Rodrigo Rodrigues Marcondes

**Efeitos do exercício sobre os aspectos metabólicos e reprodutivos de
modelos murinos de síndrome dos ovários policísticos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel

Coorientadora: Profa. Dra. Kátia Cândido Carvalho

Versão corrigida e definitiva de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 13/10/2011

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Marcondes, Rodrigo Rodrigues

Efeitos do exercício sobre os aspectos metabólicos e reprodutivos de modelos murinos de síndrome dos ovários policísticos / Rodrigo Rodrigues Marcondes -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Gustavo Arantes Rosa Maciel.

Coorientador: Kátia Cândido Carvalho.

Descritores: 1.Síndrome do ovário policístico 2.Exercício 3.Tecido adiposo

USP/FM/DBD-253/17

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família: meus pais Juca e Wilma, meu irmão Rodolfo, e minha avó Lídia. O apoio e educação que vocês me deram foi essencial para a execução desse trabalho.

Agradecimentos

Registro meu agradecimento:

Ao professor Gustavo A. R. Maciel, pela orientação científica que segue desde a época de mestrado, ensinamentos, incentivo e amizade. Seu incentivo e sua orientação foram essenciais para minha carreira na ciência. Registro aqui o meu muito obrigado.

À professora Elisabet Stener-Victorin (Instituto Karolinska), pela orientação e tutoria durante todas as etapas desse estudo. Obrigado por me receber em seu laboratório e me proporcionar o aprendizado de vários métodos em experimentação animal e em desenhos de estudos experimentais. Mudei como humano e profissional após sua tutoria e conselhos. Admiro sua competência e serei eternamente grato pelos ensinamentos transmitidos.

À doutora Kátia C. Carvalho pela orientação e tutoria nos trabalhos de bancada, amizade, suporte e conselhos desde a época de mestrado. Obrigado por compartilhar todo conhecimento técnico possível, o que contribuiu consideravelmente para minha formação profissional.

Ao professor Edmund C. Baracat por todo suporte, orientações e incentivo durante toda a minha jornada na pós-graduação. Muito obrigado por tudo.

Aos amigos e pesquisadores Manuel Maliqueo, Romina Fornes, Min Hu, Anna Benrick, Milana Kokosar, Maria Manti, Mary, Eva Lindgren e Lisa Lindheim (Grupo de Endocrinologia Reprodutiva e Metabolismo, Instituto Karolinska), pelo auxílio direto e indireto na execução dos experimentos e pela amizade e fraternidade de todos. Minha temporada na Suécia foi excepcional pelo aprendizado em ciência e pelos momentos ao lado de todos vocês.

Aos professores Karin Stenkula (Universidade de Lund) e Samuel W. Cushman (NIH) pela tutoria e ajuda na interpretação dos dados com o método de morfometria de adipócitos. A mentoria desses professores foi essencial para a execução desse estudo.

Aos pesquisadores Mattias Carlström (Instituto Karolinska), pelo auxílio prático na análise de composição corporal de animais, e Niklas Ivarsson (Instituto Karolinska), pelo auxílio com o uso, coleta e análise de dados da roda de corrida.

Ao meu amigo e grande pesquisador Jorge Correia (Instituto Karolinska), pelos conselhos relacionados à ciência e pelos primers doados para melhoria desse estudo.

Ao professor Carlos E. Negrão e ao pesquisador Igor L. Gomes Santos (Incor), pelo auxílio inicial com pesquisa experimental em exercício, o que me auxiliou para o desenvolvimento desse projeto.

A minha amiga Natália Garcia pelo incentivo, conselhos e ajuda desde à época de mestrado até os dias atuais, e também pelo auxílio em momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM 58), Thiago H. Gonçalves, Juciara C. Silva, Giulia Araújo, Nalva, Leonardo Tomiatti, Giovana Maffazioli, Luísa Pimenta e demais amigos, pelo incentivo e compartilhamento de conhecimento durante a execução desse projeto.

Ao meu amigo Vinícius C. Amaral, por me apresentar ao LIM 58 e por me incentivar por toda essa jornada na ciência.

Ao professor José Maria Soares Junior, pelos conselhos, conhecimento transmitido e críticas científicas ao longo de minha carreira acadêmica.

Aos meus amigos João Lopes, Quim, Gianluca, Anderson, Eduardo, Bruno, Sheila, Paulo Jannig, Pedro Amorim, Matheus, Dênis, João Amorim, Paula, Xin, Dominyka,

Emilia, Emma, Shamim, Julen, Leo e demais amigos, os quais indiretamente contribuíram para esse trabalho com amizade, incentivo e apoio nos momentos difíceis. Tenho eterna gratidão pela amizade de todos vocês.

Ao programa Ciência Sem Fronteiras, que financiou um ano de minha estadia no Instituto Karolinska, o que proporcionou a mim grande amadurecimento científico durante esse período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio de viagem para estadia adicional no exterior, a ao Instituto Karolinska, pelo auxílio financeiro e estrutura para realização desse trabalho.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
1.1. Síndrome dos ovários policísticos.....	1
1.2. Modelos animais para o estudo da síndrome dos ovários policísticos.....	3
1.3. Tecido adiposo e seu papel nas disfunções metabólicas.....	5
1.4. O papel do exercício no tecido adiposo e nas disfunções metabólicas em mulheres com síndrome dos ovários policísticos.....	10
2. Objetivos.....	12
3. Material e métodos.....	13
3.1. Animais.....	13
3.2. Procedimento do estudo.....	13
3.3. Exercício voluntário em roda de corrida.....	15
3.4. Esfregaço vaginal.....	15
3.5. Teste de tolerância à insulina (TTI).....	15
3.6. Teste de tolerância à glicose (TTG).....	15
3.7. ELISA para detecção de insulina.....	16
3.8. Avaliação da composição corporal por absorção de raios-X de dupla energia (DEXA).....	16
3.9. Distribuição e diâmetro de adipócitos.....	17
3.10. Processamento histológico.....	17
3.11. PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR).....	18
3.12. Quantificação de triglicérides no fígado.....	20
3.13. Análise estatística.....	21
4. Resultados.....	22
4.1. Peso corporal e ingestão alimentar.....	22
4.2. Ciclo estral.....	23
4.3. Composição corporal antes do exercício.....	24
4.4. Atividade da roda de corrida.....	25
4.5. Composição corporal após o exercício e peso de órgãos.....	25
4.6. Tolerância à insulina.....	28
4.7. Tolerância à glicose e níveis de insulina durante o TTG.....	29
4.8. Índices de resistência insulínica e função das células beta do pâncreas.....	29
4.9. Distribuição de diâmetro de células e expressão de genes relacionados à adipogênese e metabolismo de lipídeos no tecido adiposo.....	32
4.10. Expressão de genes relacionados à via do NOTCH, família dos BMPs, browning e atividade simpática no tecido adiposo.....	37
4.11. Triglicérides no fígado.....	41
5. Discussão.....	43
6. Conclusões.....	49
7. Referências.....	50
Apêndice	

Lista de abreviaturas e siglas

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°	Graus
µg	Micrograma
µm	Micrometro
ANOVA	Análise de variância
AUC	Área sob a curva
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
C	Celsius
C/EBP- α	Proteína ligante ao amplificador CCAATalfa
CIDEA	Ativador de morte celular CIDE-A
cm ²	Centímetro quadrado
DEXA	Absorção de raios-X de dupla energia
DHT	Di-hidrotestosterona
DM2	Diabetes mellitus do tipo 2
DMO	Densidade mineral óssea
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Grama
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
H. E.	Hematoxilina e eosina
HOMA-B	Modelo de avaliação da homeostase das células beta do pâncreas
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina
ISI ₀	Índice de sensibilidade à insulina
L	Litro
LH	Hormônio luteinizante
m	Metro
mg	Miligrama
MGA	Massa gorda abdominal
MGT	Massa gorda total
ml	Mililitro
mmol	Milimol
ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGC1- α	Coativador 1 alfa do PPAR- γ
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PRDM16	Proteína Coreguladora PRDM16
qRT-PCR	PCR quantitativo em Tempo Real
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
SREBP-1	Proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1
TTG	Teste de tolerância à glicose
TTI	Teste de tolerância à insulina
UCP-1	Termogenina

Lista de tabelas

Tabela 1. Lista de ensaios utilizados nas reações de PCR quantitativo em Tempo Real...	19
Tabela 2. Porcentagem de fases do ciclo estral entre os 83-91 dias de idade dos animais de acordo com o grupo experimental.....	24
Tabela 3. Composição corporal dos animais antes do exercício.....	25
Tabela 4. Atividade das rodas de corrida nos grupos DHT+EX e LET+EX.....	25
Tabela 5. Composição corporal e peso dos órgãos após o exercício.....	27
Tabela 6. Modelos de avaliação de resistência insulínica e de função das células beta do pâncreas.....	29

Lista de figuras

Figura 1. Esquema do desenho do estudo.....	14
Figura 2. Desenvolvimento em peso dos animais entre os grupos experimentais.....	22
Figura 3. Ingestão alimentar nos grupos experimentais.....	23
Figura 4. Testes de tolerância à insulina.....	30
Figura 5. Testes de tolerância à glicose.....	31
Figura 6. Distribuição de tamanho de adipócitos e expressão de genes relacionados à adipogênese e metabolismo de lipídeos nos tecidos adiposos inguinal e mesentérico.....	34
Figura 7. Fotomicrografias e histogramas de distribuição de adipócitos por tamanho no tecido adiposo inguinal.....	35
Figura 8. Fotomicrografias e histogramas de distribuição de adipócitos por tamanho no tecido adiposo mesentérico.....	36
Figura 9. Expressão de genes relacionados a lipólise no tecido adiposo mesentérico.....	37
Figura 10. Expressão de genes relacionados a via do NOTCH, família dos BMPs, <i>browning</i> e atividade simpática.....	39
Figura 11. Correlação entre os dados de expressão gênica de <i>Notch1</i> e marcadores de <i>browning</i> no tecido adiposo inguinal.....	40
Figura 12. Concentração de triglicérides no fígado nos grupos experimentais.....	41
Figura 13. Resumo dos efeitos do exercício sobre os fenótipos metabólicos e reprodutivos em camundongos expostos ao letrozol e di-hidrotestosterona.....	42

Resumo

Marcondes, R.R. *Efeitos do exercício sobre os aspectos metabólicos e reprodutivos de modelos murinos de síndrome dos ovários policísticos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

O exercício físico é intervenção de primeira linha e parece melhorar os sintomas da síndrome dos ovários policísticos (SOP). Porém, os mecanismos dessas alterações ainda são pouco entendidos. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do exercício voluntário sobre os aspectos metabólicos e reprodutivos de modelos murinos de SOP induzida por di-hidrotestosterona (DHT) ou letrozol (LET). Péletes de DHT ou LET foram utilizados para a indução de SOP experimental em camundongas pré-puberes. Os camundongos controles receberam péletes sem substância ativa. Cinco semanas após a exposição aos compostos teve início o exercício voluntário em rodas de corrida. Foram avaliados peso, composição corporal, tolerância à insulina e à glicose e o ciclo estral. Os grupos experimentais foram: controle (n=9), DHT (n=10), LET (n=9), DHT+exercício (EX) (n=9) e LET+EX (n=10). Após 4-5 semanas de exercício, os animais foram eutanasiados e os tecidos adiposos inguinal e mesentérico foram utilizados para análises morfológicas e moleculares. O grupo DHT apresentou aumento do peso corporal, aumento da proporção de grandes adipócitos mesentéricos e ciclo estral anormal. O grupo LET apresentou aumento do peso corporal e massa gorda, diminuição da sensibilidade à insulina, aumento da população de adipócitos pequenos, aumento da expressão de genes relacionados à lipólise na gordura mesentérica e ciclo estral anormal. O exercício reduziu a massa gorda e a expressão de genes da via NOTCH no tecido adiposo inguinal e mesentérico, e restaurou a morfologia alterada dos adipócitos mesentéricos, e a expressão de genes da via do NOTCH foi negativamente correlacionada com a expressão de genes da via de *browning* (transformação da gordura branca em gordura de fenótipo marrom) nos grupos DHT+EX e LET+EX. Em conclusão, o exercício restaurou a morfologia dos adipócitos mesentéricos em modelos animais de SOP induzida por DHT e LET, melhorou a sensibilidade à insulina, aumentou a expressão mesentérica de genes relacionados à lipólise e melhorou o ciclo estral em modelo animal de SOP induzida por LET. Esses benefícios podem ser atribuídos, pelo menos em parte, pela inibição de genes da via do NOTCH e pela modulação das vias de *browning* e lipólise no tecido adiposo.

Descritores: síndrome do ovário policístico; exercício; tecido adiposo.

Abstract

Marcondes, R.R. *Effects of exercise on metabolic and reproductive aspects of polycystic ovary syndrome mouse models* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Exercise is the first line treatment and it seems to improve the symptoms of polycystic ovary syndrome (PCOS), but the mechanisms of these alterations are still poorly understood. The objective of this study was to evaluate the effects of voluntary exercise on metabolic and reproductive aspects of PCOS mouse models induced by dihydrotestosterone (DHT) or letrozole (LET). DHT or LET pellets were used for the induction of experimental PCOS in prepubertal mice. Control mice received placebo pellets. Five weeks after exposure to the substances, voluntary exercise on running wheels began. Body weight, body composition, insulin and glucose tolerance, and estrous cycle were evaluated. The experimental groups were control (n = 9), DHT (n = 10), LET (n = 9), DHT+exercise (EX) (n = 9) and LET+EX (n = 10). After 4-5 weeks of exercise, the animals were euthanized and the inguinal and mesenteric fat depots were collected for morphological and molecular analyzes. The DHT group showed increased body weight, increased proportion of large mesenteric adipocytes and abnormal estrous cycle. The LET group presented increased body weight and fat mass, decreased insulin sensitivity, increased population of small adipocytes, increased expression of genes related to lipolysis in mesenteric fat and abnormal estrous cycle. Exercise reduced fat mass and NOTCH pathway gene expression in inguinal and mesenteric adipose tissue, and restored the altered morphology of mesenteric adipocytes, and NOTCH pathway gene expression was negatively correlated with gene expression of the browning (transformation from white fat to brown-like fat) markers in both DHT+EX and LET+EX groups. In conclusion, the exercise restored the mesenteric adipocyte morphology in the DHT- and LET-induced PCOS mouse models, and the insulin sensitivity, the mesenteric expression of genes related to lipolysis, and improved the estrous cycle in the LET-induced PCOS mouse model. These benefits may be attributed, at least in part, to the inhibition of NOTCH pathway genes and the modulation of browning and lipolysis pathways in the adipose tissue.

Descriptors: polycystic ovary syndrome; exercise; adipose tissue.

1. Introdução

1.1. Síndrome dos ovários policísticos

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é a endocrinopatia mais comum em mulheres em idade reprodutiva. É uma entidade clínica heterogênea, possui etiologia desconhecida e é caracterizada principalmente por hiperandrogenismo, anovulação crônica e ovários policísticos (1). Disfunções metabólicas, como resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e dislipidemia, frequentemente se associam à SOP, o que leva mulheres com a síndrome a terem maior risco de diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) e de doenças cardiovasculares (2).

A obesidade também se associa fortemente à SOP, uma vez que mais de 50% das pacientes com SOP apresentam algum grau de excesso de peso (1). Além disso, essas pacientes parecem mais propensas a ganharem peso, principalmente com acúmulo de gordura visceral, chamada obesidade central (3, 4). Sabe-se também que a obesidade piora os achados reprodutivos, metabólicos (3, 4) e a resposta ao tratamento com metformina (5).

Quanto à fisiopatologia reprodutiva, o hiperandrogenismo é resultante de uma secreção exagerada de androgênios pelos ovários e adrenais. O hiperandrogenismo de origem ovariana é atribuído a uma série de alterações: o hiperestímulo de hormônio luteinizante (LH) nas células da teca interna ovariana, a ação da insulina como co-gonadotrofina (6), a resposta exacerbada das células da teca ao estímulo de LH (7), bem como a expressão aumentada de enzimas das células da teca envolvidas na síntese de androgênios, principalmente as enzimas do citocromo P450, 17, 20 liase e 17 hidroxilase (7, 8).

Na síndrome, as células da teca possuem capacidade aumentada de produção de androgênios sob o estímulo da insulina e do LH (9). O LH, por sua vez, encontra-se em concentrações aumentadas em 40-50% das mulheres com SOP (10). A justificativa para esse

aumento é uma alteração da função normal do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano e pode ser resultante de alterações nos mecanismos de retroalimentação mediados por esteroides sexuais na secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo (11), o que pode contribuir para o aumento da frequência e amplitude dos pulsos de GnRH (6).

A hipersecreção de LH parece ser influenciada por estímulo central mediado pela insulina, uma vez que a insulina interage com os seus receptores em neurônios hipotalâmicos e pode estimular a secreção do GnRH e consequentemente LH (12, 13). De fato, camundongos com obesidade induzida por dieta rica em gordura apresentam aumento dos pulsos de GnRH/LH e disfunção na fertilidade. Quando há o nocaute do gene que codifica o receptor de insulina, ocorre a normalização da secreção de GnRH/LH e melhora da fertilidade (14).

Quanto ao aspecto metabólico, mulheres com SOP possuem maior prevalência de intolerância à glicose e DM2 em comparação a mulheres com ovulação normal (15). Essa síndrome também é associada com a esteatose hepática (1), que é definida pelo acúmulo lipídico nos hepatócitos (16). Também é sabido que a resistência à insulina acomete tanto pacientes magras como obesas com SOP, indicando que esta disfunção metabólica não é uma característica dependente exclusivamente da obesidade (15). Por mais que a resistência insulínica na SOP não seja dependente da obesidade, esta é observada nos fenótipos reprodutivos e metabólicos mais graves da síndrome (4). Além disso, pacientes com SOP apresentam aumento da atividade simpática, o que pode contribuir para disfunções metabólicas e cardiovasculares (1).

Recentes estudos sugerem haver associação entre a SOP e disfunção do tecido adiposo, uma vez que essas mulheres apresentam hipertrofia de adipócitos, inflamação de baixo grau no tecido adiposo e alteração da produção e secreção de adipocinas (17). A hipertrofia de adipócitos em região subcutânea abdominal é um fator fortemente associado com a resistência insulínica (18). Referente a alterações transcricionais, diversas vias de sinalização estão

alteradas, incluindo vias de citocinas, do receptor de androgênio e do fator de crescimento nervoso (NGF, *nerve growth factor*), entre outras (19).

Poucos estudos são realizados com o tecido adiposo visceral de pacientes com SOP. Porém, estudos na gordura visceral omental mostram alteração do perfil de expressão de genes relacionados à via de sinalização da insulina, metabolismo de lipídeos, inflamação e estresse oxidativo (20), e aumento da taxa de lipólise induzida por catecolaminas (21).

A etiologia da síndrome não é completamente conhecida, mas fatores genéticos e ambientais parecem estar relacionados com a sua gênese (1, 4). Devido a dificuldades éticas e logísticas para de uso de amostras de pacientes para pesquisa, o uso de modelos animais se tornou uma alternativa para tentar desvendar a gênese e fisiopatologia da SOP, bem como para investigar estratégias de tratamento para esta condição.

1.2. Modelos animais para o estudo da síndrome dos ovários policísticos

Há vários modelos animais descritos na literatura, porém, nenhum reproduz completamente as características da síndrome. Pode-se induzir o aparecimento de fenótipos similares à SOP com exposição a esteroides sexuais (22, 23), letrozol (24), luz contínua (25), entre outros (26). Espécies tais como primatas, ovelhas, ratos e camundongos tem sido utilizados como modelos animais de SOP (27). Porém, o uso de primatas e ovelhas para pesquisa é extremamente caro (22, 28). Alternativamente, podem-se usar roedores para o estudo da SOP, sendo que esses animais possuem vantagens como a estabilidade genética e o curto período do ciclo estral, além da relativa facilidade de manejo e manutenção (28).

Diversos estudos tem utilizado a exposição a esteroides sexuais no período pré-natal, neonatal ou pré-puberal (27). Em ratas, foi mostrado que a exposição pré-puberal à dihidrotestosterona (DHT), que é um androgênio não aromatizável, induz a características

metabólicas e reprodutivas similares à SOP na vida adulta desses animais (22). Também foi mostrado, em camundongos, que a exposição pré-puberal a DHT leva a anovulação, diestro persistente, cistos ovarianos, aumento de peso, hipertrofia de adipócitos e intolerância à glicose ao teste de tolerância a glicose por via intraperitoneal (29).

Outro composto utilizado para a indução de modelos experimentais de SOP em roedores é o letrozol (LET), substância esta que inibe a ação da enzima aromatase, resultando no impedimento da conversão de androgênios em estrogênios e consequente acúmulo androgênico. Em modelos de ratos com SOP experimental induzida por LET, quando comparados ao modelo de SOP induzida por DHT, foi notado que o primeiro reproduz mais características reprodutivas da SOP, enquanto os modelos induzidos por DHT possuem fenótipo metabólico mais exacerbado, com resistência insulínica ao clampe euglicêmico hiperinsulinêmico (22). Anos depois foi mostrado que dentre as doses testadas, a exposição pré-puberal ao LET por dose diária de 200 µg/dia induz tanto características reprodutivas como características metabólicas da síndrome, incluindo a resistência insulínica ao clampe euglicêmico hiperinsulinêmico (24).

Em camundongos, a exposição pré-puberal ao LET também induz as disfunções reprodutivas e metabólicas características da SOP, resultando em animais com ovários policísticos, anovulação, metaestro/diestro persistente, aumento de peso e adiposidade, hipertrofia de adipócitos e intolerância à glicose ao teste intraperitoneal de tolerância a glicose (30).

Os modelos murinos de SOP induzida por DHT e LET apresentam muitas similaridades, tais como a irregularidade do ciclo estral, anovulação crônica e cistos ovarianos. Porém apenas o modelo de DHT apresenta esteatose hepática em avaliação histológica (31). Ambos modelos possuem hiperandrogenismo, porém, por diferentes mecanismos. O modelo animal de DHT apresenta hiperandrogenismo pela administração exógena de androgênio, já o

modelo de LET pela inibição da enzima aromatase, inibindo a conversão de androgênios em estrogênios, levando ao acúmulo androgênico.

É importante ressaltar que tanto o modelo murino de SOP induzida por DHT como por LET apresentam aumento de adiposidade corporal e alterações morfológicas no tecido adiposo (29, 30).

1.3. Tecido adiposo e seu papel nas disfunções metabólicas

O tecido adiposo é um órgão complexo com importantes efeitos sobre a fisiologia e patofisiologia do organismo humano. Este órgão tem a função de estocar energia em forma de triglicérides (lipogênese) em situações de balanço energético positivo e liberar substrato energético em forma de ácidos graxos (lipólise) em situações de demanda energética, participando assim da homeostase de nutrientes (32). Além disso, o tecido adiposo secreta substâncias com atividade endócrina, como a leptina, adiponectina, entre outros, sendo estas denominadas coletivamente como adipocinas. Estas substâncias participam em diversos processos fisiológicos, sendo que grande parte destas possuem papel na homeostase energética e de glicose (33).

Referente à anatomia dos depósitos de gordura, há a distinção de dois depósitos principais: subcutâneo e visceral (34). Os depósitos de gordura subcutâneos são envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo e são supridos por vasos sanguíneos e nervos específicos, principalmente noradrenérgicos. Em roedores há dois depósitos subcutâneos, o anterior e o posterior. O depósito subcutâneo anterior possui forma piramidal e se localiza profundamente na região interescapular, com projeções simétricas no sentido lateral entre a escápula e os músculos do dorso e também com projeções para as regiões cervical e axilar. O depósito

subcutâneo posterior é localizado na base das patas posteriores e se estende da região lombar até a parte inguinal (porção inguinal), púbica e glútea (porção glútea) (35).

Os depósitos de gordura visceral estão localizados na cavidade torácica e abdominal. O principal depósito torácico é o depósito mediastinal e é disposto em torno da parte proximal da aorta e de seus ramos torácicos. Os depósitos de gordura abdominal são divididos em retro e intraperitoneal. A gordura retroperitoneal se estende em sentido paravertebral, sendo localizada entre a coluna vertebral e o peritônio posterior. Os depósitos de gordura intraperitoneais são: perirenal, parametrial, paravesical, mesentérico e omental. Roedores machos apresentam ainda o depósito epididimal e as fêmeas apresentam o depósito periovariano. Em roedores fêmeas os depósitos perirenal, parametrial, paravesical e periovariano estão localizados no mesmo depósito, chamado de depósito abdomino-pélvico (35).

Há diversas diferenças fisiológicas dos adipócitos subcutâneos para os viscerais, especialmente em transporte e armazenamento de ácidos graxos, lipólise, produção de adipocinas e adaptação ao balanço energético positivo e negativo (36). Existem duas hipóteses para estas diferenças: a primeira é referente à especificidade de inervação e vascularização de cada depósito; a segunda diz que os adipócitos de cada depósito possuem mecanismos celulares autônomos que ditam essa diferença (34).

Esse tecido é constituído por células chamadas adipócitos, que podem compor 35-70% da massa de gordura, e células presentes na fração vascular estromal, que incluem pré-adipócitos, células-tronco mesenquimais, macrófagos, leucócitos, entre outras (37). Os adipócitos, estes são classificados em três tipos: branco, marrom e bege (34).

O adipócito branco possui a capacidade de estocar e liberar energia em forma de lipídeo. Essa característica do adipócito branco permite que o organismo possua fonte de

energia no jejum entre as refeições e no jejum prolongado. Sua forma esférica propicia o armazenamento de grande quantidade de lipídeo em um espaço relativamente pequeno, sendo que seu citoplasma é ocupado em cerca de 90% por um depósito unilocular de lipídeo composto por partículas de triglicérides e poucas mitocôndrias. Além disso, estes adipócitos possuem a capacidade de produzir hormônios (38).

Já o adipócito marrom tem como função a termogênese, pois possui a capacidade de dissipar a energia contida em forma de calor. Esta característica do adipócito marrom só é possível devido à presença da termogenina (UCP-1, do inglês *Uncoupling Protein 1*), que é uma proteína mitocondrial específica do adipócito marrom que interrompe o fluxo de elétrons da cadeia respiratória e favorece a produção de calor ao invés de adenosina trifosfato. Os adipócitos marrons clássicos possuem alta expressão basal de UCP-1, mesmo sem estímulo, e estão localizados no tecido adiposo marrom interescapular e perirenal em roedores (34). Estes adipócitos possuem múltiplos depósitos pequenos de gordura, grande número de mitocôndrias e são ricamente inervados e vascularizados (39).

O adipócito bege possui muitas características similares ao adipócito marrom, incluindo a morfologia e a expressão de UCP-1, mas se localiza dentro do tecido adiposo branco. Estímulos como o frio, exercício e alguns hormônios podem induzir o aumento da expressão de UCP-1 e, conseqüentemente, aumento da capacidade termogênica no adipócito bege. Quando estimulados, os adipócitos beges podem expressar UCP-1 em proporções similares ao do adipócito marrom. Porém, por mais que haja algumas similaridades entre os adipócitos bege e marrom, estes possuem origens embriológicas diferentes (40).

O processo pelo qual os pré-adipócitos se diferenciam em adipócitos maduros é denominado adipogênese. Os adipócitos só passam a ser responsivos a insulina e capazes de estocar lipídeos quando estão no estágio maduro (41). Vários fatores estão relacionados com a diferenciação de células adiposas, mas moléculas como o receptor ativado por proliferadores

de peroxissoma gama (PPAR- γ), a proteína ligante ao amplificador CCAAT alfa (C/EBP- α), proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1 (SREBP-1 ou SREBF-1), são fatores centrais no estímulo da adipogênese (41, 42).

Outros fatores, como membros da família das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs, do inglês *bone morphogenetic proteins*) também têm sido descritos como estimuladores da adipogênese. Observou-se que células mesenquimais expostas ao BMP-4 se diferenciam em células adiposas. O BMP-2 também estimula a adipogênese, mas ainda não se sabe se o BMP-2 exerce esse papel por si só ou se essa molécula é dependente de outros fatores, como insulina, para estimular a diferenciação de adipócitos (42).

Quanto à expansão do tecido adiposo, na vida adulta a mesma ocorre principalmente por hipertrofia de adipócitos, seguida de hiperplasia, especialmente em casos de obesidade prolongada. Na obesidade, a hipertrofia de adipócitos culmina com o aumento da lipólise basal por essas células, liberação de substâncias pró-inflamatórias e necrose celular no tecido adiposo, de modo que esses fatores são associados com o desenvolvimento de resistência à insulina (32).

A gordura subcutânea possui expansibilidade limitada e quando o balanço energético positivo excede a capacidade de expansão desse depósito, os lipídeos passam a se acumular na gordura visceral e em outros tecidos (43). O acúmulo de gordura visceral é relacionado com doenças metabólicas e cardiovasculares (34).

Na disfunção de armazenamento de lipídeos pelo tecido adiposo, ocorre o que se denomina lipotoxicidade, onde os lipídeos passam a se acumular em outros tecidos, tais como músculos esqueléticos, fígado, rins, coração e pâncreas. O acúmulo de lipídeos nesses tecidos (gordura ectópica) é relacionado ao desenvolvimento de DM2 e parece ocorrer para manter os ácidos graxos não esterificados circulantes em concentrações seguras para o organismo (32).

Uma hipótese para o acúmulo de gordura ectópica seria devido à inabilidade de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, o que resultaria na falta de capacidade do tecido adiposo em armazenar gordura de modo apropriado e, como consequência disso, a gordura passaria a ser depositada em outros tecidos além do tecido adiposo (44). De fato, tem sido mostrado em pacientes diabéticos do tipo 2 que no tecido subcutâneo abdominal há acúmulo de células adiposas pequenas quando comparados a indivíduos controles pareados por índice de massa corporal (44), além da diminuição da expressão de genes relacionados à adipogênese (44, 45).

O tecido adiposo marrom parece exercer um papel chave nos distúrbios metabólicos, uma vez que há redução da atividade dos adipócitos marrons e alterações em sua fisiologia em quadros como a obesidade e DM2. Por outro lado, a ativação de adipócitos marrons e beges, e o aumento da população de células beges no tecido adiposo branco, mecanismo esse conhecido como *browning* (termo não identificado em português), têm sido relacionados à melhora do perfil metabólico e proteção contra obesidade (46). Vários fatores têm sido descritos na literatura como estimuladores de *browning*, tais como o frio, exercício, fatores hormonais, entre outros (38).

Em relação as moléculas envolvidas no processo de *browning*, coativador 1 alfa do PPAR- γ (PGC1- α), proteína coreguladora PRDM16 (PRDM16) e o ativador de morte celular CIDE-A (CIDEA) exercem papel fundamental nesse evento e, junto com o UCP-1, são utilizados como marcadores de *browning* (38).

Recentemente, a inibição da via de sinalização NOTCH por meio de nocaute dos genes *Notch1* e *Rbpj* tem mostrado promover *browning* do tecido adiposo branco e melhora sensibilidade à insulina e à glicose. Ainda a inibição dessa via pelo fármaco dibenzazepina aumenta a expressão de *Ucp1* e também melhora o metabolismo de insulina e glicose, sugerindo

que a via do NOTCH é um potencial alvo para terapias contra diabetes e obesidade (47). A via do NOTCH possui uma forte interligação com as BMPs em vários eventos celulares (48). Os BMPs 4 e 7 tem mostrado induzir a diferenciação de células-tronco adiposas em adipócitos com fenótipo marrom (49), e o aumento da expressão de BMP-4 *in vivo* tem mostrado induzir *browning* e melhora do metabolismo de insulina e glicose (50). O papel dessas moléculas na SOP e o efeito do exercício sobre tais moléculas na síndrome ainda não é conhecido.

1.4. O papel do exercício no tecido adiposo e nas disfunções metabólicas em mulheres com síndrome dos ovários policísticos

Os benefícios do exercício à saúde têm sido descritos há séculos, porém, os mecanismos celulares e moleculares do exercício ainda não são totalmente conhecidos. A biologia do exercício é complexa e envolve a adaptação de vários órgãos (51). A inatividade física aumenta a incidência de diversas doenças crônicas e a baixa capacidade do indivíduo em realizar exercício é um preditor independente de maior morbidade e mortalidade (52). Além disso, a baixa capacidade de realizar exercício induz disfunções metabólicas, tais como aumento de adiposidade, da insulina e da glicose de jejum, hiperlipidemia, disfunções cardiovasculares (53) e esteatose hepática em ratos (54).

O exercício tem mostrado melhorar o metabolismo de glicose tanto no músculo esquelético, como no tecido adiposo (55). Pesquisas prévias têm relatado que o exercício pode promover benefícios metabólicos por estimular o *browning* no tecido adiposo branco (56).

Por outro lado, os mecanismos dos benefícios do exercício na SOP ainda não são completamente conhecidos. A terapêutica atual da SOP inclui mudança nos hábitos de vida, tais como a mudança da dieta e execução de exercícios físicos, e também a utilização de alguns fármacos, como a metformina e anti-concepcionais (57). O exercício tem mostrado em

melhoras significativas nos sintomas da SOP (57-59), especificamente esta terapia tem mostrado melhora na sensibilidade à insulina e metabolismo de glicose e também nas concentrações séricas de androgênios (57, 60, 61). Além disso, mudanças de hábitos de vida incluindo exercício tem mostrado melhoras no ciclo menstrual e medidas antropométricas (62).

Em modelos animais de SOP, o exercício tem mostrado promover melhoras na morfologia ovariana (63), ciclo estral (63-65), ovulação (65, 66), concentrações séricas de androgênios (65), sensibilidade à insulina (64, 67), adiposidade (67), diâmetro de adipócitos (64, 67), níveis séricos de adipocinas (67), e normaliza a expressão gênica de marcadores de atividade simpática, NGF e receptor adrenérgico beta 3 (ADRB3), no tecido adiposo mesentérico (63).

Ainda não se sabe certamente as vias que são alvos do exercício no tecido adiposo na SOP, e ainda não se sabe qual é o papel de vias com grande importância para o metabolismo, como as vias de sinalização NOTCH, BMP e relacionadas ao *browning*, na SOP. O descobrimento de vias alvo do exercício no tecido adiposo pode ajudar no desenvolvimento de terapias para disfunções metabólicas.

Diante do exposto, nossa hipótese é que o exercício físico promove benefícios do ponto de vista metabólico e reprodutivo nos modelos investigados. Avaliaremos também as diferentes respostas nos dois modelos animais de SOP.

2. Objetivos

2.1. *Objetivo geral*

Avaliar os efeitos do exercício voluntário sobre os aspectos metabólicos e reprodutivos de modelos murinos da síndrome dos ovários policísticos induzida por dihidrotestosterona ou letrozol.

2.2. *Objetivos específicos*

Avaliar os efeitos do exercício:

- Sobre a expressão de genes das vias de sinalização NOTCH, da família das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e de marcadores de *browning* nos tecidos adiposos inguinal e mesentérico;
- Sobre a tolerância a insulina e a glicose;
- Na composição corporal;
- Sobre a distribuição de diâmetro de adipócitos e de genes relacionados a adipogênese, metabolismo de lipídeos e de atividade simpática;
- Sobre a concentração de triglicérides no fígado;
- No ciclo estral.

3. Material e métodos

3.1. Animais

Quarenta e sete camundongos fêmeas pré-puberes (C57BL/6JRj) com 24 dias de idade foram adquiridos do Janvier Labs (Le Genest Saint-Isle, França) e usados nesse experimento. Os animais foram mantidos em número de 4-5 por gaiola sob temperatura controlada a 22° C e ciclo de 12 horas claro:12 horas escuro. Os camundongos tiveram acesso *ad libitum* à água e ração comercial (16,5% proteína, 4% lipídeos, 58% carboidratos, 3,5% fibras, 6% vitaminas e minerais, e <12% água; Lantmannen Lantbruk, Malmö, Suécia). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Estudos com Animais do Instituto Karolinska, Suécia, protocolo: N259-2014.

3.2. Procedimento do estudo

Com 28 dias de idade os animais foram divididos randomicamente em três grupos: controle (n=9), di-hidrotestosterona (DHT) (n=19), e letrozol (LET) (n=19). Para indução de SOP experimental, sob efeito anestésico de isoflurano, os animais do grupo DHT receberam, por via subcutânea na região cervical, o implante de péletes de liberação contínua de di-hidrotestosterona (2,5 mg; dose diária: 27,5 µg, Innovative Research of America, Sarasota, EUA), de modo que a atividade destes péletes dura 90 dias (29). Sob as mesmas condições os animais do grupo LET receberam péletes de liberação contínua de letrozol (3,5 mg; dose diária: 50 µg, Innovative Research of America, Sarasota, EUA), sendo que a atividade destes péletes dura 70 dias (30). Os animais do grupo controle receberam péletes de placebo pelo mesmo procedimento. O peso corporal foi avaliado semanalmente. Cinco semanas após a implantação dos péletes, os animais foram submetidos ao escaneamento por DEXA para a avaliação da composição corporal antes do exercício. Um dia após a avaliação da composição corporal, o

grupo DHT foi randomizado e uma parte dos animais foram alocados em gaiolas com rodas de corrida e então os grupos experimentais passaram a ser organizados como segue: controle (n=9), DHT (n=10), LET (n=9), DHT com exercício (DHT+EX) (n=9), e LET com exercício (LET+EX) (n=10). Com 86 dias de idade os animais foram submetidos ao teste de tolerância a insulina e, após 5 dias, ao teste de tolerância a glicose. Aos 94-95 dias de idade, os animais foram submetidos a avaliação por DEXA e eutanasiados (Figura 1). As rodas de corrida foram bloqueadas 24 horas antes da eutanásia dos animais. O sangue oriundo da artéria axilar, tecidos adiposos inguinal e mesentérico, e fígado foram coletados para análises posteriores.

Figura 1. Esquema do desenho do estudo. DHT, di-hidrotestosterona; LET, letrozol; EX, exercício; DEXA, *dual-energy X-ray absorptiometry* (absorção de raios-X de dupla energia); TTI, teste de tolerância a insulina; TTG teste oral de tolerância a glicose.

3.3. Exercício voluntário em roda de corrida

O exercício voluntário em roda de corrida foi realizado por 4-5 semanas. Os animais dos grupos DHT+EX e LET+EX foram alocados individualmente em gaiolas com uma roda de corrida (*low-profile wireless running wheel for mouse*; Med Associates, StAlbans, EUA) cada, onde os animais tiveram livre acesso a mesma. As evoluções da roda de corrida foram registradas no programa Wheel Manager (Med Associates).

3.4. Esfregaço vaginal

O ciclo estral foi avaliado por esfregaço vaginal, sendo este coletado diariamente entre os 83-91 dias de idade dos animais. Foi avaliada a porcentagem de tempo em cada fase do ciclo estral nesse período.

3.5. Teste de tolerância à insulina (TTI)

Após jejum e rodas de corrida bloqueadas por 2 horas, uma amostra de sangue foi coletada da cauda dos animais para dosagem basal de glicose, por meio de glicosímetro (One Touch Ultra-2; LifeScan, Inc., Milpitas, EUA). Então os animais receberam uma injeção de insulina por via intraperitoneal (0.5 U/kg) e amostras de sangue oriundas da cauda foram coletadas 15, 30 e 45 minutos após a injeção, para dosagem de glicose.

3.6. Teste de tolerância à glicose (TTG)

Os animais foram submetidos a jejum e as rodas de corrida bloqueadas por 5-6 horas antes do teste de tolerância à glicose. Foi mensurada a concentração basal de glicose no

sangue oriundo da cauda dos animais, por glicosímetro (One Touch Ultra-2), e coletado ~40 µl de sangue em tubos com EDTA (Microvette® CB 300 K2E; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Alemanha) para posterior dosagem basal de insulina. Imediatamente após isso, os animais receberam glicose (2 g/kg) por gavagem e foi feita a mensuração de glicose no sangue após 15, 30, 60 e 90 minutos após a gavagem. Aos 15 minutos após a gavagem de glicose, também foi coletado sangue (~40 µl) para dosagem de insulina.

3.7. ELISA para detecção de insulina

Amostras de sangue coletadas no teste de tolerância a glicose foram centrifugadas a 4°C, 2000 xg, por 15 minutos, e então o plasma foi coletado e estocado a -80°C para utilização posterior. As amostras de plasma foram utilizadas para detecção de insulina pelo método ELISA. Os ensaios foram realizados por meio do Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit 90080 (Crystal Chem, Inc., Downers Grove, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O limite de detecção do kit era de 0.05 ng/ml. Os coeficientes de variância intra e inter-ensaios foram ambos $\leq 10\%$.

3.8. Avaliação da composição corporal por absorção de raios-X de dupla energia (DEXA)

Após 5 e 10 semanas da implantação dos péletes, foi realizada a avaliação da composição corporal dos animais por meio de absorção de raios-X de dupla energia (DEXA, *dual-energy X-ray absorptiometry*). Sob anestesia com inalação de isoflurano (2,1 %, 250 ml de ar/min.), os animais foram submetidos ao DEXA com o sistema Lunar PIXImus (GE Medical Systems, Madison, EUA), onde foram avaliados: massa gorda, massa magra e densidade mineral óssea. Adicionalmente, foi avaliado a massa gorda na região abdominal utilizando o programa PIXImus2 2.10 (Lunar Corporation, Madison, EUA). Seguido ao DEXA

feito após 10 semanas da implantação dos péletes, os animais foram eutanasiados e os tecidos adiposos inguinal, mesentérico e parametrial foram dissecados e pesados para confirmação dos dados de massa gorda.

3.9. Distribuição e diâmetro de adipócitos

Amostras de 8-12 mg de tecido adiposo inguinal e mesentérico foram fixadas em tetróxido de ósmio. Posteriormente as amostras foram lavadas com água destilada e estocadas em solução salina 0,9% até a contagem e análise de diâmetro de células adiposas pelo Multisizer 3 Coulter Counter (Beckman Coulter, Miami, EUA) com abertura de 400 μm . A variação efetiva de tamanho com essa abertura é de 20 até 240 μm . O instrumento foi parametrizado para efetuar contagem de 6000 células. Os dados foram avaliados em histogramas de contagem contra diâmetro de células pelo programa Multisizer 3.

3.10. Processamento histológico

Os tecidos adiposos inguinal e mesentérico foram fixados em formol tamponado a 5% (Histofix; Histolab, Gotemburgo, Suécia) por 24 horas. Após isso, esses órgãos foram submetidos às seguintes etapas: desidratação com álcool etílico; diafanização com xilol; impregnação com parafina histológica em forma líquida em estufa mantida a temperatura de 60° C; inclusão em parafina a temperatura ambiente. Os blocos de parafina contendo o material biológico foram seccionados em micrótomo ajustado para realizar cortes de 7 μm de espessura. Posteriormente, foi realizada a coloração pela hematoxilina e eosina (H. E.). As lâminas foram utilizadas para análise morfológica em microscópio óptico.

3.11. PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

A extração do RNA total dos tecidos foi realizada através do *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* com tratamento com *RNase-Free DNase* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), seguindo as especificações do fabricante. A integridade do RNA foi avaliada no sistema de eletroforese Experion (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). A síntese dos cDNAs foi realizada utilizando o kit iScript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). Os cDNAs foram armazenados a -20°C e posteriormente utilizados nas reações de PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR). A análise de expressão relativa para os transcritos dos genes *Notch1*, *Rbpj*, *Hes1*, *Hey1*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*, *Ucp1*, *Ppargc1a*, *Prdm16*, *Cidea*, *Pparg*, *Adrb3*, *Ngf*, *Ngfr*, *Adipoq*, *Slc2a4*, *Serbf1*, *Cebpa*, *Acaca*, *Lpl* e *Lipe* foi realizada utilizando o sistema de detecção por sondas fluorescentes TaqMan® (Tabela 1). As reações foram desenvolvidas no volume total de 10 μL (6,25 ng de cDNA, 5 μL de Taqman Gene Expression Master Mix and 0,5 μL de ensaios TaqMan®). A expressão de *G0s2*, *Pnpla2*, *Plin1*, *Cgi58*, *Mgl1*, e *Fsp27* foi avaliada usando primers do sistema SYBR® Green (Life technologies) (3,125 ng de cDNA, 0,3 μL (5 μM) de primer senso, 0,3 μL (5 μM) de primer antisenso, e 2,6 μL Power SYBR® Green PCR Master Mix). O gene *Gapdh* foi selecionado com gene endógeno após análise no software Expression Suite v1.0.4 (Life Technologies, EUA). Foram utilizadas placas de 384 poços e as corridas foram realizadas no aparelho ViiA 7 RUO System (Life technologies), conforme especificações do fabricante, utilizando a ciclagem padrão do aparelho: 2 minutos a 50°C , 10 minutos a 95°C , 45 ciclos de 10 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C . As análises das reações foram realizadas utilizando o programa ViiA 7 RUO System 1.2.3 (Life technologies) e os valores de expressão relativa foram obtidos pelo método do Delta-Delta CT.

Tabela 1. Lista de ensaios utilizados nas reações de PCR quantitativo em Tempo Real.

Genes	Referência da sequência (NCBI)	Identificação dos ensaios TaqMan / Sequência dos primers
<i>Via de sinalização NOTCH</i>		
<i>Notch1</i>	NM_008714.3	Mm00435249_m1
<i>Rbpj</i>	NM_001080927.2	Mm03053645_s1
<i>Hes1</i>	NM_008235.2	Mm01342805_m1
<i>Hey1</i>	NM_010423.2	Mm00468865_m1
<i>Família das BMPs relacionadas ao browning</i>		
<i>Bmp4</i>	NM_007554.2	Mm00432087_m1
<i>Bmp7</i>	NM_007557.3	Mm00432102_m1
<i>Marcadores de browning</i>		
<i>Ucp1</i>	NM_009463.3	Mm01244861_m1
<i>Ppargc1a</i>	NM_008904.2	Mm01208835_m1
<i>Prdm16</i>	NM_027504.3	Mm00712556_m1
<i>Cidea</i>	NM_007702.2	Mm00432554_m1
<i>Marcadores de atividade simpática</i>		
<i>Adrb3</i>	NM_013462.3	Mm02601819_g1
<i>Ngf</i>	NM_013609.3	Mm00443039_m1
<i>Ngfr</i>	NM_033217.3	Mm01309638_m1
<i>Marcadores de adipócitos maduros</i>		
<i>Slc2a4</i>	NM_009204.2	Mm00436615_m1
<i>Adipoq</i>	NM_009605.4	Mm00456425_m1
<i>Adipogênese</i>		
<i>Pparg</i>	NM_001127330.1 NM_011146.3	e Mm01184322_m1
<i>Srebf1</i>	NM_011480.4	Mm00550338_m1
<i>Bmp2</i>	NM_007553.3	Mm01340178_m1
<i>Metabolismo de lipídeos</i>		
<i>Acaca</i>	NM_133360.2	Mm01304257_m1
<i>Lpl</i>	NM_008509.2	Mm00434764_m1
<i>Lipe</i>	NM_001039507.2 NM_010719.5	e Mm00495359_m1

<i>Cebpa</i>	NM_001287514.1, NM_001287515.1, NM_001287521.1, NM_001287523.1 e NM_007678.3	Mm00514283_s1
<i>G0s2</i>	NM_008059.3	S: GGCCTAGTTGAGACGGTGTG A: GTGGAGGGACTGCTGTTCAC
<i>Pnpla2</i>	NM_001163689.1	S: CTGAGAATCACCATTCCCACATC A: CACAGCATGTAAGGGGGAGA
<i>Plin1</i>	NM_175640.2	S: CAAGCACCTCTGACAAGGTTC A: GTTGGCGGCATATTCTGCTG
<i>Cgi58</i>	NM_026179.2	S: TGGTGTCCCACATCTACATCA A: CAGCGTCCATATTCTGTTTCCA
<i>Mgll</i>	NM_001166251.1	S: CACGTGGACACCATCCAGAA A: GCCACTAGGATGGAGATGGC
<i>Fsp27</i>	NM_178373.3	S: ATGGACTACGCCATGAAGTCT A: CGGTGCTAACACGACAGGG
<i>Genes endógenos</i>		
<i>Gapdh</i>	NM_008084.2	Mm99999915_g1
<i>Gapdh</i>	NM_008084.3	S: TGCACCACCAACTGCTTAG A: GGATGCAGGGATGATGTTC

NCBI, *National Center for Biotechnology Information*. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). S, senso; A, antisenso.

3.12. Quantificação de triglicérides no fígado

Aproximadamente 100 mg ($103,66 \pm 0,48$ mg) de tecido hepático foi removido e alocado em 1 ml de solução de NP40 a 5 % (EMD Millipore Corp., Billerica, EUA) e homogeneizado utilizando Tissue Lyser II (QIAGEN) à 28 Hz por 2 minutos. Após homogeneizado as amostras foram submetidas as seguintes temperaturas: 85° C por 5 minutos, temperatura ambiente, e 85° C por 5 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 16.000 xg por 2 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de triglicérides utilizando o

kit Randox TRIGS (Randox Laboratories, Crumlin, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante. O kit detecta de 22,9 a 1172 mg/dl de triglicérides. Para cada amostra a concentração de triglicérides foi normalizada pelo peso de tecido utilizado (mg) para o ensaio.

3.13. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com os programas IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp., Armonk, EUA) e Prism GraphPad 6.05 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados com distribuição normal foi utilizada a análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Bonferroni. Já para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn para comparações multiplas. O teste ANOVA com medidas repetidas complementado pelo teste de Bonferroni foi utilizado para avaliação do peso corporal e dos testes de tolerância à insulina e à glicose. Comparações dos dados de DEXA e peso corporal coletados antes do exercício foram feitas entre: Controle vs DHT vs LET. Comparações de dados coletados após o exercício foram feitas entre: Controle vs DHT vs DHT+EX, e Controle vs LET vs LET+EX. Dados da atividade das rodas de corrida foram comparados pelo teste *T-student*. Os resultados são descritos como médias $\pm$ erro padrão e o $P < 0.05$ foi considerado significativo.

4. Resultados

4.1. Peso corporal e ingestão alimentar

Cinco semanas após a exposição aos péletes, os animais de ambos os grupos DHT e LET apresentaram maior peso que os controles ($P<0,01$ e $P<0,0001$, respectivamente). Do mesmo modo, às dez semanas após a exposição aos péletes, os grupos DHT e LET mantiveram maior peso que o grupo controle (ambos $P<0,0001$). Os grupos de animais treinados, DHT+EX e LET+EX, também apresentaram maior peso em relação ao grupo controle ($P<0,0001$ e $P<0,001$, respectivamente). A análise do desenvolvimento do peso nos grupos experimentais é representada na Figura 2.

Camundongos dos grupos DHT+EX e LET+EX tiveram maior ingestão alimentar que os animais controles e os respectivos modelos animais de SOP ($P < 0.0001$) (Figura 3, A-D).

Figura 2. Desenvolvimento em peso dos animais entre os grupos experimentais. (A) Desenvolvimento em peso dos grupos controle, DHT e DHT+EX. (B) Desenvolvimento em peso dos grupos controle, LET e LET+EX. *a* – Controle vs DHT antes do exercício ($P<0,0001$), *b* – Controle vs DHT depois do exercício ($P<0,001$), *c* – Controle vs DHT+EX depois do exercício ($P<0,05$), *d* – Controle vs LET antes do exercício ($P<0,0001$), *e* – Controle vs LET depois do exercício ($P<0,0001$), *f* – Controle vs LET+EX depois do exercício ($P<0,001$).

Figura 3. Ingestão alimentar nos grupos experimentais. (A) Ingestão alimentar por semana e (B) média de ingestão alimentar durante o período de exercício nos grupos DHT, DHT+EX e controle. (C) Ingestão alimentar por semana e (D) média de ingestão alimentar durante o período de exercício nos grupos LET, LET+EX e controle. *a* – Controle vs DHT+EX ($P < 0,0001$), *b* – DHT vs DHT+EX ($P < 0,0001$), *c* – Controle vs LET+EX ($P < 0,0001$), *d* – LET vs LET+EX ($P < 0,0001$).

4.2. Ciclo estral

Os modelos animais de SOP induzida por DHT, tanto os sedentários como os exercitados, passaram maior parte do período avaliado em diestro e menor tempo em estro quando comparado aos controles ($P < 0,01$). O proestro foi ausente no grupo DHT e esteve presente em apenas um animal do grupo DHT+EX. Não houve diferença significativa em relação ao metaestro no grupo DHT quando comparado ao controle, já o grupo DHT+EX teve menor tempo nesta fase em relação ao controle durante o período avaliado ($P < 0,05$).

Quanto aos modelos animais de SOP induzida por LET, ambos os sedentários e submetidos ao exercício tiveram ausência de proestro. Os animais do grupo LET permaneceram mais tempo em metaestro ($P<0,05$) e menos tempo em estro ($P<0,01$) comparado aos controles. Não houve diferenças significativas na fase de diestro no grupo LET e nas fases de estro, metaestro e diestro no grupo LET+EX em relação ao grupo controle. Os dados de porcentagem dispendida nas fases do ciclo estral de acordo com os grupos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de fases do ciclo estral entre os 83-91 dias de idade dos animais de acordo com o grupo experimental.

	Controle	DHT	LET	DHT+EX	LET+EX	P-valor
Proestro	12,3 ± 3,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,2 ± 1,2*	0,0 ± 0,0	$P<0,001$
Estro	37,0 ± 4,5	8,9 ± 6,2*	7,4 ± 2,6*	3,7 ± 3,7*	20,0 ± 6,6	$P<0,01$
Metaestro	30,9 ± 3,6	18,9 ± 6,2	60,5 ± 8,3*	6,2 ± 3,8*	46,7 ± 7,9	$P<0,05$
Diestro	19,8 ± 3,6	72,2 ± 9,9*	32,1 ± 8,4	88,9 ± 8,5*	33,3 ± 10,7	$P<0,001$

* – vs Controle ($P<0,05$).

4.3. Composição corporal antes do exercício

Antes do início do exercício (5 semanas após exposição aos péletes), os animais do grupo DHT apresentaram mais peso, massa gorda abdominal, massa magra absoluta e densidade mineral óssea comparado ao grupo controle ($P<0,05$). Já os animais do grupo LET apresentaram maior peso, massa gorda total, massa gorda abdominal, razão massa gorda/massa magra e densidade mineral óssea em relação aos animais controles ($P<0,05$). Quando os dados de percentual de massa magra corporal foram avaliados, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 3).

4.4. Atividade da roda de corrida

Não houve diferença significativa da atividade das rodas de corrida entre os grupos DHT+EX e LET+EX durante o experimento (Tabela 4).

Tabela 3. Composição corporal dos animais antes do exercício.

	Controle	DHT	LET	P-valor
Peso (g)	19,76 ± 0,20	22,12 ± 0,22*	24,62 ± 0,43*	P<0,001
MGT (g)	2,07 ± 0,08	2,43 ± 0,07	3,42 ± 0,11*	P<0,001
MGA (g)	1,39 ± 0,04	1,76 ± 0,06*	2,56 ± 0,09*	P<0,001
Massa magra (g)	12,07 ± 0,21	13,51 ± 0,14*	14,58 ± 0,34*	P<0,001
Massa magra (%)	61,06 ± 0,74	61,12 ± 0,55	59,25 ± 1,02	NS
Razão MGT/ massa magra	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,24 ± 0,01*	P<0,001
DMO (g/cm ²)	0,0435 ± 0,0007	0,0458 ± 0,0005*	0,0464 ± 0,0003*	P<0,01

MGT, massa gorda total; MGA, massa gorda abdominal; DMO, densidade mineral óssea; NS, não significativa. * – vs Controle (P<0,05).

Tabela 4. Atividade das rodas de corrida nos grupos DHT+EX e LET+EX.

	DHT+EX	LET+EX	P-valor
<i>Distância percorrida</i>			
Semana 1 (m)	9559,62 ± 1347,23	8941,75 ± 925,59	NS
Semana 2 (m)	17243,27 ± 1559,91	18537,33 ± 1364,83	NS
Semana 3 (m)	18606,96 ± 1721,57	20114,27 ± 1282,74	NS
Semana 4 (m)	13096,40 ± 1627,96	16449,80 ± 1377,71	NS

NS, não significativa.

4.5. Composição corporal após o exercício e peso de órgãos

Após 4,5 semanas de exercício (10^a semana de exposição aos péletes), os animais do grupo DHT apresentaram maior peso e massa magra que o grupo controle (P<0,0001 e

$P<0,01$). Houve tendência de aumento da massa gorda total ($P=0,055$) e do peso da gordura mesentérica ($P=0,056$) no grupo DHT em relação ao grupo controle. O peso do coração e do rim foi maior nos animais do grupo DHT comparado ao controle ($P<0,01$ e $P<0,0001$, respectivamente). Os animais do grupo LET apresentaram maior peso, massa gorda total, massa gorda abdominal e massa magra comparado com o grupo controle ($P<0,01$). Adicionalmente, o grupo LET apresentou maior peso dos ovários que o grupo controle ($P<0,01$).

Os animais do grupo DHT+EX exibiram maior peso ($P<0,01$) e massa magra ($P<0,05$) que os controles. Quando comparados aos animais sedentários, o grupo DHT+EX apresenta conteúdo reduzido de massa gorda total e abdominal, e redução na razão massa gorda/massa magra comparado ao grupo DHT ($P<0,05$), e de massa gorda abdominal e razão massa gorda/massa magra comparado ao grupo controle ($P<0,05$). Adicionalmente, os depósitos de gordura mesentérica e de gordura parametrial tiveram menor peso no grupo DHT+EX que nos modelos animais sedentários de DHT ($P<0,05$ e $P<0,01$, respectivamente). Referente a gordura inguinal, houve uma tendência a diminuição do peso deste depósito de gordura no grupo DHT+EX em relação ao grupo DHT ($P=0,055$). Os animais do grupo DHT+EX também apresentaram aumento do peso do coração, rim e ovário quando comparados ao grupo controle ($P<0,0001$, $P<0,0001$ e $P<0,05$, respectivamente). Quanto aos animais do grupo LET+EX, estes apresentaram maior peso corpóreo ($P<0,01$) e massa magra ($P<0,001$) que o grupo controle. Comparado ao grupo LET, os animais do grupo LET+EX possuem menor razão massa gorda/massa magra ($P<0,01$), massa gorda total ($P<0,01$) e abdominal ($P<0,05$), o que foi confirmado pela redução do peso dos depósitos de gordura inguinal e parametrial (ambos $P<0,05$). Em relação ao grupo controle, o grupo LET+EX possui maior peso de rim ($P<0,01$) e ovário ($P<0,001$). As comparações de percentual de massa magra corpórea não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados de composição corporal por DEXA e peso dos órgãos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Composição corporal e peso dos órgãos após o exercício.

	Controle	DHT	LET	DHT+EX	LET+EX	P-valor
<i>Composição corporal</i>						
Peso (g)	20,76 ± 0,36	23,24 ± 0,37 ^a	24,43 ± 0,61 ^b	22,63 ± 0,24 ^e	23,06 ± 0,39 ^f	P<0,001
MGT (g)	2,30 ± 0,07	2,69 ± 0,12	3,13 ± 0,27 ^b	1,93 ± 0,12 ^c	2,38 ± 0,12 ^d	P<0,001
MGA (g)	1,84 ± 0,06	2,12 ± 0,11	2,40 ± 0,22 ^b	1,49 ± 0,07 ^{c,e}	1,80 ± 0,11 ^d	P<0,001
Massa magra (g)	12,56 ± 0,32	14,42 ± 0,18 ^a	15,57 ± 0,32 ^b	14,34 ± 0,61 ^e	15,10 ± 0,53 ^f	P<0,001
Massa magra (%)	60,46 ± 0,78	62,16 ± 1,07	63,83 ± 1,10	63,27 ± 2,28	65,46 ± 1,91	NS
Razão MGT/ massa magra	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,13 ± 0,004 ^{c,e}	0,16 ± 0,004 ^f	P<0,01
DMO (g/cm ²)	0,0512 ± 0,0006	0,0515 ± 0,0007	0,0521 ± 0,0005	0,0507 ± 0,0010	0,0514 ± 0,0005	NS
<i>Peso dos órgãos</i>						
Gordura inguinal (mg)	130,40 ± 7,62	153,34 ± 11,54	187,38 ± 29,61	120,81 ± 6,94	114,46 ± 13,84 ^d	P<0,05
Gordura mesentérica (mg)	91,13 ± 4,42	122,86 ± 12,13	139,47 ± 20,04	88,43 ± 7,61 ^c	102,09 ± 16,40	NS
Gordura parametrial (mg)	158,93 ± 24,92	188,80 ± 24,74	230,57 ± 53,78	89,29 ± 13,40 ^c	99,34 ± 17,74 ^d	P<0,01
Ovário (mg)	3,33 ± 0,25	3,54 ± 0,24	6,62 ± 0,79 ^b	4,49 ± 0,32 ^e	7,10 ± 0,68 ^f	P<0,001
Útero (mg)	63,91 ± 7,81	56,71 ± 7,42	73,38 ± 7,30	60,88 ± 11,87	60,83 ± 2,53	NS
Rim (mg)	107,89 ± 2,54	145,00 ± 5,25 ^a	121,58 ± 4,32	154,66 ± 5,11 ^e	131,80 ± 6,89 ^f	P<0,001
Coração (mg)	115,78 ± 3,48	130,73 ± 2,69 ^a	126,42 ± 2,99	140,73 ± 3,73 ^e	130,32 ± 5,85	P<0,001

MGT, massa gorda total; MGA, massa gorda abdominal; DMO, densidade mineral óssea; NS, não significante. ^a– Controle vs DHT (P<0,05), ^b– Controle vs LET (P<0,05), ^c– DHT vs DHT+EX (P<0,05), ^d– LET vs LET+EX (P<0,05), ^e– Controle vs DHT+EX (P<0,05), ^f– Controle vs LET+EX (P<0,05).

4.6. Tolerância à insulina

Não houve diferenças significativas nas concentrações de glicose ou da área sob a curva (AUC, *area under the curve*) durante o teste de tolerância a insulina nos animais do grupo DHT comparados aos grupos DHT+EX e controle.

Os animais do grupo LET apresentaram aumento das concentrações de glicose durante o TTI (teste de tolerância à insulina) quando comparados ao grupo controle (ANOVA com medidas repetidas complementado pelo teste de Bonferroni: $P < 0,05$). Adicionalmente, o grupo LET apresentou maior AUC de glicose ($P < 0,05$) e também maior concentração sanguínea de glicose 30 ($P < 0,05$) e 45 minutos ($P < 0,001$) após a injeção de insulina. Por outro lado, o grupo LET apresentou menor concentração sanguínea de glicose basal que o grupo controle ($P < 0,05$).

Quando avaliado a porcentagem de alteração das concentrações de glicose durante o TTI, comparado ao controle, o grupo LET apresentou maiores concentrações de glicose 15, 30 e 45 minutos após a injeção de insulina ($P < 0,001$, $P < 0,001$ e $P < 0,0001$, respectivamente).

Os animais do grupo LET+EX possuíam menores concentrações de glicose ($P < 0,05$) e menor AUC de glicose ($P < 0,05$) que o grupo LET durante o TTI. Além disso, as concentrações sanguíneas de glicose foram menores no grupo LET+EX em relação ao grupo LET 15 e 45 minutos (ambos $P < 0,05$) após a injeção de insulina. As concentrações basais de glicose foram menores no grupo LET+EX em relação ao controle ($P < 0,001$). Avaliando a porcentagem de alteração das concentrações de glicose durante o teste, o grupo LET+EX apresenta aumento das concentrações de glicose aos 30 ($P < 0,05$) e 45 minutos ($P < 0,01$) após a injeção de insulina, quando comparado ao grupo controle. Os resultados do teste de tolerância à insulina estão representados na Figura 4 (A-F).

4.7. Tolerância à glicose e concentrações de insulina durante o TTG

Não houve diferença significativa entre os grupos referente as concentrações de glicose e AUC. Quanto as concentrações insulina, também não houve diferença significativa entre os grupos. Porém, houve uma tendência à menor AUC de insulina no grupo DHT+EX comparado ao grupo DHT (ANOVA: $P<0,05$; Bonferroni: $P=0,051$). Os resultados do teste de tolerância à glicose e concentrações de insulina dosadas a 0 e 15 minutos do TTG estão representados na Figura 5 (A-H).

4.8. Índices de resistência insulínica e função das células beta do pâncreas

Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos referente aos índices de HOMA-IR e ISI_0 . Quanto ao índice HOMA-B, houve aumento deste índice no grupo LET em relação ao grupo controle ($P<0,05$). Os índices HOMA-IR, HOMA-B e ISI_0 estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Modelos de avaliação de resistência insulínica e de função das células beta do pâncreas.

	Controle	DHT	LET	DHT+EX	LET+EX	P-valor
HOMA-B	27,5 ± 5,2	37,4 ± 4,9	64,7 ± 15,7*	22,8 ± 4,0	49,9 ± 8,3	$P<0,01$
HOMA-IR	2,3 ± 0,4	3,4 ± 0,4	3,2 ± 0,7	2,1 ± 0,3	2,4 ± 0,3	NS
ISI_0	51,2 ± 9,3	76,6 ± 8,1	70,8 ± 15,8	47,3 ± 7,5	53,9 ± 7,1	NS

NS, não significativo; HOMA-B, modelo de avaliação da homeostase das células beta do pâncreas; HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; ISI_0 , índice de sensibilidade à insulina; * – vs Controle ($P<0,05$).

Teste de tolerância a insulina

Figura 4. Teste de tolerância à insulina e à glicose. (A) Concentrações sanguíneas de glicose durante o teste de tolerância a insulina (TTI) nos grupos controle, DHT e DHT+EX. (B) Alteração em porcentagem das concentrações de glicose durante o TTI nos grupos controle, DHT e DHT+EX. (C) Área sob a curva das concentrações de glicose no TTI nos grupos controle, DHT e DHT+EX. (D) Concentrações sanguíneas de glicose durante o TTI nos grupos controle, LET e LET+EX. (E) Alteração em porcentagem das concentrações de glicose durante o TTI nos grupos controle, LET e LET+EX. (F) Área sob a curva (AUC, *area under the curve*) das concentrações de glicose no TTI nos grupos controle, LET e LET+EX. *a* – Controle vs LET ($P<0,05$), *b* – Controle vs LET+EX ($P<0,05$), *c* – LET vs LET+EX ($P<0,05$).

Figura 5. Teste de tolerância à glicose. (A) Concentrações sanguíneas de glicose durante o teste de tolerância a glicose (TTG) nos grupos controle, DHT e DHT+EX. (B) AUC das concentrações de glicose durante o TTG nos grupos controle, DHT e DHT+EX. (C) Concentrações plasmáticas de insulina basal e 15 minutos após gavagem com glicose nos grupos controle, DHT e DHT+EX. (D) AUC das concentrações de insulina no TTG nos grupos controle, DHT e DHT+EX. (E) Concentrações sanguíneas de glicose durante o TTG nos grupos controle, LET e LET+EX. (F) AUC das concentrações de glicose durante o TTG nos grupos controle, LET e LET+EX. (G) Concentrações plasmáticas de insulina basal e 15 minutos após gavagem com glicose nos grupos controle, LET e LET+EX. (H) AUC das concentrações de insulina no TTG nos grupos controle, LET e LET+EX.

4.9. Distribuição de diâmetro de células e expressão de genes relacionados à adipogênese e metabolismo de lipídeos no tecido adiposo

Tecido adiposo inguinal:

Em camundongos não exercitados expostos a DHT, houve mudança na morfologia do tecido adiposo inguinal, com maior proporção de adipócitos pequenos (~30-40 µm de diâmetro) em relação ao grupo controle, sendo esta mudança ainda mais acentuada nos camundongos exercitados expostos ao DHT, com proporção ainda maior de adipócitos pequenos (~20-40 µm de diâmetro) em relação aos controles (Figura 6A). O grupo DHT teve aumento da expressão do *Bmp2* em relação ao controle ($P<0,05$). O grupo DHT+EX não apresentou diferenças significativas em relação aos grupos DHT e controle na expressão de genes relacionados à adipogênese e metabolismo de lipídeos (Figura 6B).

No grupo LET, também se observou no tecido adiposo inguinal que houve aumento da proporção de adipócitos pequenos (~20-25 µm de diâmetro) e que o exercício (LET+EX) aumenta ainda mais a proporção de adipócitos pequenos (~20-35 µm de diâmetro) em relação aos controles (Figura 6C). O grupo LET+EX apresentou menor expressão dos genes *Srebf1* (lipogênese), *Lpl* e *Lipe* (lipólise) em relação ao grupo LET ($P<0,05$), de modo que o gene *Srebf1* apresentou menor expressão também em relação ao grupo controle ($P<0,05$) (Figura 6D).

Amostras representativas do tecido adiposo inguinal de animais de diferentes grupos são mostradas na Figura 7.

Tecido adiposo mesentérico:

No grupo DHT, houve um aumento da proporção de adipócitos mesentéricos maiores (~50-60 µm de diâmetro) comparado ao grupo controle. No grupo DHT+EX, há uma mudança para a redução do tamanho de adipócitos mesentéricos em relação ao grupo DHT

sedentário, principalmente comparando a proporção de adipócitos com diâmetro entre 20-35 μm (Figura 6E). Os animais do grupo DHT+EX apresentaram maior expressão de *Slc2a4*, *Lpl* e *Lipe* em comparação aos grupos DHT e controle ($P<0,05$) (Figura 6F).

No grupo LET houve um maior aumento da proporção de adipócitos mesentéricos pequenos (~20-30 μm de diâmetro) em relação ao controle. O grupo LET+EX apresenta uma tendência a normalização da distribuição de adipócitos mesentéricos por tamanho (Figura 6G). O grupo LET apresentou aumento da expressão dos genes *Slc2a4*, *Lpl* e *Lipe* em comparação ao grupo controle ($P<0,01$, $P<0,01$ e $P<0,001$, respectivamente) (Figura 6H). Já o grupo LET+EX apresentou aumento da expressão de *Slc2a4* em relação ao grupo controle ($P<0,01$) (Figura 6H).

Amostras representativas do tecido adiposo mesentérico de animais de diferentes grupos são mostradas na Figura 8.

Devido aos grupos LET e DHT+EX apresentarem aumento da expressão de genes relacionados à lipólise (*Lpl* e *Lipe*), decidimos investigar de modo mais pormenorizado a expressão de genes relacionados à via lipolítica no tecido adiposo mesentérico. Observamos que o grupo DHT+EX apresenta maior expressão de *G0s2* em comparação ao grupo DHT e aos controles ($P<0,05$) (Figura 9A). Não observamos nenhuma alteração significativa em relação aos demais genes da via da lipólise no grupo LET (Figura 9B).

Figura 6. Distribuição de tamanho de adipócitos e expressão de genes relacionados à adipogênese e metabolismo de lipídeos nos tecidos adiposos inguinal e mesentérico. (A) Distribuição de adipócitos por tamanho e (B) expressão de genes relacionados a adipogênese e metabolismo de lipídeos no tecido adiposo inguinal nos grupos controle, DHT e DHT+EX. (C) Distribuição de adipócitos por tamanho e (D) expressão de genes relacionados a adipogênese e metabolismo de lipídeos no tecido adiposo inguinal nos grupos controle, LET e LET+EX. (E) Distribuição de adipócitos por tamanho e (F) expressão de genes relacionados a adipogênese e metabolismo de lipídeos no tecido adiposo mesentérico nos grupos controle, DHT e DHT+EX. (G) Distribuição de adipócitos por tamanho e (H) expressão de genes relacionados a adipogênese e metabolismo de lipídeos no tecido adiposo mesentérico nos grupos controle, LET e LET+EX. *a* – Controle vs DHT ($P<0.05$), *b* – Controle vs DHT+EX ($P<0.05$), *c* – DHT vs DHT+EX ($P<0.05$), *d* – Controle vs LET ($P<0.05$), *e* – Controle vs LET+EX ($P<0.05$), *f* – LET vs LET+EX ($P<0.05$).

Figura 7. Fotomicrografias e histogramas de distribuição de adipócitos por tamanho no tecido adiposo inguinal. Nas duas primeiras linhas estão dispostas fotomicrografias de duas amostras representativas (H.E., 200x), seguidos por duas linhas com amostras representativas para distribuição de adipócitos por tamanho para os grupos (da esquerda para a direita): controle, DHT, DHT+EX, LET e LET+EX.

Figura 8. Fotomicrografias e histogramas de distribuição de adipócitos por tamanho no tecido adiposo mesentérico. Nas duas primeiras linhas estão dispostas fotomicrografias de duas amostras representativas (H.E., 200x), seguidos por duas linhas com amostras representativas para distribuição de adipócitos por tamanho para os grupos (da esquerda para a direita): controle, DHT, DHT+EX, LET e LET+EX.

Figura 9. Expressão de genes relacionados a lipólise no tecido adiposo mesentérico. (A) Expressão gênica nos grupos DHT, DHT+EX e controle, e (B) LET, LET+EX e controle. *a* – Controle vs DHT+EX ($P<0,01$), *b* – DHT vs DHT+EX ($P<0,01$).

4.10. Expressão de genes relacionados à via do NOTCH, família dos BMPs, *browning* e atividade simpática no tecido adiposo

Tecido adiposo inguinal:

Quanto ao tecido adiposo inguinal, não houve diferença de expressão dos genes das vias de NOTCH, BMPs, *browning* e atividade simpática no grupo DHT comparado ao controle. Já o grupo LET apresentou aumento da expressão de *Prdm16* comparado ao grupo controle ($P<0,05$) (Figura 10).

Em ambos os grupos treinados, DHT+EX e LET+EX, houve diminuição da expressão do gene *Notch1* no tecido adiposo inguinal em relação aos respectivos modelos animais sedentários, DHT e LET ($P<0,05$ e $P<0,01$). Comparado aos controles, o grupo DHT+EX apresentou aumento da expressão de *Ppargc1a*, *Prdm16*, *Cidea* e *Ucp1* no tecido adiposo inguinal ($P<0,05$, $P<0,01$, $P<0,001$ e $P<0,05$, respectivamente) (Figura 10).

A expressão de marcadores de *browning*, *Cidea* e *Ucp1*, foi negativamente correlacionada com a expressão de *Notch1* no tecido adiposo inguinal de camundongos do grupo DHT+EX ($r = -0.74$ e $r = -0.71$, respectivamente; ambos $P<0.05$). No grupo LET+EX,

a expressão de *Ucp1* e outro marcador de *browning*, *Ppargc1a*, também foi negativamente correlacionada com a expressão de *Notch1* no tecido adiposo inguinal ($r = -0.74$ e $r = -0.71$, respectivamente; ambos $P < 0.05$). Não houve correlações significativas entre a expressão de marcadores de *browning* e a expressão de *Notch1* nos grupos controle, DHT e LET (Figura 11).

Tecido adiposo mesentérico:

No tecido adiposo mesentérico, os modelos animais sedentários de SOP induzida por DHT apresentaram expressão diminuída de *Notch1* comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). Já os animais do grupo LET apresentaram aumento da expressão de *Bmp7* e *Cidea* comparado aos animais controles ($P < 0,05$) (Figura 10).

O grupo DHT+EX mostrou diminuição da expressão de *Rbpj* (via do Notch) e aumento da expressão de *Bmp7* no tecido adiposo mesentérico em relação ao grupo DHT ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente). Quando comparado ao grupo controle, os animais do grupo DHT exibiram diminuição da expressão de *Notch1* ($P < 0,001$) e aumento da expressão de *Bmp7* ($P < 0,001$) e *Cidea* ($P < 0,05$). Os modelos animais do grupo LET+EX também diminuição de *Rbpj* em relação ao modelo animal sedentário de SOP induzida por LET ($P < 0,05$) (Figura 10).

Figura 10. Expressão de genes relacionados a via do NOTCH, família dos BMPs, *browning* e atividade simpática. (A) Expressão de RNAm na gordura inguinal nos grupos controle, DHT e DHT+EX. (B) Expressão de RNAm na gordura mesentérica nos grupos controle, DHT e DHT+EX. (C) Expressão de RNAm na gordura inguinal nos grupos controle, LET e LET+EX. (D) Expressão de RNAm na gordura mesentérica nos grupos controle, LET e LET+EX. *a* – Controle vs DHT ($P < 0,05$), *b* – Controle vs DHT+EX ($P < 0,05$), *c* – DHT vs DHT+EX ($P < 0,05$), *d* – Controle vs LET ($P < 0,05$), *e* – Controle vs LET+EX ($P < 0,05$), *f* – LET vs LET+EX ($P < 0,05$).

Figura 11. Correlação entre os dados de expressão gênica de *Notch1* e marcadores de *browning* no tecido adiposo inguinal. Correlações entre a expressão gênica de *Notch1* e: (A) *Pparg1a*, (B) *Cidea* e (C) *Ucp1* no grupo controle; (D) *Pparg1a*, (E) *Cidea* e (F) *Ucp1* no grupo DHT;

(G) *Pparg1a*, (H) *Cidea* e (I) *Ucp1* no grupo DHT+EX; (J) *Pparg1a*, (K) *Cidea* e (L) *Ucp1* no grupo LET; (M) *Pparg1a*, (N) *Cidea* e (O) *Ucp1* no grupo LET+EX. O teste de correlação de Pearson foi utilizado nessa análise. *- correlações com $P < 0,05$.

4.11. Triglicérides no fígado

Houve diminuição da concentração de triglicérides hepáticos nos animais do grupo DHT+EX comparados aos animais dos grupos DHT ($P < 0,05$) e controle ($P < 0,001$) (Figura 12A). Não houve diferenças significativas de concentração de triglicérides no fígado de animais expostos ao LET (Figura 12B).

Figura 12. Concentração de triglicérides no fígado nos grupos experimentais. (A) Concentração de triglicérides hepáticos nos grupos DHT, DHT+EX e controle, e (B) LET, LET+EX e controle. *a* – Control vs DHT+EX ($P < 0,001$), *b* – DHT vs DHT+EX ($P < 0,05$).

Os resultados do presente estudo estão resumidos em esquema na Figura 13.

Figura 13. Resumo dos efeitos do exercício sobre os fenótipos metabólicos e reprodutivos em camundongos expostos ao letrozol e di-hidrotestosterona. Os fenótipos de camundongos sedentários expostos a DHT e LET são resumidos nos quadrantes superior esquerdo e direito, respectivamente. Os resultados de camundongos sedentários são comparados ao grupo controle. Os efeitos do exercício em camundongos expostos a DHT e LET são resumidos nos quadrantes inferior esquerdo e direito, respectivamente. Os resultados dos camundongos treinados e expostos a DHT e LET são comparados aos respectivos camundongos expostos a DHT e LET sedentários. ↑, aumento/estímulo; ↓ diminuição/inibição; ≈ não alterado.

5. Discussão

No presente estudo, demonstramos que o exercício tem efeitos distintos na sensibilidade à insulina e na morfologia e função do tecido adiposo em dois modelos animais de SOP com fenótipos diferentes. Além disso, mostramos que o exercício diminui a expressão de genes relacionados à via de sinalização NOTCH no tecido adiposo subcutâneo e visceral de modelos murinos da SOP induzidos por DHT ou LET, indicando que esta via de sinalização pode ser um alvo do exercício. Além disso, o exercício parece promover melhora do ciclo estral apenas dos modelos murinos de SOP induzida por LET, mostrando que os diferentes modelos de SOP usado nesse estudo apresenta diferentes respostas ao exercício em relação ao aspecto reprodutivo.

É bem sabido que as mulheres com diagnóstico de SOP possuem maior prevalência de sobrepeso e obesidade (1), e também que ratos e camundongos expostos a DHT (22, 29) ou LET (24, 30) mimetizam essa característica. Em concordância com os dados obtidos a partir de humanos (1), ambos os modelos murinos utilizados nesse estudo, expostos a DHT ou LET, possuíam maior ganho de peso comparado aos controles. Porém apenas os camundongos expostos ao LET apresentaram aumento da massa gorda total e abdominal, e resistência à insulina no presente estudo. Quanto a distribuição de gordura em mulheres com SOP, ainda é controverso se existe aumento da quantidade de gordura visceral na SOP, embora alguns dados apoiem este conceito (68). No entanto, a intervenção no exercício em mulheres com SOP diminui o acúmulo de gordura visceral e melhora a sensibilidade à insulina (69), o que corrobora com os nossos resultados em modelos murinos de SOP induzida por LET. Além disso, tanto os camundongos expostos ao LET como à DHT submetidas ao exercício apresentaram diminuição da razão de massa gorda / massa magra em comparação com os camundongos não exercitados. Diante desses resultados, alguns benefícios metabólicos promovidos pelo exercício podem ser atribuídos ao aumento da massa muscular e ao possível

aumento do gasto energético. Além disso, os modelos murinos de SOP induzida tanto por DHT como por LET, quando submetidos ao exercício, apresentam maior ingestão alimentar comparado aos grupos sedentários. Em algumas linhagens de camundongos o exercício voluntário aumenta a ingestão alimentar comparado a camundongos sedentários (70). Esse aumento de ingestão alimentar pode ser atribuído ao aumento de demanda calórica dos animais treinados.

A hipertrofia de adipócitos tem sido associada à resistência à insulina em mulheres com SOP (18), e os modelos de camundongos com SOP induzida por DHT ou LET têm aumento do tamanho de adipócitos inguinais e viscerais (29-31). No entanto, os estudos anteriores com camundongos expostas à DHT ou ao LET utilizaram métodos diferentes para quantificar o tamanho de adipócitos. Os métodos existentes para avaliar o tamanho dos adipócitos variam quanto à exatidão e limitações, mas o uso de tecnologias com adipócitos fixados com tetróxido de ósmio tornou-se uma ferramenta poderosa (71). O uso de adipócitos fixados com tetróxido de ósmio com a técnica Coulter Counter Multisizer (44) permite uma análise precisa da distribuição de adipócitos por tamanho.

No presente estudo, os camundongos expostos à DHT apresentaram maior diâmetro de adipócitos mesentéricos comparados aos controles. Por outro lado, quatro a cinco semanas de exercício voluntário diminuiu o diâmetro de adipócitos no tecido adiposo mesentérico de camundongos expostos à DHT, o que foi acompanhado pelo aumento da expressão de genes relacionados à lipólise (*Lipe* e *Lpl*). Camundongos submetidos ao exercício em roda de corrida apresentam aumento da lipólise (72) e a diminuição no tamanho dos adipócitos reflete o efeito do exercício observado em camundongos saudáveis e obesos, o que também contribui para reduzir a adiposidade (73). A lipólise do tecido adiposo é um evento importante durante o exercício prolongado, uma vez que fornece combustível para a atividade dos músculos esqueléticos (74).

Além da hipertrofia de adipócitos, a adipogênese comprometida e o aumento da proporção de pequenos adipócitos têm sido relacionados à resistência à insulina (44, 75). Nossos dados mostram há uma proporção aumentada de pequenos adipócitos na gordura mesentérica de camundongos expostas ao LET em comparação com os controles. Além disso, o exercício apresentou uma tendência a restaurar a morfologia disfuncional da gordura mesentérica dos modelos murinos de SOP induzida por LET.

Com base nas diferenças de distribuição de tamanho dos adipócitos dos animais expostos ao LET e à DHT, sugerimos que o exercício tem efeitos distintos sobre a morfologia do tecido adiposo de modelos animais com diferentes fenótipos da SOP experimental.

Os camundongos expostos ao LET, além do aumento da adiposidade, tinham expressão aumentada de genes envolvidos na lipólise (*Lipe* e *Lpl*) na gordura mesentérica, mas não na gordura inguinal. Estes dados corroboram com o padrão de lipólise observado na obesidade, com aumento da lipólise basal, que é mais pronunciada na gordura visceral do que na subcutânea (76). O aumento da lipólise na obesidade parece estar relacionado com uma disfunção da insulina em exercer seu papel de inibição da lipólise, devido à resistência à insulina em adipócitos (77). A deficiência da ação da insulina como inibidora da lipólise tem sido observada no tecido adiposo de mulheres com obesidade visceral (78, 79).

Tem sido notado que a perda de peso restaura a sensibilidade à insulina no tecido adiposo, e conseqüentemente restaura os efeitos inibitórios da lipólise mediados pela insulina nesse tecido (80). A expressão de mRNA de *Lipe* e *Lpl* no grupo LET+EX não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, sugerindo que o exercício tenha normalizado uma disfunção lipolítica na gordura visceral pelo exercício, provavelmente devido a uma melhor sensibilidade à insulina no tecido adiposo.

A exposição contínua ao LET e à DHT demonstrou anteriormente induzir resistência à insulina, avaliada por clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico, em ratas (22). Em nosso estudo, os modelos murinos de SOP induzidos por LET exibiram o fenótipo metabólico mais comprometido, apresentando regulação disfuncional da glicose durante o teste de tolerância à insulina e aumento da adiposidade. Uma possível explicação é que a inibição da atividade da enzima aromatase piora a condição metabólica nos camundongos expostos ao LET. Por outro lado, os modelos murinos de SOP induzida por LET, na mesma dose utilizada nesse estudo, não apresentaram diminuição das concentrações séricas de estradiol comparados com camundongos controle (30), indicando que os distúrbios metabólicos encontrados nesse modelo animal não são atribuídos ao hipoestrogenismo.

Ao contrário de estudos anteriores (29, 30), os camundongos expostos ao LET e à DHT não apresentaram intolerância à glicose em nosso estudo. Essa divergência pode ser atribuída a diferentes vias de administração da glicose. Em nosso estudo, foi utilizado o teste de tolerância oral à glicose, que representa o método mais fisiológico de administração desse composto (81), enquanto estudos anteriores utilizaram a administração de glicose pela via intraperitoneal (29, 30). O teste de tolerância à glicose que utiliza a via intraperitoneal tem maiores concentrações de glicose em comparação com o teste de tolerância oral à glicose devido à ausência de resposta das incretinas (82).

Mostramos nesse estudo que o exercício diminui a expressão de genes da via de sinalização NOTCH tanto na gordura inguinal como na gordura mesentérica. Recentemente, a via de sinalização do NOTCH tem mostrado um papel importante na regulação do metabolismo. De fato, camundongos nocautes para os genes *Notch1* e *Rbpj* no tecido adiposo apresentaram aumento do *browning* de tecido adiposo, adiposidade reduzida, melhora do metabolismo da glicose, maior sensibilidade à insulina, e não apresentaram aumento de adiposidade e efeitos metabólicos deletérios quando expostos a dieta rica em gordura (47). Também, foi demonstrado

que o bloqueio farmacológico de ligante da via do NOTCH em camundongos promove melhora do metabolismo da insulina e da glucose, previne o ganho de peso, reduz a massa gorda e tamanho de adipócitos, e ainda aumenta a expressão de mRNA de GLUT-4 no tecido adiposo (83). Em nosso estudo, o exercício diminuiu a expressão de *Notch1* no depósito de gordura inguinal e *Rbpj* na gordura mesentérica em tanto em camundongos expostas ao LET como à DHT. Em camundongos expostos à DHT, o exercício aumentou a expressão gênica de marcadores de *browning* nas gorduras inguinal e mesentérica. Além disso, a expressão de *Notch1* foi negativamente correlacionada com a expressão de marcadores de *browning* na gordura inguinal dos modelos murinos de SOP induzidos por LET ou DHT. Essas observações dão indícios que o exercício pode promover a melhora da saúde metabólica através da inibição da via de sinalização do NOTCH no tecido adiposo de modelos murinos de SOP induzida por LET ou DHT.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a mostrar que o exercício diminui a expressão de genes da via de sinalização NOTCH no tecido adiposo subcutâneo e visceral de dois modelos animais de SOP diferentes. Contudo, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos do exercício na via de sinalização do NOTCH no tecido adiposo de camundongos expostas à DHT e ao LET.

No fígado foi mostrado que os modelos animais de DHT treinados apresentaram diminuição do conteúdo de triglicérides em relação ao grupo DHT sedentário. Esse achado corrobora com os achados de estudos em modelos de ratos diabéticos, mostrando diminuição da quantidade de triglicérides hepáticos (84), e em humanos, que também mostra que o exercício reduz a quantidade de gordura no fígado, melhorando o quadro de esteatose hepática independentemente da perda de peso (85).

Além dos aspectos metabólicos, observamos uma melhora do ciclo estral em camundongos do grupo LET+EX. Outros estudos com modelos animais de SOP, porém em

ratos, têm mostrado que o exercício voluntário em roda de corrida melhora o ciclo estral (63-65) e outros componentes reprodutivos, como a morfologia ovariana (63, 66). Porém, nenhuma melhora do ciclo estral foi notada no grupo DHT+EX após 4-5 semanas de exercício. No estudo de Homa e colaboradores (86), utilizando modelos murinos de SOP induzida por androgenização pré-natal expostos ao exercício voluntário em roda de corrida, notaram que apenas após 11 semanas de exercício houve melhora do ciclo estral nesses modelos animais de SOP.

Não se sabe se o aumento de intensidade do exercício pode exercer melhoras no ciclo estral nesses modelos animais de SOP, já que alguns estudos apontam que o exercício vigoroso tem mostrado superioridade em aspectos metabólicos em mulheres com SOP (87, 88), mas os aspectos reprodutivos ainda não são bem estudados.

Em suma, quatro a cinco semanas de exercício voluntário alteram de modo diferente os aspectos do tecido adiposo, metabolismo de insulina, conteúdo de triglicérides hepáticos e do ciclo estral nos modelos animais de LET e DHT. O exercício altera a composição corporal e inibe a expressão de genes da via do NOTCH similarmente em ambos modelos estudados.

6. Conclusões

- O exercício diminuiu a expressão de genes da via de sinalização NOTCH nos tecidos adiposos inguinal e mesentérico nos modelos de SOP induzida por DHT ou LET;
- O exercício aumentou a expressão de genes relacionados ao *browning* nos tecidos adiposos inguinal e mesentérico nos modelos de DHT;
- A expressão de genes da via do NOTCH foi negativamente correlacionada com a expressão de genes relacionados ao *browning* no tecido adiposo inguinal nos dois modelos submetidos a exercício voluntário;
- O exercício diminuiu a adiposidade e melhorou as alterações morfológicas de tecido adiposo em ambos os modelos;
- O exercício diminuiu a razão massa gorda/massa magra nos dois modelos;
- O exercício restaurou a sensibilidade à insulina em modelos de LET;
- O exercício diminuiu a concentração de triglicérides no fígado no modelo de DHT;
- O exercício melhorou o ciclo estral em modelos de LET.

7. Referências

1. Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev.* 2015;36(5):487-525.
2. Lim SS, Davies MJ, Norman RJ, Moran LJ. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2012;18(6):618-37.
3. Jayasena CN, Franks S. The management of patients with polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(10):624-36.
4. Moran LJ, Norman RJ, Teede HJ. Metabolic risk in PCOS: phenotype and adiposity impact. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(3):136-43.
5. Maciel GA, Soares Júnior JM, Alves da Motta EL, Abi Haidar M, de Lima GR, Baracat EC. Nonobese women with polycystic ovary syndrome respond better than obese women to treatment with metformin. *Fertil Steril.* 2004;81(2):355-60.
6. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2005;352(12):1223-36.
7. Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Navab A, Magoffin DA. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(3):1318-23.
8. Magoffin DA. Ovarian enzyme activities in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2006;86 Suppl 1:S9-S11.
9. Maciel GA, Baracat EC, Benda JA, Markham SM, Hensinger K, Chang RJ, et al. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5321-7.
10. Homburg R. Polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008;22(2):261-74.
11. Pastor CL, Griffin-Korf ML, Aloï JA, Evans WS, Marshall JC. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(2):582-90.
12. Pralong FP. Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;324(1-2):82-6.
13. Gamba M, Pralong FP. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: the role of leptin and insulin. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;254-255:133-9.
14. DiVall SA, Herrera D, Sklar B, Wu S, Wondisford F, Radovick S, et al. Insulin receptor signaling in the GnRH neuron plays a role in the abnormal GnRH pulsatility of obese female mice. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119995.
15. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev.* 2012;33(6):981-1030.
16. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science.* 2011;332(6037):1519-23.
17. Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM. Adipose tissue dysfunction, adipokines and low-grade chronic inflammation in PCOS. *Reproduction.* 2015.
18. Mannerås-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, Jennische E, Odén A, Holm G, et al. Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2):E304-11.

19. Kokosar M, Benrick A, Perfilyev A, Fornes R, Nilsson E, Maliqueo M, et al. Epigenetic and Transcriptional Alterations in Human Adipose Tissue of Polycystic Ovary Syndrome. *Sci Rep*. 2016;6:22883.
20. Cortón M, Botella-Carretero JJ, Benguría A, Villuendas G, Zaballos A, San Millán JL, et al. Differential gene expression profile in omental adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(1):328-37.
21. Ek I, Arner P, Ryden M, Holm C, Thorne A, Hoffstedt J, et al. A unique defect in the regulation of visceral fat cell lipolysis in the polycystic ovary syndrome as an early link to insulin resistance. *Diabetes*. 2002;51(2):484-92.
22. Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 2007;148(8):3781-91.
23. Marcondes RR, Carvalho KC, Duarte DC, Garcia N, Amaral VC, Simões MJ, et al. Differences in neonatal exposure to estradiol or testosterone on ovarian function and hormonal levels. *Gen Comp Endocrinol*. 2015;212:28-33.
24. Maliqueo M, Sun M, Johansson J, Benrick A, Labrie F, Svensson H, et al. Continuous administration of a P450 aromatase inhibitor induces polycystic ovary syndrome with a metabolic and endocrine phenotype in female rats at adult age. *Endocrinology*. 2013;154(1):434-45.
25. Lombardi LA, Simões RS, Maganhin CC, da Silva CF, Maciel GA, Baracat EC, et al. [Morphology of the interstitial cells of rat polycystic ovaries: an experimental study]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012;34(7):323-8.
26. Singh KB. Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. *Fertil Steril*. 2005;84 Suppl 2:1228-34.
27. Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. Animal models of the polycystic ovary syndrome phenotype. *Steroids*. 2013;78(8):734-40.
28. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod*. 2012;86(5):149, 1-12.
29. van Houten EL, Kramer P, McLuskey A, Karels B, Themmen AP, Visser JA. Reproductive and metabolic phenotype of a mouse model of PCOS. *Endocrinology*. 2012;153(6):2861-9.
30. Kauffman AS, Thackray VG, Ryan GE, Tolson KP, Glidewell-Kenney CA, Semaan SJ, et al. A Novel Letrozole Model Recapitulates Both the Reproductive and Metabolic Phenotypes of Polycystic Ovary Syndrome in Female Mice. *Biol Reprod*. 2015;93(3):69.
31. Caldwell AS, Middleton LJ, Jimenez M, Desai R, McMahon AC, Allan CM, et al. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. *Endocrinology*. 2014;155(8):3146-59.
32. Jo J, Shreif Z, Periwai V. Quantitative dynamics of adipose cells. *Adipocyte*. 2012;1(2):80-8.
33. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(5):R159-71.
34. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20-44.
35. Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab*. 2010;11(4):253-6.

36. Tchkonian T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab.* 2013;17(5):644-56.
37. Rodriguez A, Ezquerro S, Mendez-Gimenez L, Becerril S, Fruhbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* 2015;309(8):E691-714.
38. Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity.* 2012;13 Suppl 2:83-96.
39. Cohen P, Spiegelman BM. Brown and Beige Fat: Molecular Parts of a Thermogenic Machine. *Diabetes.* 2015;64(7):2346-51.
40. Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab.* 2015;22(4):546-59.
41. Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol.* 2013;92(6-7):229-36.
42. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(12):885-96.
43. Smith U. Abdominal obesity: a marker of ectopic fat accumulation. *J Clin Invest.* 2015;125(5):1790-2.
44. McLaughlin T, Sherman A, Tsao P, Gonzalez O, Yee G, Lamendola C, et al. Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia.* 2007;50(8):1707-15.
45. Yang X, Jansson PA, Nagaev I, Jack MM, Carvalho E, Sunnerhagen KS, et al. Evidence of impaired adipogenesis in insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;317(4):1045-51.
46. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(1):24-36.
47. Bi P, Shan T, Liu W, Yue F, Yang X, Liang XR, et al. Inhibition of Notch signaling promotes browning of white adipose tissue and ameliorates obesity. *Nat Med.* 2014;20(8):911-8.
48. Kluppel M, Wrana JL. Turning it up a Notch: cross-talk between TGF beta and Notch signaling. *Bioessays.* 2005;27(2):115-8.
49. Elsen M, Raschke S, Tennagels N, Schwahn U, Jelenik T, Roden M, et al. BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014;306(5):C431-40.
50. Qian SW, Tang Y, Li X, Liu Y, Zhang YY, Huang HY, et al. BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(9):E798-807.
51. Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Looking Ahead Perspective: Where Will the Future of Exercise Biology Take Us? *Cell Metab.* 2015;22(1):25-30.
52. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell.* 2014;159(4):738-49.
53. Wisløff U, Najjar SM, Ellingsen O, Haram PM, Swoap S, Al-Share Q, et al. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science.* 2005;307(5708):418-20.
54. Thyfault JP, Rector RS, Uptergrove GM, Borengasser SJ, Morris EM, Wei Y, et al. Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury. *J Physiol.* 2009;587(Pt 8):1805-16.

55. Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Metabolism. Exercise remodels subcutaneous fat tissue and improves metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(4):198-200.
56. Roman S, Agil A, Peran M, Alvaro-Galue E, Ruiz-Ojeda FJ, Fernandez-Vazquez G, et al. Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2015;165(4):464-79.
57. Hoeger K, Davidson K, Kochman L, Cherry T, Kopin L, Guzick DS. The impact of metformin, oral contraceptives, and lifestyle modification on polycystic ovary syndrome in obese adolescent women in two randomized, placebo-controlled clinical trials. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4299-306.
58. Nybacka Å, Carlström K, Ståhle A, Nyrén S, Hellström PM, Hirschberg AL. Randomized comparison of the influence of dietary management and/or physical exercise on ovarian function and metabolic parameters in overweight women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2011;96(6):1508-13.
59. Nybacka Å, Carlström K, Fabri F, Hellström PM, Hirschberg AL. Serum antimüllerian hormone in response to dietary management and/or physical exercise in overweight/obese women with polycystic ovary syndrome: secondary analysis of a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2013;100(4):1096-102.
60. Lamb JD, Johnstone EB, Rousseau JA, Jones CL, Pasch LA, Cedars MI, et al. Physical activity in women with polycystic ovary syndrome: prevalence, predictors, and positive health associations. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(4):352.e1-6.
61. Joham AE, Teede HJ, Hutchison SK, Stepto NK, Harrison CL, Strauss BJ, et al. Pigment epithelium-derived factor, insulin sensitivity, and adiposity in polycystic ovary syndrome: impact of exercise training. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;20(12):2390-6.
62. Curi DD, Fonseca AM, Marcondes JA, Almeida JA, Bagnoli VR, Soares JM, et al. Metformin versus lifestyle changes in treating women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2012;28(3):182-5.
63. Manneras L, Cajander S, Lonn M, Stener-Victorin E. Acupuncture and exercise restore adipose tissue expression of sympathetic markers and improve ovarian morphology in rats with dihydrotestosterone-induced PCOS. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2009;296(4):R1124-31.
64. Benrick A, Maliqueo M, Miao S, Villanueva JA, Feng Y, Ohlsson C, et al. Resveratrol is not as effective as physical exercise for improving reproductive and metabolic functions in rats with dihydrotestosterone-induced polycystic ovary syndrome. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:964070.
65. Wu C, Lin F, Qiu S, Jiang Z. The characterization of obese polycystic ovary syndrome rat model suitable for exercise intervention. *PLoS One*. 2014;9(6):e99155.
66. Manni L, Cajander S, Lundeberg T, Naylor AS, Aloe L, Holmäng A, et al. Effect of exercise on ovarian morphology and expression of nerve growth factor and alpha(1)- and beta(2)-adrenergic receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *J Neuroendocrinol*. 2005;17(12):846-58.
67. Manneras L, Jonsdottir IH, Holmang A, Lonn M, Stener-Victorin E. Low-frequency electro-acupuncture and physical exercise improve metabolic disturbances and modulate gene expression in adipose tissue in rats with dihydrotestosterone-induced polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 2008;149(7):3559-68.
68. Huang ZH, Manickam B, Ryvkin V, Zhou XJ, Fantuzzi G, Mazzone T, et al. PCOS is associated with increased CD11c expression and crown-like structures in adipose tissue and increased central abdominal fat depots independent of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(1):E17-24.

69. Huber-Buchholz MM, Carey DG, Norman RJ. Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: role of insulin sensitivity and luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(4):1470-4.
70. Jung AP, Curtis TS, Turner MJ, Lightfoot JT. Physical activity and food consumption in high- and low-active inbred mouse strains. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(10):1826-33.
71. Parlee SD, Lentz SI, Mori H, MacDougald OA. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. *Methods in enzymology.* 2014;537:93.
72. Monleon D, Garcia-Valles R, Morales JM, Briocche T, Olaso-Gonzalez G, Lopez-Grueso R, et al. Metabolomic analysis of long-term spontaneous exercise in mice suggests increased lipolysis and altered glucose metabolism when animals are at rest. *J Appl Physiol (1985).* 2014;117(10):1110-9.
73. Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, 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.* 2009;297(2):E495-504.
74. Horowitz JF. Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14(8):386-92.
75. McLaughlin T, Lamendola C, Coghlan N, Liu TC, Lerner K, Sherman A, et al. Subcutaneous adipose cell size and distribution: relationship to insulin resistance and body fat. *Obesity (Silver Spring).* 2014;22(3):673-80.
76. Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie.* 2016;125:259-66.
77. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr.* 2007;27:79-101.
78. Albu JB, Curi M, Shur M, Murphy L, Matthews DE, Pi-Sunyer FX. Systemic resistance to the antilipolytic effect of insulin in black and white women with visceral obesity. *Am J Physiol.* 1999;277(3 Pt 1):E551-60.
79. Johnson JA, Fried SK, Pi-Sunyer FX, Albu JB. Impaired insulin action in subcutaneous adipocytes from women with visceral obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280(1):E40-9.
80. Löfgren P, Hoffstedt J, Näslund E, Wirén M, Arner P. Prospective and controlled studies of the actions of insulin and catecholamine in fat cells of obese women following weight reduction. *Diabetologia.* 2005;48(11):2334-42.
81. Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech.* 2010;3(9-10):525-34.
82. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(6):E1323-32.
83. Fukuda D, Aikawa E, Swirski FK, Novobrantseva TI, Kotelianski V, Gorgun CZ, et al. Notch ligand delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(27):E1868-77.
84. Linden MA, Fletcher JA, Morris EM, Meers GM, Kearney ML, Crissey JM, et al. Combining metformin and aerobic exercise training in the treatment of type 2 diabetes and NAFLD in OLETF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(3):E300-10.
85. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, Thoma C, Moore S, Taylor R, et al. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut.* 2011;60(9):1278-83.
86. Homa LD, Burger LL, Cuttitta AJ, Michele DE, Moenter SM. Voluntary Exercise Improves Estrous Cyclicity in Prenatally Androgenized Female Mice Despite

- Programming Decreased Voluntary Exercise: Implications for Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Endocrinology*. 2015;156(12):4618-28.
87. Greenwood EA, Noel MW, Kao CN, Shinkai K, Pasch LA, Cedars MI, et al. Vigorous exercise is associated with superior metabolic profiles in polycystic ovary syndrome independent of total exercise expenditure. *Fertil Steril*. 2016;105(2):486-93.
88. Almenning I, Rieber-Mohn A, Lundgren KM, Shetelig Løvvik T, Garnæs KK, Moholdt T. Effects of High Intensity Interval Training and Strength Training on Metabolic, Cardiovascular and Hormonal Outcomes in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Pilot Study. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138793.

Apêndice

Artigo publicado oriundo da tese:

Marcondes RR, Maliqueo M, Fornes R, Benrick A, Hu M, Ivarsson N, Carlström M, Cushman SW, Stenkula KG, Maciel GAR, Stener-Victorin E. Exercise differentially affects metabolic functions and white adipose tissue in female letrozole- and dihydrotestosterone-induced mouse models of polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;448:66-76.

Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28344042>