



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UNICEUB  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE – FACES  
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**RAFAEL DOMINGOS GUIMARÃES GUEDES**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GENES E PROTEÍNAS QUE  
REGULAM A SÍNTESE DE TESTOSTERONA EM CAMUNDONGOS  
COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA  
SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXERCÍCIOS**

**BRASÍLIA-DF  
2018**



**RAFAEL DOMINGOS GUIMARÃES GUEDES**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GENES E PROTEÍNAS QUE  
REGULAM A SÍNTESE DE TESTOSTERONA EM CAMUNDONGOS  
COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA  
SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXERCÍCIOS**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e pesquisa pela Faculdade de Ciências da Educação e Saúde – FACES

Orientação: Fernanda Costa Vinhaes de Lima

**BRASÍLIA-DF  
2018**

<b>Sumário</b>	
<b>Lista de Abreviaturas</b>	4
<b>Resumo</b>	6
<b>Introdução</b>	8
<b>Referencial teórico</b>	10
<b>Metodologia</b>	15
<b>Resultados e discussões</b>	23
<b>Considerações finais</b>	31
<b>Referências</b>	32

## **Lista de Abreviaturas**

ADP – ADENOSINA DIFOSFATO

*AMPK* - Adenosina Monofosfato

AMPK - Proteína Quinase Ativada Por Adenosina Monofosfato

ATP - Adenosina Trifosfato

BAT- Brown Adipose Tissue

CC - Grupo controle

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CFMV – Conselho Federal De Medicina Veterinária

CH - Grupo controle tratado com DHL

CIEX UnB - Laboratório De Cirurgia Experimental Da Universidade De Brasília

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DF - Distrito Federal

DHL - Dieta Hiperlipídica

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELIZA - Ensaio De Imunoabsorção Enzimática

FarMOL - Laboratório de Farmacologia Molecular

FEPECS – Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde

FS - Faculdade de Ciências

*GLUT4* - Gene Transportador De Glicose

IF - Inatividade física

IN - Intenso intervalado

m – Metros

MACP - Proteínas Transportadoras de Ânions Mitocondriais

mg/g – Miligrama por grama

min - Minuto

MO - Moderado Contínuo

NBCI

ng/dL – nanograma por decilitro

qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real

RNA<sub>m</sub> – Ácido Ribonucleico Mensageiro

SES – Secretaria de Estado de Saúde

TA – Tecido Adiposo

UCP1 – Proteína desacopladora 1

UI - Unidade Internacional

UnB - Universidade de Brasília

USP - Universidade de São Paulo

WAT – White Adipose Tissue

## Resumo

### **ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GENES E PROTEÍNAS QUE REGULAM A SÍNTESE DE TESTOSTERONA EM CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXERCÍCIOS**

**Rafael Domingos Guimarães Guedes – UniCEUB, PIBIC-CNPq, aluno bolsista**  
*rafaeldomingos8c@gmail.com*

**Fernanda Costa Vinhaes de Lima – UniCEUB, professora orientadora**  
*fernanda.Lima@uniceub.br*

**Olivia Laquis De Moraes - UniCEUB, professora colaboradora**  
*livilaquis@gmail.com*

**Adriana Lofrano Alves Porto- UNB, professora colaboradora**  
*adlofrano@gmail.com*

**Kim Sampaio de Lacerda Mileski – UnB, pesquisador colaborador**  
*kim\_mileski@hotmail.com*

A obesidade é apontada como fator disruptivo da normalidade de níveis hormonais e físicos, estando relacionada a enfermidades com elevado grau de morbidade e mortalidade, como hipertensão, diabetes e acidentes vasculares. A velocidade de absorção e armazenamento de gordura no Tecido Adiposo (TA) estão associados diretamente a questões endócrinas, genéticas, sedentarismo, gasto energético e tipo de dieta do indivíduo. O gene *UCP1* é alvo dos estudos que tem como temática a obesidade e a termogênese, por ter um papel importante no funcionamento do Tecido Adiposo Branco (WAT) e do Tecido Adiposo Marrom (BAT), assim como a enzima *AMPK* no tecido muscular. O hipogonadismo trata-se de um descontrole fisiológico, em alguns casos decorrente do grau de obesidade, caracterizado pela incapacidade de produzir testosterona, espermatozoides circulantes e consequentemente infertilidade, além de dificuldade de manutenção do tecido muscular. O objetivo do presente estudo foi avaliar a síntese de testosterona de camundongos (n=25) machos de linhagem C57BL/6 submetidos à Dieta Hiperlipídica (DHL) e diferentes protocolos de atividade física. Para realização da pesquisa os animais foram divididos em cinco grupos para avaliação física pré e pós indução de obesidade por DHL. Os grupos realizaram diferentes protocolos experimentais segregados em cinco grupos: (CC) grupo controle, (IF) grupo de inatividade física, (CH) grupo tratado com DHL sem exercício, (MO) grupo tratado com DHL submetido a exercício moderado contínuo, (IN) grupo tratado com DHL submetido a exercício intenso intervalado. Ao término dos experimentos os animais foram novamente avaliados fisicamente e tiveram seus dados, sangue e tecidos de interesse coletados. O material genético foi submetido à reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), sendo realizada a amplificação do gene *UCP1* por pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos. A dosagem de testosterona foi realizada por meio ensaio imunoenzimático competitivo (ELISA kit). Os grupos submetidos a DHL obtiveram um ganho mais acentuado de peso em relação ao CC no momento pré protocolos de atividade física. Após os testes de os grupos MO e IN ganharam menos peso que o CC. Os indivíduos do protocolo de atividade moderada melhoraram a distância percorrida no teste de esteira em relação aos CH e CC. Os grupos CH e MO apresentaram massa dos testículos menores que CC, enquanto o grupo de inatividade física foi semelhante à do grupo controle. A massa do BAT do grupo IN foi maior que o CC, apontando maior eficiência da termogênese neste protocolo. O período de protocolo experimental com camundongos com obesidade induzida por DHL minimizou o ganho de peso quando

comparado com o CC, como também o ganho de peso nos animais magros. Tais dados estabelecem uma relação direta de práticas de atividade física com prevenção de obesidade e afecções metabólicas. Outros estudos envolvendo a termogênese e o papel do BAT são importantes para compreender melhor relação entre tal tecido e a perda da massa de tecido testicular, como também, o aumento da termogênese em protocolos de atividade de alta intensidade.

**Palavras-Chave:** Obesidade. Hipogonadismo. Treinamento físico. *UCP1*. Testosterona. Sedentarismo. *AMPK*.

## Introdução

A homeostase corpórea é modulada por fatores externos e internos como vias metabólicas, interações hormonais e fatores genéticos. O sistema fisiológico está constantemente sofrendo ações de órgãos e tecidos de diferentes origens, que desempenham funções importantes para o equilíbrio do indivíduo. Como resposta destas atividades, os indivíduos apresentam *feedbacks* positivos e/ou negativos de acordo com o tipo de estímulo e intensidade que lhe são sofridos Ji et al. (2018 e Mawaw et al. (2017).

A obesidade é apontada por pesquisadores como um fator disruptivo da normalidade de níveis hormonais e físicos, estando relacionada a enfermidades com elevado grau de morbidade e mortalidade, como diabetes tipo 2, hipertensão, acidentes vasculares, hiperlipidemia e trombose. Ela está presente em diversos estudos da atualidade por se tratar de um estado físico de desregulação de vias metabólicas e da homeostase que acomete uma parcela significativa da população mundial Mawaw et al. (2017 e Stosio et al. (2016a).

Fatores como tipo de dieta, etnia, prática de atividade física e aspectos genéticos são apontados como moduladores do quadro de obesidade. Alguns fatores endócrinos e metabólicos são utilizados para verificar modulações severas do organismo, sabendo-se que síndromes metabólicas estão diretamente ligadas à obesidade.

Dentro dos fatores precursores do quadro de obesidade, temos uma dieta hipercalórica como causa do ganho desregulado de gordura corpórea e subsequentes neoplasias metabólicas, doenças cardio-metabólicas (TMCs), acidentes vasculares e diabete *mellitus*. A velocidade de absorção de gordura e o seu estoque no tecido adiposo estão associados diretamente a questões endócrinas, genéticas, sedentarismo e dieta obesogênica Lee et al. (2018 e McGee et al. (2008).

O Tecido Adiposo (TA), além da função de reserva de lipídios, também é responsável pela produção de hormônios importantes para a regulação, como leptina e grelina, responsáveis, respectivamente pela sensação de saciedade e fome Porter et al. (2016 e Symonds et al. (2018a).

O Hipogonadismo apresentasse como um dos descontroles fisiológicos recorrente do grau de obesidade. Tal desregulação do organismo é caracterizada

pela parada ou mal funcionamento das gônadas masculinas e femininas, modulando os níveis de hormônios sexuais como testosterona e estradiol Melmed et al. (2015 e De Roux et al. (2003).

Em indivíduos do sexo masculino, o hipogonadismo caracteriza-se pela incapacidade de produzir testosterona, espermatozoides circulantes e subsequente infertilidade. A testosterona está associada a ganho e manutenção de massa muscular e o metabolismo corpóreo, estando diretamente ligada ao aumento da massa gorda e adiposidade visceral Macedo et al. (2014 e De Roux et al. (2003 e Surampudi et al. (2014).

A síntese de tal hormônio é realizada nos testículos em indivíduos masculinos, por cascata de reações bioquímicas reguladas pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG), modulados por picos de Hormônio Luteinizante (LH) responsável pela síntese e secreção. A testosterona é um hormônio do tipo esteróide derivado do colesterol, sendo modulado por sua presença e quantidade no organismo Melmed et al. (2015).

Este estudo faz parte de um projeto maior, desenvolvido na Universidade de Brasília - UnB e propõe-se a colaborar para o aumento da casuística da patogênese da obesidade, ao estudar camundongos machos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica submetidos a protocolos diferentes de atividade física.

## Referencial teórico

A obesidade é abordada na literatura como enfermidade do século XXI por acometer parcela significativa da população mundial. Em estudos realizados em 2016 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) apontou que parte considerável da população mundial vive em países com maior morbidade de pessoas com obesidade do que de desnutrição, apontando que 1,9 bilhão de adultos, com 18 anos ou mais, apresentavam quadro de excesso de peso, onde 650 milhões, destes, já eram indivíduos obesos. E 39% dos adultos com 18 anos ou mais estavam acima do peso e 13% eram obesos Mawaw et al. (2017 e WHO (2017).

Dos dados mais alarmantes encontrasse o número alto de crianças e adolescentes com sobrepeso ou com algum grau de obesidade. Dentro da população infantil e infanto-juvenil 41 milhões de crianças menores de 5 anos e 340 milhões de crianças e adolescentes com idade entre 5 e 19 anos estavam acima do peso ou obesas WHO (2017).

São dispostas três categorias de obesidade, sendo grau 1, grau 2 e grau 3 também denominada de obesidade mórbida. Tal parâmetro é estabelecido por meio de cálculo da massa corporal do indivíduo em relação a sua altura (2x). O resultado do cálculo é denominado Índice de Massa Corporal (IMC)

**Tabela 1:** Índice de Massa Corporal e classificação de obesidade.

IMC	Classificação
<16	magreza grave
16 a <17	magreza moderada
17 a <18,5	magreza leve
18,5 a <25	saudável
25 a <30	sobrepeso
30 a <35	obesidade grau I
35 a <40	obesidade grau II
$\geq 40$	obesidade grau III (mórbida)

Tal parâmetro não é diagnóstico, pois outros fatores são levados em conta, como níveis de colesterol e percentual de gordura corporal, assim ele é apresentado como um índice corporal que é calculado pela média populacional.

A Obesidade é encarada em estudos como fator disruptivo da normalidade metabólica e hormonal por promover descontrole de níveis para a homeostase corpórea, diretamente ligada a enfermidades e disfunções com elevado grau de morbidade e mortalidade, como diabetes tipo 2, problemas cardiovasculares, hipertensão, acidentes vasculares, hiperlipidemia e trombose, além de síndromes metabólicas como o hipogonadismo McGee et al. (2008 e Stosio et al. (2016a e Surampudi et al. (2014).

O hipogonadismo é um descontrole fisiológico recorrente do grau de obesidade, caracterizado pelo mau funcionamento das gônadas masculinas e femininas. O Hipogonadismo em indivíduos do sexo masculino é evidenciado pela incapacidade de produzir testosterona, espermatozoides circulantes e subsequente infertilidade. A baixa produção desse hormônio afeta no ganho e manutenção de massa muscular, funcionamento tireoidiano e o metabolismo corpóreo, estando diretamente ligada ao aumento da massa gorda e adiposidade visceral e cutânea.

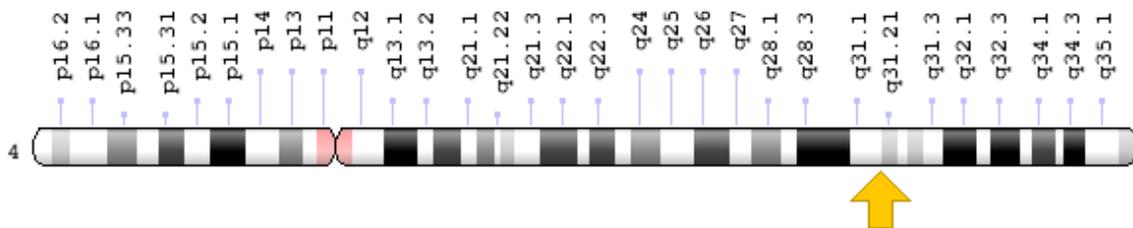
Já está estabelecida a associação da obesidade com a resistência insulínica à diminuição da concentração plasmáticas de testosterona ao hipogonadismo masculino Caldas et al. (2009 e Casulari et al. (2010 e McGee et al. (2008).

O grande volume de gordura é uma das características de indivíduos com obesidade, estando dispostas em gotículas de lipídeos no tecido adiposo na forma subcutânea ou visceral. O Tecido Adiposo (TA) é composto por adipócitos, células capazes de armazenar de gotículas lipídicas, com papel fundamental na produção de esteróides, armazenamento de energia e isolamento térmico. O corpo humano apresenta três tipos de TA o marrom, o bege e o branco. O marrom é encontrado em menor quantidade, sendo grande responsável pela produção da proteína *UCP1* responsável pela oxidação de glicose e lipídeos e termogênese Symonds et al. (2018b).

Segundo Symonds e colaboradores (2013) o controle da absorção e armazenamento de energia está diretamente ligado a interações gênicas, funcionamento da termogênese e papel dos Tecidos Adiposos. O gene *UCP1* é de grande alvo dos estudos que tem como temática a obesidade, termogênese, por ter

um papel importante no funcionamento do Tecido Adiposo Branco (WAT) e do Tecido Adiposo Marrom (BAT), ao expressar a proteína desacopladora 1 (*UCP1*).

O gene *UCP1* (ID do gene: 7350) está localizado no braço longo do cromossomo 4 q31.1 (figura 1) responsável pela síntese da proteína desacopladora 1 (*UCP1*). As proteínas de tal gênero, desacopladoras, pertencem a família da Proteínas Transportadoras de Ânions Mitocondriais (MACP), realizando dissipação de calor pela fosforilação oxidativa da síntese de Adenosina Trifosfato (ATP), denominada em alguns estudos como termogênese sem tremores, sendo um processo de vazamento de prótons mitocondriais, por reduzirem o potencial de membrana, por movimentação de H<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup> Bertholet; Kirichok (2017 e Stosio et al. (2016a).



**Figura 1:** Locus do gene *UCP1* (Homo sapiens Annotation Release 109, GRCh38.p12. fonte: NCBI).

A expressão da proteína desacopladora ocorre inicialmente no período neonatal dos seres humanos com a finalidade de evitar uma possível hipotermia pós parto, e tem sua ação reduzida durante a vida adulta do indivíduo. Visando seu poder termogênico no balanço energético estudos envolvendo tal proteína buscam a sua ação em indivíduos adultos, em especial com grau elevado de obesidade para melhor desempenho da termogênese. Além da ação termogênica, após sua ativação é visto um rápido aumento em hormônios metabólicos, como catecolaminas, hormônios tireoidianos, cortisol e leptina Porter et al. (2016 e Symonds (2013 e Symonds et al. (2018a).

O Tecido Adiposo Marrom (BAT) tem como característica a produção de calor por meio da ativação da proteína *UCP1*. Em seres humanos o BAT tem um papel importante na termogênese e no metabolismo, por conseguir produzir rapidamente grandes quantidades de calor com quantidades relativamente pequenas no corpo,

tendo ação direta no balanço de energia como a homeostase de glicose e lipídios. O BAT é capaz de produzir muito mais calor do que qualquer outro órgão do corpo por possuir 10 vezes mais a quantidade de *UCP1* do que o TA bege, apontando maior de impacto no equilíbrio energético de todo o corpo Porter et al. (2016 e Stosio et al. (2016b e Symonds et al. (2018b).

A expressão da proteína *UCP1* está presente no BAT e pode ser induzida pelo exercício físico no WAT. Esse processo de indução é possível graças a presença de adipócitos nos tecidos, propondo tornar o tecido pobre em atividade termogênica em um tecido mais ativo. Porter et al. (2016 e Stosio et al. (2016a).

A prática regular de atividades físicas é apontada como moduladora de saúde e conseqüentemente do grau de obesidade, por promover o estímulo de síntese de hormônios metabólicos e liberações de substâncias como a dopamina, neurotransmissor responsável pela sensação de satisfação e prazer, liberada após a prática de exercícios.

A via de sinalização da Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato (*AMPK*) é um dos agentes do metabolismo da energia celular por ser ativada na fibra muscular durante a prática de exercício físico devido às mudanças de níveis de fosfato. Esta proteína desempenha o papel de sensor dos níveis de energia disposto na célula, provocando a inibição de vias metabólicas que consomem energia ou favorecem os fatores que aumentam a produção de Adenosina Trifosfato (ATP), como a captação de glicose e a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético Bolster et al. (2002).

Segundo Bolster e colaboradores (2002) a expressão da *AMPK* regula a expressão de genes relacionados ao metabolismo celular, como o gene transportador de glicose (*GLUT4*), aumentando a captação de glicose e também a oxidação de ácidos graxos no tecido músculo. Esta proteína, portanto, tem o papel importante na sinalização de disponibilidade de ATP e ADP, modulando o metabolismo intermediário ao provocar atividades celulares para aumentar a disponibilidade de energia e sustentar altos níveis de fosfato de energia.

No modelo animal, roedores apresentam semelhança no potencial da *UCP1* para geração de calor com os humanos. Mesmo com algumas contradições nos protocolos experimentais, é possível constatar a semelhança significativa na *UCP1* de roedores e seres humanos Fan et al. (2015 e Porter et al. (2016).



## Metodologia

Para realização do estudo foram solicitados vinte e cinco camundongos machos da linhagem C57BL/6 do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

Os indivíduos foram divididos em cinco grupos, com até 5 animais, e alocados em gaiolas (micro isolador em estante ventilada – Alesco, SP, Brasil), mantidos com temperatura controlada (25 °C) em ciclo claro/escuro a cada 12 horas (escuro entre 19:00 h e 7:00 h), em salas de alojamento do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), como demonstrado na Figura 2.



**Figura 2:** Alojamento dos animais no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

O primeiro grupo foi utilizado como Controle (CC, n=5) tanto de tipo de dieta como de atividade física, recebendo dieta controle AIN-93G (15,8% de lipídeos, 20,3% de proteína e 63,9% de carboidratos), formulada para as fases de crescimento, gestação e lactação de roedores, de acordo com as diretrizes AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993).

O restante dos indivíduos foi dividido em quatro grupos (n=20) experimentais, sendo: (IF) grupo de inatividade física n=5, (CH) grupo tratado com Dieta Hiperlipídica sem exercício n=5, (MO) grupo tratado com Dieta Hiperlipídica submetido a exercício moderado contínuo n=5, (IN) grupo tratado com Dieta Hiperlipídica submetido a exercício intenso intervalado n=5.

Os quatro foram induzidos à mesma dieta hiperlipídica, e submetidos à diferentes protocolos de atividade física. Foram alimentados com Dieta Hiperlipídica (DHL) constituída por 57,2% de lipídios, 15,2% de proteína e 27,6% de carboidratos, para induzir a obesidade nos animais.

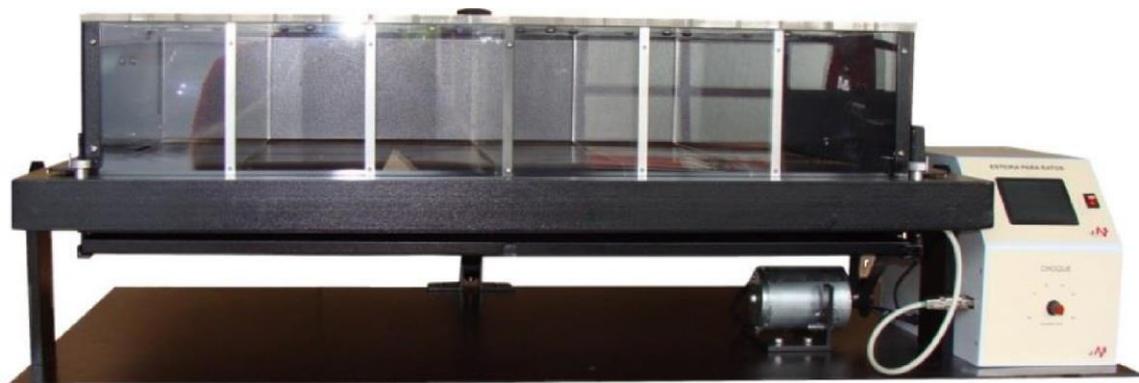
Todos os animais foram submetidos a dieta específica desde os 28 dias de idade, período que representa o início da puberdade, experimentos, até o final do estudo (224 dias de vida). A dieta controle e a DHL foram fornecidas na forma de pelota e o acesso a elas e a água (filtrada) foi livre.

Todos os grupos foram submetido à dieta por 140 dias, tendo o grupo CC recebido dieta controle e os quatro grupos uma dieta hiperlipídica. Após 140 dias de dieta específica (aos 168 dias de vida), foi realizado o início dos protocolos experimentais, com duração de 8 semanas.

Os grupos CC e CH foram utilizados como controles nas análises, para avaliar as possíveis alterações genótípicas e fenotípicas. Todos os grupos se alimentaram da mesma quantidade de alimento, onde os grupos tratados com DHL receberam ração mais calóricas mas na mesma quantidade.

### **Teste de esteira**

Foi realizado, inicialmente, um contato prévio dos indivíduos com a esteira por cerca de 7 dia, antes do início dos experimentos, para adaptação aos protocolos. Em seguida foram submetidos ao teste de esforço em esteira ergométrica para camundongos. O equipamento (figura 3) possuíam dispositivos elétrico de baixa frequência e intensidade (até 3 mA), para estimular os indivíduos a realizar o exercício.



**Figura 3:** Esteira para camundongos (AVS Projetos®)

No teste os indivíduos foram submetidos a corrida em esteira para avaliar a capacidade cardiorrespiratória. A velocidade inicial foi de 6 m/min, sofrendo intensificação de 2 m/min a cada 2 minutos com inclinação constante de 25°, até que o animal dê sinais de ser incapaz de continuar correndo. Este protocolo foi adaptado de HØYDAL *et al.*, 2007 e RODRIGUES *et al.*, 2007.

Foi registrado a maior distância, velocidade e tempo percorridos pelos animais para avaliação indireta da capacidade aeróbia máxima do animal e planejamento dos protocolos de treinamento. Os testes foram realizados em dois momentos: antes e após 8 semanas do treinamento.

### ***Protocolos experimentais***

**Protocolo do grupo 1** (CC – dieta controle / sem treinamento físico): não realizaram nenhuma atividade física além da movimentação espontânea realizada diariamente.

**Protocolo do grupo 2** (CH – dieta hiperlipídica / sem treinamento físico): foram submetidos a dieta DHL e não realizaram nenhuma atividade física além da movimentação espontânea realizada diariamente.

**Protocolo do grupo 3** (IF – dieta hiperlipídica / sem treinamento físico / com inatividade): foram submetidos a dieta DHL e ao processo de inatividade física, por meio de suspensão de membros inferiores e consequente redução da mobilidade do animal simulando um indivíduo em inatividade e sedentarismo.

Tal protocolo foi adaptado de um modelo criado inicialmente pela agência espacial americana que pretendia simular os efeitos da falta da ação da gravidade no espaço Morey (1979), e de diversos estudos envolvendo a inatividade física Bey; Hamilton (2003 e Zderic; Hamilton (2006).

Com a finalidade de reduzir as complicações causadas pelo modelo de tração cutânea, foi realizado neste projeto um modelo de tração óssea, como estabelecido por Ferreira e colaboradores (2011). Nele é implantado na cauda do animal um anel, entre a 6<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> vértebra para ser alocado na lateral da gaiola, possibilitando o melhor acompanhamento do pesquisador aos animais e evitando sua fuga (figura 4), para esse modelo dois animais foram necessários para um piloto, com intuito de treinamento e aprimoramento da técnica cirúrgica.



**Figura 4:** Protocolo de inatividade física em camundongos

Os camundongos do grupo de inatividade tiveram seus membros posteriores suspensos, durante o período de 12 horas por dia, durante o período noturno, por elevação por meio de ganchos presos em haste metálica com a finalidade de atrofia ao tecido muscular dos membros suspensos. Tal modelo simula uma pessoa em estado de inatividade e sedentarismo.

Para melhor funcionamento do protocolo foram alocados apenas dois indivíduos por gaiola para evitar danos a estrutura de suspensão e o estresse do animal. Durante o protocolo experimental os indivíduos eram pesados três vezes por semana, e tinham demais informações de interesse colhidas. Aqueles que apresentavam sinais de estresse, porfirina nos olhos ou qualquer comportamento fora do normal foram retirados do protocolo.

**Protocolo do grupo 4** (MO – dieta hiperlipídica / exercício contínuo de intensidade moderada): foram submetidos a dieta DHL e treinamento contínuo de intensidade

moderada com sessões de corrida em esteira. Para cada sessão foi realizado aquecimento de 10 minutos com intensidade de 50% do máximo atingido durante avaliação física, e posteriormente a 70% da velocidade máxima durante aproximadamente 60 min, em 5 dias por semana, por 8 semanas.

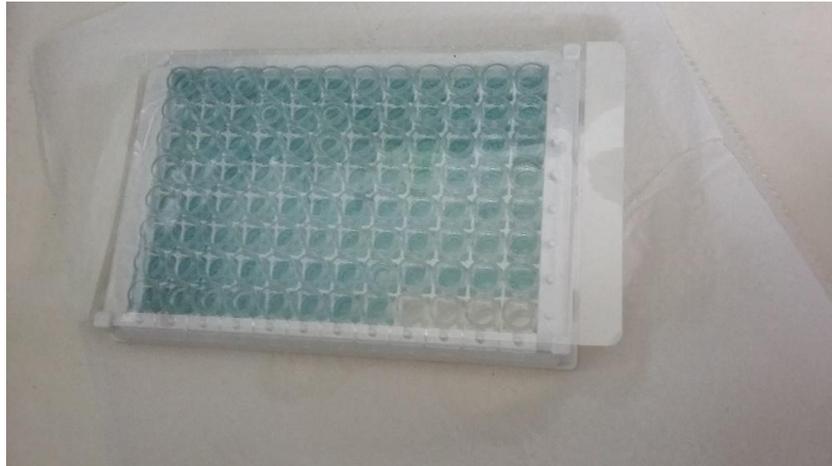
**Protocolo do grupo 5** (IN – dieta hiperlipídica / exercício Intervalado de alta intensidade): foram submetidos a dieta DHL e treinamento intervalado de alta intensidade. Para cada sessão foi realizado aquecimento de 10 minutos com intensidade de 50% do máximo atingido durante avaliação física. O protocolo propôs um treinamento que durou em média 45 min com percurso de 4 minutos em alta intensidade em 85-90% da velocidade, seguido por 3 minutos com intensidade moderada em 70% entre as corridas de 4 minutos, intervalando alta e média intensidade, com duração total de no máximo 60 minutos em 5 dias por semana, por 8 semanas.

### **Coleta de material biológico**

Os indivíduos do presente estudo realizaram duas coletas de sangue para a dosagem de testosterona total plasmática uma antes do início do protocolo experimental, após 140 dias de dieta específica, e outra após término do protocolo experimental, após a eutanásia. Foi feita a coleta de 100 µL do sangue por meio de corte distal na cauda do animal, anestesiada com cloridrato de xilocaína (Bravet®). Ao final da coleta os animais tiveram o corte cauterizado e o material reservado. O sangue foi centrifugado a 4000 rpm, durante 20 minutos, em uma temperatura de 4° C para obtenção do soro plasmático, que por fim foi armazenado a -80° C.

### ***Dosagem de testosterona***

As amostras biológicas coletadas foram submetidas a ensaio imuno enzimático competitivo (ELISA kit, Abcam®) para dosagem das concentrações de testosterona plasmáticas em duplicata (figura 5).



**Figura 5.** Placa do kit para ensaio imunoenzimático.

### ***Eutanásia***

Os animais foram eutanasiados por meio de anestesia com o fármaco isoflurano (Forane, Abbott, Brasil) ao final dos protocolos experimentais, 228º de vida. Os indivíduos foram eutanasiados e tiveram sangue e tecidos de interesse coletados em ordem de grupo para igualar as condições entre os grupos. Foram coletados os tecidos adiposo inguinal, epididimal, retroperitoneal e subescapular, coração, fígado, testículos, músculos sóleo e gastrocnêmico (figura 6). cirúrgicos foram realizados no laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade de Brasília – CIEX UnB



**Figura 6:** Testículos e Tecido adiposo branco visceral de animal com obesidade induzida.

Os tecidos foram pesados em balança de alta precisão, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em frizer  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise da expressão de RNA mensageiro (RNAm) e suas respectivas proteínas.

### ***Expressão de genes e proteínas***

Foi realizada a extração de RNAm total dos tecidos, transcrição reversa e *qRT-PCR* em tempo real pelo método SYBR GREEN usando kit comercial (Life Technologies) e primers específicos para amplificação do gene *UCP1* e análise quantitativa relativa. E também a expressão da proteína *AMPK* e *UCP1* por Western-Blot.

### ***Parecer ético***

Os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos) (CONCEA, 2013).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, com UnB-Doc número 33236/2015. RNAm do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA CFMV

A eutanásia realizada segundo o Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais (CFMV - 2013) e o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA - 2013) usando métodos químico e físico. Foi realizada sedação e decapitação dos indivíduos, este método é considerado aceitável para roedores de pequeno porte (CONCEA - Resolução Normativa, Nº 13, 2013).

Após a eutanásia, as carcaças dos animais foram descartadas seguindo as normas para este tipo de resíduo, Lei Nacional de Resíduos Sólidos Nº 12.305/2010.

## Resultados e discussões

A utilização de modelos animais para estudos experimentais são importantes para obter informações sobre os mecanismos celulares e moleculares, em especial para verificar efeitos benéficos do exercício na prevenção, tratamento respostas de doenças, síndromes metabólicas e eficiência de diferentes protocolos de experimentação Høydal et al. (2007).

### **Período Pré treinamento**

No período que antecedeu os protocolos de experimentos, foram feitas coletas de dados, no qual o grupo controle CC consumiu por dia, em média, aproximadamente 28% mais água em relação aos grupos que receberam dieta hiperlipídica, que consumiram quantidades médias semelhantes, sendo CH, e IN. E em relação a dieta, o grupo controle CC consumiu uma quantidade de dieta 21% maior do que o grupo submetido a dieta hiperlipídica sem exercício CH. Os grupos tratados com DHL consumiram quantidades médias semelhantes, sendo, MO.

Esse dado é explicado pelo fato que a dieta hiperlipídica apresenta uma maior quantidade de energia por grama (22,38 kJ/g) em comparação com a dieta controle (16,74 kJ/g). O grupo CC, mesmo consumido uma maior quantidade de dieta (g) consumiu em média 16% menos energia da dieta (190,0 ± 36,5 kJ) em comparação aos grupos que consumiram dieta hiperlipídica MO, CH e IN. Por fim, esses três grupos consumiram a mesma quantidade de energia proveniente da dieta (tabela 1).

**Tabela 1:** Consumo médio de água e dieta antes do protocolo experimental

	CC	CH	MO	IN
Água (ml/dia)	14,3 ± 3,0	11,2 ± 2,7	11,1 ± 2,4	11,2 ± 2,3
Dieta (g/dia)	11,4 ± 2,2	9,4 ± 1,9	10,2 ± 1,9	10,5 ± 2,0
Dieta (kJ/dia)	190,0 ± 36,5	210,9 ± 41,4	229,0 ± 42,9	235,6 ± 45,6

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção IF: Dieta Hiperlipídica/Inatividade Física MO: Dieta Hiperlipídica/Exercício Moderado Contínuo IN: Dieta Hiperlipídica/Exercício Intenso Intervalado

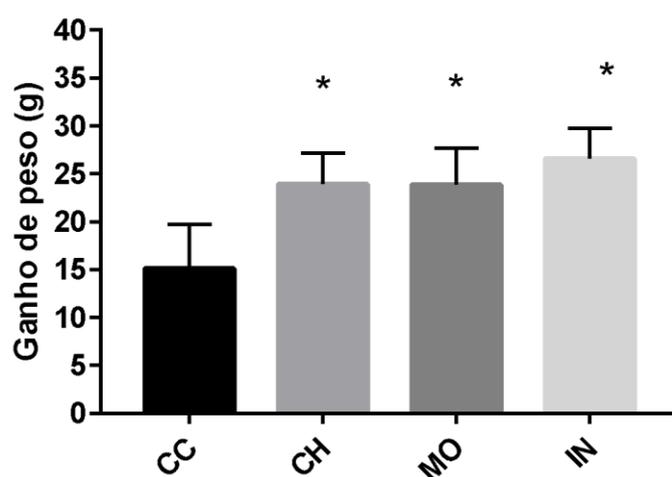
Todos os grupos (CC, CH, MO, IN) iniciaram suas respectivas dietas com pesos estatisticamente semelhantes. Após 140 dias de dieta, todos os grupos que receberam dieta hiperlipídica CH, MO e IN tinham uma média de peso final maior

(+33%) do que o grupo controle CC. Todos os grupos que receberam dieta hiperlipídica CH, MO e IN ganharam, em média, aproximadamente 64% mais peso do que o grupo que recebeu dieta controle CC (tabela 2 e figura 7).

**Tabela 2:** Variação da massa corporal antes do protocolo experimental

	CC	CH	MO	IN
Peso Inicial (g)	12,1 ± 2,7	11,0 ± 2,1	12,5 ± 4,9	12,8 ± 3,4
Peso Final (g)	27,3 ± 3,5	34,9 ± 4,0	36,4 ± 5,9	39,4 ± 3,7
Diferença de peso (g)	15,1 ± 4,6	23,9 ± 3,2	23,8 ± 3,8	26,6 ± 3,1

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção IF: Dieta Hiperlipídica/Inatividade Física MO: Dieta Hiperlipídica/Exercício Moderado Contínuo IN: Dieta Hiperlipídica/Exercício Intenso Intervalado



**Figura 7:** Ganho de peso entre grupos antes do protocolo experimental.

O protocolo de indução de obesidade realizado foi semelhante ao estudo realizado por Fan e colaboradores (2015). Esses autores avaliaram os efeitos de 10 semanas (70 dias) de dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/6 machos e verificaram que, além de levar à obesidade, a dieta levou a um decréscimo na fertilidade e afetou negativamente as concentrações de testosterona, estradiol e LH, em comparação com o grupo que recebeu dieta controle.

### **Período de treinamento**

Durante o protocolo experimental, o grupo com dieta hiperlipídica sem exercício CH foi o grupo que consumiu significativamente, em média, 30% menos água em comparação com os outros grupos CC, MO e IN. Os grupos CC, MO e IN consumiram quantidades de água semelhantes. Todos os grupos consumiram a mesma quantidade (g) de dieta por dia. Entretanto, os dois grupos que fizeram

exercício MO e IN consumiram, em média, mais energia da dieta (+24%) do que o grupo com dieta controle CC. Todos os grupos com dieta hiperlipídica CH, MO e IN consumiram a mesma energia (kJ) proveniente da dieta durante o protocolo experimental (tabela 3).

**Tabela 3:** Consumo médio de água e dieta durante o protocolo experimental

	CC	CH	MO	IN
Água (ml/dia)	18,0 ± 2,6	13,5 ± 2,6	17,4 ± 2,7	16,7 ± 3,0
Dieta (g/dia)	13,8 ± 1,8	11,8 ± 1,3	12,6 ± 1,8	13,0 ± 1,6
Dieta (kJ/dia)	230,8 ± 30,3	263,4 ± 29,5	282,8 ± 41,2	291,2 ± 35,5

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção IF: Dieta Hiperlipídica/Inatividade Física MO: Dieta Hiperlipídica/Exercício Moderado Contínuo IN: Dieta Hiperlipídica/Exercício Intenso Intervalado

Ao iniciar o protocolo experimental, todos os grupos que receberam dieta hiperlipídica CH, MO e IN tinham uma média de peso estatisticamente maior (+33%) do que o grupo controle CC. O peso final dos animais após o protocolo experimental foi semelhante entre os grupos. Aqueles que fizeram exercício MO e IN ganharam aproximadamente 72% menos peso que o grupo controle CC.

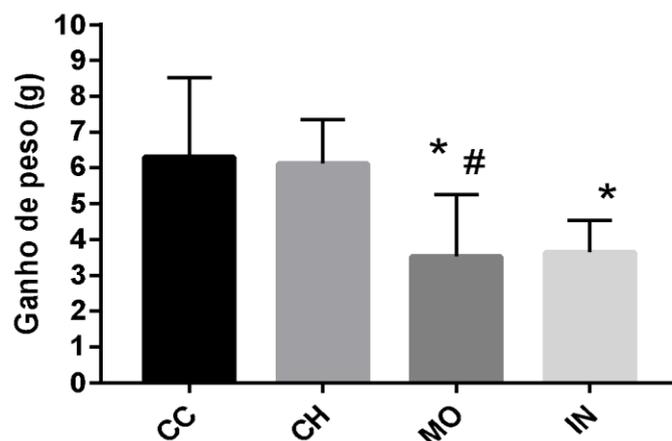
O ganho de peso entre os grupos controle com (CH) e sem (CC) dieta hiperlipídica e após o protocolo experimental foi estatisticamente semelhante (23% e 19%, respectivamente), assim como o ganho de peso entre grupos que fizeram exercício MO e IN (9 e 9%, respectivamente). Somente o grupo que fez exercício moderado MO ganhou menos peso (-74%) que o grupo controle CH ( $p=0,086^*$ ) (tabela 4).

**Tabela 4:** Variação da massa corporal durante o protocolo experimental

	CC	CH	MO	IN
Peso Inicial (g)	27,3 ± 3,5	34,9 ± 4,0	36,4 ± 5,9	39,4 ± 3,7
Peso Final (g)	33,6 ± 5,0	41,0 ± 4,1	39,9 ± 6,6	43,0 ± 4,3
Diferença de peso (g)	6,3 ± 2,2	6,1 ± 1,2	3,5 ± 1,7	3,7 ± 0,9

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção IF: Dieta Hiperlipídica/Inatividade Física MO: Dieta Hiperlipídica/Exercício Moderado Contínuo IN: Dieta Hiperlipídica/Exercício Intenso Intervalado

Embora todos os grupos tenham em média ganhado peso, o grupo controle com dieta controle CC ganhou percentualmente mais peso (+23%) do que os grupos que fizeram exercício MO (+9%) e IN (+9%) (figura 8)



**Figura 8:** Ganho de peso entre os grupos durante o protocolo experimental.

Estes resultados indicam que, apesar dos grupos MO e IN estarem gastando mais energia devido aos seus respectivos protocolos de exercício, eles também estavam consumindo mais energia por meio da dieta. Esse achado também é apresentado nos estudos de Thorogood e colaboradores (2011), que ao avaliarem a perda de peso em pessoas obesas e concluírem que as recomendações de 60 minutos de atividade física moderada durante cinco dias na semana feita pelo Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM) não foi suficiente para promover a perda de peso acentuada DONNELLY et al. (2009).

### **Tecidos**

A pesagem dos tecidos dos animais após eutanásia possibilitou análise comparativa entre os grupos submetidos aos diferentes protocolos com relação a composição corporal. Apesar das mudanças na massa corporal (g) dos animais e na aptidão cardiorrespiratória indicarem maior eficiência do exercício contínuo de intensidade moderada comparativamente ao intervalado de alta intensidade.

Os dados revelam resultados diferentes com relação a massa do tecido adiposo marrom (mg/g) e massa do testículo (mg/g). A massa do BAT do grupo submetido ao protocolo de exercício intervalado de alta intensidade (IN) foi significativamente maior (+59%) do que o CC, enquanto que não houve diferença com relação aos outros grupos. Revelando que a maior massa do BAT no grupo IN aponta para provável maior efetividade desse tipo de exercício em ativar a termogênese.

O tecido adiposo marrom tem sido fonte de uma quantidade crescente de pesquisas nos últimos anos, devido a sua redescoberta como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de doenças associadas a obesidade, uma vez que ele tem um potencial de aumentar consideravelmente o gasto energético corporal Porter et al. (2016) e Symonds et al. (2018b, 2018a).

Flouris e colaboradores (2017) realizaram revisão sistemática que incluiu oito estudos que avaliaram os efeitos induzidos pelo exercício na expressão da *UCP1* que caracteriza o tecido adiposo marrom e sua função termogênica. Apesar dos resultados encontrados serem diferentes, por conta das diferenças entre os protocolos de exercício nos artigos publicados, evidências indicam que o exercício físico regular induz respostas adaptativas e melhorando a expressão da proteína *UCP1* no tecido adiposo em animais obesos.

A massa dos testículos dos grupos que receberam dieta hiperlipídica CH e MO foram menores (-48% e -37%, respectivamente) que o grupo CC, mas não no grupo que fez exercício intervalado de alta intensidade (IN). O testículo é o órgão efetor do eixo reprodutivo masculino, e principal responsável pela produção total de testosterona. Reduções no volume testicular podem estar associadas a redução global da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Assim, é possível especular que a redução do volume testicular nos grupos CH e MO possa estar associada a efeitos deletérios da dieta hiperlipídica e/ou obesidade sobre o eixo reprodutivo, que também persistiram no grupo que fez exercício moderado (MO) Fan et al. (2015) e Melmed et al. (2015) e Morey (1979).

Os dados do grupo amostral indicaram que o exercício de alta intensidade pode ter prevenido a diminuição do peso dos testículos nos animais obesos.

### ***Distância percorrida pelos animais***

A distância inicial percorrida no teste de esteira pelo CC foi, em média, 25% maior do que a de todos os grupos que receberam dieta hiperlipídica CH, MO e IN. Após os protocolos experimentais, a distância percorrida no teste de esteira pelos dois grupos que praticaram exercício MO e IN e o grupo controle CC foram significativamente maiores (+25%) em comparação com o grupo controle que recebeu dieta hiperlipídica CH. Não houve diferença na distância final percorrida entre os grupos CC, MO e IN.

A diferença da distância percorrida (delta) antes e após os protocolos experimentais foi significativamente maior (4x) nos grupos MO e IN em comparação com o CH. Somente o grupo que fez exercício moderado MO teve um aumento (+15%) na distância percorrida no teste maior em comparação ao grupo CC. Os grupos IN e MO tiveram aumentos semelhantes na distância percorrida (tabela 5).

**Tabela 5:** Distância percorrida no teste de esteira antes e depois dos protocolos

	CC	CH	MO	IN
Distância Inicial (m)	238,2 ± 14,1	193,0 ± 17,5	188,0 ± 29,5	190,0 ± 33,6
Distância Final (m)	356,4 ± 26,0	247,8 ± 42,1	442,6 ± 86,7	399,8 ± 73,3
Distância Delta (m)	118,2 ± 28,5	54,8 ± 30,8	254,6 ± 79,2	209,8 ± 80,2

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção IF: Dieta Hiperlipídica/Inatividade Física MO: Dieta Hiperlipídica/Exercício Moderado Contínuo IN: Dieta Hiperlipídica/Exercício Intenso Intervalado

Os resultados obtidos no teste de rampa antes do início do protocolo experimental de treinamento apresentam maior performance do grupo CC em relação ao CH, MO, IN. O desempenho se deu possivelmente por conta do peso dos animais, e, conseqüentemente, do tipo de dieta consumida pelos indivíduos. Importante observar que o teste de rampa realizado na esteira é considerado um método eficiente, não invasivo e de baixo custo para avaliação funcional da aptidão cardiovascular em camundongos da linhagem C57BL/6 com obesidade induzida pela dieta Petrosino et al. (2016).

No recente estudo de Robinson e colaboradores (2017), foi demonstrado que o treinamento intenso foi mais eficiente para este desfecho, em seres humanos, enquanto no presente estudo foi constatado o inverso, o grupo MO teve maior aumento de performance no teste de rampa (distância percorrida) que o grupo CC, de menor peso corporal, demonstrando uma possível maior eficácia do protocolo de exercício contínuo de intensidade moderada na melhora da capacidade aeróbia.

### **Concentração plasmática de testosterona**

A dosagem de testosterona dos indivíduos apresentou valores irregulares e fora do esperado para o momento pós protocolos. Em média tiveram níveis semelhantes de concentração, porém quando analisados individualmente apresentaram oscilações nos valores, como o caso do grupo CH que após o protocolo experimental apresentou variação de 0,7 até 1,2 ng/dl como apontado na tabela 6.

**Tabela 6:** Concentração plasmática de testosterona

	CC	CH	MO	IN
Pré treinamento (ng/dl)	315,3 ± 416,8	303,1 ± 445,8	311,7 ± 602,8	491,1 ± 446,1
Pós treinamento (ng/dl)	453,0 ± 942,8	1,2 ± 0,7	491,7 ± 812,9	3,4 ± 1,3

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção IF: Dieta Hiperlipídica/Inatividade Física MO: Dieta Hiperlipídica/Exercício Moderado Contínuo IN: Dieta Hiperlipídica/Exercício Intenso Intervalado

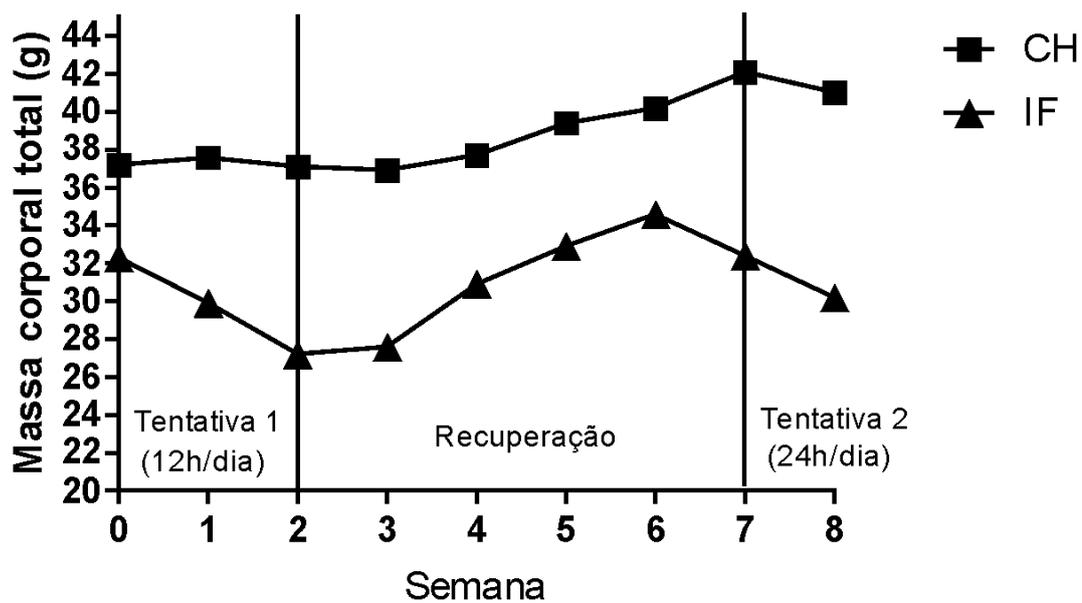
Os achados apresentam concordância com o apontado em estudos de Rodrigues e colaboradores em 2007 ao trabalhar com teste de esforço máximo de ratos diabéticos, e descrever a melhora no desempenho dos indivíduos portadores da síndrome metabólica. O trabalho ainda evidencia o papel importante do treinamento físico na capacidade física por envolver uma metodologia relativamente simples e de baixo custo, que pode ser utilizado como um indicador da capacidade cardiorrespiratória em estudos que investiguem o efeito fisiológico do exercício agudo ou crônico no controle e ratos machos diabéticos, como o estudo que é proposto por esse trabalho.

Devido à inconsistência nos valores apresentados, o dado foi então desconsiderado para fins de análise. É possível que o método da coleta de sangue tenha danificado as amostras, uma vez que muitas apresentaram padrões de baixa qualidade e indícios de degradação celular (hemólise).

### ***Grupo de inatividade física***

O grupo de Inatividade Física apresentou complicações em relação ao protocolo bem no começo dos experimentos, apresentando sinais de estresse e complicações durante a execução do protocolo de inatividade, onde tiveram os anéis da cauda removidos e os animais foram mantidos em recuperação, sem intervenção, durante 5 semanas. Foi realizada uma segunda tentativa após o período de recuperação, porém utilizando uma fita esparadrapo ligada a um anel para suspensão, esse teste foi realizado durante uma semana, com os indivíduos em suspensão (24h/dia).

Entretanto na segunda tentativa os animais mantiveram a perda de peso, cerca de -2,2 g (Figura 9). Por fim os indivíduos foram removidos dos testes e tiveram seus dados coletados posteriormente junto com os demais grupos.



**Figura 9:** Massa corporal dos indivíduos do grupo de Inatividade Física (IF) e do grupo controle com dieta hiperlipídica (CH) em relação as semanas de protocolos experimentais.

## **Considerações finais**

Oito semanas de exercício físico de diferentes intensidades melhoraram o desempenho de corrida em camundongos com obesidade induzida e minimizou o ganho de peso, principalmente no grupo MO, em comparação com o grupo CC. O exercício físico não evitou, mas minimizou significativamente o ganho de peso nos animais submetidos à dieta hiperlipídica em ambos os protocolos treinamento. O ganho de peso em animais submetidos à dieta controle enfatiza a importância de ser fisicamente ativo para prevenir a obesidade.

Ambos os protocolos de exercício físico foram capazes de atenuar o ganho de peso em relação ao CC, mesmo com a maior ingestão calórica, o que reforça o benefício dos protocolos de treinamento no controle de peso. O grupo MO teve semelhante ganho de peso ao CH sugerindo possível maior eficácia do protocolo de exercício moderado em comparação com o exercício intenso em relação a menor ganho de peso.

Uma alimentação saudável e de baixa caloria pode prevenir ganho de peso e, possivelmente, manter a produção de testosterona entre os níveis fisiológicos. Diferentes protocolos de exercício podem atenuar parcialmente os efeitos deletérios de uma dieta inadequada. Os resultados do presente estudo sugerem que o HIIT, modelos de atividade intensiva, tem papel importante para preservar as fibras de contração rápida, sendo o músculo correlacionado com a massa do testículo.

É importante salientar que o tamanho das amostras em cada grupo pode ter limitado algumas comparações e que estudos adicionais são necessários para investigar o papel da atividade física e de suas características (frequência, duração e intensidade) na prevenção e tratamento do hipogonadismo masculino, assim como e segurança do HIIT em populações com sobrepeso e obesidade.

A intensidade da melhora da capacidade cardiorrespiratória induzida por diferentes protocolos de treinamento físico ainda requer maiores estudos, com amostras maiores e com controle de outras variáveis potencialmente interferentes. Um novo experimento com tamanho maior da amostra poderá esclarecer esse fenômeno.

## Referências

- BERTHOLET, A. M.; KIRICHOK, Y. UCP1: A transporter for H<sup>+</sup> and fatty acid anions. **Biochimie**, v. 134, p. 28–34, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27984203>>. Acesso em: 14/9/2018.
- BEY, L.; HAMILTON, M. T. Suppression of skeletal muscle lipoprotein lipase activity during physical inactivity: a molecular reason to maintain daily low-intensity activity. **The Journal of Physiology**, v. 551, n. 2, p. 673–682, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12815182>>. Acesso em: 14/9/2018.
- BOLSTER, D. R.; CROZIER, S. J.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 27, p. 23977–80, 2002. American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997383>>. Acesso em: 13/9/2018.
- CALDAS, A. D. A.; PORTO, A. L.; MOTTA, L. D. C. DA; CASULARI, L. A. Relationship between insulin and hypogonadism in men with metabolic syndrome. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 53, n. 8, p. 1005–11, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20126854>>. Acesso em: 14/9/2018.
- CASULARI, L. A.; CALDAS, A. D. A.; DOMINGUES CASULARI MOTTA, L.; LOFRANO-PORTO, A. Effects of metformin and short-term lifestyle modification on the improvement of male hypogonadism associated with metabolic syndrome. **Minerva endocrinologica**, v. 35, n. 3, p. 145–51, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20938417>>. Acesso em: 14/9/2018.
- DONNELLY, J. E.; BLAIR, S. N.; JAKICIC, J. M.; et al. Appropriate Physical Activity Intervention Strategies for Weight Loss and Prevention of Weight Regain for Adults. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 41, n. 2, p. 459–471, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19127177>>. Acesso em: 15/9/2018.
- FAN, Y.; LIU, Y.; XUE, K.; et al. Diet-Induced Obesity in Male C57BL/6 Mice Decreases Fertility as a Consequence of Disrupted Blood-Testis Barrier. (J. R. Drevet, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0120775, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25886196>>. Acesso em: 15/9/2018.
- FERREIRA, J. A.; CRISSEY, J. M.; BROWN, M. An Alternant Method to the Traditional NASA Hindlimb Unloading Model in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, , n. 49, p. e2467–e2467, 2011. Disponível em: <<http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2467>>. Acesso em: 14/9/2018.
- FLOURIS, A. D.; DINAS, P. C.; VALENTE, A.; et al. Exercise-induced effects on UCP1 expression in classical brown adipose tissue: a systematic review. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 31, n. 2, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28085671>>. Acesso em: 15/9/2018.
- HØYDAL, M. A.; WISLØFF, U.; KEMI, O. J.; ELLINGSEN, Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 14, n. 6, p. 753–760, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18043295>>. Acesso em: 14/9/2018.
- JI, M.; TANG, A.; ZHANG, Y.; et al. The Relationship between Obesity, Sleep and Physical Activity in Chinese Preschool Children. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 3, p. 527, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29543749>>. Acesso em: 20/3/2018.
- LEE, J.-H.; LEE, R.; HWANG, M.-H.; HAMILTON, M. T.; PARK, Y. The effects of exercise on vascular endothelial function in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 10, n. 1, p. 15, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29541164>>. Acesso em: 20/3/2018.
- MACEDO, D. B.; CUKIER, P.; MENDONÇA, B. B.; et al. Avanços na etiologia, no diagnóstico e no tratamento da puberdade precoce central. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 2, p. 108–117, 2014. ABE&M. Disponível em: <

27302014000200108&lng=pt&tling=pt>. Acesso em: 28/9/2017.

MAWAW, P.; YAV, T.; LUKANKA, O.; et al. A cross-sectional study on obesity and related risk factors among women of the central market of Lusonga in Lubumbashi, Democratic Republic of Congo. **The Pan African medical journal**, v. 28, p. 157, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29541303>>. Acesso em: 20/3/2018.

MCGEE, S. L.; VAN DENDEREN, B. J. W.; HOWLETT, K. F.; et al. AMP-Activated Protein Kinase Regulates GLUT4 Transcription by Phosphorylating Histone Deacetylase 5. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 860–867, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18184930>>. Acesso em: 13/9/2018.

MELMED, S.; POLONSKY, K. S.; LARSEN, P. R.; KRONENBERG, H. **Williams textbook of endocrinology**. 2015.

MOREY, E. R. Spaceflight and Bone Turnover: Correlation with a New Rat Model of Weightlessness. **BioScience**, v. 29, n. 3, p. 168–172, 1979. Oxford University Press. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioscience/article-lookup/doi/10.2307/1307797>>. Acesso em: 14/9/2018.

PETROSINO, J. M.; HEISS, V. J.; MAURYA, S. K.; et al. Graded Maximal Exercise Testing to Assess Mouse Cardio-Metabolic Phenotypes. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0148010, 2016. Public Library of Science. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26859763>>. Acesso em: 15/9/2018.

PORTER, C.; HERNDON, D. N.; CHONDRONIKOLA, M.; et al. Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function. **Cell metabolism**, v. 24, n. 2, p. 246–55, 2016. NIH Public Access. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27508873>>. Acesso em: 14/9/2018.

ROBINSON, M. M.; DASARI, S.; KONOPKA, A. R.; et al. Enhanced Protein Translation Underlies Improved Metabolic and Physical Adaptations to Different Exercise Training Modes in Young and Old Humans. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 3, p. 581–592, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28273480>>. Acesso em: 15/9/2018.

RODRIGUES, B.; FIGUEROA, D. M.; MOSTARDA, C. T.; et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular Diabetology**, v. 6, n. 1, p. 38, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18078520>>. Acesso em: 14/9/2018.

DE ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J.-C.; et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 19, p. 10972–10976, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12944565>>. Acesso em: 17/9/2017.

STOSIO, M.; WITKOWICZ, A.; KOWALSKA, A.; KARABON, L. Genetic background of aberrant thermogenin expression (UCP1) in obesity leading to metabolic syndrome. **Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)**, v. 70, n. 0, p. 1389–1403, 2016a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28100847>>. Acesso em: 31/8/2018.

STOSIO, M.; WITKOWICZ, A.; KOWALSKA, A.; KARABON, L. Genetic background of aberrant thermogenin expression (UCP1) in obesity leading to metabolic syndrome. **Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)**, v. 70, n. 0, p. 1389–1403, 2016b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28100847>>. Acesso em: 14/9/2018.

SURAMPUDI, P.; SWERDLOFF, R. S.; WANG, C. An update on male hypogonadism therapy. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 15, n. 9, p. 1247–64, 2014. NIH Public Access. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24758365>>. Acesso em: 5/8/2018.

SYMONDS, M. E. Brown adipose tissue growth and development. **Scientifica**, v. 2013, p. 305763, 2013. Hindawi Limited. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278771>>. Acesso em: 31/8/2018.

SYMONDS, M. E.; ALDISS, P.; POPE, M.; BUDGE, H. Recent advances in our understanding of brown and beige adipose tissue: the good fat that keeps you healthy. **F1000Research**, v. 7, p. 1129, 2018a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30079236>>. Acesso em: 14/9/2018.

SYMONDS, M. E.; ALDISS, P.; POPE, M.; BUDGE, H. Recent advances in our

understanding of brown and beige adipose tissue: the good fat that keeps you healthy. **F1000Research**, v. 7, p. 1129, 2018b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30079236>>. Acesso em: 24/8/2018.

WHO. Tenfold increase in childhood and adolescent obesity in four decades: new study by Imperial College London and WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/detail/11-10-2017-tenfold-increase-in-childhood-and-adolescent-obesity-in-four-decades-new-study-by-imperial-college-london-and-who>>. Acesso em: 31/8/2018.

ZDERIC, T. W.; HAMILTON, M. T. Physical inactivity amplifies the sensitivity of skeletal muscle to the lipid-induced downregulation of lipoprotein lipase activity. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 1, p. 249–257, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16195388>>. Acesso em: 14/9/2018.