Figura 5. Representação de uma sessão de HIIT.....	16
Figura 6. Cinética durante o teste de esforço físico máximo.....	27
Figura 7. Consumo de água e ração.....	28
Figura 8. A) Evolução da massa corporal ao longo das semanas de protocolo experimental; B) Ganho de massa corporal; C) Índice de Lee.....	29
Figura 9. Massa dos depósitos adiposos.....	29
Figura 10. A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido adiposo subcutâneo corado com hematoxilina e eosina.....	31
Figura 11. A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido adiposo periepididimal corado com hematoxilina e eosina.....	32
Figura 12. A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido adiposo marrom corado com hematoxilina e eosina.....	33
Figura 13. Fotomicrografias representativas do tecido adiposo branco subcutâneo corado com <i>picrosirius red</i>	34
Figura 14. Fotomicrografias representativas do tecido adiposo branco periepididimal corado com <i>picrosirius red</i>	36
Figura 15. Fotomicrografias representativas do tecido adiposo marrom corado com <i>picrosirius red</i>	38
Figura 16. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido adiposo subcutâneo (A), periepididimal (C) e marrom (E) com marcação imunoquímica para TGF-beta-1.....	39
Figura 17. Expressão proteica da fibronectina.....	40
Figura 18. Expressão de proteínas associadas a capacidade termogênica do tecido adiposo.....	41
Figura 19. Heatmap de interações entre as variáveis.....	43

Lista de tabelas

Tabela 1 Metabolismo de repouso após o protocolo de HIIT.....	24
Tabela 2 Parâmetros metabólicos avaliados no teste de esforço físico pré- HIIT.....	25
Tabela 3 Parâmetros metabólicos avaliados no teste de esforço físico pós- HIIT.....	26
Tabela 4 Glicemia de jejum	30

Lista de abreviaturas

DCV	Doenças cardiovasculares
DM2	Diabetes Mellitus tipo II
FGF-21	Fator de crescimento de fibroblasto 21
<i>Fgf21</i>	Gene: fator de crescimento de fibroblasto 21
GE	Gasto energético
HIIT	Treinamento físico intervalado de alta intensidade
iVO ₂	Intensidade associada ao consumo máximo de oxigênio
MEC	Matriz extracelular
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGC-1-alfa	Coativador gama do receptor ativado do proliferador de peroxissoma-alfa
<i>Pgc1a</i>	Gene: Coativador gama do receptor ativado do proliferador de peroxissoma-alfa
PSR	Coloração de picrosirius red
QR	Quociente respiratório
S	Sedentário
T	Treinado
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TAB-PE	Tecido adiposo branco periepididimal
TAB-SC	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAM	Tecido adiposo marrom
TFA	Treinamento físico aeróbio
TGF-beta-1	Fator de transformação do crescimento-beta-1
<i>Tgfb1</i>	Gene: fator de transformação do crescimento-beta-1
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral-alfa
UCP1	Proteína desacopladora 1
<i>Ucp1</i>	Gene: proteína desacopladora 1
VCO ₂	Produção de gás carbônico
VO ₂	Consumo de oxigênio
VO ₂ máx	Consumo de oxigênio máximo

VO_2pico Pico de consumo de oxigênio

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Tecido adiposo	3
2.2 Matriz extracelular e microambiente do tecido adiposo.....	7
2.3 Treinamento físico e o tecido adiposo	10
3. OBJETIVOS	14
3.1 Geral:	14
3.2 Específicos.....	14
4. METODOLOGIA.....	15
4.1 Amostra	15
4.2 Desenho experimental	15
4.3 Protocolo de treinamento físico (HIIT).....	16
4.4 Determinação da capacidade aeróbia máxima.....	17
4.4.1 Protocolo do teste de esforço físico máximo	17
4.4.2 Calorimetria indireta.....	17
4.5 Massa corporal	18
4.6 Consumo de ração e água.....	18
4.7 Glicemia de jejum	18
4.8 Procedimento de morte dos animais e coleta dos tecidos	19
4.9 Histologia do tecido adiposo.....	19

4.9.1	Análise morfológica do TA.....	19
4.9.2	Análise do colágeno.....	21
4.10	Imunohistoquímica.....	22
4.11	Western Blot.....	22
4.12	Análise estatística	24
5.	RESULTADOS	24
5.1	Metabolismo de repouso	24
5.2	Capacidade aeróbia e gasto energético.....	24
5.3	Consumo de água e ração	27
5.4	Massa corporal e dos depósitos de TA.....	28
5.5	Glicemia de jejum	29
5.6	Morfologia dos adipócitos e gotículas lipídicas.....	30
5.7	Matriz extracelular do TA.....	33
5.8	Marcadores associados à capacidade termogênica do TA.....	40
5.9	Correlação entre as variáveis.....	42
6.	DISCUSSÃO	44
7.	CONCLUSÃO.....	50
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

O último levantamento do *Our World in Data* mostrou que 31,8% das mortes no mundo e 28,78% no Brasil são causadas por doenças cardiovasculares (DCV)¹. Para atingir o objetivo da Organização Mundial da Saúde (OMS) de reduzir em 25% a taxa de morte por DCV até 2025 exigirá, entre muitos elementos, uma redução eficaz na prevalência dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de DCV². Esses fatores são: hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade, diabetes mellitus tipo II (DM2), tabagismo e reduzida capacidade aeróbia^{3,4}.

O quanto cada fator de risco predispõe ao risco de morte por DCV não é semelhante. A reduzida capacidade aeróbia, por exemplo, é capaz de prever melhor o risco de morte por DCV do que alguns fatores de risco classicamente estabelecidos, como hipertensão arterial, dislipidemia, DM2 e uso de tabaco³. Assim, aumentar o consumo máximo de oxigênio ($VO_{2\text{máx}}$), o principal marcador da capacidade aeróbia, em apenas 3,5 ml/kg/min reflete em uma redução de 15% no risco de morte por DCV⁵.

A única intervenção comportamental capaz de aumentar consistentemente a capacidade aeróbia é a prática regular de exercício físico⁶. Não obstante, um terço dos adultos no mundo (~50% dos adultos no Brasil⁷) não realizam o mínimo de 150 minutos semanais de exercício físico recomendado pela OMS⁶. A pandemia da COVID-19 agravou ainda mais esse cenário, pois tem sido reportado aumento no tempo em comportamento sedentário - como ficar sentado, reclinado ou deitado - e redução na prática de exercício físico por indivíduos que, pré-pandemia, eram fisicamente ativos⁸⁻¹⁰.

O tempo em comportamento sedentário tem uma relação direta com o risco de morte. Cada hora em comportamento sedentário resulta em um aumento de 2% no risco de morte. Quando um indivíduo passa mais de 8 horas consecutivas sentado, cada hora pode representar um aumento de 8% no risco de morte¹¹. Para mitigar esse efeito, são necessários 60 a 75 minutos de exercício físico em uma intensidade moderada por dia¹², equivalente à 30 a 38 minutos de exercício físico intenso⁶.

O panorama, acima ilustrado, revela a inevitável necessidade global de intervenções no âmbito do exercício físico, que superem barreiras para a prática e sejam eficazes em promover os benefícios esperados. Uma intervenção que ganhou destaque nos últimos anos foi o treinamento físico intervalado de alta intensidade (HIIT), especialmente em função de uma das principais barreiras para a prática de exercícios físicos: a percepção de falta de tempo¹³⁻¹⁵.

Com sessões tão curtas quanto 10 minutos, o HIIT é capaz de conferir aumento na capacidade aeróbia similar ao observado com sessões de 50-60 minutos do treinamento físico aeróbio (TFA) contínuo^{15,16}. Enquanto dados provenientes de meta-análises com sessões de HIIT, com duração aproximada de 40 minutos, o apontam como superior ao TFA no aumento da capacidade aeróbia em diversas populações¹⁷⁻²².

A relação entre o aumento da capacidade aeróbia e a redução do risco de morte pode estar inversamente associada com a adiposidade total, especificamente com a massa de depósitos adiposos branco (TAB) subcutâneo (TAB-SC) e visceral, mas não do tecido adiposo marrom (TAM)²³⁻²⁶. Isso porque o TAB, ao expandir excessivamente, como ocorre na obesidade, tende a tornar-se disfuncional²⁷, de modo a mediar o estabelecimento de DCV, câncer, DM2 e esteatose hepática não-alcoólica²⁸⁻³². Por outro lado, o TAM tem grande capacidade termogênica e a sua massa está inversamente associada com a obesidade e doenças metabólicas^{33,34}.

Embora se saiba que o HIIT é eficaz para aumentar a capacidade aeróbia, muitas lacunas ainda existem sobre os efeitos do HIIT nos diferentes depósitos de TA, especialmente no que diz respeito à capacidade termogênica do TA, morfologia dos adipócitos e matriz extracelular (MEC). Portanto, o presente estudo foi delineado para investigar as adaptações morfológicas e funcionais de diferentes depósitos de TA de camundongos submetidos ao HIIT. A hipótese testada foi de que o HIIT reduziria o tamanho dos adipócitos nos depósitos de TAB e que isso estaria associado com alterações na MEC e ao aumento na capacidade termogênica do TAB-SC e do TAM.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido adiposo

O TA já foi considerado um tecido conjuntivo inerte, com a “simples” função de armazenamento de lipídios, ou seja, com poucos atributos funcionais^{33,35,36}. Do final dos anos 80 até o meio dos anos 90, com a descoberta de fatores séricos secretados pelas células adiposas, como adiposina³⁷, fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa)³⁸ e leptina³⁹, esse paradigma teve que ser revisto e o TA passou a ser reconhecido como uma peça central na regulação da homeostase energética. A partir disso, a estrada com estudos sobre aspectos do desenvolvimento, função e fisiopatologia do TA tem se expandido significativamente³⁵.

Grandes avanços foram feitos desde essa mudança de paradigma e muitos outros ainda devem ser feitos, pois, hoje, sabe-se que cada depósito de TA possui características próprias. Assim, a identidade metabólica e as principais funções de um depósito de TA dependem do tipo de TA (depósito de TAM ou TAB) e, se for de TAB, da localização física no organismo. Dessa maneira, entender a heterogeneidade dos depósitos de TA é a pedra basilar para entender o TA^{30,35}.

Os depósitos de TAB são os mais abundantes no organismo e contemplam de 3% a 70% da massa corporal⁴⁰. Eles são otimizados para o armazenamento de energia na forma de lipídios^{30,33} e podem ser divididos em TAB-SC, localizado logo abaixo da pele, e TAB visceral, com localização em volta dos órgãos viscerais do tórax e do abdômen. A importância dessa classificação é destacada pela diferença no risco cardiometabólico associado com a expansão de cada um desses depósitos. Enquanto a expansão do TAB visceral resulta em comprometimento na regulação da homeostase energética do organismo e está intimamente ligada ao aumento do risco cardiometabólico²⁹, a expansão do TAB-SC está associada a um efeito protetor sobre o risco cardiometabólico^{29,30,35}.

O TA visceral contém mais adipócitos grandes, enquanto o TAB-SC apresenta maior quantidade de adipócitos pequenos⁴¹. Os adipócitos grandes apresentam maiores taxas de lipólise, são mais resistentes à insulina e mais

propensos à apoptose⁴². Em contrapartida, os adipócitos pequenos são mais sensíveis à insulina e possuem maior afinidade por ácidos graxos livres e triglicerídeos. Desse modo, os adipócitos pequenos atuam como um potente reservatório para os ácidos graxos livres e triglicerídeos, prevenindo que eles se depositem em locais fora do tecido adiposo, como músculo esquelético, coração e fígado^{41,42}. Outras diferenças entre o TAB visceral e o TAB-SC envolvem os maiores níveis de células e citocinas pró-inflamatórias presentes no TAB visceral^{41,43}.

Os depósitos de TAB também compartilham diversas características entre si, tais como a extraordinária capacidade de alteração de tamanho e função em resposta à uma variedade de estímulos^{30,31}. Nesse sentido, os depósitos de TAB são capazes de expandir em tamanho rapidamente, por meio do aumento no armazenamento de lipídios nos adipócitos (hipertrofia) e/ou do aumento no número de adipócitos (hiperplasia). Ambas as situações podem ser observadas alguns dias após o início de uma dieta hipercalórica em camundongos^{31,44}. Além do mais, esses depósitos compartilham características morfológicas, como adipócitos com única gotícula lipídica, que ocupa a maior parte do citoplasma e empurra o núcleo para a periferia da célula, reduzida vascularização e inervação⁴⁵.

O TAM, por sua vez, representa aproximadamente 4,3% da massa de gordura em humanos e é tipicamente encontrado na região interescapular e supraclavicular. Os adipócitos do TAM são especializados em dissipar energia na forma de calor e são distintos dos adipócitos do TAB. Eles possuem múltiplas gotículas de lipídios, ao invés de uma única larga gotícula. Ainda mais distinta é a grande quantidade de mitocôndrias e a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1, *uncoupling protein 1*). A UCP1 desacopla o gradiente de próton mitocondrial da síntese de ATP, dissipando a energia na forma de calor⁴⁶ (Figura 1). Dessa maneira, ela é responsável pela termogênese não-dependente de tremor²⁹. Outra característica própria dos adipócitos marrons é a rica rede de capilares e inervação do sistema nervoso simpático que os envolvem²⁹.

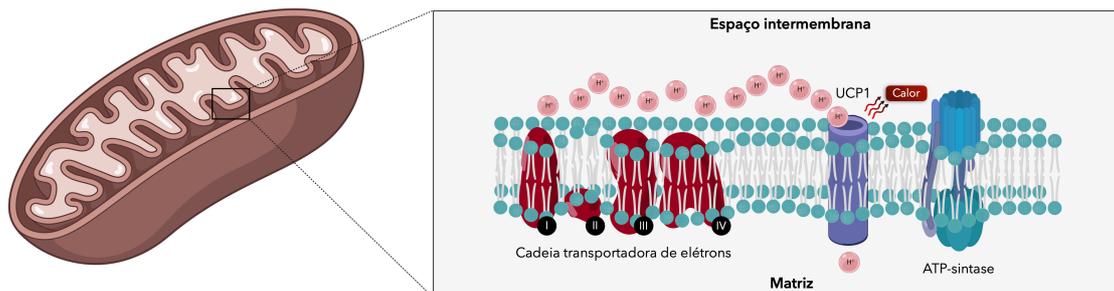


Figura 1. Mecanismo de ação da UCP1. A UCP1 localiza-se na membrana interna da mitocôndria, e a sua ação é permitir o influxo de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial. Dessa forma, ela dissipa o gradiente de prótons, criado pela cadeia transportadora de elétrons, gerando calor e impedindo que eles sejam utilizados pela ATP-sintase na formação de ATP.

Um terceiro tipo de TA é denominado de bege (Figura 2). As células adiposas beges podem ser encontradas espargidas em depósitos de TAB. O processo pelo qual uma célula adiposa torna-se bege é denominado de *browning*. Essa denominação deve-se ao fato de que as células adiposas beges compartilham das características morfológicas e funcionais dos adipócitos marrons, incluindo a capacidade termogênica. Assim, os adipócitos beges apresentam múltiplas gotículas lipídicas e grande quantidade de mitocôndrias que expressam UCP1⁴⁷.

Todavia, os adipócitos beges possuem origem diferente dos adipócitos marrons, já que são células progenitoras com histórico de expressão do receptor-alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (*Pdgfra*, *platelet-derived growth factor receptor-alfa*)⁴⁸. Já os adipócitos marrons são células positivas para o fator miogênico 5 (*Myf5*, *myogenic factor 5*)⁴⁸. Essas diferenças nas origens resultam em células com diferentes perfis gênicos.

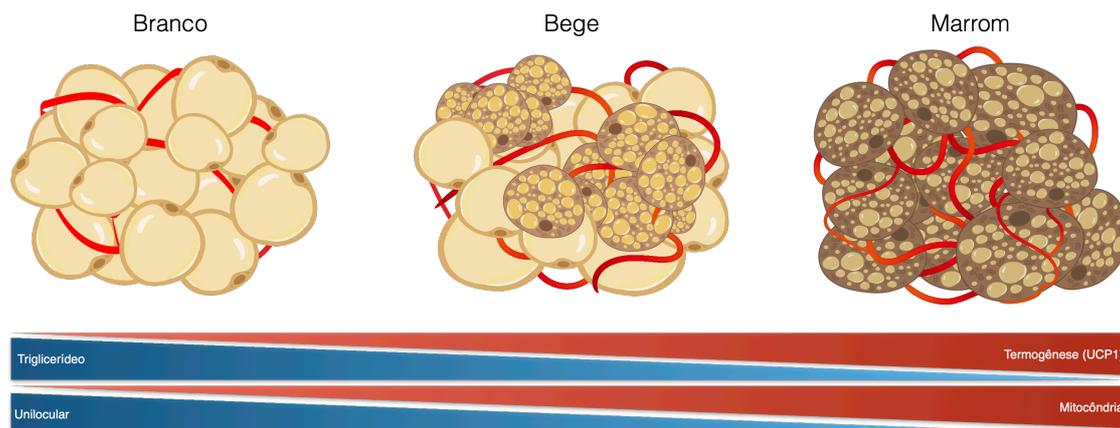


Figura 2. Representação do tecido adiposo branco, bege e marrom. O tecido adiposo branco é caracterizado por adipócitos uniloculares com poucas mitocôndrias. O tecido adiposo bege possui áreas com adipócitos multiloculares com alto conteúdo mitocondrial e capacidade termogênica, através da expressão da UCP1. Por sua vez, o tecido adiposo marrom é densamente preenchido por adipócitos multiloculares com alto conteúdo mitocondrial e expressão de UCP1. Dessa forma, o tecido adiposo bege representa um meio-termo entre características do tecido adiposo branco e marrom

Os adipócitos marrons apresentam elevada expressão de genes termogênicos, como da UCP1 e do coativador gama do receptor ativado do proliferador de peroxissoma alfa 1 (PGC-1-alfa), mesmo quando não estimulados. Em contraste, os adipócitos beges expressam esses genes apenas em resposta a estímulos⁴⁸, tais como o frio, medicamentos e exercício físico²⁹. Dessa maneira, na ausência de um desses estímulos, os adipócitos beges apresentam características de um adipócito branco⁴⁷. Portanto, as características dos adipócitos beges são transitórias, enquanto nos adipócitos marrons são constitutivas.

A característica mais distintiva dos adipócitos marrons e beges é a capacidade termogênica. Para que seja ativada, é necessário a indução por estimulação β_3 -adrenérgica e/ou a presença de ácidos graxos⁴⁶. Assim, condições que aumentam a disponibilidade de ácidos graxos, como a lipólise ou uma refeição, irão induzir o processo de termogênese nesses adipócitos⁴⁶. Portanto, a atividade deles, além de servir como mecanismo para manter a temperatura corporal em resposta ao frio, também serve para preservar o balanço energético e limitar o ganho de massa corporal⁴⁸. De fato, a magnitude da resposta termogênica em função da dieta é paralela à capacidade

termogênica dos adipócitos que expressam UCP1^{46,48}. Assim, aumentar a UCP1 pode ser um alvo terapêutico para o tratamento e prevenção da obesidade e doenças metabólicas correlatas. Corroborando isso, animais geneticamente modificados que expressam excessivamente UCP1, apresentam resistência à obesidade quando expostos à dietas hipercalóricas⁴⁹.

2.2 Matriz extracelular e microambiente do tecido adiposo

A organização do TA é similar à de uma colmeia. A MEC, através de uma matriz isotrópica de colágeno e fibras elásticas, é quem suporta e organiza o TA. Os adipócitos se organizam tipicamente em estruturas hexagonais imperfeitas. Para isso, a fibronectina extracelular e a laminina formam uma rede com as fibras de colágeno e fornecem pontos de ancoragem para as integrinas da membrana dos adipócitos⁵⁰. Preenchendo o espaço intersticial, estão os pequenos pré-adipócitos, capilares, nervos e células imunes, formando, assim, o microambiente do TA⁵⁰ (Figura 3).

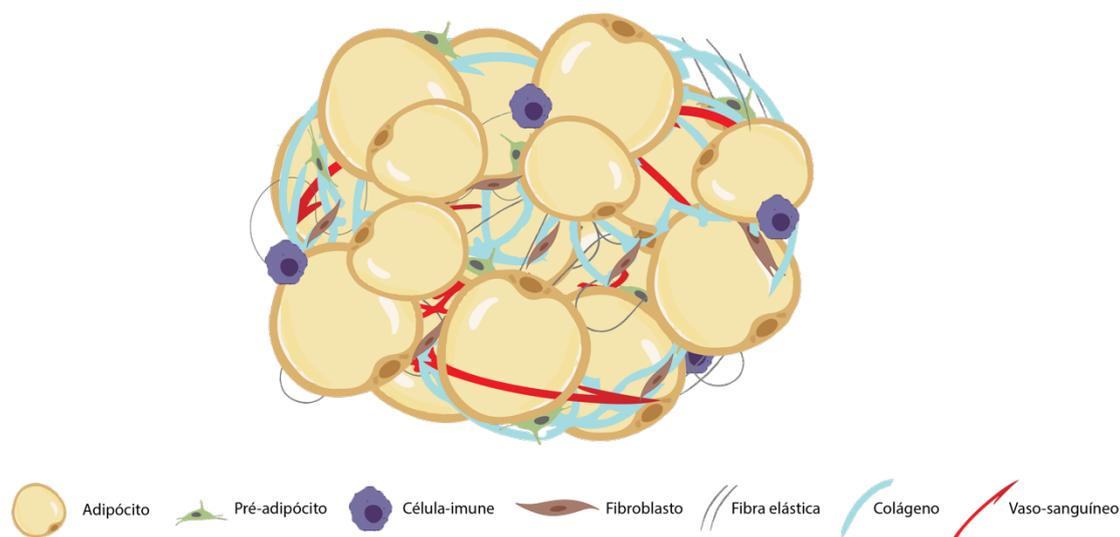


Figura 3. Composição do tecido adiposo.

As diferentes características dos depósitos de TA aparecem na expressão de componentes estruturais da MEC. O TAB-SC em relação ao TAB visceral apresenta maior expressão de colágeno tipo I e tipo VI, porém menor expressão de colágeno tipo IV, fibronectina e laminina^{51,52}. Diferenças na expressão desses

componentes estruturais da MEC entre o TAB e o TAM ainda não estão estabelecidas na literatura. Entretanto, como o acúmulo de colágeno está associado a adipócitos menores⁵² e os adipócitos do TAM são menores que do TAB⁵³, é possível que o TAM apresente maior deposição de colágeno em relação ao TAB.

A interação dos adipócitos com a MEC é balanceada para fornecer tanto flexibilidade quanto estabilidade para o tecido. A flexibilidade é necessária para hipertrofia, migração e diferenciação celular⁵⁰. Enquanto a estabilidade é um requisito para manutenção da estrutura e integridade funcional do tecido como um todo⁵⁰.

Embora as fibras de colágeno tipo I sejam as principais responsáveis pela sustentação da estrutura do TA⁵⁴, a interação dos adipócitos com a MEC pode ser melhor exemplificada pelo papel do colágeno tipo VI. O colágeno VI junto com o colágeno tipo IV medeia a ancoragem da lâmina basal aos adipócitos⁵⁵. Além disso, o colágeno VI aumenta a resistência do TA, tornando-o mais rígido, o que restringe a expansão dos adipócitos. Assim, em humanos, a ausência de colágeno tipo VI permite a infiltração distrófica de gordura nos músculos⁵⁰. Já em camundongos *knockout* para colágeno tipo VI (*Col6KO*), os adipócitos são excessivamente grandes, mas sem comprometimento na homeostase lipídica e glicêmica⁵⁰. Portanto, quanto menos rígida a MEC, maior a flexibilidade para a expansão dos adipócitos de maneira saudável³⁰.

Outros componentes do microambiente do TA, que também regulam os adipócitos, são os capilares⁵⁰. A vasculatura transporta nutrientes e hormônios para o TA e do TA para o restante do organismo⁵⁶, além de permitir a distribuição do calor produzido no TA. Os lipídios transportados na corrente sanguínea são hidrolisados em moléculas menores pela ação da lipoproteína lipase, as quais são captadas pelos adipócitos através de receptores de membrana, como o CD36⁵⁷. Conforme os lipídios se acumulam dentro da célula, o TA se expande. Essa expansão é um processo cooperativo que tanto direciona quanto requisita o remodelamento vascular⁵⁰.

Diferenças na rede vascular são observadas nos depósitos de TA. Por necessitar de grande quantidade de vasos para distribuir todo o calor produzido, o TAM é o depósito de TA mais vascularizado. De fato, são três capilares para

cada adipócito no TAM, contra um capilar por adipócito no TAB⁵². Entre os depósitos de TAB, o TAB-SC é mais vascularizado do que o TAB visceral e tem potencial angiogênico superior⁵⁸. O potencial angiogênico superior do TAB-SC pode ser um mecanismo pelo qual esse depósito é mais suscetível ao *browning* do que o TAB visceral⁵⁹.

Além da rede vascular, neurônios no TA regulam a função dos adipócitos através da liberação de neurotransmissores. A noradrenalina liberada pelos nervos simpáticos estimula os adipócitos marrons e bege, através dos receptores β_3 -adrenérgicos, a metabolizar os lipídios armazenados para termogênese e, similarmente, estimula a lipólise nos adipócitos brancos para a liberação de ácidos graxos. A estimulação β_3 -adrenérgica nos adipócitos também induz a produção e a secreção de adipocinas, como por exemplo, o fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF-21, *fibroblast growth factor 21*)⁶⁰.

O FGF-21 regula importantes aspectos do metabolismo, como o balanço energético e a homeostase glicêmica e lipídica⁶¹. Por isso ele tem sido investigado como um potencial alvo terapêutico para o tratamento e prevenção da obesidade, DM2 e dislipidemias⁶⁰. Junto com o FGF-19 e FGF-23, o FGF-21 compõe a subfamília hormonal dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF)⁶². Essa subfamília possui duas características distintas: ausência do domínio de ligação para a heparina, o que deixa os FGFs livres para serem secretados na corrente da sanguínea ao invés de sequestrados pela MEC^{60,62}, e a necessidade do correceptor Klotho para a sinalização. O Klotho compensa a baixa afinidade dos membros dessa subfamília pelos receptores de FGF (FGFr), sendo o determinante primário do local de ação dessas proteínas^{60,62}. Quando associado ao Klotho, o FGF-21 é capaz de ativar os receptores FGFr-1, FGFr-2, FGFr-3 e FGFr-4. Desses receptores, é FGFr1 quem tem a maior afinidade pelo FGF-21⁶².

O TAB, por ser pouco inervado pelo sistema nervoso simpático, apresenta reduzida capacidade para sintetizar o FGF-21, de maneira que a ação do FGF-21 ocorre principalmente de forma endócrina. Isso já não acontece com o ricamente inervado TAM⁶⁰. Tanto no TAB quanto no TAM, o FGF-21 atua estimulando os adipócitos a captarem ácidos graxos e glicose, independentemente da ação da insulina⁶⁰. Como descrito anteriormente, a

presença de ácidos graxos estimula a termogênese em adipócitos que expressam UCP1. Além do mais, um dos efeitos do FGF-21 sobre a termogênese no TA é o aumento da expressão de UCP1, que é regulado pelo aumento da expressão da PGC-1-alfa⁶³. Com isso, o FGF-21 está envolvido no *browning* do TAB e no aumento da capacidade termogênica do TAM⁶⁰. Portanto, o FGF-21 demonstra bem a integração entre os adipócitos e o microambiente do TA, representado pela vasculatura e sistema nervoso.

Portanto, o TA é formado pela interação entre adipócitos, MEC e o microambiente que ela hospeda. A consequência disso é que não é possível mexer em um desses elementos sem afetar o equilíbrio da estrutura como um todo. Dessa forma, intervenções benéficas para o TA tendem a modular cada um desses elementos, mas sem abalar a harmonia entre eles.

2.3 Treinamento físico e o tecido adiposo

Utilizado com o objetivo de melhorar ou manter a performance ou a saúde, o TFA é caracterizado por sessões planejadas, estruturadas e repetidas de atividade física, que elevam o gasto energético e desafiam a homeostase do organismo por um período prolongado^{64,65}. Os efeitos do TFA são como os de uma pílula preventiva contra 26 tipos de doenças crônicas, incluindo DCV, DM2, obesidade, esteatose hepática não-alcoólica e certos tipos de cânceres⁶⁶. A eficácia dessa pílula é diretamente associada aos efeitos que o TFA exerce sobre a capacidade aeróbia³, sendo capaz de aumentá-la em 20-40%⁶⁷.

Segundo o posicionamento da Associação Americana do Coração (*American Heart Association*), a capacidade aeróbia é um reflexo da saúde do organismo como um todo, pois integra a função de diversos sistemas³. A cadeia de processos, que integra a capacidade aeróbia, envolve a capacidade do sistema cardiovascular (coração e vasos sanguíneos) e respiratório (pulmões) de atender com precisão a demanda do músculo esquelético por sangue rico em oxigênio e nutrientes. Soma-se a isso, a capacidade do músculo esquelético de usar esses recursos para produzir energia para o movimento^{3,65}.

O aspecto orgânico da capacidade aeróbia implica que, ao aumentá-la, diversos sistemas do organismo são afetados. Assim, por exemplo, há um aumento da função cardíaca, endotelial e do músculo esquelético⁶⁷⁻⁶⁹. Além de

importantes adaptações metabólicas no organismo, tais como melhora na sensibilidade à insulina e tolerância à glicose⁷⁰, aumento na oxidação de lipídios associado com reduções no colesterol LDL e aumento no HDL⁷⁰, redução ou prevenção de ganho de peso corporal⁷⁰ relacionado com redução do tamanho médio dos adipócitos e do conteúdo de lipídios⁷¹, e maior flexibilidade metabólica, refletindo a capacidade do organismo em ajustar a oxidação do substrato energético de acordo com a disponibilidade⁷². Essa larga gama de efeitos no organismo é o que conecta o aumento da capacidade aeróbia com a redução no risco de morte por todas as causas e por DCV^{3,66}.

Parte dos efeitos observados com o TFA são mediados por alterações no TAB, como nosso grupo demonstrou anteriormente^{73,74}. Nesses estudos, observamos que camundongos submetidos ao TFA contínuo, quando comparados aos seus pares sedentários, apresentaram maior capacidade aeróbia, depósitos de TAB viscerais mais leves, com maior capacidade lipolítica, com redução da atividade enzimática da G6PDH, que atua regulando o processo lipogênico e aumento na atividade de enzimas responsáveis pela oxidação de lipídios⁷³. Enquanto no TAB-SC, observamos o aumento na expressão da UCP1 e da ATGL, que estão envolvidas na termogênese e hidrólise dos triglicerídeos, respectivamente, além de aumento na atividade de enzimas responsáveis pela lipólise⁷⁴.

Por sua vez, Stanford et al.⁷¹ ao realizarem o transplante de TAB-SC da região inguinal de camundongos treinados para a cavidade visceral de camundongos sedentários, observaram melhora na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina, e maior captação de glicose pelo TAM e pelos músculos esqueléticos nos animais transplantados. Além disso, é sabido que o TFA estimula o *browning* do TAB-SC^{75,76} e do TAB periepídimal (TAB-PE), e reduz o perfil inflamatório⁷⁷.

O TFA também reduz marcadores de remodelamento de MEC no TAB-SC^{78,79}. Camundongos alimentados com dieta rica em gordura e submetidos a um protocolo de TFA apresentaram redução na deposição de colágeno, menor expressão de colágeno e do fator de transformação de crescimento beta-1 (TGF-beta-1)⁷⁹, um potente estimulador da síntese de colágeno. Além disso,

após uma sessão de exercício aeróbio, houve redução na expressão de marcadores de remodelamento da MEC como *Tgfb1* e *Pdgf* em camundongos⁷⁸.

O HIIT é uma poderosa alternativa ao clássico TFA. O HIIT envolve repetidos períodos de alta intensidade (acima do limiar anaeróbio), intercalados por períodos de recuperação em baixa intensidade⁸⁰⁻⁸². A duração de uma sessão de HIIT, excluindo o tempo de aquecimento e volta a calma, pode ser de 10 minutos até 90 minutos⁸⁰⁻⁸². Os elementos responsáveis por essa variação no tempo para concluir as sessões de HIIT são: variações no número de repetições (3-40), na duração dos intervalos de alta intensidade (3 segundos até 8 minutos) e no tempo de recuperação (15 segundos até 5 minutos)⁸⁰⁻⁸².

Enquanto Hill inventava o conceito de $VO_2máx$ ⁸³, nas décadas de 20 e 30, o finlandês voador Paavo Nurmi, 9 vezes medalhista de ouro olímpico em provas de corrida de meia e longa distância, introduzia o HIIT no cenário mundial como uma forma eficaz de aumentar o desempenho aeróbio^{81,84}. Uma clássica sessão de HIIT realizada por Nurmi consistia em 6 intervalos de 400 metros a 24 km/h no meio da floresta^{81,84}. Não obstante, não foi Nurmi quem popularizou o HIIT.

A popularidade do HIIT veio na década de 50, com os pés do corredor Emil Zatopek e seus exterminadores treinos de 60 tiros de 400 metros⁸⁵. Com base nesses treinos, Zatopek foi o primeiro homem a correr 20 quilômetros em menos de uma hora e o único atleta a vencer os 5.000 metros, 10.000 metros e a maratona em uma mesma Olimpíada (Helskinki, 1952)⁸⁴. A partir desses fantásticos resultados, por um tempo, cada avanço nos recordes mundiais nas provas de corrida de média e longa distância pareceu estar associado com uma nova descoberta no treino intervalado^{84,85}.

Os espetaculares resultados proporcionados pelo HIIT nas pistas de corrida despertaram o interesse do mundo científico. Nos anos de 1960, os primeiros estudos científicos com o HIIT começaram a ser publicados pelos grupos de Astrand e Christensen⁸⁶⁻⁸⁹. Hoje, o acúmulo de evidências sobre o HIIT permite dizer que a eficácia dele para promover adaptações aeróbias são similares ou superiores às do TFA^{17,90}. Dados de meta-análises mostraram que o HIIT promove efeito superior ao TFA no aumento do $VO_2máx$ em indivíduos saudáveis¹⁷, com DCV¹⁸⁻²⁰ e em crianças obesas²². A meta-análise de Khalafi e Symonds⁹¹ mostra o HIIT como superior ao TFA na promoção da saúde

metabólica. Enquanto dados de duas outras meta-análises^{92,93} mostraram que os efeitos do HIIT na redução da massa corporal e adiposidade são similares aos do TFA, embora o HIIT requisite menos tempo para alcançar tais resultados⁹²

Os efeitos do HIIT sobre os diferentes depósitos de TA são bem menos conhecidos na literatura. Motta et al.⁹⁴ demonstraram que o HIIT foi capaz de aumentar a expressão proteica da PGC-1-alfa no TAB-PE de camundongos e a carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT-1), que é responsável pela entrada de ácidos graxos no interior da mitocôndria para serem oxidados. Em outro estudo, os autores observaram que o HIIT reduziu o tamanho dos adipócitos⁹⁵.

Haram et al.⁹⁶, ao executarem dois protocolos de treinamento em ratos (HIIT e TFA), observaram que o HIIT promoveu maior fosforilação do receptor da insulina no TA. Contudo, Larsen et al.⁹⁷ não observaram aumento na função mitocondrial do TAB-SC de humanos após 6 semanas de HIIT. De acordo com os autores, para humanos, protocolos mais longos podem ser necessários para observar melhoras na função mitocondrial do TA devido à lenta taxa de renovação dos adipócitos⁹⁷. Todavia, para melhorar a captação de glicose no TA de humanos, duas semanas de HIIT parecem ser suficientes⁹⁸.

Adicionalmente aos estudos mencionados anteriormente, alguns autores avaliaram os efeitos do HIIT em animais alimentados com dietas hipercalóricas⁹⁹⁻¹⁰¹. Por exemplo, Davis et al.¹⁰⁰ alimentaram camundongos com dieta rica em gordura associada a restrição calórica, calculada através do consumo médio dos animais do grupo controle. Esses animais, quando submetidos ao protocolo de HIIT não apresentaram aumento do *browning* no TAB-PE e TAB-SC, bem como não encontraram diferenças significativas na expressão da *Ucp1*, *Ffg21* e *Pgc1a*, porém apresentaram redução na expressão de *Ucp1* no TAM.

Wang et al.¹⁰¹ mostraram que o HIIT realizado por camundongos alimentados com dieta rica em gordura foi capaz de melhorar a ação da insulina, aumentar a atividade termogênica e o número de adipócitos multiloculares do TAM, bem como estimular o *browning*, avaliado por meio do aumento da UCP1 no TAB-SC. Em contrapartida, Marcinko et al.⁹⁹ não encontraram diferenças em camundongos alimentados com dieta rica em gordura e submetidos a um protocolo de HIIT nos marcadores de *browning* (*Ucp1*, *Cidea* e *Pgc1a*) no TAB-

PE. Esses achados revelam que os efeitos do HIIT são depósitos de TA dependente, e que, portanto, não podem ser generalizados para todos os depósitos de TA.

Embora a literatura forneça evidências acerca dos efeitos do HIIT nas características morfológicas e capacidade termogênica do TA, ainda há uma vasta lacuna sobre como essas respostas podem se conectar com alterações na MEC. Ainda assim, as evidências atuais não deixam dúvidas de que o HIIT proporciona benefícios para a saúde e para o desempenho aeróbio. Esses benefícios são mediados por um largo espectro de complexas adaptações no organismo. Parte dessas adaptações ocorrem nos diferentes depósitos de TA. Engajar apenas uma pequena fração dessas respostas adaptativas, podem conferir importantes benefícios para a saúde¹⁰². Desse modo, delinear os efeitos do HIIT nos diferentes depósitos de TA abre o caminho para identificar moléculas, vias e, em última instância, novos tratamentos para combater doenças crônicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Estudar os efeitos do HIIT nas características morfológicas e funcionais de diferentes depósitos de TA de camundongos.

3.2 Específicos

Investigar em camundongos sedentários e treinados:

- Os parâmetros de massa corporal e de tecidos, consumo alimentar e glicemia de jejum;
- A capacidade aeróbia;
- A morfometria dos adipócitos;
- Marcadores de MEC e de capacidade termogênica do TA.

4. METODOLOGIA

4.1 Amostra

Foram utilizados camundongos machos (C57BL/6J; n=27), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram recebidos no biotério com 4 semanas de vida. O protocolo experimental iniciou quando os animais atingiram 6 semanas de vida. No início do protocolo experimental, os animais foram separados aleatoriamente em 2 grupos experimentais: sedentário (S, n=15) e treinado (T, n=12).

Os animais foram mantidos em caixas compartilhadas (n=4-5), dentro de estante refrigerada com temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$; com ciclo claro-escuro invertido de 12-12 horas, iniciando às 7 horas. Água e comida foram administradas *ad libitum*. Todos os procedimentos seguiram as normas do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovadas pelos Comitês de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo (protocolo número 001/2018) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo número 1149/2018).

4.2 Desenho experimental

Antes do início do protocolo experimental todos os animais realizaram teste esforço físico máximo. Na primeira semana de protocolo experimental foi avaliada a glicemia de jejum dos animais. Na segunda, quarta e sexta semanas foram realizados novos testes de esforço físico para reajuste da velocidade de treino. Na sétima semana foi reavaliada a glicemia de jejum, enquanto na oitava semana, foi realizado o último teste de esforço físico em todos os animais. Quarenta e oito horas após esse teste, foi realizado o procedimento de morte dos animais para a coleta dos tecidos, os quais foram destinados para as avaliações *in vitro*. O resumo do desenho experimental pode ser observado na Figura 4.

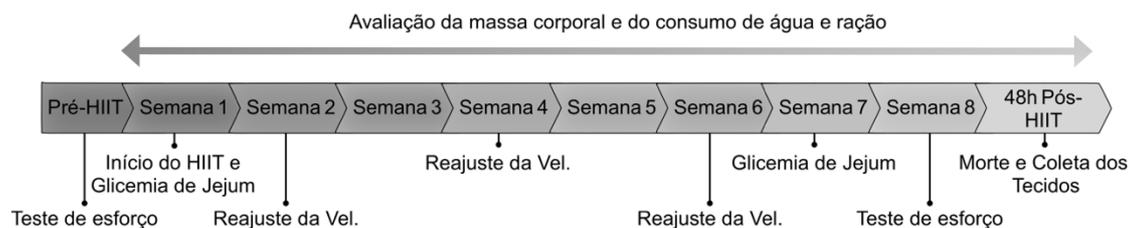


Figura 4. Representação do desenho experimental.

4.3 Protocolo de treinamento físico (HIIT)

O HIIT foi realizado em esteira rolante com inclinação a 25°, 5 vezes por semana, durante 8 semanas, de acordo com protocolo adaptado de Kemi et al.¹⁰³. A sessão de treino (Figura 5) teve duração de uma hora e consistiu em um aquecimento de 7 minutos (40% V_{máx.}), seguido por 8 intervalos de 4 minutos de corrida (85% V_{máx.}), com intervalos de 2 minutos de recuperação ativa (40% V_{máx.}) e finalizada com 7 minutos de corrida a 40% V_{máx.}. Os reajustes de velocidade foram realizados a cada duas semanas por meio da realização de teste de esforço físico máximo, conforme descrito no tópico 4.4.1. Os camundongos S foram submetidos a caminhada na esteira 3 vezes por semana, durante 5 minutos para manterem a habilidade de corrida e reduzir o efeito do estresse.

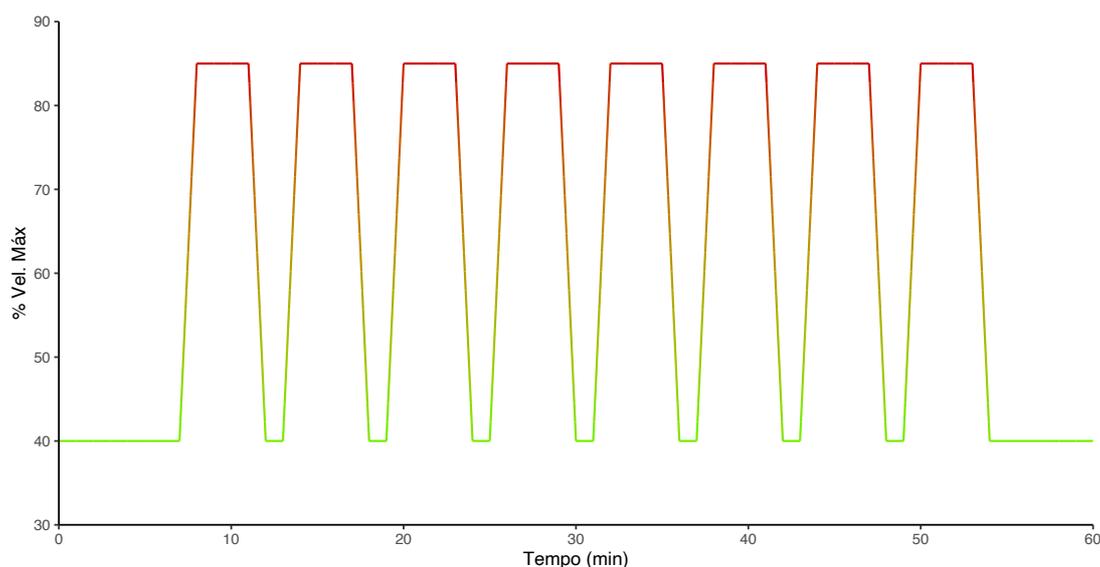


Figura 5. Representação de uma sessão de HIIT.

4.4 Determinação da capacidade aeróbia máxima

4.4.1 Protocolo do teste de esforço físico máximo

O protocolo de teste de esforço para determinar o $VO_{2m\acute{a}x}$ e a velocidade de treino foi adaptado de Kemi et al.¹⁰³, e consistiu em 5 minutos a 11 cm/s seguido de aumentos de 3 cm/s a cada 2 minutos, com 25° de inclinação da esteira. O aumento na velocidade prosseguiu até que o animal se recusasse a correr, mesmo após ser estimulado por 10 segundos.

4.4.2 Calorimetria indireta

A avaliação por calorimetria indireta ocorreu após os animais serem adaptados ao sistema por três dias antes do teste. A adaptação consistiu em colocar os animais para caminhar por 15 minutos a 8 cm/s. Após os animais estarem adaptados ao sistema, o metabolismo de repouso foi avaliado por 30 minutos. Para a análise foram considerados os últimos 5 minutos. Foram registrados, através do programa Metabolism® (Oxylet System, Panlab, Barcelona, Espanha), o consumo de oxigênio (VO_2 , ml/kg/min), a produção de gás carbônico (VCO_2 , ml/kg/min), o coeficiente respiratório (QR) e o gasto energético (GE).

A partir dos valores médios de VO_2 e VCO_2 de repouso foram calculados a utilização de substratos energéticos, carboidratos e lipídios em mg/kg/min, utilizando a fórmula descrita por Ferrannini¹⁰⁴:

$$\text{Oxidação de carboidratos} = (VO_2 \cdot 4,55) - (VCO_2 \cdot 3,21)$$

$$\text{Oxidação de lipídios} = (VO_2 \cdot 1,67) - (VCO_2 \cdot 1,67)$$

Logo após a avaliação do metabolismo de repouso, os animais foram submetidos ao teste de esforço físico máximo, seguindo o protocolo descrito no tópico anterior (3.3.1). Foram registrados os mesmos parâmetros que foram avaliados durante o repouso. A partir deles, foram calculados: VO_{2pico} (ml/kg/min), definido como o maior valor de VO_2 , considerando o último estágio concluído e o último estágio não-concluído; consumo máximo de oxigênio ($VO_{2m\acute{a}x}$, ml/kg/min), utilizando a média do VO_2 do último estágio do teste de esforço. No momento do $VO_{2m\acute{a}x}$ foram calculados o gasto energético (GE, kcal/kg/min), QR máximo (QR_{máx}) e a utilização de substratos energéticos.

Também foi calculada a intensidade de exercício correspondente ao VO_2 máx (iVO_2 , km/h), utilizando a fórmula adaptada de Machado, Caputo e Denadai¹⁰⁵:

$$iVO_2 = \text{Velcon} + \left(\frac{t}{120} \right) \cdot 0,1$$

A Velcon corresponde a velocidade em km/h do último estágio concluído; t refere-se ao tempo em que o animal permaneceu no último estágio não-concluído; 120 ao tempo de duração de cada estágio em segundos; 0,1 a taxa de incremento na velocidade a cada estágio em km/h.

A partir da cinética do VO_2 e VCO_2 foram calculados a cinética do QR, carboidratos e lipídios. Adicionalmente, utilizando o VO_2 máx, foi determinada a cinética do custo relativo de corrida a partir da porcentagem do VO_2 máx utilizada durante o teste.

4.5 Massa corporal

A avaliação da massa corporal dos animais foi realizada em balança digital. Os valores foram coletados durante todo o protocolo experimental, às terças, quartas e quintas-feiras, antes da realização do protocolo de HIIT. A média dos três registros foi utilizada para calcular a evolução da massa corporal por semana. Adicionalmente, foi calculado o ganho de massa corporal dos animais através da diferença entre a massa corporal final e a massa corporal inicial.

4.6 Consumo de ração e água

Durante todo o protocolo experimental, o consumo de ração e de água dos animais foi monitorado por três dias consecutivos (terça, quarta e quinta-feira). Foi utilizada a média do consumo dos três dias avaliados para calcular o consumo médio de ração e água por semana.

4.7 Glicemia de jejum

Com intuito de caracterizar o modelo experimental, a glicemia de jejum dos animais foi avaliada no início e ao final do protocolo. Para isso, os animais

foram submetidos a 8 horas de restrição alimentar e, em seguida, uma amostra de sangue foi coletada e analisada em glicosímetro (Accu-Chek, Performa).

4.8 Procedimento de morte dos animais e coleta dos tecidos

Ao final do protocolo experimental (48 horas após última sessão de treino), os animais foram submetidos a restrição alimentar de 8 horas e posteriormente, anestesiados por injeção i.p. de pentobarbital (3 mg / 100 g de peso corporal). No momento em que o animal não mais demonstrou sinais de reflexo nas patas traseiras, foi feita a avaliação da massa corporal e do comprimento naso-anal.

A coleta do sangue foi seguida da coleta e avaliação da massa dos depósitos de TAB (TAB-SC e TAB-PE) e tecido adiposo marrom interescapular (TAM). Parte dos depósitos de TA foi armazenada em freezer -80° C e parte fixada em solução de formalina 4%¹⁰⁶.

Após a coleta dos depósitos de TA, a tíbia dos animais foi coletada e mensurada. E, utilizando a medida do comprimento naso-anal e da massa corporal, o índice de de Lee¹⁰⁷ foi calculado através da fórmula:

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{massa corporal (g)}}}{\text{Comprimento naso-anal (mm)}} \cdot 10$$

4.9 Histologia do tecido adiposo

Os depósitos de TA foram coletados e conservados em solução de formalina 4% durante 24 horas, e em seguida, foram mantidos em álcool 70% por 48 horas para a fixação do tecido. Na sequência, os tecidos foram processados (desidratação, diafanização e parafinização do material) e incluídos em parafina. Os blocos de tecido foram cortados em seções de 3 µm para as colorações com hematoxilina e eosina (H&E) e picrosirius red (PSR), enquanto para imunohistoquímica foram feitas seções de 2µm.

4.9.1 Análise morfológica do TA

Os cortes corados com H&E foram observados em microscopia de campo claro (*bright-field*), aumento de 400x, no microscópio Leica DMLS. Foram coletadas 10 imagens por corte através do programa Leica Q Win Plus (V. 3.5.1).

A análise das imagens foi realizada com o programa ImageJ (V. 1.53k). Para os cortes de TAB-SC e TAB-PE foram quantificadas a área (μm^2) de todas os adipócitos (≥ 50 adipócitos por animal), exceto aqueles localizados na borda do campo de imagem, de acordo com metodologia adaptada de Heinonen et al.¹⁰⁸. A área dos adipócitos foi distribuída em quartis, de forma que os adipócitos que ficaram no quartil 1 foram classificadas como pequenos; no intervalo interquartil 1 e 2, médios; no intervalo interquartil 2 e 3, grandes; e acima do quartil 3, muito grandes.

A partir da área (A) dos adipócitos e assumindo um formato esférico, foi calculado o diâmetro (d) dos adipócitos utilizando a seguinte fórmula¹⁰⁹:

$$d=2\left(\sqrt{\frac{A}{\pi}}\right)$$

Com o diâmetro dos adipócitos, foi calculado o volume (V) em picolitros (pL) deles¹¹⁰:

$$V=\frac{\left(\frac{4}{3}\cdot\pi\cdot\left(\frac{d}{2}\right)^3\right)}{1000}$$

A massa (m) dos adipócitos foi calculada considerando que os adipócitos são compostos de um material com a densidade da trioleína ($\rho=9,15 \mu\text{g/pL}$ ^{10,108,111}):

$$m=V\cdot\rho$$

O número de adipócitos (n) em cada depósito foi estimado dividindo a massa do tecido pela massa média dos adipócitos para cada animal¹⁰⁸:

$$n=\frac{\text{massa do depósito } (\mu\text{g})}{\text{Massa média dos adipócitos } (\mu\text{g})}$$

Por sua vez, a análise das imagens de TAM também foi realizada com o programa ImageJ (V. 1.53k), entretanto, foi adotado um procedimento automático de quantificação da área das gotículas. Para isso, foi desenvolvida uma macro com o seguinte pipeline: calibrar a imagem; extrair o canal verde do *stack* RGB; remover ruídos (*despeckle*); subtrair o background da imagem com o método de *sliding paraboloide* com raio de 346 pixels; aplicar um filtro de mediana com raio de 4 pixels para evitar que ruídos sejam destacados ao aumentar a nitidez da imagem; aumentar a nitidez da imagem com o filtro

unsharp mask, raio de 3 pixels e peso da máscara de 0.9; obter o contorno da imagem usando o filtro de chapéu mexicano (*Mexican hat filter*); transformar a imagem em binária; remover ruídos com iterações de operações binárias de abrir, fechar e dilatar; por fim, separar uma gotícula lipídica da outra com o algoritmo de *watershed* e tolerância de 2.

Com as gotículas devidamente separadas, elas foram analisadas e a área de cada uma delas foi obtida. A partir da área das gotículas, foram realizadas para o TAM, as mesmas análises que foram realizadas para o TAB-SC e TAB-PE descritas acima.

4.9.2 Análise do colágeno

Para avaliar a deposição de colágeno nos depósitos de TAB-SC, TAB-PE e TAM, foi preparado o corante PSR através da diluição do Direct Red 80 (Sigma-Aldrich) em solução aquosa saturada com ácido pícrico (1,3%), na proporção de 1g/L. Os cortes foram corados por uma hora com o corante. Na sequência, os cortes foram observados com o microscópio Leica DMLS em microscopia de campo-claro e de luz polarizada, com aumento de 400x. Dez imagens por corte foram capturadas com software Leica Q Win Plus (V. 3.5.1) e analisadas com o software ImageJ (V. 1.53k).

As imagens de campo-claro foram utilizadas para quantificar a deposição de colágeno no corte. Para isso uma macro no imageJ foi desenvolvida. O pipeline adotado na macro foi: calcular a área total do corte; transformar a imagem em *Lab Stack* e selecionar a imagem "a*", pois nessa imagem a marcação do PSR se destaca das outras estruturas por aparecer na cor branca; selecionar a marcação do PSR aplicando o ajuste de *Threshold*; por fim, a marcação do PSR foi calculada como porcentagem de área positiva por área de tecido.

Enquanto as imagens feitas com luz polarizada foram utilizadas para quantificar a proporção entre fibras de colágeno do tipo I e III¹¹². As fibras do tipo I foram consideradas como as estruturas com cor do vermelho ao amarelo, e as fibras do tipo III com cor verde¹¹². Para obter essa proporção, uma macro foi desenvolvida com o seguinte pipeline: calcular a área total da imagem; aplicar filtro de *Unsharp Mask*, com raio de 9 pixels e máscara de 0,6, para destacar as

fibras polarizadas; aplicar um filtro de mediana com raio de 3 e de *Gaussian Blur* com sigma de 2, para remover artefatos da imagem; aplicar o método *Color Deconvolution* para selecionar todo espectro do vermelho ao amarelo; reaplicar o *Color Deconvolution* para selecionar o espectro do verde¹¹³. Com isso, foi calculado a área ocupada pelas fibras do tipo I e do tipo III em relação a área total do tecido e calculado a razão entre elas.

Adicionalmente, as imagens feitas com luz polarizadas foram utilizadas para quantificar características individuais das fibras de colágeno. O método de análise utilizado foi proposto e validado por Drifka et al.¹¹⁴. Dessa maneira, as imagens foram, primeiramente, preparadas com o software ImageJ (V. 1.53k) através da conversão delas para 8-bit. Na sequência, as imagens foram quantificadas com o software CT-FIRE (V. 2.0) para obter o comprimento, espessura e retidão das fibras de colágeno.

4.10 Imunohistoquímica

Para o ensaio de imunohistoquímica, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica através da utilização de alta temperatura (123°C) e tampão citrato (0,01%, pH=6). Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 10 volumes, bloqueio de proteínas com *Super Block* (Scytek Laboratories) e incubação *overnight* com o anticorpo primário anti-TGF-beta-1 (Santa-Cruz, sc-146; 1:2000). Na sequência, foi realizada a incubação com polímero anti-coelho para tecido de camundongo (Nichirei Bioscience Inc.). A marcação foi revelada utilizando o 3,3'-Diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, D7304) como cromógeno, por três minutos. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris (Merck). Foram feitas 10 imagens por corte com aumento de 400x, utilizando o programa Leica QWin Plus V. 3. As imagens foram analisadas com o software ImageJ (V. 1.53k), utilizando o método de *Color Deconvolution*¹¹⁵ e os resultados apresentados como porcentagem de área positiva por área de tecido.

4.11 Western Blot

As amostras de TA foram homogeneizadas em tampão de extração de proteínas, contendo 1 M HEPES, 2 M NaCl, 20% SDS, 0,5 M EDTA e 100 mM

Benzamidina, pH=7,4, acrescido do coquetel inibidor de protease e fosfatase, sem EDTA (Thermo Scientific), na concentração de 10 µl/ml. A proporção entre tecido (mg) e tampão (µl) utilizada foi de 1:4.

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, 4°C, por 10 min. Na sequência, foi coletado o infranadante. Uma parte dele foi destinada para quantificar a concentração de proteína, através do kit de ensaio proteico BCA™ (PIERCE Biotechnology). Enquanto a outra parte foi armazenada a - 80°C para as posteriores análises por *Western Blot*.

Para os ensaios de *Western Blot* do TAB-SC e TAB-PE foram utilizadas amostras contendo 60µg de proteína e para o TAM foram utilizadas amostras com 40µg de proteína. As amostras foram aplicadas em géis de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), para separar, por eletroforese, as proteínas de acordo com a massa molecular. Após as proteínas estarem separadas no gel, elas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) por 2 horas.

Com a transferência concluída, a membrana foi bloqueada por 1h em temperatura ambiente com solução de BSA 5% e incubada *overnight*, a 4°C, com o anticorpo primário. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-UCP1 (Abcam, ab10983; concentração de 1:1000), anti-PGC-1-alfa (Abcam, ab191838; 1:1000), anti-Fibronectina (Abcam, ab2414; 1:1000), e anti-FGF-21 (Abcam, ab171942; 1:1000). Como normalizador, foi utilizado o anti-beta-actina (Santa-Cruz, sc-4778; 1:2000).

Após a incubação e a remoção do anticorpo primário, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário de cabra anti-coelho marcado com HRP (Invitrogen, New York, USA; 1:1000). Todos os anticorpos utilizados foram diluídos em solução de BSA 5%.

Por fim, o sinal da membrana foi detectado por meio da reação da peroxidase na solução de ECL, durante exposição no equipamento Image Quant LAS 4000mini (GE Healthcare Lifescience®). A intensidade das bandas foi quantificada pelo programa ImageJ (V. 1.53k).

4.12 Análise estatística

Os dados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão da média e comparados através do teste *t-student* ou da análise de variância de um ou dois fatores (ANOVA). Para as análises de ANOVA com diferença estatística, foi utilizado o post-hoc de Tukey.

Os dados obtidos foram utilizados para criar um *heatmap* de correlação de Pearson entre as variáveis. O nível de significância foi calculado através da distribuição t. As correlações em que o número de pares foi <3 não foram calculadas e estão apresentadas no *heatmap* como um bloco cinza.

Em todos os casos foi adotado nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Todas as análises foram feitas com R (V. 4.0.2).

5. RESULTADOS

5.1 Metabolismo de repouso

Conforme pode ser observado na Tabela 1, o metabolismo de repouso dos animais avaliado por calorimetria indireta não foi alterado pelo HIIT, ou seja, o VO_2 , QR, gasto energético, oxidação de carboidratos e lipídios não diferiram entre os grupos.

Tabela 1 Metabolismo de repouso após o protocolo de HIIT.

	Sedentário (n=15)	Treinado (n=12)
VO_2 (ml/min/kg)	37,36 \pm 2,92	35,42 \pm 2,16
QR	0,86 \pm 0,02	0,84 \pm 0,04
GE (kcal/min/kg)	273,21 \pm 20,16	251,40 \pm 15,34
Oxi. CHO (mg/kg/min)	53,92 \pm 6,42	48,09 \pm 8,05
Oxi. LIP (mg/kg/min)	8,91 \pm 3,97	7,49 \pm 3,02

VO_2 , consumo de oxigênio; QR, quociente respiratório; GE, gasto energético; Oxi. CHO, oxidação de carboidratos; Oxi. LIP, oxidação de lipídios.

5.2 Capacidade aeróbia e gasto energético

Antes do início do protocolo de HIIT, os grupos experimentais não diferiam na velocidade máxima atingida no teste de esforço físico máximo ($S = 34,06 \pm$

1,86 cm/s; T= 36,35 ± 1,27 cm/s). Para avaliar a resposta metabólica, parte dos animais foram submetidos ao teste de esforço físico máximo no sistema calorimetria indireta. Não foram observadas diferenças entre os grupos no tempo máximo de teste, velocidade máxima, iVO_2 , $VO_{2m\acute{a}x}$, VO_{2pico} , $QR_{m\acute{a}x}$, $GEm\acute{a}x$ e oxidação de carboidratos e de lipídios (Tabela 2). É importante ressaltar que o $QR_{m\acute{a}x} \geq 1$ confirma que o teste foi máximo¹¹⁶ e conforme os dados obtidos no teste de esforço físico máximo (Tabela 2 e Tabela 3), ambos os grupos experimentais atingiram o máximo no esforço.

Ao final do protocolo de HIIT, o grupo T teve desempenho superior ao grupo S no teste de esforço físico máximo, pois o tempo até a exaustão, velocidade máxima, iVO_2 , $VO_{2m\acute{a}x}$, VO_{2pico} e $GEm\acute{a}x$ foram significativamente maiores (Tabela 3). O $QR_{m\acute{a}x}$, a oxidação de carboidratos e de lipídios não foram diferentes entre os grupos.

Tabela 2 Parâmetros metabólicos avaliados no teste de esforço físico pré-HIIT.

	Sedentário (n=6)	Treinado (n=6)
Tempo até exaustão (min)	20,67 ± 1,07	22,00 ± 0,77
Velocidade máxima (cm/s)	29,00 ± 1,41	31,50 ± 1,20
iVO_2	1,00 ± 0,05	1,07 ± 0,05
$VO_{2m\acute{a}x}$ (ml/kg/min)	39,82 ± 2,77	39,99 ± 2,48
VO_{2pico} (ml/kg/min)	45,21 ± 2,93	45,98 ± 3,01
$QR_{m\acute{a}x}$	1,08 ± 0,08	1,04 ± 0,09
$GEm\acute{a}x$ (kcal/min/kg)	288,85 ± 15,76	291,76 ± 14,41
Oxi. CHO (mg/kg/min)	53,27 ± 5,65	54,96 ± 5,81
Oxi. LIP (mg/kg/min)	1,75 ± 1,03	1,83 ± 1,83

iVO_2 , intensidade associada ao $VO_{2m\acute{a}x}$; $VO_{2m\acute{a}x}$, consumo máximo de oxigênio; VO_{2pico} , consumo pico de oxigênio; $QR_{m\acute{a}x}$, quociente respiratório ao final do teste de esforço; GE, gasto energético ao final do teste de esforço; Oxi. CHO, oxidação de carboidratos no $VO_{2m\acute{a}x}$; Oxi. LIP, oxidação de lipídios no $VO_{2m\acute{a}x}$.

Tabela 3 Parâmetros metabólicos avaliados no teste de esforço físico pós-HIIT.

	Sedentário (n=15)	Treinado (n=11)
Tempo até exaustão(min)	21,87 ± 0,51	30,64 ± 0,83*
Velocidade máxima (cm/s)	31,20 ± 0,74	44,27 ± 1,24*
iVO₂	1,05 ± 0,03	1,49 ± 0,04*
VO₂máx (ml/kg/min)	44,71 ± 2,53	54,85 ± 2,73*
VO₂pico (ml/kg/min)	49,06 ± 2,33	62,40 ± 3,50*
QRmáx	0,99 ± 0,04	1,01 ± 0,04
GEmáx (kcal/min/kg)	324,58 ± 17,06	390,20 ± 19,72*
Oxi. CHO (mg/kg/min)	66,19 ± 8,82	77,38 ± 8,83
Oxi. LIP (mg/kg/min)	3,26 ± 2,95	1,79 ± 3,12

iVO₂, intensidade associada ao VO₂máx; VO₂máx, consumo máximo de oxigênio; VO₂pico, consumo pico de oxigênio; QRmáx, quociente respiratório ao final do teste de esforço; GE, gasto energético ao final do teste de esforço; Oxi. CHO, oxidação de carboidratos no VO₂máx; Oxi. LIP, oxidação de lipídios no VO₂máx. *p<0,05 vs. Sedentário.

Quanto as cinéticas do VO₂ (Figura 6A), do QR (Figura 6C) e da oxidação de carboidratos e de lipídios (Figura 6D) durante o teste de esforço físico pós-HIIT, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos. Contudo, a cinética do custo relativo de corrida (Figura 6B) revelou que os animais treinados apresentaram maior economia de corrida durante os estágios intermediários do teste (minutos 14, 15 e 16).

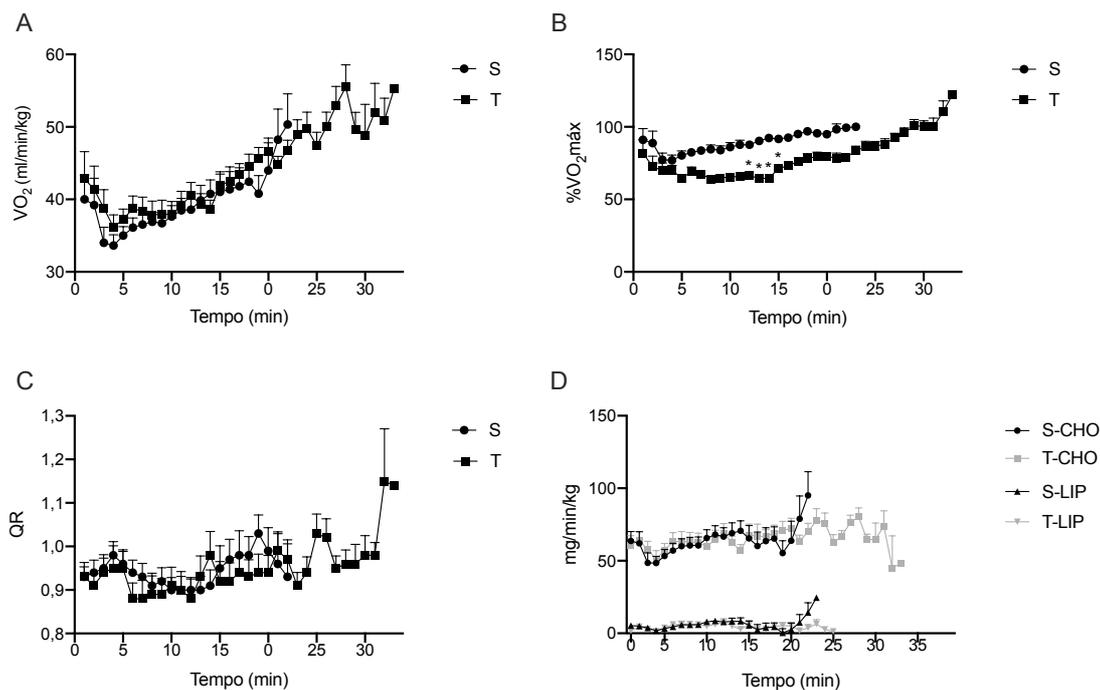


Figura 6. Cinética durante o teste de esforço físico máximo: A) Consumo de oxigênio, VO₂ (ml/min/kg); B) Custo relativo da corrida (%VO₂máx); C) Quociente respiratório (QR); D) Oxidação de carboidrato (CHO) e lipídios (LIP). S, Sedentário (n=15); T, Treinado (n=11). *p<0,05 vs. S.

5.3 Consumo de água e ração

O protocolo de HIIT não resultou em diferenças significativas no consumo de água (Figura 7A) nem de ração (Figura 7B) dos animais ao longo das semanas. Quando calculado o consumo médio de água (Figura 7C) e de ração (Figura 7D), ambos também não diferiram entre os grupos.

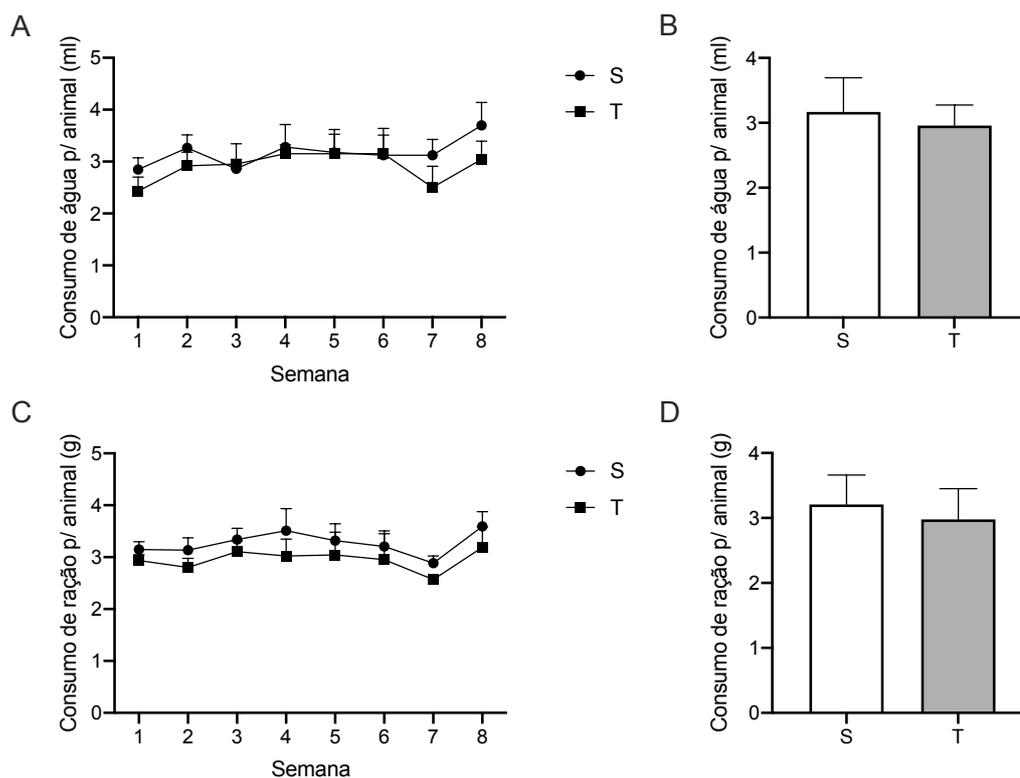


Figura 7. Consumo de água e ração. A) Consumo de água ao longo das semanas; B) Consumo médio de água; C) Consumo de ração ao longo das semanas; D) Consumo médio de ração. S, Sedentário (n=15); T, Treinado (n=12).

5.4 Massa corporal e dos depósitos de TA

O protocolo experimental iniciou com a massa corporal dos grupos pareada. No entanto, ao longo das semanas, os animais T apresentaram menor massa corporal comparados aos animais S, sendo significativa a diferença a partir da sexta semana. (Figura 8A). Ademais, observamos menor ganho de massa corporal dos animais T no final do protocolo experimental (Figura 8B). A diferença de massa corporal entre os grupos não refletiu em diferença significativa no índice de Lee (Figura 8C).

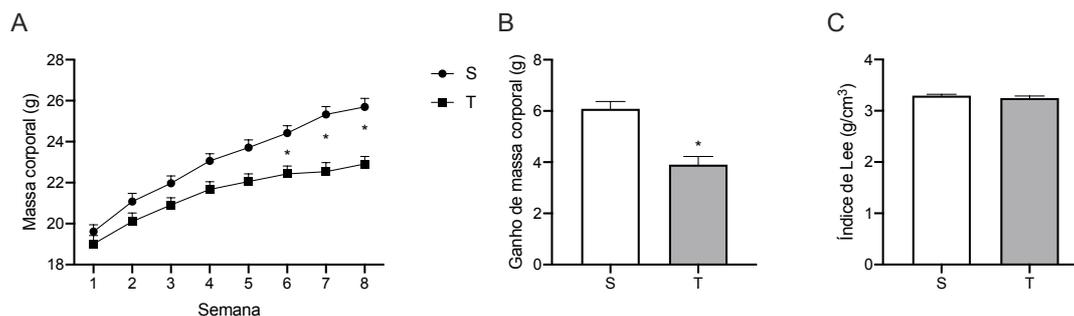


Figura 8. A) Evolução da massa corporal ao longo das semanas de protocolo experimental; B) Ganho de massa corporal; C) Índice de Lee. S, sedentário (n=15); T, treinado (n=12). *p<0,05 vs. S.

Não foram observadas diferenças nas massas dos depósitos de TAB-SC e TAM (Figura 9). Entretanto, a massa do TAB-PE foi significativamente menor no grupo T comparado ao grupo S.

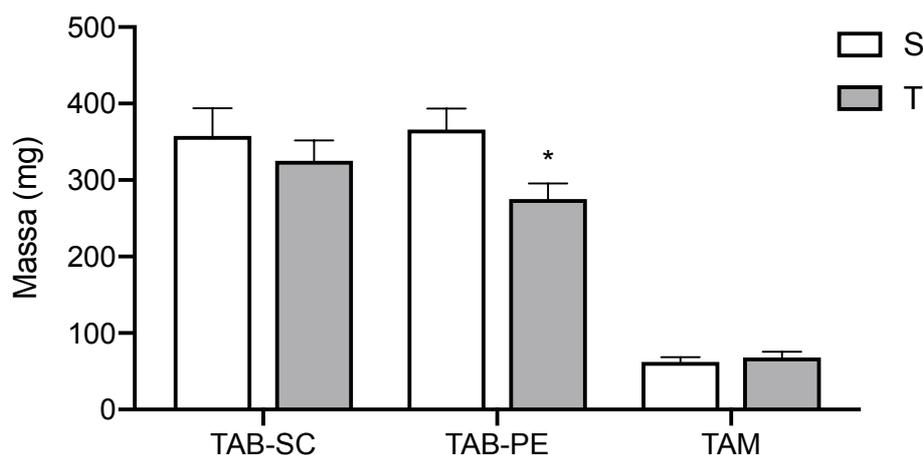


Figura 9. Massa dos depósitos adiposos: TAB-SC, tecido adiposo branco subcutâneo; TAB-PE, tecido adiposo branco periepidual; TAM, tecido adiposo marrom. S, Sedentário (n=15); T, Treinado (n=12). *p<0,05 vs. TAB-PE, S.

5.5 Glicemia de jejum

Embora os animais treinados tenham apresentado menor massa do TAB-PE, um depósito visceral, e isso esteja associado com benefícios no metabolismo glicêmico, a glicemia de jejum não foi diferente entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 Glicemia de jejum

	Pré-HIIT (mg/dl)	Pós-HIIT (mg/dl)
Sedentário (n=6)	150,33 ± 5,30	145,33 ± 6,38
Treinado (n=5)	135,60 ± 3,17	134,00 ± 7,62

5.6 Morfologia dos adipócitos e gotículas lipídicas

A Figura 10A mostra os cortes histológicos utilizados para a análise da morfologia dos adipócitos do TAB-SC. Observamos que o grupo T apresentou área (Figura 10B) diâmetro (Figura 10C), volume (Figura 10D) e massa (Figura 10E) significativamente menores comparadas ao grupo S. Além disso, o grupo T apresentou maior frequência de adipócitos pequenos e menor frequência de adipócitos muito grandes, porém não houve diferença na frequência de adipócitos com tamanho médio e grande (Figura 10F). Ao usar a massa dos adipócitos para estimar o número de adipócitos no TAB-SC (Figura 10G), foi observado um maior número de adipócitos no grupo T comparado ao S.

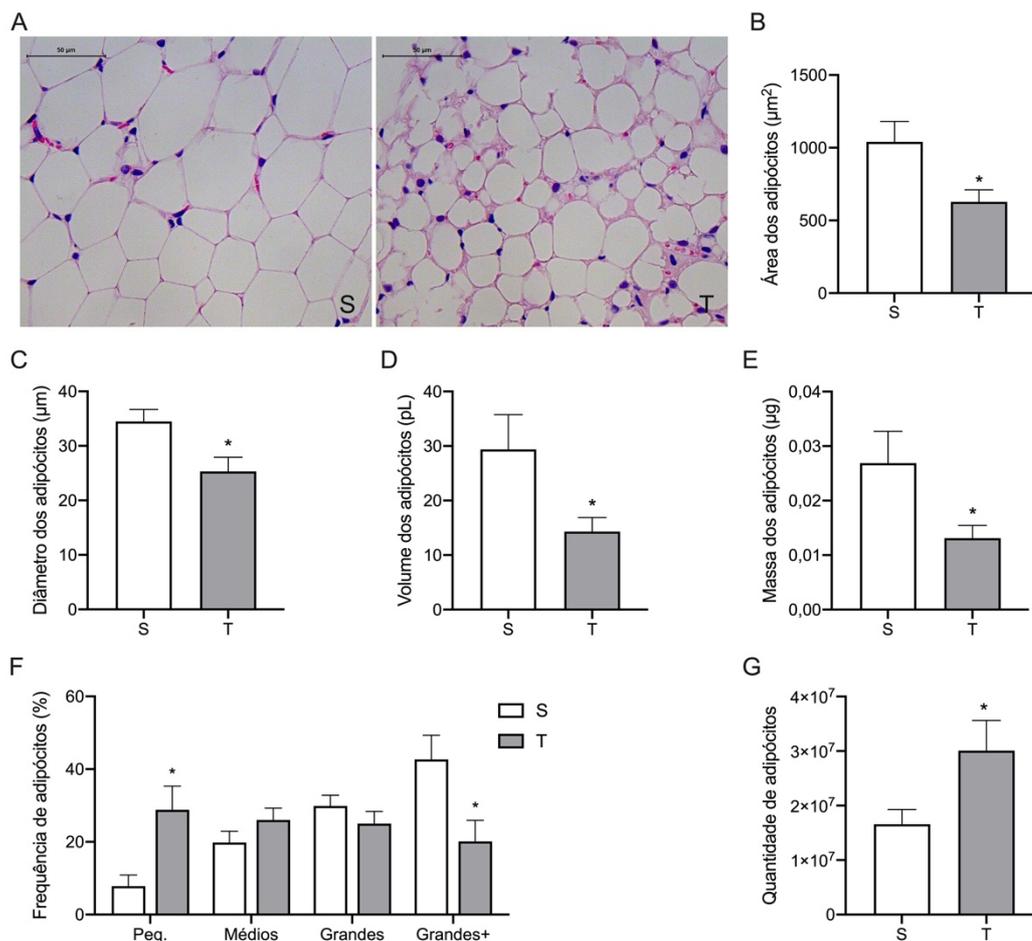


Figura 10. A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido adiposo subcutâneo corado com hematoxilina e eosina (400x); B) Área dos adipócitos; C) Diâmetro dos adipócitos; D) Volume dos adipócitos; E) Massa dos adipócitos; F) Frequência de distribuição de adipócitos por tamanho: pequenos, médios, grandes e muito grandes (grandes+); G) Estimativa da quantidade de adipócitos no tecido. S, sedentário (n=8); T, treinado (n=9). * $p < 0,05$ vs. S.

Resultados similares foram encontrados na morfologia dos adipócitos do TAB-PE (Figura 11A). Dessa forma, os animais T apresentaram adipócitos com menor área (Figura 11B), diâmetro (Figura 11C), volume (Figura 11D) e massa (Figura 11E) comparados aos animais S. Em relação a distribuição dos adipócitos por tamanho, os grupos não apresentaram diferenças na frequência de adipócitos pequenos, médios e grandes, contudo os animais T apresentaram menor frequência de adipócitos muito grandes (Figura 11F). Ademais, diferentemente do que ocorreu no TAB-SC, não houve diferença no número de adipócitos no TAB-PE (Figura 11G).

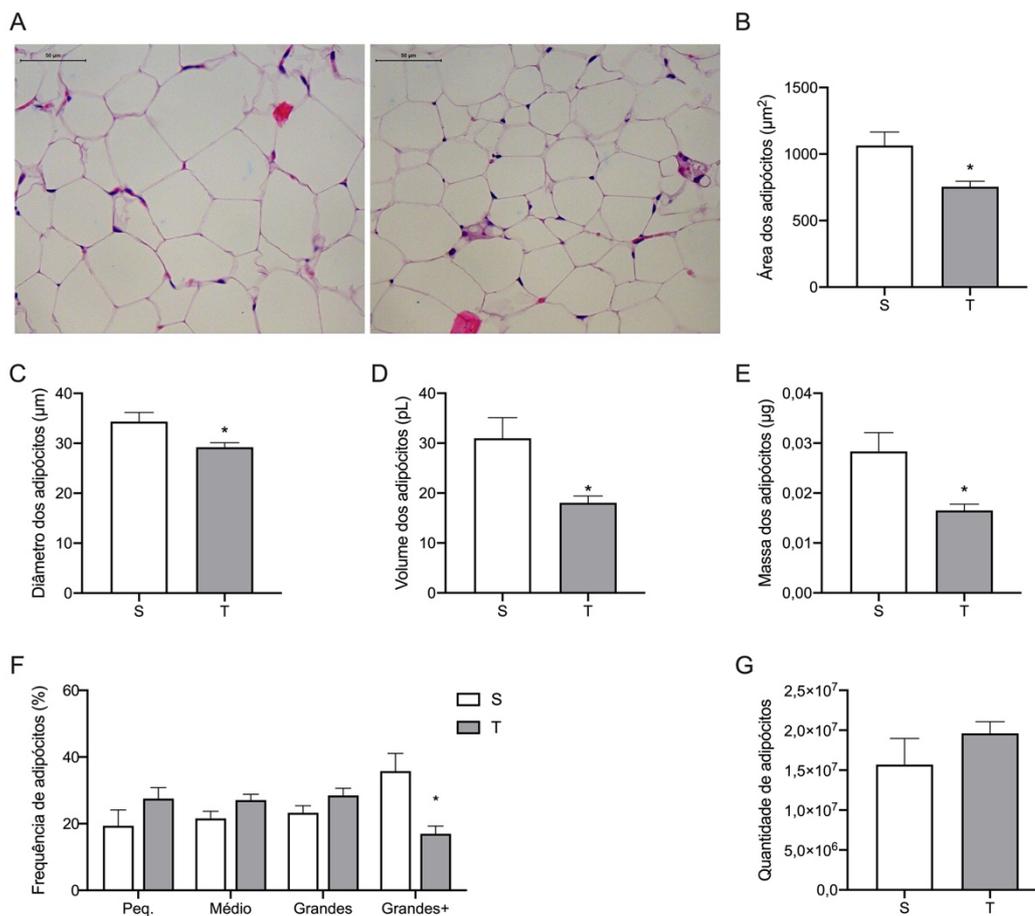


Figura 11. A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido adiposo periepididimal corado com hematoxilina e eosina (400x); B) Área dos adipócitos; C) Diâmetro dos adipócitos; D) Volume dos adipócitos; E) Massa dos adipócitos; F) Frequência de distribuição de adipócitos por tamanho: pequenos, médios, grandes e muito grandes (grandes+); G) Estimativa da quantidade de adipócitos no tecido. S, sedentário (n=8); T, treinado (n=6). * $p < 0,05$ vs. S.

No TAM, a análise da morfologia das gotículas lipídicas (Figura 12A) não permitiu identificar diferenças significativas entre os grupos. Destarte, a área, diâmetro, volume, massa, distribuição por tamanho e quantidade de gotículas lipídicas (Figura 12B-G) não foram diferentes entre os grupos experimentais.

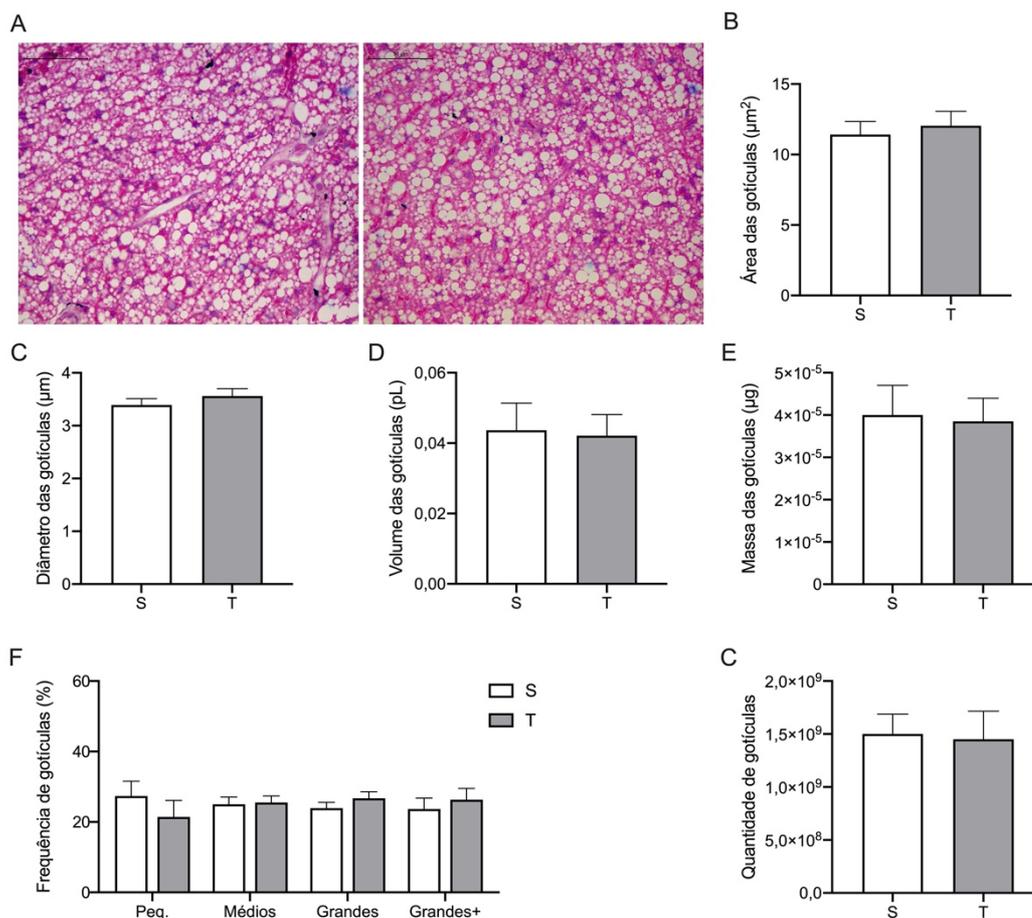


Figura 12. A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido adiposo marrom corado com hematoxilina e eosina (400x); B) Área das gotículas lipídicas C) Diâmetro das gotículas; D) Volume das gotículas; E) Massa das gotículas; F) Frequência de distribuição de gotículas por tamanho: pequenos, médios, grandes e muito grandes (grandes+); G) Estimativa da quantidade de adipócitos no tecido. S, sedentário (n=8); T, treinado (n=6). *p<0,05 vs. S.

5.7 Matriz extracelular do TA

A avaliação do colágeno no TAB-SC por meio da coloração de PSR em campo claro, representada na Figura 13A, não revelou diferença na deposição de colágeno entre os grupos experimentais (Figura 13B). Enquanto a análise feita com luz polarizada, exemplificada na Figura 13C, permitiu observar um aumento significativo na proporção de fibras de colágeno tipo I em relação as do tipo III nos animais T (Figura 13D). As características individuais das fibras de colágeno, representada na Figura 13E também foram avaliadas e não foram identificadas diferenças entre os grupos no comprimento das fibras de colágeno

(Figura 13F) e na espessura (Figura 13G), porém foi observada redução significativa na retidão das fibras de colágeno no grupo T (vs. S; Figura 13H).

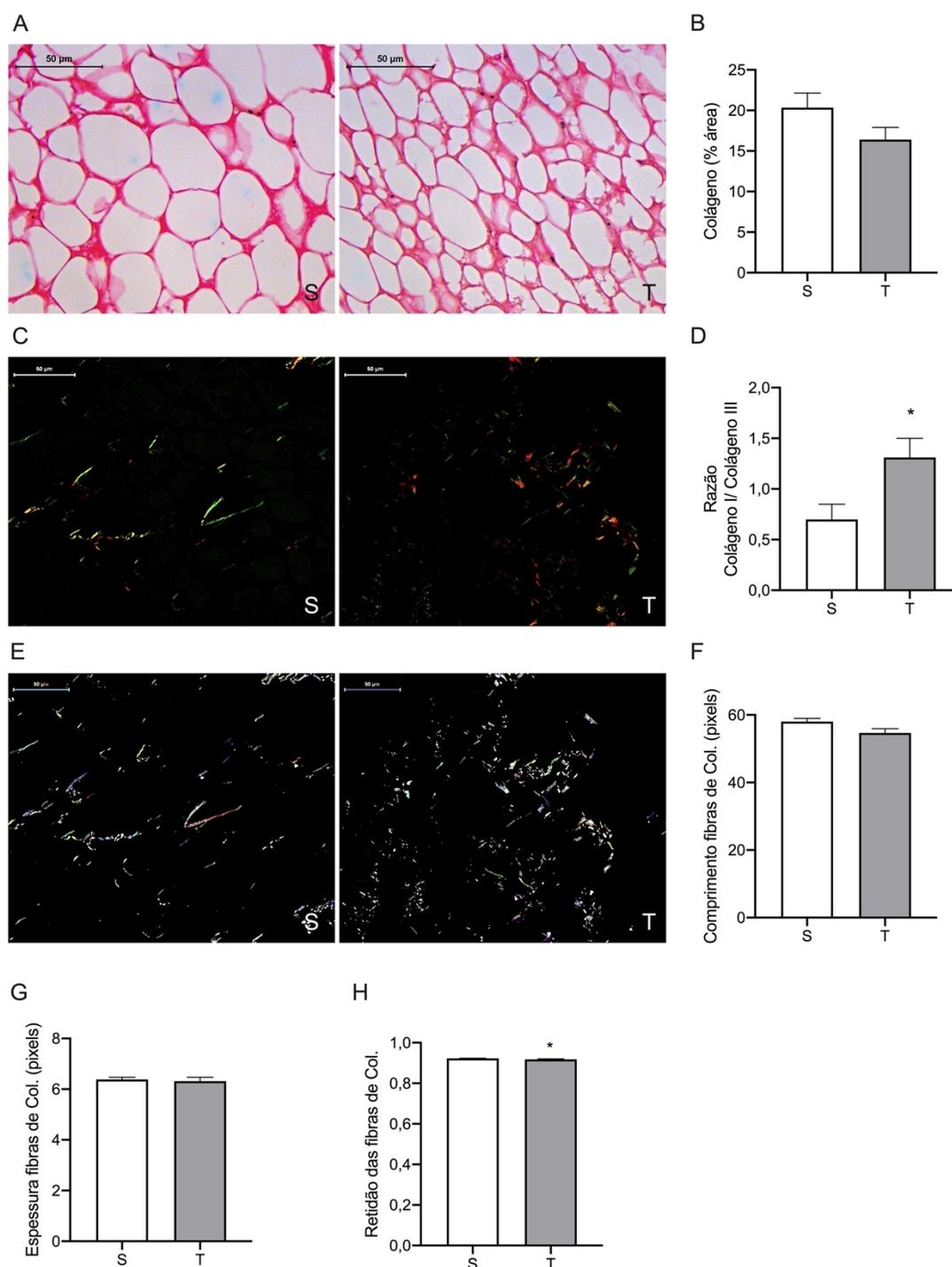


Figura 13. Fotomicrografias representativas do tecido adiposo branco subcutâneo corado com *picrosirius red*: campo claro (A) e luz polarizada (C). B) Porcentagem de colágeno por área; D) Razão entre fibras de colágeno I e III; E) Imagens representativas da identificação de fibras de colágeno; Comprimento (F), espessura (G) e retidão (H) das fibras de colágeno. S, sedentário (n=7); T, treinado (n=7). * $p < 0,05$ vs. S.

No TAB-PE, a avaliação da deposição de colágeno em campo claro, representada na Figura 14A, não revelou diferenças significativas entre os grupos (Figura 14B). A análise com luz polarizada, representada na Figura 14C, não revelou diferenças na razão entre fibras de colágeno do tipo I e do tipo III (Figura 14D). Enquanto a análise individual das fibras de colágeno, exemplificada na Figura 14E, também não mostrou diferenças entre os grupos na espessura (Figura 14F), no comprimento (Figura 14G) e na retidão (Figura 14H) das fibras de colágeno.

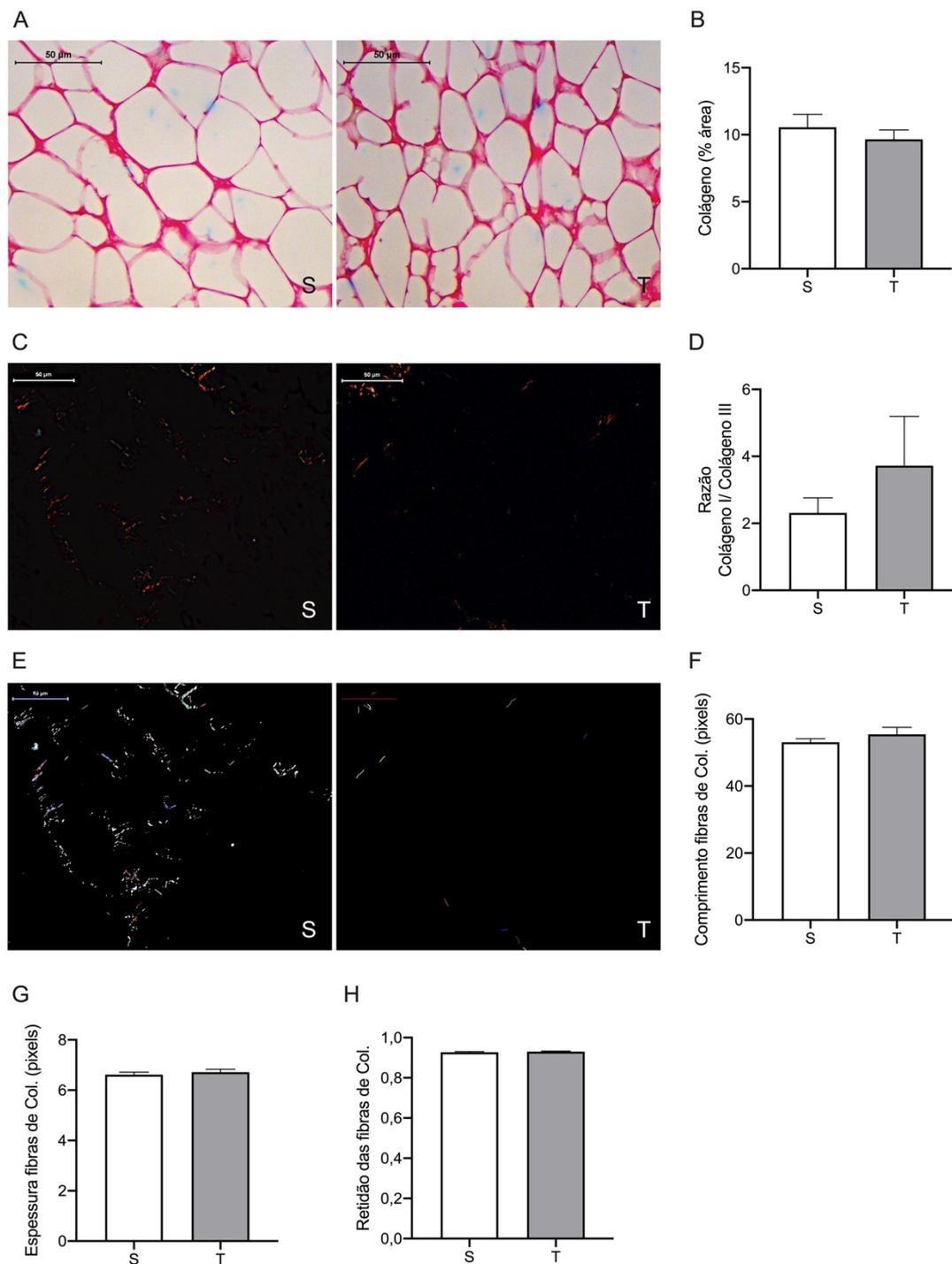


Figura 14 Fotomicrografias representativas do tecido adiposo branco periepididimal corado com *picrosirius red*: campo claro (A) e luz polarizada (C). B) Porcentagem de colágeno por área; D) Razão entre fibras de colágeno I e III; E) Imagens representativas da identificação de fibras de colágeno; Comprimento (F), espessura (G) e retidão (H) das fibras de colágeno. S, sedentário (n=7); T, treinado (n=7).

Similar ao TAB-PE, no TAM, a análise da deposição de colágeno em campo claro, demonstrada na Figura 15A, também não indicou diferenças entre os grupos (Figura 15B). Assim como a análise feita com luz polarizada, representada na Figura 15C, também não mostrou diferenças entre os grupos na razão entre fibras de colágeno do tipo I e tipo III (Figura 15D). Enquanto a análise individual das fibras de colágeno, ilustrada na Figura 15E, não demonstrou diferenças entre os grupos no comprimento (Figura 15F) e espessura (Figura 15G) delas, contudo houve uma tendência ao aumento na retidão das fibras de colágeno dos animais T em relação aos S ($p=0,068$; Figura 15H).

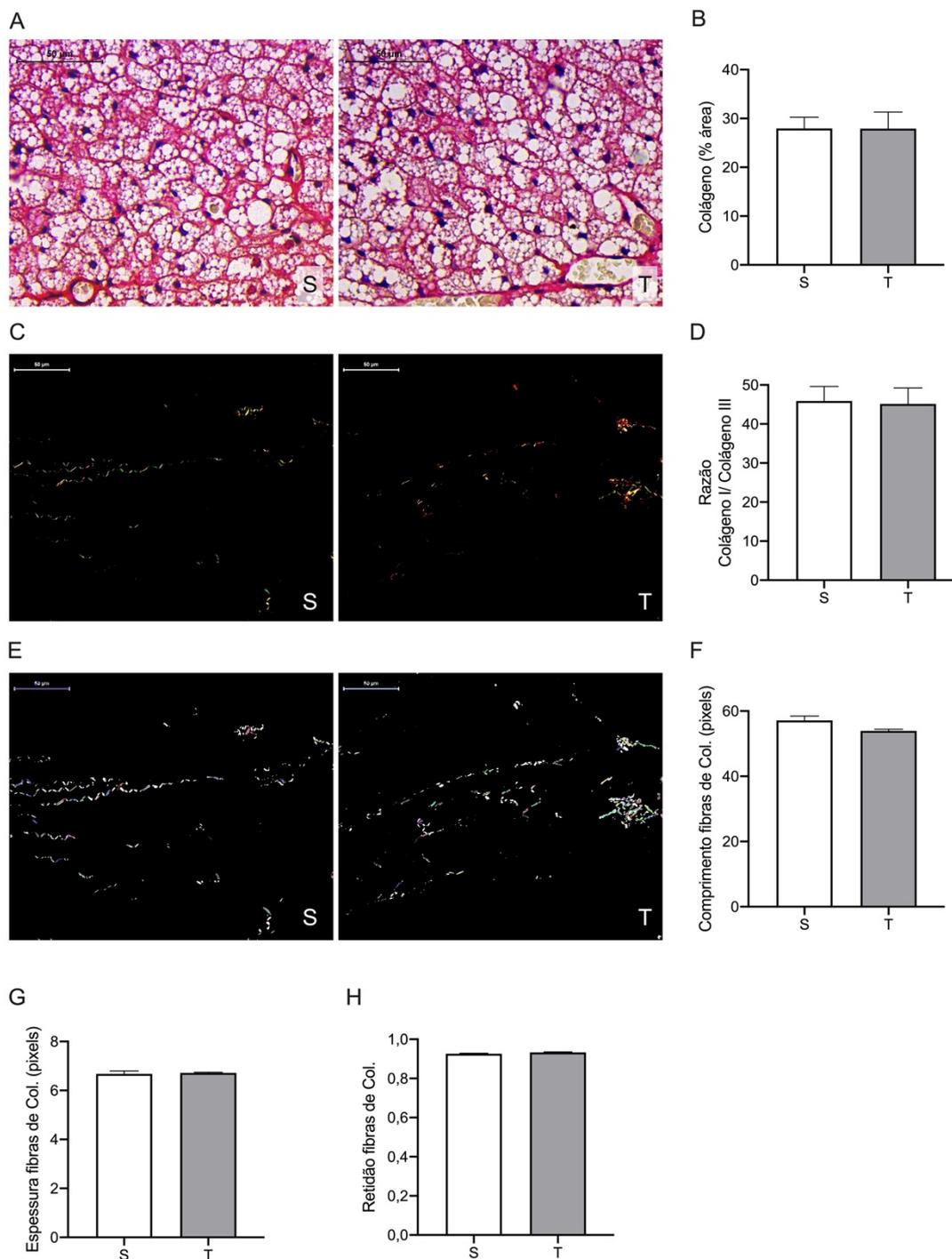


Figura 15. Fotomicrografias representativas do tecido adiposo marrom corado com *picrosirius red*: campo claro (A) e luz polarizada (C). B) Porcentagem de colágeno por área; D) Razão entre fibras de colágeno I e III; E) Imagens representativas da identificação de fibras de colágeno; Comprimento (F), espessura (G) e retidão (H) das fibras de colágeno. S, sedentário (n=8); T, treinado (n=6).

Tendo em vista o aumento na proporção de fibras de colágeno tipo I em relação as fibras do tipo III no TAB-SC dos animais T, o TGF-beta-1, um potente

estimulador da síntese de colágeno I¹¹⁷ foi avaliado nos depósitos estudados, ou seja, no TAB-SC(Figura 16A), TAB-PE (Figura 16C) e TAM (Figura 16E). Conforme o esperado, apenas no TAB-SC, a expressão do TGF-beta-1 foi significativamente maior no grupo T (Figura 16B). Assim, não foram identificadas diferenças na expressão do TGF-beta-1 no TAB-PE (Figura 16D) e no TAM (Figura 16F).

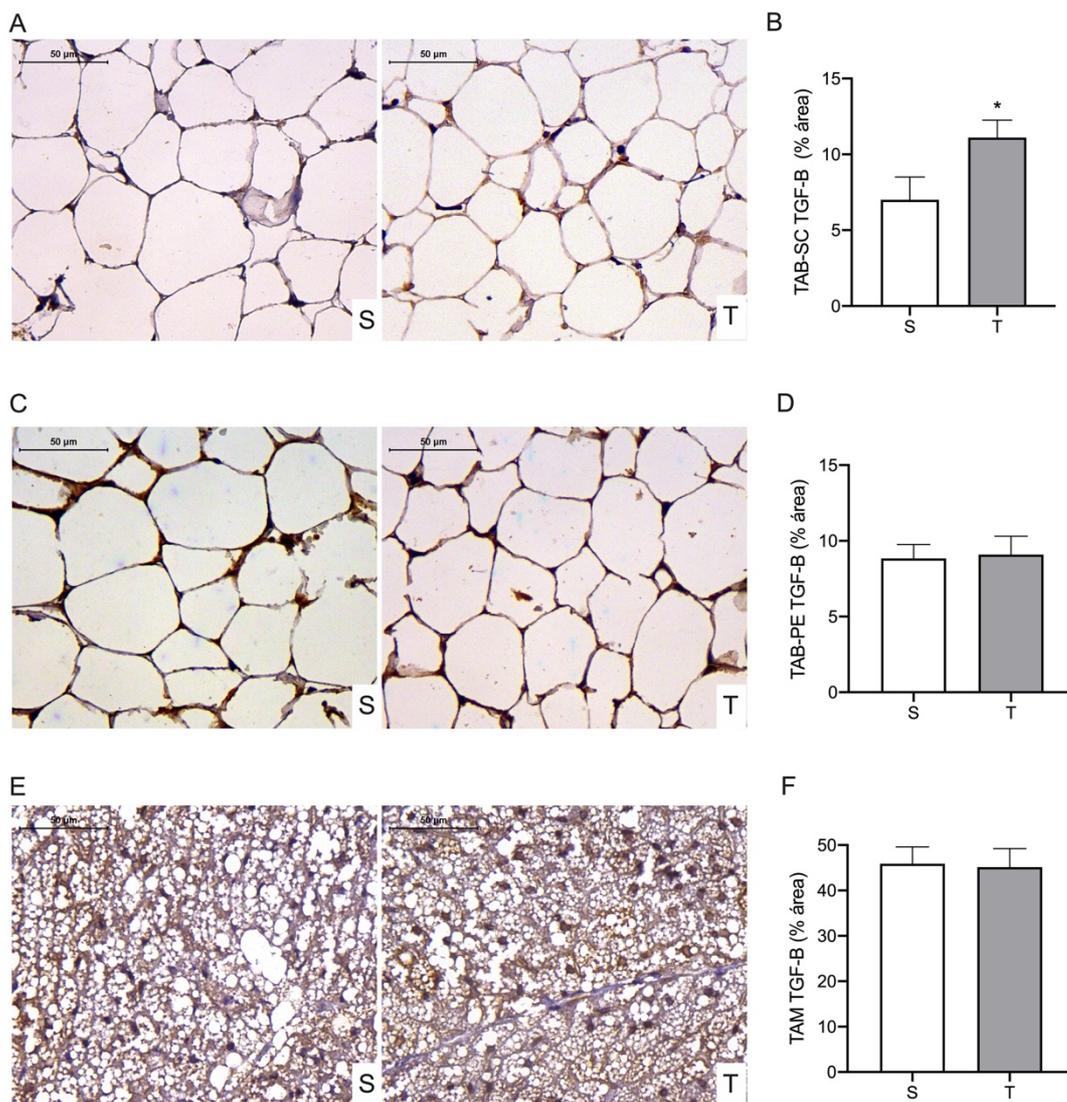


Figura 16. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido adiposo subcutâneo (A), periepididimal (C) e marrom (E) com marcação imunoistoquímica para TGF-beta-1 (400x); Porcentagem de área com marcação positiva para TGF-beta-1 no tecido adiposo subcutâneo (B), periepididimal (D) e marrom (F). S, sedentário (n=9); T, treinado (n=7). *p<0,05 vs. S.

Como o TGF-beta-1 também promove aumento na expressão da fibronectina, uma importante conectora dos adipócitos com a MEC¹¹⁸, também avaliamos a fibronectina. No entanto, não houve diferença na expressão proteica da fibronectina no TAB-SC (Figura 17A), no TAB-PE (Figura 17B) e TAM (Figura 17C).

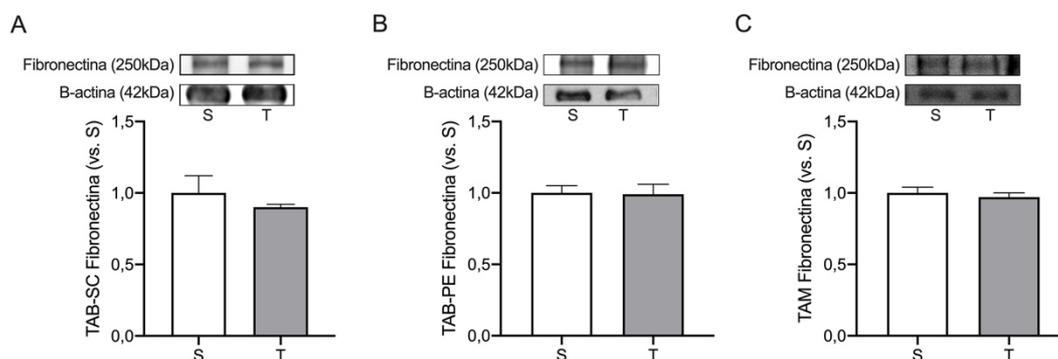


Figura 17. Expressão proteica da fibronectina no tecido adiposo subcutâneo (A) periepídidimo (B) e marrom (C). S, sedentário (n=4); T, treinado (n=4).

5.8 Marcadores associados à capacidade termogênica do TA

A expressão proteica da UCP1, principal marcadora da capacidade termogênica do TA, não foi diferente entre os grupos no TAB-SC (Figura 18A) e no TAM (Figura 18C), enquanto que no TAB-PE, a UCP1 não foi detectada (Figura 18C); Foram avaliadas também as expressões proteicas da PGC-1-alfa e do FGF-21. Os resultados encontrados não demonstraram diferenças significativas entre os grupos na expressão proteica da PGC-1-alfa no TAB-SC (Figura 18D), TAB-PE (Figura 18E) e TAM (Figura 18F). Já para o FGF-21, embora os grupos não tenham apresentado diferenças no TAB-SC (Figura 18G) e no TAM (Figura 18I), o HIIT foi capaz de aumentar significativamente a expressão proteica dele no TAB-PE (Figura 18H).

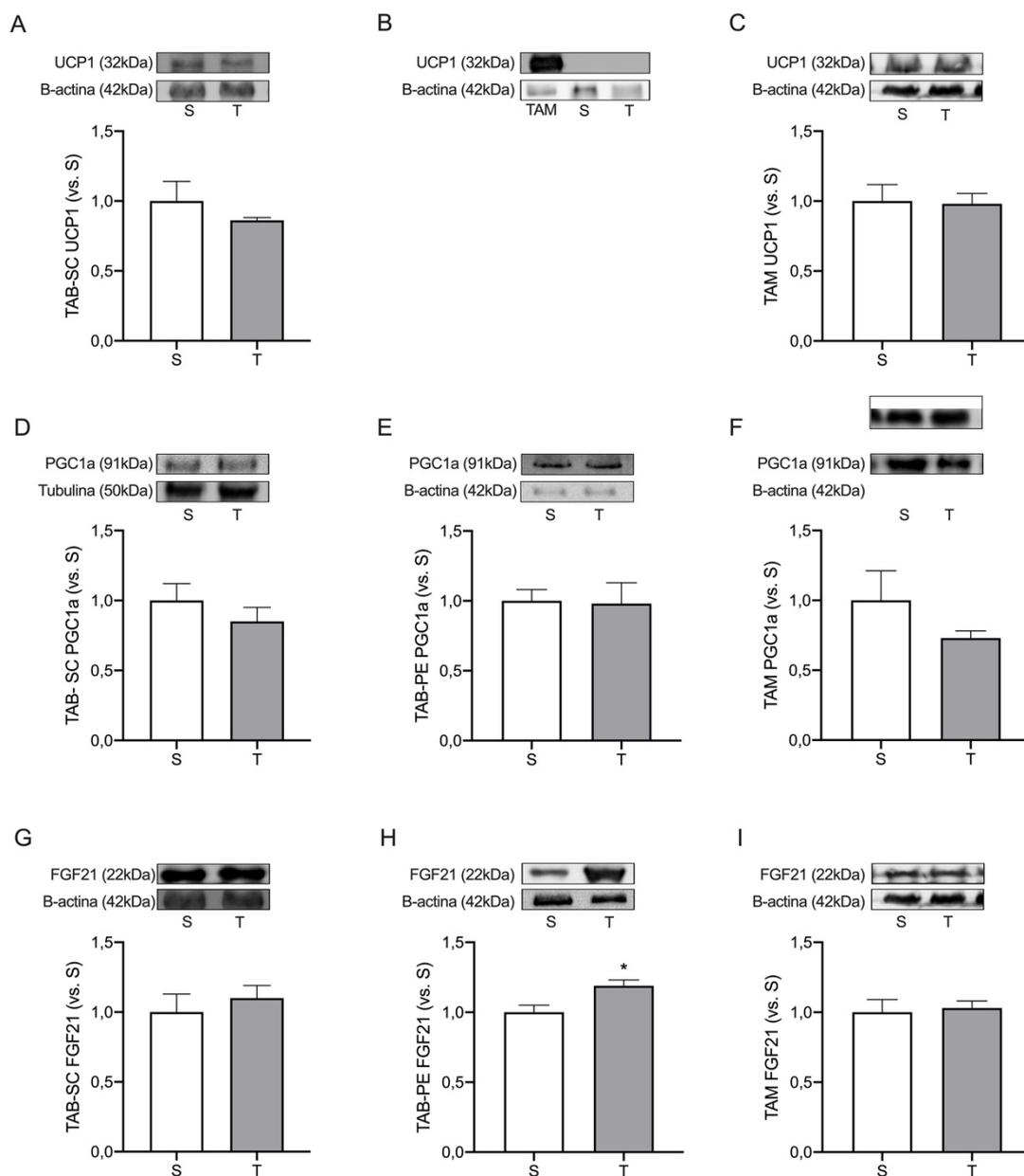


Figura 18. Expressão de proteínas associadas a capacidade termogênica do tecido adiposo. Expressão proteica da UCP1 no tecido adiposo subcutâneo (A) periepididimal (B) e marrom (C); Expressão proteica da PGC-1-alfa no tecido adiposo subcutâneo (D), periepididimal (E) e marrom (F); Expressão proteica do FGF-21 no tecido adiposo subcutâneo (G), periepididimal (H) e marrom (I). S, sedentário (n=9-4); T, treinado (n=7-4). *p<0,05 vs. S

5.9 Correlação entre as variáveis

A correlação entre as variáveis obtidas ao longo do trabalho resultou em um heatmap com 2809 correlações (Figura 19). Ao desconsiderar uma das direções das correlações – pois a matriz de correlação correlacionou as variáveis de maneira bidirecional (Ex: a-b e b-a) – e a diagonal principal, que são as correlações das variáveis com elas mesmas (Ex: a-a), 1378 correlações foram obtidas. Dessas, 119 apresentaram nível significativo de correlação ($p < 0,05$).

Devido à natureza das variáveis envolvidas, alguns níveis significativos de correlação eram esperados, como por exemplo, entre o tempo e a velocidade máxima no teste de esforço. No entanto, outras interações entre as variáveis foram observadas, como as correlações negativas entre a expressão proteica do FGF-21 no TAB-PE e a massa corporal ($r = -0,75$), a massa do TAB-SC e a espessura das fibras de colágeno ($r = -0,56$), a frequência de adipócitos pequenos no TAM e a expressão do TGF-beta-1 no TAB-PE ($r = -0,62$) e a razão entre fibras de colágeno do tipo I e III no TAB-SC com a área dos adipócitos do TAB-PE ($r = -0,66$). A associação de variáveis de diferentes depósitos entre si evidencia a interconexão entre os diferentes depósitos de TA.

Foram observadas correlações positivas significativas, dentre as quais destacam-se a área dos adipócitos e a frequência de adipócitos muito grandes no TAM com a expressão do TGF-beta-1 no TAB-PE ($r = 0,69$ e $0,73$ respectivamente), a retidão das fibras e a frequência de adipócitos muito grandes no TAB-SC com a expressão do TGF-beta-1 no TAB-PE ($r = 0,56$ e $0,87$, respectivamente) e a área dos adipócitos do TAB-PE com a deposição de colágeno nesse depósito ($r = 0,60$).

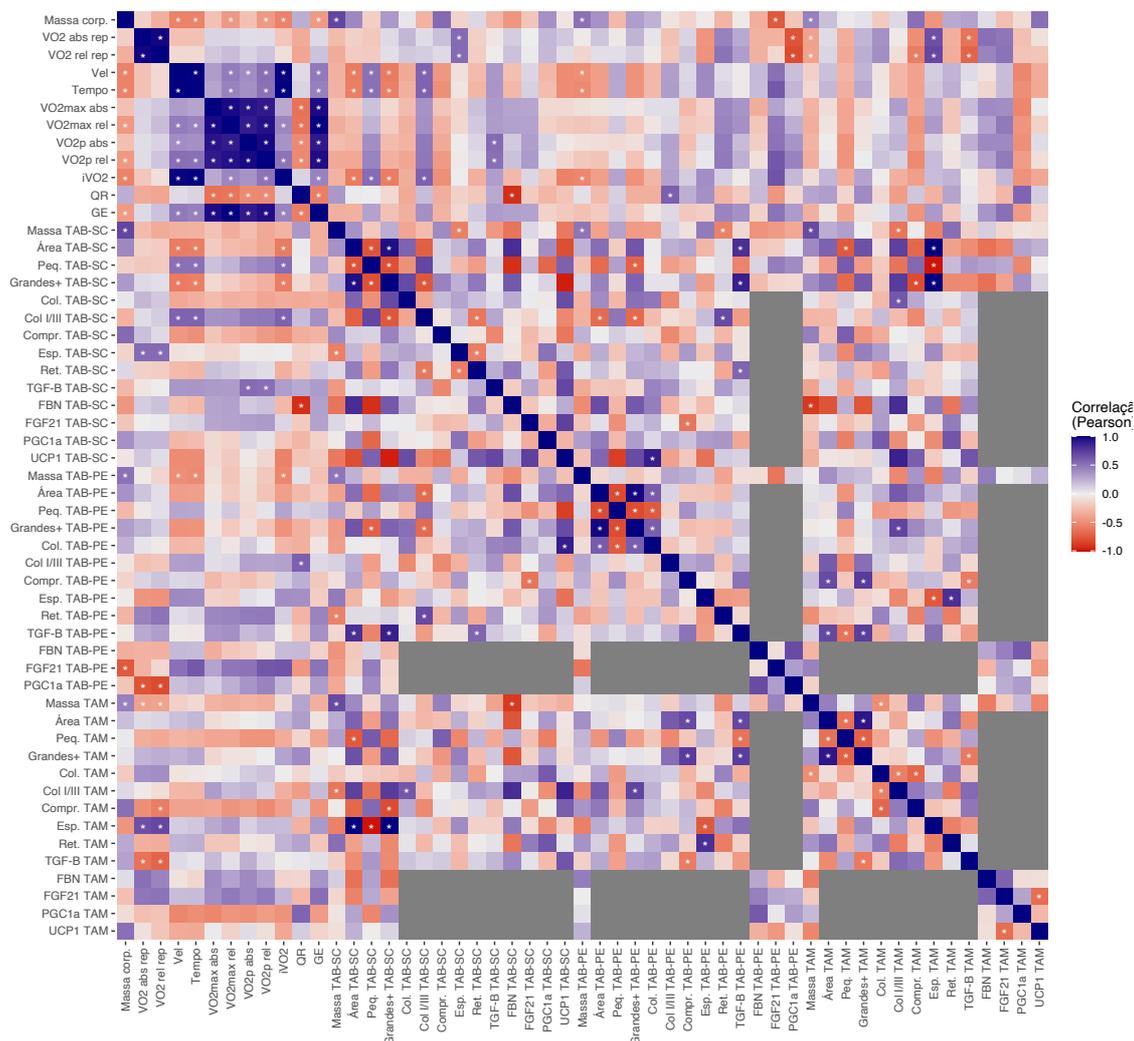


Figura 19. Heatmap de interações entre as variáveis. Massa corp, massa corporal dos animais; VO2 abs rep, consumo de oxigênio (VO2) absoluto em repouso; VO2 rel rep, (VO2) relativo em repouso; Vel, velocidade máxima no teste de esforço; Tempo, tempo no teste de esforço; VO2max abs, VO2 máximo absoluto; VO2max rel, VO2 máximo relativo; VO2p abs, VO2 pico absoluto; VO2p rel, VO2 pico relativo; iVO2, intensidade associada ao VO2 máximo; QR, quociente respiratório; GE, gasto energético no VO2 máximo; massa do tecido adiposo branco subcutâneo (TAB-SC); Área, área média dos adipócitos; Peq. TAB-SC, frequência de adipócitos pequenos; Grandes+, frequência de adipócitos muito grandes; Col., deposição de colágeno; Col I/III, razão entre colágeno I e III; Compr., comprimento das fibras de colágeno; Esp, espessura das fibras de colágeno; Ret., retidão das fibras de colágeno; FBN, fibronectina. TAB-PE, tecido adiposo branco periepídido; TAM, tecido adiposo marrom. Blocos em cinza, correlações não computadas. * $p < 0,05$

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho propôs a investigação dos efeitos do HIIT nas características morfológicas e funcionais de diferentes depósitos de TA. Além disso, avaliou os efeitos do HIIT na capacidade aeróbia e em parâmetros de massa corporal e de tecidos, consumo alimentar e glicemia de jejum.

Os efeitos observados com o protocolo de HIIT no aumento da capacidade aeróbia estão de acordo com os resultados obtidos no protocolo original realizado por Kemi et al.¹⁰³. Dessa maneira, no presente estudo, os mesmos ganhos de *performance* foram obtidos com sessões de treino com metade da duração das sessões utilizadas no protocolo original¹⁰³ (1h vs. 2h). Não obstante, sessões de treino com duração de uma hora ainda falham em atender um dos grandes atrativos do HIIT, que é proporcionar benefícios para a saúde e *performance* com sessões de treino mais curtas^{15,16}. Assim, um próximo passo de investigação é testar se os efeitos do HIIT se sustentam com sessões de treino mais curtas.

A duração da sessão de HIIT utilizada no presente trabalho foi a mesma que utilizamos em um trabalho anterior com o TFA¹¹⁹. Contudo, com o TFA, não observamos aumento significativo do VO_2 máx, o principal marcador da capacidade aeróbia. Isso pode sugerir uma eficácia superior do HIIT para aumentar o VO_2 máx em camundongos¹²⁰, similar ao que é observado em humanos¹⁷⁻²². Independente da modalidade de treinamento, o iVO_2 , um poderoso índice para descrever a associação entre VO_2 máx e a economia de corrida¹⁰⁵, é uma variável mais sensível para captar as variações da capacidade aeróbia¹⁰⁵. Assim como observado previamente com o TFA¹¹⁹, o HIIT também aumentou o iVO_2 .

Outro resultado observado com o HIIT foi o aumento da economia de corrida dos animais. Assim, para uma mesma velocidade absoluta, os animais T consumiram relativamente menos oxigênio. Nosso grupo já havia observado o efeito do TFA na economia de corrida¹²¹, enquanto outros grupos observaram esse efeito com o HIIT em humanos¹²² e em camundongos¹²³. O aumento na economia de corrida tem um significado especial para indivíduos treinados, pois reflete melhor os ganhos de *performance* com o treinamento do que alterações

no $VO_{2m\acute{a}x}$ ^{122,124}. Esse dado em conjunto com o aumento do $VO_{2m\acute{a}x}$, sugere que o HIIT é uma ferramenta eficaz para aumentar a capacidade aeróbia tanto em praticantes de exercícios físicos iniciantes quanto em indivíduos treinados.

Embora os animais tenham sido alimentados com dieta normocalórica, o HIIT foi capaz de promover menor ganho de massa corporal. Outros grupos reportaram esse mesmo efeito^{95,101,125,126}, enquanto o efeito do HIIT na redução da massa corporal em humanos está devidamente documentado em meta-análises^{127,128}. No presente estudo, o principal determinante da menor massa corporal no grupo T possivelmente foi o gasto energético das sessões de treino, pois o gasto energético de repouso e o consumo de ração não foram diferentes entre os grupos experimentais.

A ausência de alteração no gasto energético de repouso com o HIIT está de acordo com dados anteriores do nosso grupo com o TFA⁷⁴. Ainda assim, a hipótese de que alterações no metabolismo de repouso sejam responsáveis pela redução da massa corporal não pode ser totalmente descartada. Isso porque a avaliação do metabolismo de repouso foi realizada em apenas um momento do dia e não em 24 horas. Além do mais, é possível que o efeito termogênico do alimento tenha mascarado os efeitos do HIIT no metabolismo de repouso, haja visto os animais não terem sido submetidos ao jejum previamente ao registro. Em um trabalho anterior do nosso grupo, os animais foram submetidos a 8 horas de jejum antes da avaliação do metabolismo de repouso¹²⁹. Nesse trabalho foi observado um aumento no consumo de oxigênio em repouso pelos animais treinados¹²⁹. Portanto, em um próximo trabalho com o HIIT, para endereçar essa limitação, o consumo alimentar dos animais deve ser restringido antes do registro do metabolismo de repouso.

A redução da massa corporal com o HIIT foi acompanhada e significativamente associada ($r=0,51$) à redução da massa do TAB-PE, mas não dos outros depósitos de gordura avaliados. Castano et al.¹²⁵ observaram esse mesmo efeito do HIIT, enquanto Motta et al.¹³⁰ encontraram redução nas massas dos TAB-PE e TAB-SC. Essa discrepância nos resultados pode ter sido ocasionada pelas diferenças nos protocolos de HIIT. No trabalho de Motta et al.¹³⁰, em cada sessão de treino, os animais correram até a exaustão, o que pode ter resultado em um volume de treino superior ao utilizado no presente estudo.

O HIIT reduziu não apenas a massa do TAB-PE, mas também o tamanho dos adipócitos. Não obstante, essas variáveis não apresentaram correlação. A redução no tamanho dos adipócitos, tanto em depósitos viscerais quanto subcutâneos, com o TFA^{131,132} e com HIIT^{95,101,120} é um resultado consistente na literatura. O mecanismo responsável por essa resposta é a alteração no balanço entre processos lipolíticos e lipogênicos. Assim, o treinamento físico aumenta a capacidade lipolítica^{73,131,132} e reduz a expressão de genes lipogênicos¹³². Embora o objetivo do trabalho não tenha sido avaliar os efeitos do HIIT em marcadores lipogênicos e lipolíticos, não podemos excluir a possibilidade de que o aumento na lipólise e/ou redução na lipogênese seja responsável pela alteração no tamanho dos adipócitos no TAB-PE.

No TAB-SC, não só observamos adipócitos menores como também uma maior frequência de adipócitos pequenos. Os adipócitos pequenos, em relação aos adipócitos hipertrofiados, apresentam menores taxas lipolíticas e de secreção de citocinas pró-inflamatórias, além de maior secreção de adiponectina. Essas características fazem com que o tamanho dos adipócitos seja um fator de risco independente para o desenvolvimento de comprometimentos metabólicos, como resistência à insulina^{42,133}. Por outro lado, estimular a maior frequência de adipócitos pequenos, através da adipogênese, é uma das ações dos medicamentos da classe das tiazolidinedionas (TZD) no tratamento do DM2^{42,134}. Contudo, o uso desses medicamentos é discutido devido às preocupações com possíveis efeitos colaterais cardíacos e com o ganho de peso corporal associado⁴². Assim, é possível que o HIIT promova efeitos similares a esses medicamentos no aumento na frequência de adipócitos pequenos, ao mesmo tempo em que vai na direção oposta dos efeitos colaterais que eles provocam. Ou seja, o HIIT pode proporcionar um estímulo a maior frequência de adipócitos pequenos, com aumento da saúde cardiovascular^{3,6} e redução da massa corporal^{127,128}.

Como a massa do TAB-SC não foi significativamente reduzida pelo HIIT, mas a massa dos adipócitos sim, o número estimado de adipócitos no TAB-SC foi significativamente maior nos animais T. Isso sugere que o HIIT promoveu aumento na diferenciação de adipócitos, levando à hiperplasia do TAB-SC. Esses possíveis adipócitos recém diferenciados, por serem pequenos¹³⁵, podem

ter contribuído para o aumento na frequência de adipócitos pequenos observada no grupo T. É importante ressaltar que, assim como discutido anteriormente para o TAB-PE, não podemos excluir um possível efeito do aumento na lipólise e/ou redução na lipogênese na modulação do tamanho dos adipócitos no TAB-SC.

Poucos trabalhos investigaram se o HIIT é capaz de afetar a adipogênese^{120,136}. O trabalho Ahn et al.¹³⁶ sugere que o HIIT pode estimular vias envolvidas na adipogênese, pois observaram que o HIIT, mas não o TFA, é capaz de aumentar a expressão da C/EBP-alfa, uma proteína chave na regulação da adipogênese, no TAB-SC de indivíduos obesos¹³⁶. Enquanto Khalafi et al.¹²⁰, que adotaram uma metodologia de quantificação do número de adipócitos similar ao presente trabalho, observaram que ratos obesos submetidos ao HIIT apresentam redução no número de adipócitos do TAB-SC em magnitude maior do que a observada com o TFA¹²⁰.

Outros dados na literatura sugerem que camundongos com livre acesso a roda de corrida podem apresentar redução da adipogênese no TAB-SC, mas não no TAB-PE¹³⁷. Em outro estudo, ratos com livre acesso a roda de corrida não apresentam diferenças no número de adipócitos¹³⁸. Por fim, ratos submetidos ao TFA não aumentam o número de adipócitos no TAB-SC e no TAB visceral retroperitoneal^{139,140}, não obstante, apresentam taxa reduzida de apoptose no TAB-SC¹³⁹. Tendo em vista essas evidências, o efeito do HIIT no número de adipócitos observado no presente trabalho tem que ser visto com cautela. Primeiramente, porque a metodologia utilizada foi diferente de outros trabalhos¹³⁷⁻¹⁴⁰. Em segundo lugar, porque marcadores da adipogênese não foram avaliados. Portanto, explorar os efeitos do HIIT na adipogênese é um desdobramento futuro do presente trabalho.

Se, de fato, o HIIT estimulou a hiperplasia no TAB-SC, isso precedeu o aumento na razão entre colágeno tipo I e tipo III (o que, na ausência de alterações na deposição total de colágeno, sugere uma maior quantidade desse tipo de colágeno) e do TGF-beta-1 e. Isso porque, tanto o colágeno tipo I quanto o TGF-beta-1 são inibidores da diferenciação de adipócitos, embora esse efeito não seja suficiente para de-diferenciá-los^{141,142}. Ademais, o TGF-beta-1 pode ter sido o responsável pelo aumento no colágeno tipo I¹¹⁷.

Não obstante o possível aumento no colágeno tipo I no TAB-SC e o fato de que as fibras dele sejam mais espessas que as do tipo III¹¹², não foi identificada diferença entre os grupos na espessura das fibras. Esse dado corrobora o que mostra a literatura, de que não é possível separar as fibras de colágeno tipo I das do tipo III pela espessura^{143,144}. Além do mais, o aumento na espessura, comprimento e retidão das fibras de colágeno estão associados a um enrijecimento da MEC e tumores^{114,145,146}. Tendo isso em vista, a redução na retidão das fibras de colágeno nos animais T pode ter contribuído para uma MEC com menor rigidez e, conseqüentemente, adipócitos com menor estresse mecânico^{42,146}.

Em relação a matriz extracelular no TAB-PE, não obstante à redução do tamanho médio dos adipócitos e da frequência de adipócito muito grandes, não apresentou sinais de remodelamento para nenhuma das variáveis avaliadas. Isso sugere que a alteração na morfologia dos adipócitos não é suficiente para disparar mecanismos de remodelamento da MEC. Isso pode explicar também a ausência de diferenças entre os grupos para as variáveis da MEC avaliadas no TAM. Ademais, considerando que a termoneutralidade dos animais é em aproximadamente 30° C, mas que foram mantidos em uma temperatura de 22 ± 2° C, é possível que essa diferença possa ter mascarado possíveis efeitos do HIIT na morfologia das gotículas lipídicas do TAM⁵⁹.

As alterações na morfologia dos adipócitos do TAB-SC e TAB-PE não foram acompanhadas de mudanças significativas nos marcadores da capacidade termogênica avaliados. Assim, embora o HIIT tenha aumentado o FGF-21 significativamente no TAB-PE, é improvável que ele tenha atuado para modular a capacidade termogênica. O FGF-21 exerce uma plethora de efeitos no organismo, incluindo o controle do balanço energético e a regulação da homeostase glicêmica e lipídica^{61,62}. Assim, aumentar a capacidade termogênica é apenas um dos efeitos que exerce⁶³. Para exemplificar, camundongos que expressam excessivamente FGF-21 no TAB-PE, mesmo na ausência de aumento na expressão da UCP1, apresentam redução da adiposidade total e da inflamação do TA, maior expressão de adiponectina e maior sensibilidade à insulina¹⁴⁷.

Embora trabalhos na literatura tenham reportado o aumento da UCP1 no TAB-SC^{130,148,149} e no TAM¹⁴⁹ de camundongos treinados com o HIIT, e no TAB-SC de camundongos treinados com o TFA⁷⁴, o conjunto de dados relacionados a capacidade termogênica dos três depósitos avaliados sugere que o HIIT não foi capaz de aumentá-la. O presente trabalho não é o primeiro a reportar a ausência de alterações na capacidade termogênica do TA com o HIIT. Maharjan et al.¹⁴⁹ não observaram efeitos do HIIT na expressão da UCP1 no TAB-SC e TAB-PE de camundongos. Enquanto, Marcinko et al.⁹⁹, similar ao presente trabalho, também não observaram alterações na expressão da *Pgc1a* e nem detectaram a expressão da *Ucp1* no TAB-PE, o que não é surpreendente, tendo em vista que esse depósito apresenta níveis baixos ou não detectáveis de UCP1⁵⁹.

Os resultados dissonantes dos efeitos do HIIT e do TFA na capacidade termogênica do TA de camundongos sugerem que alguma característica do protocolo de treinamento físico pode influenciar essa resposta. Uma possibilidade é que a resposta do HIIT na capacidade termogênica é inversamente correlacionada com a resposta da massa corporal. Destarte, nos trabalhos em que foram observados aumento na UCP1 com o HIIT, a massa corporal não foi diferente entre os grupos de animais sedentários e treinados^{130,148,149}.

Como o aumento da capacidade termogênica com o treinamento físico parece ser inversamente regulado no TAB-SC e TAM^{59,131,150}, a ausência de alterações na capacidade termogênica no TAB-SC não resultou em redução na capacidade termogênica do TAM ou na promoção do *whitening*, com aumento na área de adipócitos uniloculares¹⁵⁰. Além do mais, o aumento na capacidade termogênica do TA com o HIIT é um paradoxo. O HIIT é um estímulo que aumenta a temperatura corporal, consome energia e faz com que o organismo lute para ser energeticamente eficiente. Isso posto, não está claro o porquê de ele ser capaz de aumentar a expressão de células que inerentemente desperdiçam energia, dissipando-a na forma de calor^{131,151}. Essa noção está mais de acordo com dados em humanos, que não mostraram uma associação entre capacidade aeróbia e capacidade termogênica do TAB-SC^{152,153} e, que o TAM de indivíduos treinados pode apresentar uma redução na atividade metabólica¹⁵⁴.

7. CONCLUSÃO

O conjunto de achados no presente trabalho demonstra o potencial do HIIT para aumentar a capacidade aeróbia e reduzir o ganho de massa corporal, independente de alterações na capacidade termogênica dos depósitos de TA avaliados. Além do mais, o HIIT reduziu o tamanho dos adipócitos no TAB-SC e no TAB-PE, enquanto os efeitos nos componentes da MEC aconteceram apenas no TAB-SC. O HIIT não modificou qualquer variável morfofuncional no depósito de TAM. Esse conjunto de achados contribui para o melhor entendimento dos efeitos do HIIT nos diferentes depósitos de TA e, portanto, servem de conhecimento para futuros estudos que tenham como objetivo a prevenção e o tratamento de doenças cardiometabólicas por meio do treinamento físico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 BULL, F. C. *et al.* World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. **British Journal of Sports Medicine**, 54, n. 24, p. 1451-1462, 2020/12// 2020.

2 ORGANIZATION, W. H. Sixty-sixth World Health Assembly: Follow-up to the Political Declaration of the High-level Meeting of the General Assembly on the Prevention and Control of Non-communicable Diseases. **WHO Governing Body Documentation**, 2013.

3 ROSS, R. *et al.* Importance of Assessing Cardiorespiratory Fitness in Clinical Practice: A Case for Fitness as a Clinical Vital Sign: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, 134, n. 24, 2016/12/13/ 2016.

4 GLOBAL BURDEN OF CARDIOVASCULAR DISEASES, C. *et al.* The Burden of Cardiovascular Diseases Among US States, 1990-2016. **JAMA Cardiol**, 3, n. 5, p. 375-389, May 1 2018.

5 KODAMA, S. Cardiorespiratory Fitness as a Quantitative Predictor of All-Cause Mortality and Cardiovascular Events in Healthy Men and Women: A Meta-analysis. **JAMA**, 301, n. 19, p. 2024, 2009/05/20/ 2009.

6 FIUZA-LUCES, C. *et al.* Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors. **Nature Reviews Cardiology**, 15, n. 12, p. 731-743, 2018/12// 2018.

7 BRASIL; MINISTÉRIO DA, S. Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019. 2020 2020.

8 MEYER, J. *et al.* Joint prevalence of physical activity and sitting time during COVID-19 among US adults in April 2020. **Prev Med Rep**, 20, p. 101256, Dec 2020.

9 MEYER, J. *et al.* Changes in Physical Activity and Sedentary Behavior in Response to COVID-19 and Their Associations with Mental Health in 3052 US Adults. **Int J Environ Res Public Health**, 17, n. 18, Sep 5 2020.

10 MCDOWELL, C. P. *et al.* Working From Home and Job Loss Due to the COVID-19 Pandemic Are Associated With Greater Time in Sedentary Behaviors. **Front Public Health**, 8, p. 597619, 2020.

11 THIVEL, D. *et al.* Physical Activity, Inactivity, and Sedentary Behaviors: Definitions and Implications in Occupational Health. **Frontiers in Public Health**, 6, p. 288, 2018/10/05/ 2018.

12 EKELUND, U. *et al.* Does physical activity attenuate, or even eliminate, the detrimental association of sitting time with mortality? A harmonised meta-analysis of data from more than 1 million men and women. **The Lancet**, 388, n. 10051, p. 1302-1310, 2016/09// 2016.

13 ARZU, D.; TUZUN, E. H.; EKER, L. Perceived barriers to physical activity in university students. **J Sports Sci Med**, 5, n. 4, p. 615-620, 2006.

14 ITO, S. Rationale and optimising of outcomes in high-intensity interval training for health and disease. **The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine**, 10, n. 3, p. 151-164, 2021/05/25/ 2021.

15 GIBALA, M. J. Interval Training for Cardiometabolic Health: Why Such A HIIT? **Current Sports Medicine Reports**, 17, n. 5, p. 148-150, 2018/05// 2018.

16 SABAG, A.; LITTLE, J. P.; JOHNSON, N. A. Low - volume high - intensity interval training for cardiometabolic health. **The Journal of Physiology**, p. JP281210, 2021/04/18/ 2021.

17 MILANOVIC, Z.; SPORIS, G.; WESTON, M. Effectiveness of High-Intensity Interval Training (HIT) and Continuous Endurance Training for VO₂max Improvements: A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Trials. **Sports Med**, 45, n. 10, p. 1469-1481, Oct 2015.

18 ELLIOTT, A. D. *et al.* Interval training versus continuous exercise in patients with coronary artery disease: a meta-analysis. **Heart Lung Circ**, 24, n. 2, p. 149-157, Feb 2015.

19 LIOU, K. *et al.* High Intensity Interval versus Moderate Intensity Continuous Training in Patients with Coronary Artery Disease: A Meta-analysis of Physiological and Clinical Parameters. **Heart Lung Circ**, 25, n. 2, p. 166-174, Feb 2016.

20 LEAL, J. M.; GALLIANO, L. M.; DEL VECCHIO, F. B. Effectiveness of High-Intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity Continuous Training in Hypertensive Patients: a Systematic Review and Meta-Analysis. **Curr Hypertens Rep**, 22, n. 3, p. 26, Mar 3 2020.

21 WESTON, K. S.; WISLOFF, U.; COOMBES, J. S. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. **Br J Sports Med**, 48, n. 16, p. 1227-1234, Aug 2014.

22 LIU, J.; ZHU, L.; SU, Y. Comparative Effectiveness of High-Intensity Interval Training and Moderate-Intensity Continuous Training for Cardiometabolic Risk Factors and Cardiorespiratory Fitness in Childhood Obesity: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Front Physiol**, 11, p. 214, 2020.

23 MARTINEZ-TELLEZ, B. *et al.* Relationships between cardiorespiratory fitness/muscular strength and (18)F-fluorodeoxyglucose uptake in brown adipose tissue after exposure to cold in young, sedentary adults. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 11314, Aug 5 2019.

24 WONG, S. L. *et al.* Cardiorespiratory fitness is associated with lower abdominal fat independent of body mass index. **Med Sci Sports Exerc**, 36, n. 2, p. 286-291, Feb 2004.

25 LESSER, I. A. *et al.* The association between cardiorespiratory fitness and abdominal adiposity in postmenopausal, physically inactive South Asian women. **Prev Med Rep**, 2, p. 783-787, 2015.

26 JANSSEN, I. *et al.* Fitness alters the associations of BMI and waist circumference with total and abdominal fat. **Obes Res**, 12, n. 3, p. 525-537, Mar 2004.

27 REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology**, 13, n. 11, p. 633-643, 2017/11// 2017.

28 REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nat Rev Endocrinol**, 13, n. 11, p. 633-643, Nov 2017.

29 OIKONOMOU, E. K.; ANTONIADES, C. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. **Nat Rev Cardiol**, 16, n. 2, p. 83-99, Feb 2019.

30 KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nat Rev Drug Discov**, 15, n. 9, p. 639-660, Sep 2016.

31 CHOUCANI, E. T.; KAJIMURA, S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. **Nat Metab**, 1, n. 2, p. 189-200, Feb 2019.

32 SCHEJA, L.; HEEREN, J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. **Nature Reviews Endocrinology**, 15, n. 9, p. 507-524, 2019/09// 2019.

33 COHEN, P.; KAJIMURA, S. The cellular and functional complexity of thermogenic fat. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 22, n. 6, p. 393-409, 2021/06// 2021.

34 WHITE, J. D.; DEWAL, R. S.; STANFORD, K. I. The beneficial effects of brown adipose tissue transplantation. **Molecular Aspects of Medicine**, 68, p. 74-81, 2019/08// 2019.

35 ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. What we talk about when we talk about fat. **Cell**, 156, n. 1-2, p. 20-44, Jan 16 2014.

36 SUN, W. *et al.* Plasticity and heterogeneity of thermogenic adipose tissue. **Nat Metab**, 3, n. 6, p. 751-761, Jun 2021.

37 COOK, K. S. *et al.* Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. **Science**, 237, n. 4813, p. 402-405, Jul 24 1987.

38 HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259, n. 5091, p. 87-91, Jan 1 1993.

39 ZHANG, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 372, n. 6505, p. 425-432, Dec 1 1994.

40 LENZ, M. *et al.* Adipose tissue in health and disease through the lens of its building blocks. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 10433, 2020/12// 2020.

41 IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obes Rev**, 11, n. 1, p. 11-18, Jan 2010.

42 GHABEN, A. L.; SCHERER, P. E. Adipogenesis and metabolic health. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 20, n. 4, p. 242-258, 2019/04// 2019.

43 TRAN, T. T.; KAHN, C. R. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. **Nat Rev Endocrinol**, 6, n. 4, p. 195-213, Apr 2010.

44 JEFFERY, E. *et al.* Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. **Nat Cell Biol**, 17, n. 4, p. 376-385, Apr 2015.

45 SYMONDS, M. E. **Adipose tissue biology**. Springer, 2012. 1461409659.

46 CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, 84, n. 1, p. 277-359, 2004.

47 IKEDA, K.; MARETICH, P.; KAJIMURA, S. The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 29, n. 3, p. 191-200, 2018.

48 HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, 19, p. 1252, 09/29/online 2013. Review Article.

49 KOZAK, L. P.; ANUNCIADO-KOZA, R. UCP1: its involvement and utility in obesity. **International Journal of Obesity**, 32, n. 7, p. S32-S38, 2008/12/01 2008.

50 POPE, B. D. *et al.* Microenvironmental control of adipocyte fate and function. **Trends in cell biology**, 26, n. 10, p. 745-755, 2016 2016.

51 MORI, S. *et al.* Characteristic Expression of Extracellular Matrix in Subcutaneous Adipose Tissue Development and Adipogenesis; Comparison with Visceral Adipose Tissue. **International Journal of Biological Sciences**, 10, n. 8, p. 825-833, 2014. Research Paper.

52 PELLEGRINELLI, V.; CAROBBIO, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia**, 59, n. 6, p. 1075-1088, 2016/06/01 2016.

53 STOCK, M. J.; CINTI, S. ADIPOSE TISSUE | Structure and Function of Brown Adipose Tissue. In: CABALLERO, B. (Ed.). **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 2003. p. 29-34.

54 SUN, K. *et al.* Fibrosis and adipose tissue dysfunction. **Cell Metab**, 18, n. 4, p. 470-477, Oct 1 2013.

55 KUO, H. J. *et al.* Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. **J Biol Chem**, 272, n. 42, p. 26522-26529, Oct 17 1997.

56 SCHERER, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes**, 55, n. 6, p. 1537-1545, Jun 2006.

57 GOLDBERG, I. J.; ECKEL, R. H.; ABUMRAD, N. A. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase-and CD36-mediated pathways. **Journal of lipid research**, 50, n. Supplement, p. S86-S90, 2009.

58 GEALEKMAN, O. *et al.* Depot-Specific Differences and Insufficient Subcutaneous Adipose Tissue Angiogenesis in Human Obesity. **Circulation**, 123, n. 2, p. 186-194, 2011/01/18 2011.

59 TOWNSEND, L. K.; WRIGHT, D. C. Looking on the "brite" side exercise-induced browning of white adipose tissue. **Pflugers Arch**, 471, n. 3, p. 455-465, Mar 2019.

60 OWEN, B. M.; MANGELSDORF, D. J.; KLIEWER, S. A. Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 26, n. 1, p. 22-29, 2015.

61 GENG, L.; LAM, K. S. L.; XU, A. The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic. **Nature Reviews Endocrinology**, 16, n. 11, p. 654-667, 2020/11// 2020.

62 FISHER, F. M.; MARATOS-FLIER, E. Understanding the Physiology of FGF21. **Annual Review of Physiology**, 78, n. 1, p. 223-241, 2016/02/10 2016.

63 FISHER, F. M. *et al.* FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. **Genes Dev**, 26, n. 3, p. 271-281, Feb 1 2012.

64 GREMEAUX, V. *et al.* Exercise and longevity. **Maturitas**, 73, n. 4, p. 312-317, Dec 2012.

65 BOOTH, F. W.; ROBERTS, C. K.; LAYE, M. J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Compr Physiol**, 2, n. 2, p. 1143-1211, Apr 2012.

66 PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scand J Med Sci Sports**, 25 Suppl 3, p. 1-72, Dec 2015.

67 PARRY-WILLIAMS, G.; SHARMA, S. The effects of endurance exercise on the heart: panacea or poison? **Nat Rev Cardiol**, 17, n. 7, p. 402-412, Jul 2020.

68 MOREIRA, J. B. N.; WOHLWEND, M.; WISLØFF, U. Exercise and cardiac health: physiological and molecular insights. **Nature Metabolism**, 2020/08/17/ 2020.

69 GUBERT, C.; HANNAN, A. J. Exercise mimetics: harnessing the therapeutic effects of physical activity. **Nat Rev Drug Discov**, 20, n. 11, p. 862-879, Nov 2021.

70 COLBERG, S. R. *et al.* Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. **Diabetes care**, 33, n. 12, p. e147-e167, 2010.

71 STANFORD, K. I. *et al.* A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis. **Diabetes**, 64, n. 6, p. 2002-2014, 2015.

72 GALGANI, J. E.; MORO, C.; RAVUSSIN, E. Metabolic flexibility and insulin resistance. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 295, n. 5, p. E1009-E1017, 2008.

73 HIGA, T. S. *et al.* Remodeling of white adipose tissue metabolism by physical training prevents insulin resistance. **Life Sciences**, 103, n. 1, p. 41-48, 2014/05// 2014.

74 AMERICO, A. L. V. *et al.* Aerobic exercise training prevents obesity and insulin resistance independent of the renin angiotensin system modulation in the subcutaneous white adipose tissue. **PLoS One**, 14, n. 4, p. e0215896, 2019.

75 STANFORD, K. I.; MIDDELBECK, R. J.; GOODYEAR, L. J. Exercise effects on white adipose tissue: being and metabolic adaptations. **Diabetes**, 64, n. 7, p. 2361-2368, 2015.

76 AMÉRICO, A. L. V. *et al.* Aerobic exercise training prevents obesity and insulin resistance independent of the renin angiotensin system modulation in the subcutaneous white adipose tissue. **PLOS ONE**, 14, n. 4, p. e0215896, 2019.

77 GLEESON, M. *et al.* The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature Reviews Immunology**, 11, p. 607, 08/05/online 2011. Review Article.

78 CZARKOWSKA-PACZEK, B. *et al.* The influence of physical exercise on the generation of TGF- β 1, PDGF-AA, and VEGF-A in adipose tissue. **European journal of applied physiology**, 111, n. 5, p. 875-881, 2011.

79 KAWANISHI, N. *et al.* Exercise training attenuates adipose tissue fibrosis in diet-induced obese mice. **Biochemical and biophysical research communications**, 440, n. 4, p. 774-779, 2013.

80 BUCHHEIT, M.; LAURSEN, P. B. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle. Part II: anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications. **Sports Med**, 43, n. 10, p. 927-954, Oct 2013.

81 BUCHHEIT, M.; LAURSEN, P. B. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part I: cardiopulmonary emphasis. **Sports Med**, 43, n. 5, p. 313-338, May 2013.

82 THIBAUT, G. A graphical model for interval training. **NEW STUDIES IN ATHLETICS**, 18, n. 3, p. 49-56, 2003.

83 HILL, A. V. Muscular Movement in Man: The Factors Governing Speed and Recovery from Fatigue. **Muscular Movement in Man: the Factors governing Speed and Recovery from Fatigue.**, 1927.

84 BILLAT, L. V. Interval training for performance: a scientific and empirical practice. Special recommendations for middle- and long-distance running. Part I: aerobic interval training. **Sports Med**, 31, n. 1, p. 13-31, 2001.

85 HERZOG, W. Running slow or running fast; that is the question: The merits of high-intensity interval training. **J Sport Health Sci**, 6, n. 1, p. 48, Mar 2017.

86 ÅSTRAND, I. *et al.* Intermittent muscular work. **Acta Physiologica Scandinavica**, 48, n. 3 - 4, p. 448-453, 1960.

87 CHRISTENSEN, E. H.; HEDMAN, R.; SALTIN, B. Intermittent and continuous running (A further contribution to the physiology of intermittent work.). **Acta Physiologica Scandinavica**, 50, n. 3 - 4, p. 269-286, 1960.

88 ASTRAND, I. *et al.* Myohemoglobin as an oxygen-store in man. **Acta Physiologica Scandinavica**, 48, p. 454-460, 1960.

89 ÅSTRAND, I. *et al.* Circulatory and respiratory adaptation to severe muscular work. **Acta Physiologica Scandinavica**, 50, n. 3 - 4, p. 254-258, 1960.

90 GIBALA, M. J. *et al.* Physiological adaptations to low - volume, high - intensity interval training in health and disease. **The Journal of physiology**, 590, n. 5, p. 1077-1084, 2012.

91 KHALAFI, M.; SYMONDS, M. E. The impact of high-intensity interval training on inflammatory markers in metabolic disorders: A meta-analysis. **Scand J Med Sci Sports**, 30, n. 11, p. 2020-2036, Nov 2020.

92 WEWEGE, M. *et al.* The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis: Exercise for improving body composition. **Obesity Reviews**, 18, n. 6, p. 635-646, 2017/06// 2017.

93 KEATING, S. E. *et al.* A systematic review and meta-analysis of interval training versus moderate-intensity continuous training on body adiposity. **Obes Rev**, 18, n. 8, p. 943-964, Aug 2017.

94 MOTTA, V. F. *et al.* Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, 123, n. 4, p. 699-709, 2017.

95 MOTTA, V. F.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. High-Intensity Interval Training Beneficial Effects in Diet-Induced Obesity in Mice: Adipose Tissue, Liver Structure, and Pancreatic Islets. **International Journal of Morphology**, 34, n. 2, 2016.

96 HARAM, P. M. *et al.* Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. **Cardiovascular research**, 81, n. 4, p. 723-732, 2009.

97 LARSEN, S. *et al.* The effect of high - intensity training on mitochondrial fat oxidation in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, 25, n. 1, 2015.

98 MOTIANI, P. *et al.* Decreased insulin-stimulated brown adipose tissue glucose uptake after short-term exercise training in healthy middle-aged men. **Diabetes Obes Metab**, 19, n. 10, p. 1379-1388, Oct 2017.

99 MARCINKO, K. *et al.* High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity. **Molecular metabolism**, 4, n. 12, p. 903-915, 2015.

100 DAVIS, R. A. H. *et al.* High-intensity interval training and calorie restriction promote remodeling of glucose and lipid metabolism in diet-induced obesity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 313, n. 2, p. E243-E256, 2017.

101 WANG, N. *et al.* High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice. **Life Sciences**, 191, p. 122-131, 2017/12// 2017.

102 MCGEE, S. L.; HARGREAVES, M. Exercise adaptations: molecular mechanisms and potential targets for therapeutic benefit. **Nat Rev Endocrinol**, 16, n. 9, p. 495-505, Sep 2020.

103 KEMI, O. J. *et al.* Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, 93, n. 4, p. 1301-1309, 2002/10/01/ 2002.

104 FERRANNINI, E. The theoretical bases of indirect calorimetry: A review. **Metabolism**, 37, n. 3, p. 287-301, 1988/03// 1988.

105 MACHADO, C. E. P.; CAPUTO, F.; DENADAI, B. S. Intensidade de exercício correspondente ao VO₂max durante o ciclismo: análise de diferentes critérios em indivíduos treinados. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, 18, n. 4, p. 333-341, 2004.

106 KHAN, T. *et al.* Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. **Molecular and cellular biology**, 29, n. 6, p. 1575-1591, 2009.

107 HIGA, T. S. *et al.* Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, 6, n. 1, p. 47, 2014.

108 HEINONEN, S. *et al.* Adipocyte morphology and implications for metabolic derangements in acquired obesity. **International Journal of Obesity**, 38, n. 11, p. 1423-1431, 2014/11/01/ 2014.

109 PARLEE, S. D. *et al.* Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. **Methods in enzymology**, 537, p. 93-122, 2014.

110 DI GIROLAMO, M.; MENDLINGER, S.; FERTIG, J. W. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. **Am J Physiol**, 221, n. 3, p. 850-858, Sep 1971.

111 SPALDING, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, 453, n. 7196, p. 783-787, 2008/06// 2008.

112 LIU, J. *et al.* Picosirius - Polarization Method for Collagen Fiber Detection in Tendons: A Mini - Review. **Orthopaedic Surgery**, 13, n. 3, p. 701-707, 2021/05// 2021.

113 CHEN, Y.; YU, Q.; XU, C.-B. A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software. **Int J Clin Exp Med**, 10, n. 10, p. 14904-14910, 2017.

114 DRIFKA, C. R. *et al.* Comparison of Picrosirius Red Staining With Second Harmonic Generation Imaging for the Quantification of Clinically Relevant Collagen Fiber Features in Histopathology Samples. **J Histochem Cytochem**, 64, n. 9, p. 519-529, Sep 2016.

115 HELPS, S. C. *et al.* Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, 20, n. 1, p. 82-90, 2012.

116 BARKER, A. R. *et al.* Establishing maximal oxygen uptake in young people during a ramp cycle test to exhaustion. **Br J Sports Med**, 45, n. 6, p. 498-503, May 2011.

117 PAN, X. *et al.* Transforming growth factor beta1 induces the expression of collagen type I by DNA methylation in cardiac fibroblasts. **PLoS One**, 8, n. 4, p. e60335, 2013.

118 VARADARAJ, A. *et al.* TGF- β triggers rapid fibrillogenesis via a novel T β RII-dependent fibronectin-trafficking mechanism. **Molecular biology of the cell**, 28, n. 9, p. 1195-1207, 2017.

119 VECCHIATTO, B. *et al.* Oxidative phenotype induced by aerobic physical training prevents the obesity-linked insulin resistance without changes in gastrocnemius muscle ACE2-Angiotensin(1-7)-Mas axis. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, 13, n. 1, p. 74, 2021/07/06 2021.

120 KHALAFI, M. *et al.* The Impact of Moderate-Intensity Continuous or High-Intensity Interval Training on Adipogenesis and Browning of Subcutaneous Adipose Tissue in Obese Male Rats. **Nutrients**, 12, n. 4, Mar 27 2020.

121 VECCHIATTO, B.; EVANGELISTA, F. D. S. A. **Papel da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no músculo esquelético para a prevenção de distúrbios metabólicos por meio do treinamento físico aeróbio**. 2019. Master's Thesis -, Universidade de São Paulo.

122 HOPKER, J. *et al.* Inverse relationship between $\dot{V}O_{2\max}$ and gross efficiency. **International journal of sports medicine**, 33, n. 10, p. 789-794, 2012.

123 HOYDAL, M. A. *et al.* Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, 14, n. 6, p. 753-760, Dec 2007.

124 SANTALLA, A.; NARANJO, J.; TERRADOS, N. Muscle efficiency improves over time in world-class cyclists. **Med Sci Sports Exerc**, 41, n. 5, p. 1096-1101, May 2009.

125 CASTANO, C. *et al.* Delivery of muscle-derived exosomal miRNAs induced by HIIT improves insulin sensitivity through down-regulation of hepatic FoxO1 in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 117, n. 48, p. 30335-30343, Dec 1 2020.

126 MOTTA, V. F. *et al.* Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, 123, n. 4, p. 699-709, Oct 1 2017.

127 O'DONOGHUE, G. *et al.* What exercise prescription is optimal to improve body composition and cardiorespiratory fitness in adults living with obesity? A network meta - analysis. **Obesity Reviews**, p. obr.13137, 2020/09/08/ 2020.

128 MAILLARD, F.; PEREIRA, B.; BOISSEAU, N. Effect of High-Intensity Interval Training on Total, Abdominal and Visceral Fat Mass: A Meta-Analysis. **Sports Med**, 48, n. 2, p. 269-288, Feb 2018.

129 MAZZUCATTO, F. *et al.* Reversal of metabolic adaptations induced by physical training after two weeks of physical detraining. **International journal of clinical and experimental medicine**, 7, n. 8, p. 2000-2008, 2014.

130 MOTTA, V. F. *et al.* Browning is activated in the subcutaneous white adipose tissue of mice metabolically challenged with a high-fructose diet submitted to high-intensity interval training. **J Nutr Biochem**, 70, p. 164-173, Aug 2019.

131 STANFORD, K. I.; GOODYEAR, L. J. Exercise regulation of adipose tissue. **Adipocyte**, 5, n. 2, p. 153-162, 2016/04/02/ 2016.

132 GARRITSON, J. D.; BOUDINA, S. The Effects of Exercise on White and Brown Adipose Tissue Cellularity, Metabolic Activity and Remodeling. **Frontiers in Physiology**, 12, n. 1938, 2021-November-02 2021. Mini Review.

133 SVENSSON, H. *et al.* Body fat mass and the proportion of very large adipocytes in pregnant women are associated with gestational insulin resistance. **Int J Obes (Lond)**, 40, n. 4, p. 646-653, Apr 2016.

134 BOUSKILA, M.; PAJVANI, U. B.; SCHERER, P. E. Adiponectin: a relevant player in PPAR γ -agonist-mediated improvements in hepatic insulin sensitivity? **International Journal of Obesity**, 29, n. 1, p. S17-S23, 2005/03/01 2005.

135 NAPOLITANO, L. M. Observations on the fine structure of adipose cells. **Ann N Y Acad Sci**, 131, n. 1, p. 34-42, Oct 8 1965.

136 AHN, C. *et al.* 721-P: Exercise Training Alters Subcutaneous Adipose Tissue Morphology in Obese Adults Even without Weight Loss. **Diabetes**, 68, n. Supplement 1, p. 721-P, 2019.

137 ALLERTON, T. D. *et al.* Exercise reduced the formation of new adipocytes in the adipose tissue of mice in vivo. **PLoS One**, 16, n. 1, p. e0244804, 2021.

138 GOLLISCH, K. S. *et al.* Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 297, n. 2, p. E495-504, Aug 2009.

139 SERTIE, R. A. L. *et al.* The mechanisms involved in the increased adiposity induced by interruption of regular physical exercise practice. **Life Sci**, 222, p. 103-111, Apr 1 2019.

140 SERTIE, R. A. *et al.* Cessation of physical exercise changes metabolism and modifies the adipocyte cellularity of the periepididymal white adipose tissue in rats. **J Appl Physiol (1985)**, 115, n. 3, p. 394-402, Aug 1 2013.

141 TAYLOR, B.; SHAH, A.; BIELCZYK-MACZYŃSKA, E. TGF- β is insufficient to induce adipocyte state loss without concurrent PPAR γ downregulation. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 14084, 2020/08/21 2020.

142 LIU, X. *et al.* Type I collagen inhibits adipogenic differentiation via YAP activation in vitro. **J Cell Physiol**, 235, n. 2, p. 1821-1837, Feb 2020.

143 ROBERTSON, A.; WATTON, P. Chapter 8: Mechanobiology of the Arterial Wall. In, 2013. p. 275-347 (273 pages).

144 KEENE, D. R. *et al.* Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter. **The Journal of cell biology**, 105, n. 5, p. 2393-2402, 1987.

145 ZHOU, Z.-H. *et al.* Reorganized Collagen in the Tumor Microenvironment of Gastric Cancer and Its Association with Prognosis. **Journal of Cancer**, 8, n. 8, p. 1466-1476, 2017. Research Paper.

146 WITTE, M. *et al.* A method to analyze the influence of mechanical strain on dermal collagen morphologies. **Scientific Reports**, 11, n. 1, p. 7565, 2021/04/07 2021.

147 QUEEN, N. J. *et al.* Visceral adipose tissue-directed FGF21 gene therapy improves metabolic and immune health in BTBR mice. **Mol Ther Methods Clin Dev**, 20, p. 409-422, Mar 12 2021.

148 MARTINEZ-HUENCHULLAN, S. F. *et al.* Constant-Moderate and High-Intensity Interval Training Have Differential Benefits on Insulin Sensitive Tissues in High-Fat Fed Mice. **Front Physiol**, 10, p. 459, 2019.

149 MAHARJAN, B. R. *et al.* Exercise induces favorable metabolic changes in white adipose tissue preventing high-fat diet obesity. **Physiol Rep**, 9, n. 16, p. e14929, Aug 2021.

150 WU, M. V. *et al.* Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high fat diet and endurance training in rats: impact on whole-body energy expenditure. **J Biol Chem**, 289, n. 49, p. 34129-34140, Dec 5 2014.

151 SEVERINSEN, M. C. K.; SCHEELE, C.; PEDERSEN, B. K. Exercise and browning of white adipose tissue - a translational perspective. **Curr Opin Pharmacol**, 52, p. 18-24, Jun 2020.

152 TSILOULIS, T. *et al.* No evidence of white adipocyte browning after endurance exercise training in obese men. **Int J Obes (Lond)**, 42, n. 4, p. 721-727, Apr 2018.

153 CAMERA, D. M. *et al.* Short-term endurance training does not alter the oxidative capacity of human subcutaneous adipose tissue. **Eur J Appl Physiol**, 109, n. 2, p. 307-316, May 2010.

154 VOSELNMAN, M. J. *et al.* Low brown adipose tissue activity in endurance-trained compared with lean sedentary men. **Int J Obes (Lond)**, 39, n. 12, p. 1696-1702, Dec 2015.