

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

**CAMILA DO VALLE GOMES GATTO**

**OVARIECTOMIA E TREINAMENTO RESISTIDO:  
INFLUÊNCIA NA MORFOLOGIA E NA ANGIOGÊNESE DO TECIDO ADIPOSE  
VISCERAL DE RATAS**

**São Carlos**

**2013**

**CAMILA DO VALLE GOMES GATTO**

**OVARIECTOMIA E TREINAMENTO RESISTIDO:  
INFLUÊNCIA NA MORFOLOGIA E ANGIOGÊNESE DO TECIDO ADIPOSEO  
VISCERAL DE RATAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, associação ampla UFSCar/UNESP da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Biologia Molecular do Exercício.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heloisa S. Selistre de Araújo.

**São Carlos**

**2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G263ot Gatto, Camila do Valle Gomes.  
Ovariectomia e treinamento resistido : influência na  
morfologia e angiogênese do tecido adiposo visceral de  
ratas / Camila do Valle Gomes Gatto. -- São Carlos :  
UFSCar, 2014.  
91 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2013.

1. Fisiologia. 2. Ovariectomia. 3. Treinamento resistido. 4.  
Tecido adiposo. 5. Fator de crescimento. 6.  
Neovascularização. I. Título.


CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

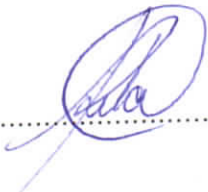
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Camila do Valle Gomes Gatto

Dia 09/09/2013

Profª. Drª. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo.....

Profª. Drª. Rita de Cássia Marqueti Durigan.....

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues.....

## DEDICATÓRIA

*À minha amada e guerreira mãe Alzira, meu exemplo de vida, à tia Sonia, minha querida segunda mãe, ao tio Edvar (in memoriam), que foi um pai maravilhoso, e ao meu esposo Luís Roberto, parceiro pra toda vida!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar-me pelos melhores caminhos.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Heloísa S. S. Araújo por ter me dito Sim!! Obrigada pelo voto de confiança e por todos os ensinamentos durante esses anos.

À Fernanda Duarte, jamais esquecerei a amizade e parceria. Serei eternamente grata pela colaboração e dedicação ao meu projeto. Agradeço também ao Paulão, Cauê, Ian e Raíssa, obrigada pelo carinho, paciência e diversão!!

À Vanessa Borges, companhia nos bons e nos momentos difíceis, minha grande e verdadeira amiga, minha irmã. Obrigada por tudo que fez por mim!

À Grazielle Silveira, uma das pessoas mais incríveis que conheci, sou muito feliz por sua amizade.

À Vivian Arakelian, obrigada pela amizade, companhia e pelas altas risadas!

Ao Guilherme Gatti pela parceria no laboratório, pela amizade e pelos açaís nos fins de tarde de trabalho! rs..

Ao Vinicius Azevedo, você é um anjo na Terra. Obrigada por me socorrer em tantos momentos difíceis dentro e fora do laboratório. Jamais esquecerei tudo o que fez por mim!!

À Graziéle Deriggi, pelo carinho e por todos os ensinamentos a mim confiados. Aprendi muito com você. Obrigada por tudo!

Ao meu querido amigo Vinícius Guzzoni pela amizade verdadeira, pelo carinho e por todas as orações.

À Patrícia Bueno pela paciência e por todos os ensinamentos. Te admiro muito!

Aos queridos colegas e amigos do LBBM: Araceli, Antônio, Bruna, Carol, Cyntia, Érika, Giselle, Kelli, Livia, Marcelo, Natalia, Patty, Rafael, Rita, Patrícia Manzine, Tamires, Uliana e Beti, cada um de vocês teve participação no meu crescimento pessoal e profissional, obrigada!

À Adriana Renner pelo apoio e pela amizade!

Aos colegas e amigos que são ou já foram integrantes do Laboratório de Fisiologia do Exercício: Yone, Giselle, Jéssica, Maria Fernanda, Markus, Danilo (Salsicha), Mateus e Gustavo, obrigada pela amizade durante todos esses anos. Obrigada Marcinha, pelo carinho e pela energia positiva!

Aos professores Dr<sup>o</sup>. Vilmar Baldissera e Dr<sup>o</sup>. Sérgio Perez por todos os ensinamentos e oportunidades no Laboratório de Fisiologia do Exercício.

Ao professor Dr<sup>o</sup>. Ricardo Borra pela disponibilidade!

À professora Dr<sup>a</sup>. Fernanda Aníbal pelo apoio e pelo suporte com o ELISA.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados ao Exercício, à Ana Cláudia, Marcela, Anderson, Toninho, Jorge e especialmente à Cynthia Castro e Karina Silva, amigas queridas, obrigada por tudo!

Aos colegas do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparada, e em especial à professora Dr<sup>a</sup>. Marisa N. Fernandes por ter disponibilizado seu laboratório para parte de minhas análises.

Aos queridos Léu Ruffoni, Fabinho e Nandão, obrigada pelo carinho e amizade, vocês são grandes amigos!

Ao Charles Wang, pelos conselhos e ensinamentos!

À Mônica Costa pelo apoio durante tantos momentos de dúvidas.

Ao Chico Vardiero - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) - pela disponibilidade e paciência com o ELISA.

À Aluana Santana da (UERJ) - pelos direcionamentos com a imunohistoquímica!

AOS MEUS FAMILIARES....

À minha família “Buscapé”: minha mãe Alzira, minha irmã Val, tia Sônia, minha madrinha Cássia, meu avô José e avó Adélia, vocês são o meu maior tesouro. Amo vocês!! Em especial, agradeço ao meu tio Edvar (*in memoriam*), que me adotou em sua vida e me deu o amor que só um verdadeiro pai poderia dar. Te amarei pra sempre!!

À minha família Gatto: vocês são exemplo de união, de Fé e doação ao próximo. Agradeço muito por todo carinho, amor e dedicação oferecidos a mim. Vocês são muito especiais em minha vida!!

Ao meu esposo Luís Roberto, amor da minha vida, obrigada por acolher meus planos, me incentivar e acreditar na minha capacidade mais do que eu mesma. Te amo muito!!

À todos, muito obrigada por tudo!!

## RESUMO

A ovariectomia em animais (remoção cirúrgica dos ovários) é um modelo de estudo utilizado para mimetizar a menopausa em mulheres. A deficiência dos hormônios ovarianos altera o perfil lipídico, aumenta a inflamação e o risco de diabetes tipo 2, sarcopenia, osteopenia, obesidade e doenças cardiovasculares. O treinamento resistido (TR) tem sido empregado como ferramenta não farmacológica na tentativa prevenir ou reverter os efeitos da pós-menopausa. No entanto, são escassos os estudos sobre os efeitos da Ovx e TR na morfologia e angiogênese do tecido adiposo visceral (TAV). Diante disto, o objetivo desta pesquisa foi verificar a influência da Ovx e do TR no tamanho e no número dos adipócitos, expressão gênica e concentração proteica de VEGF-A e densidade microvascular do TAV de ratas. Ratas *Sprague-Dawley* adultas foram divididas em quatro grupos experimentais (n=6 por grupo): Sham operado sedentário (Sham-Sed); Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). Durante o período de treinamento resistido, os animais escalaram uma escada vertical de 1,1 m com pesos atados em suas caudas, que foram aumentados progressivamente; as sessões foram realizadas três vezes na semana, com 4-9 escaladas por sessão de treino e 8-12 movimentos por escalada com intervalos de 2 minutos entre as escaladas. A morfologia e densidade vascular foram avaliadas por meio de análises histológicas, a expressão gênica e proteica do VEGF-A foram analisadas por PCR em tempo real e ELISA, respectivamente. A ovariectomia aumentou a massa corporal e provocou hipertrofia dos adipócitos, diminuição da expressão de VEGF-A e seu receptor, diminuição da concentração de VEGF-A e redução da densidade microvascular no TAV das ratas. O treinamento resistido não foi eficiente em prevenir nenhuma destas alterações. Sugere-se futuros estudos realizando adaptações neste programa de treinamento resistido, associadas ou não à dieta hipocalórica e ao tratamento com o estradiol.

**Palavras chave:** ovariectomia, treinamento resistido, tecido adiposo visceral, VEGF-A, angiogênese.

**Apoio Financeiro:** CAPES



## ABSTRACT

Ovariectomy in animals (surgical removal of ovaries) is a model used to mimic the menopause in women. The ovarian hormone deficiency alters the lipid profile, increases inflammation and the risk of type 2 diabetes mellitus, sarcopenia, osteopenia, obesity and cardiovascular diseases. Resistance training (RT) has been used as a non-pharmacological tool to prevent or reverse the postmenopausal effects. However, there are few studies evaluating the ovariectomy (Ovx) and RT effects on the morphology and angiogenesis of visceral adipose tissue (VAT). Thus, the aim of this study was to investigate the Ovx and RT influence at the size and adipocytes number, gene expression and VEGF-A protein levels and microvessel density in VAT of rats. Adult Sprague-Dawley rats were divided into four groups (n=6 per group): Sham-operated sedentary (Sham-Sed), ovariectomized sedentary (Sed-Ovx), Sham-operated resistance training (Sham-Tr) and ovariectomized resistance training (Ovx-Tr). During the resistance training period, the animals climbed a 1.1m vertical ladder with weights attached to their tails, which were progressively increased; the sessions were performed three times a week, with 4-9 climbs and 8-12 dynamic movements per climb with intervals of 2 minutes between climbs. Histological analysis was performed to analyze vascular micro density and morphology of VAT; gene expression and VEGF-A protein levels were analyzed by real-time PCR and ELISA, respectively. Ovx resulted in higher body weight, adipocyte hypertrophy, decreased both VEGF-A mRNA and protein and VEGF-R2 mRNA expression, and decreased the micro vascular density in the VAT of sedentary rats. However, RT was not able to prevent any changes induced by ovariectomy. The data indicated that Ovx impaired the morphology and angiogenesis of rats VAT and that RT protocol adopted did not prevent these changes. We suggest future studies performing adaptations in this resistance training program, associated or not to hypocaloric diet and treatment with estradiol.

**Keywords:** ovariectomy, resistance training, visceral adipose tissue, VEGF-A and angiogenesis.

**Financial Support:** CAPES

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais locais de ação do estrogênio.....	14
Figura 2. Ilustração esquemática das vias de sinalização mediada por E2 e ERs. ....	18
Figura 3. Mecanismos celulares da angiogênese.....	21
Figura 4. Interação entre a família VEGF-A e receptores. ....	24
Figura 5. Ilustração esquemática da sinalização intracelular do VEGF-R2.....	25
Figura 6. Dinamismo entre as células adiposas. ....	28
Figura 7. Estrutura e distribuição do tecido adiposo branco no corpo humano. ....	29
Figura 8. Funções da vasculatura no tecido adiposo .....	32
Figura 9. (A) Expansão saudável do TA (B) Expansão patológica do TA .....	33
Figura 10. Esquema de distribuição das ratas em grupos.....	43
Figura 11. Escada utilizada para o treinamento resistido. ....	46
Figura 12. A) Organização da carga de carregamento por sessão de treino; B) dias de treino na semana.....	47
Figura 13. Esquema resumindo o desenho experimental .....	49
Figura 14. Exemplo de um gel de agarose (1%) com amostras do tecido adiposo visceral.....	52
Figura 15. Exemplo de curva de MELT original representativa dos ciclos do PCR-RT. Gene de referência RPLPO .....	54
Figura 16. Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT. Gene de referência RPLPO .....	55
Figura 17. Figura representativa demonstrando o microscópio acoplado à câmera.....	60
Figura 18. Massa corporal. ....	63
Figura 19. Ingestão Alimentar. ....	64
Figura 20. Expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) no tecido adiposo visceral de ratas .....	65
Figura 21. Expressão gênica do receptor-2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-R2) no tecido adiposo visceral de ratas.....	66
Figura 22. Concentração proteica de VEGF-A por ELISA, no tecido adiposo visceral .....	67
Figura 23. Morfologia do TAV. Área dos adipócitos (A); Número de adipócitos (B) .....	68
Figura 24. Morfologia do TAV. Fotomicrografias representativas dos adipócitos.....	68
Figura 25. Densidade microvascular do TAV. Imunomarcagem com o CD31.....	69
Figura 26. Densidade microvascular do TAV. Fotomicrografias de análise imunohistoquímica dos adipócitos, imunomarcados com o CD31.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição tecido-específica dos receptores de estrogênio (ERs).....	16
Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados.....	54
Tabela 3. Efeitos da ovariectomia e treinamento resistido sobre os parâmetros corporais e fisiológicos .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

- E2 – Estradiol ou 17 $\beta$ -estradiol
- TR – Treinamento resistido
- OVX – Ovariectomia
- VEGF-A – Fator de crescimento endotelial vascular – A
- VEGF-R2 – Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
- TA – Tecido adiposo
- TAB – Tecido adiposo branco
- TAM – Tecido adiposo marrom
- TAV – Tecido adiposo visceral
- ER – Receptor de estrogênio
- NO – Óxido nítrico
- eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
- HIF-1 $\alpha$  – Fator induzido pela hipóxia - 1 alfa
- HDL – Lipoproteína de alta densidade
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade
- Nrp1/Nrp2 – Neuropilina 1/ neuropilina 2
- HSPGs – Proteoglicanas sulfato de heparina
- beta3AR – Receptor adrenérgico beta 3
- UCP1 – Proteína desacopladora 1
- MMP2 e MMP9 – Metaloproteinase 2 e metaloproteinase 9
- ECs – Células endoteliais
- IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina
- EGF – Fator de crescimento epidermal
- TGF $\beta$  – Fator de crescimento transformador beta
- FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

PAI-1 – inibidor do ativador de plasminogênio 1

PIGF – Fator de crescimento de placenta

IL-1 e IL6 – Interleucina 1 e interleucina 6

IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 alfa e interleucina 1 beta

HSPGs – Proteoglicanas sulfato de heparina

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

Ob/ob – Camundongo obeso

THR – Terapia de reposição hormonal

PECAM – Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

IHQ – Imunohistoquímica

HE – Eosina-Hematoxilina

$\mu\text{m}^2$  – Micrometro quadrado

$\text{mm}^2$  – Milímetro quadrado

kDA – Quilodáltons

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Estrogênio.....	14
1.2	Estrogênio e angiogênese .....	18
1.3	VEGF-A e receptores .....	23
1.4	Tecido adiposo e angiogênese .....	26
1.5	Exercício físico e angiogênese .....	36
2	OBJETIVOS.....	41
2.1	Objetivo Geral .....	41
2.2	Objetivos Específicos .....	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
3.1	Animais .....	42
3.2	Grupos Experimentais .....	42
3.2.1	Grupos Sedentários.....	43
3.2.2	Grupos treinamento resistido.....	43
3.3	Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia e da operação sham .....	44
3.4	Treinamento resistido .....	45
3.5	Controle da ingestão alimentar e da massa corporal .....	47
3.6	Eutanásia dos animais e retirada dos tecidos.....	48
3.7	Resumo do desenho experimental .....	49
3.8	Quantificação da expressão gênica.....	49
3.8.1	Procedimentos gerais.....	50
3.8.2	Extração do RNA total .....	50
3.8.3	Quantificação do RNA total .....	51
3.8.4	Determinação da integridade do RNA .....	51
3.8.5	Transcrição Reversa .....	52
3.8.6	Reação em cadeia da polimerase – tempo real (PCR-RT) .....	53
3.9	Análise da concentração proteica .....	56
3.9.1	Extração das proteínas totais .....	56
3.9.2	Determinação da concentração de VEGF-A .....	56
3.10	Análises Histológicas .....	57
3.10.1	Coloração com Hematoxilina e eosina (HE) .....	57
3.10.2	Imunohistoquímica (IHQ) .....	58
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61

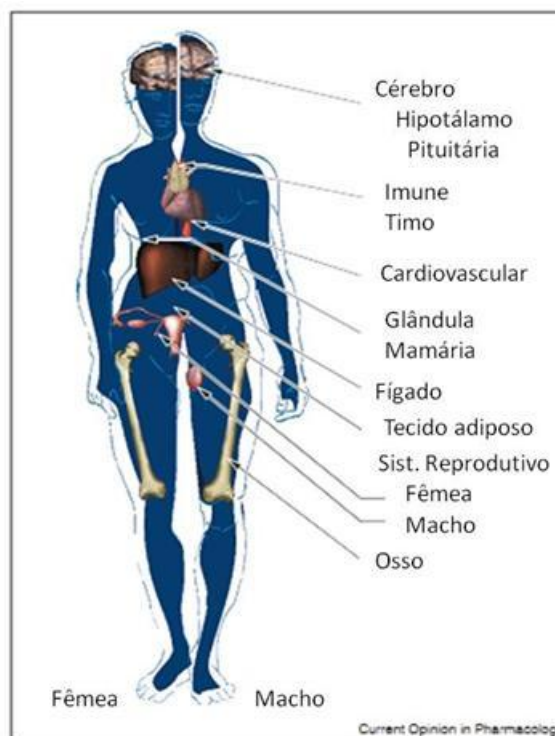
5	RESULTADOS .....	62
5.1	Efeitos da ovariectomia e treinamento resistido nos parâmetros corporais e fisiológicos .....	62
5.2	Expressão Gênica de VEGF-A e de seu receptor VEGF-R2.....	65
5.3	Análise da concentração de VEGF-A por ELISA .....	66
5.4	Análises histológicas do tecido adiposo visceral.....	67
5.4.1	Morfologia do tecido adiposo visceral (HE) .....	67
5.4.2	Densidade vascular do tecido adiposo visceral .....	69
6	DISCUSSÃO.....	71
7	BIBLIOGRAFIA.....	82

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Estrogênio

O estrogênio é o principal hormônio sexual feminino e faz parte de um grupo de hormônios esteroides, produzidos principalmente nos ovários, corpo lúteo e placenta, e em menor quantidade, em órgãos não-gonadais que incluem o fígado, coração, adrenais, pele e cérebro (GAO; DAHLMAN-WRIGHT, 2011; CUI; SHEN; LI, 2013). Os estrogênios fisiológicos no organismo são três: estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (estradiol, E2) e estriol (E3), sendo o E2, o principal estrogênio bioativo, dentro da maioria das condições fisiológicas (SCHARFMAN; MACLUSKY, 2008).

O estrogênio desempenha importantes funções, regulando o crescimento e diferenciação em quase todas as células e tecidos (Figura1) (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005).



**Figura 1.** Principais locais de ação do estrogênio. Adaptado de Mueller e Korach (2001).



Os estrogênios, primariamente regulam o desenvolvimento e função do sistema reprodutor feminino e glândulas mamárias, no entanto, exercem diversas outras funções fisiológicas, que incluem a estimulação da formação óssea e o desenvolvimento da densidade mineral óssea; inibição do envelhecimento da pele e favorecimento no seu processo de cicatrização; efeito anti-apoptótico no músculo; regulação dos níveis de HDL e LDL, regulação da homeostase da vasculatura e efeitos protetores contra o desenvolvimento da obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (MUELLER; KORACH, 2001; WEND; WEND; KRUM, 2012).

Diante disso, a ovariectomia em ratas (remoção cirúrgica dos ovários) tem sido um modelo bastante utilizado em diversos estudos para mimetizar a menopausa em mulheres e elucidar os efeitos da deficiência dos hormônios ovarianos nas suas funções biológicas e fisiológicas nos diversos órgãos e tecidos (ROGERS et al., 2009; LEITE et al., 2009; BABAEI et al., 2010; XU et al., 2012).

A menopausa é caracterizada pela cessação permanente da menstruação, que ocorre naturalmente ou é induzida por medicamentos, cirurgia, quimioterapia ou radiação. A menopausa natural é reconhecida depois de doze meses consecutivos sem a menstruação, não associada a causas fisiológicas (lactação) ou patológicas (CONFERENCE, 2005), podendo ocorrer na maioria das mulheres entre 48 e 55 anos de idade (WYLIE-ROSETT, 2005). As maiores alterações hormonais que ocorrem nesse período, são o declínio gradativo dos níveis de estradiol, com concomitante aumento nos níveis dos hormônios folicular estimulante e luteinizante (BECHLIOULIS et al., 2009).

No entanto, o declínio nos níveis dos hormônios ovarianos torna-se responsável por importantes alterações fisiológicas, incluindo o aumento da massa corporal de gordura, alterações no perfil lipídico, aumento nos marcadores inflamatórios, risco de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, sarcopenia, osteopenia e obesidade (PAQUETTE et

al., 2008; LEITE et al., 2009; MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; LEITE et. al., 2010).

Diante disto, nota-se o importante papel fisiológico protetor deste hormônio, que exerce seus efeitos via interação com seus receptores (GAO; DAHLMAN-WRIGHT, 2011). Atualmente, são conhecidos quatro distintos receptores de estrogênio (ERs): os principais, os receptores nucleares de estrogênio alfa ( $ER\alpha$ ) e beta ( $ER\beta$ ), que são fatores de transcrição ativados por ligante; o receptor de membrana GPER (ou GPER30), que está acoplado à proteína G, e o receptor ER-X (MILLER; DUCKLES, 2008; CUI; SHEN; LI, 2013).

Os ERs se localizam em diferentes tipos de células, sendo que cada receptor exibe um padrão distinto de distribuição tecido-específico através do corpo, como demonstrado na Tabela 1.

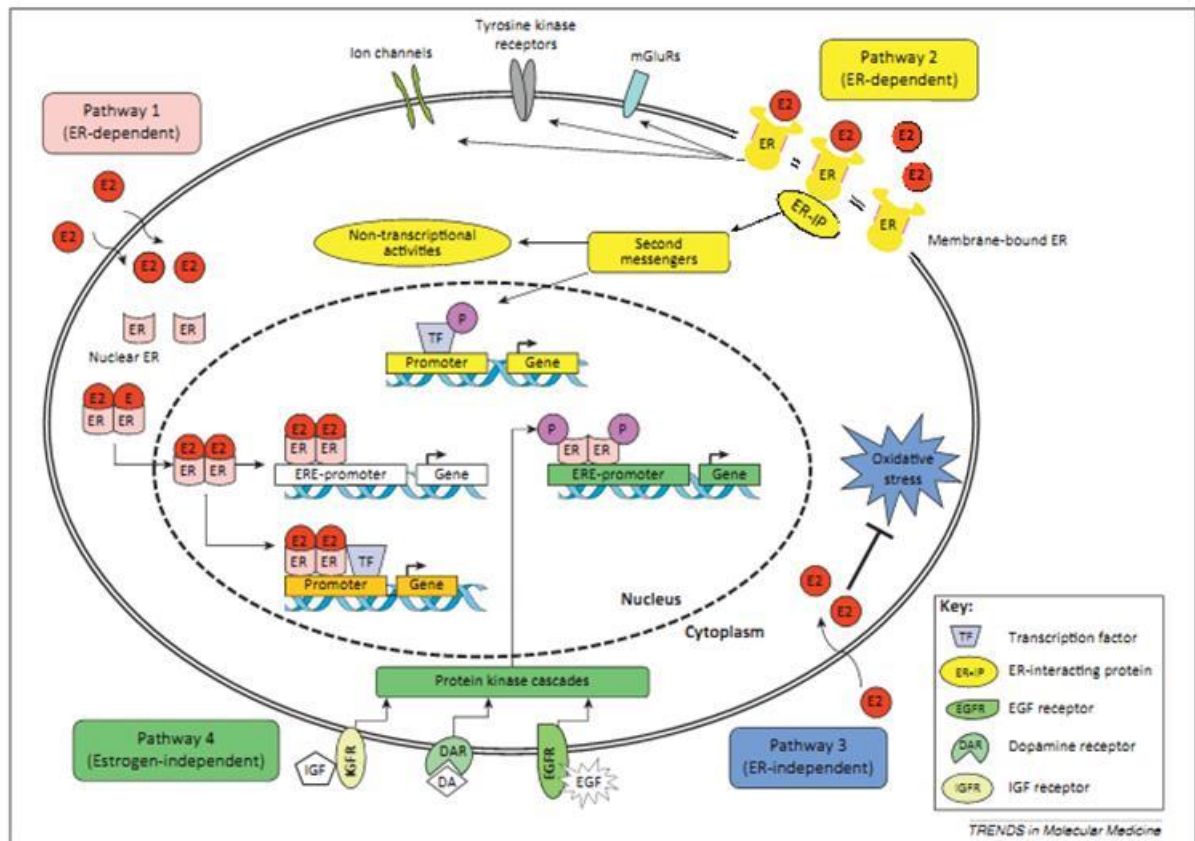
**Tabela 1.** Distribuição tecido-específica dos receptores de estrogênio (ERs).

SUBTIPOS DE ERs	DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS
<b><math>ER\alpha</math></b>	Útero, células intersticiais do ovário, mama, rins, tecido ósseo, fígado, tecido adiposo branco, algumas regiões do cérebro (amígdala, área pré-óptica, etc).
<b><math>ER\beta</math></b>	Células granulosas do ovário, cólon, epitélio próstata, endotélio vascular, medula óssea, pulmões, trato gastrointestinal, bexiga, células hematopoiéticas e algumas regiões do cérebro (amígdala, núcleo da rafe, substância negra, etc)
<b>GPR30</b>	Medula adrenal, pélvis renal, ovário e algumas regiões do cérebro (cerebelo, hipocampus, hipotálamo, área pré-óptica, etc).
<b>ER-X</b>	Enriquecido no útero e pulmão de roedores pós-natal, sendo quase indetectável em adultos; enriquecido no cérebro fetal de babuíno e neocortex de roedores pós-natal.

Adaptado de Faulds et al., (2012); Cui, Shen e Li (2013).

No entanto, os efeitos biológicos do estrogênio principalmente através de seus receptores englobam diversas vias de sinalização (Figura 2), que resultam em respostas tecido-específicas (ZHAO; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2010). A maior parte das vias de sinalização mediadas pelo estrogênio é dependente do receptor de estrogênio (ER-dependente), no entanto, existem mecanismos independentes deste receptor (ER-independente). São dois os mecanismos ER-dependentes, classificados como “genômicos” e “não-genômicos”, que podem iniciar sua via de sinalização tanto no núcleo quanto na membrana plasmática. Por outro lado, as vias ER-independentes iniciam sua sinalização, independente de ERs, através de regulação por parte de atividades enzimáticas ou interações com receptores nucleares que não são hormônios esteroides sexuais (Figura 2) (CUI; SHEN; LI, 2013).

Os eventos biológicos mediados pelos ERs nucleares ocorrem lentamente, ao longo de horas ou até dias, enquanto as cascatas de sinalização intracelular disparadas pelos ERs de membrana celular, respondem muito mais rápido, mesmo dentro de segundos (CUI; SHEN; LI, 2013).



**Figura 2.** Ilustração esquemática das vias de sinalização mediada por E2 e ERs. São quatro as vias de sinalização. Via 1: O estrogênio inicia a sinalização nuclear mediada através dos REs clássicos, que conduzem à mudanças na transcrição de genes responsivos ao estrogênio, com ou sem EREs (elementos de resposta ao estrogênio, localizados na região promotora do DNA). Via 2: A sinalização do estrogênio iniciada na membrana promove diversos efeitos citoplasmáticos, que incluem a regulação de canais iônicos de membrana, regulação nos sistemas de segundo mensageiros, modificação de fatores de transcrição ou outros receptores de membrana. Via 3: O estrogênio também pode exercer efeitos antioxidantes e supressão do estresse oxidativo de maneira ER-independente. Via 4: Ações genômicas independentes de ligante, ou seja, em condições fisiológicas normais os ERs podem ser ativados de maneira independente do ligante. Desta forma, fatores de crescimento (exemplo, EGF e IGF) e neurotransmissores (exemplo, Dopamina), disparam cascatas proteína-quinases, levando à fosforilação (P) e ativação de ERs nucleares em EREs. Fonte: Cui, Shen e Li (2013).

## 1.2 Estrogênio e angiogênese

O endotélio vascular produz óxido nítrico (NO), e este por sua vez, exerce papel essencial na manutenção da saúde vascular e proteção contra a injúria da vasculatura (KOH, 2002). O estrogênio, através de uma série de eventos celulares, regula a produção de NO e,

portanto, vasodilatação dos vasos sanguíneos (WEND; WEND; KRUM, 2012). Desta forma, a deficiência desse hormônio vem sendo associada às funções prejudicadas do endotélio (KOH, 2002).

Esta regulação se dá através da ativação de seus ERs ( $\alpha$  e  $\beta$ ), presentes nas células vasculares endoteliais (ECs) e células musculares lisas, que são parte integrante dos componentes da parede dos vasos sanguíneos (KOH, 2002; SOARES et al., 2004; HERVÉ et al., 2006). O estrogênio pode exercer efeitos diretos no seu receptor localizado na membrana celular, estimulando rapidamente a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) nas células endoteliais, via fosforilação pela MAP Quinase, e, conseqüentemente aumentando a biodisponibilidade de NO dentro de poucos minutos (efeito não genômico ER $\alpha$ -dependente) (CHEN et al., 1999). Além de vasodilatação, o estrogênio tem a capacidade de estimular o aumento na expressão de moléculas de adesão, induzindo a atividade angiogênica e a proliferação celular (HERVÉ et al., 2006). Adicionalmente aos efeitos rápidos na vasculatura, o estrogênio através do seu receptor genômico, atua promovendo alterações na expressão gênica, o que ocorre num período de horas ou dias (MENDELSON; KARAS, 1999).

No entanto, a ruptura da integridade tanto anatômica quanto funcional do endotélio (disfunção endotelial), tem sido postulada como mecanismo precursor de doenças como a aterosclerose e doenças cardiovasculares (LOSORDO; ISNER, 2001; CHOW; HANDELSMAN; NG, 2010).

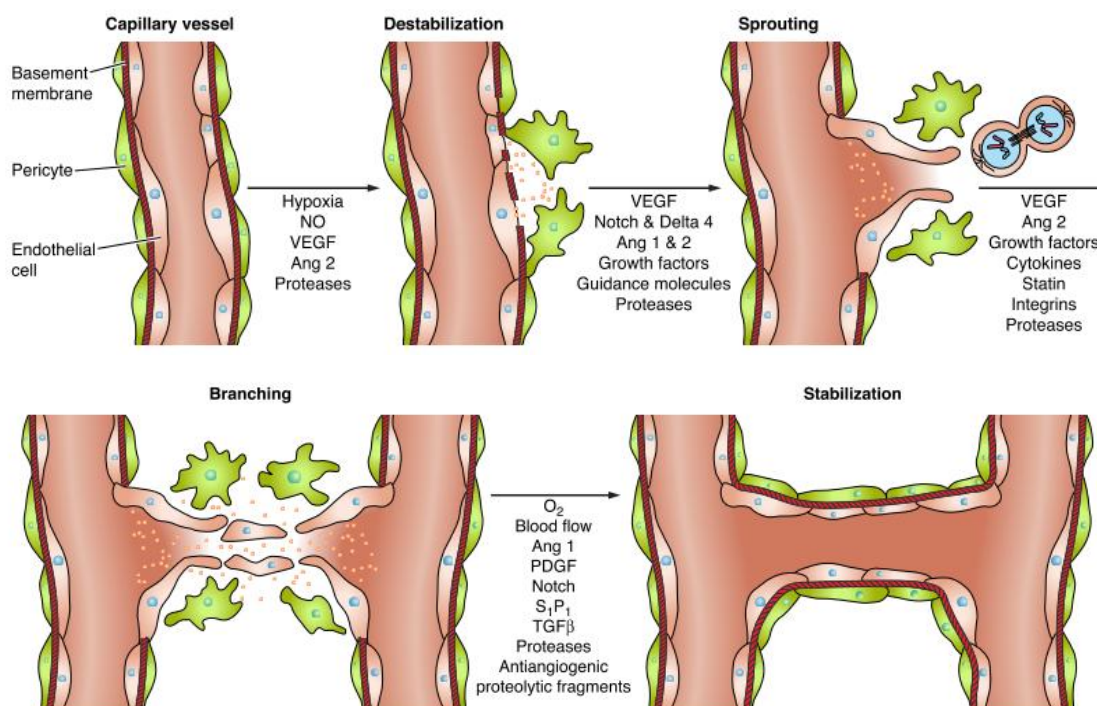
Morales et al., (1995) em estudo *in vitro*, por meio da veia umbilical humana e *in vivo*, em modelo murino, demonstraram que o estradiol aumenta a atividade de células endoteliais, que são essenciais para neovascularização, sugerindo a importante influência do estrogênio sobre a angiogênese. De fato a deficiência dos hormônios ovarianos tanto em mulheres na pós-menopausa quanto em camundongos ovariectomizados, reduz o número circulante de células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea, e o tratamento com estrogênio é

eficiente em aumentar esses níveis (STREHLOW et al., 2003; BULUT et al., 2007). Desta forma, um desequilíbrio no número e funções destas células podem conduzir à inflamação e aterosclerose (GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 2003).

A angiogênese ou neovascularização é a formação de novos vasos sanguíneos maduros, a partir de vasos pré-existentes (FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987). Essa vasculatura pré-existente, consiste principalmente de capilares e vênulas, ao invés de artérias e veias, pois a parede dos capilares e vasos finos consistem de pericitos, enquanto a parede dos grandes vasos são formados por diversas camadas de músculo liso. Os pericitos são células de origem mesenquimal e são capazes de se diferenciar em diferentes tipos de células, que incluem células musculares lisas, fibroblastos e osteoblastos. No entanto, os vasos consistem de dois principais tipos de células, que são as células endoteliais e as células murais (pericitos) (HYDER, 2006;. KARAMYSHEVA, 2008).

Desta forma, a angiogênese se inicia através da ativação das células endoteliais (ECs) no interior de um vaso “mãe”, seguida da degradação da membrana basal, migração celular endotelial organizada e direcionada, proliferação endotelial, fusão de novos brotos e formação do lúmen (LOSORDO; ISNER, 2001; TANG et al., 2010). Estes eventos, juntamente com o recrutamento de pericitos e a deposição de uma membrana basal subendotelial, promovem a maturação do vaso e quiescência (KARAMYSHEVA, 2008).

No entanto, esse processo é complexo e envolve reciprocidade entre as células, múltiplas moléculas solúveis e componentes da matriz extracelular (MEC) (Figura 3) (CLAPP et al., 2009).



**Figura 3.** Mecanismos celulares da angiogênese. A hipóxia induz a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) e de angiopoietinas-1 e 2 (Ang1 e Ang2), os quais interagem com proteases da MEC para aumentar a permeabilidade da parede do vaso capilar e destabilização da membrana basal, permitindo que as ECs migrem e se proliferem para formar novos brotos, auxiliadas pelo VEGF-A, angiopoietinas, moléculas de orientação, fatores de crescimento, citocinas e degradação da MEC. A maturação do tubo recém-formado é acompanhado por um aumento na expressão de fatores anti-angiogênicos, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), S1P1, fator de crescimento transformador beta (TGFβ), dentre outros. Fonte: Clapp et al., (2009).

Durante o desenvolvimento fetal e embrionário, a formação de novos vasos sanguíneos é essencial (CLAPP et al., 2009). Contudo, no organismo adulto, a angiogênese fisiológica é altamente restrita, sendo um processo ativado apenas sob condições estritamente definidas (KARAMYSHEVA, 2008; (CLAPP et al., 2009). Condições estas que ocorrem em associação a processos que incluem a reparação de feridas e fraturas, ovários e endométrio durante o ciclo menstrual, e o desenvolvimento da placenta e glândulas mamárias, durante a gravidez (CLAPP et al., 2009).

Entretanto, uma desordem desses mecanismos que controlam a angiogênese fisiológica pode acarretar grande impacto negativo na saúde, desencadeando a angiogênese

patológica. A angiogênese patológica caracteriza-se por uma proliferação exacerbada de vasos ou regressão/produção insuficiente ou incorreta dos mesmos. Desta forma, a angiogênese patológica normalmente está associada a doenças como câncer, artrite, retinopatias, aterosclerose e obesidade, isquemia cardíaca e cerebral, dentre outros (CLAPP et al., 2009).

Além do estrogênio, uma série de outros fatores regula a angiogênese (TANG et al., 2010), sendo que a hipóxia, através do fator induzido pela hipóxia - 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) é considerada um dos mais importantes estímulos para dar início a este processo, induzindo a expressão de um fator de crescimento endotelial vascular, o VEGF-A (KARAMYSHEVA, 2008; CLAPP et al., 2009). Outros fatores ou estímulos que também regulam a angiogênese, incluem o exercício físico, o óxido nítrico (NO), as integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 3$  e  $\alpha \nu\beta 5$ , o fator de transformação do crescimento alfa (TGF $\alpha$ ), o fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF $\beta 1$ ) e seus receptores, o fator de crescimento de fibroblasto ácido (aFGF), o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), o fator de crescimento de hepatócito (HGF), o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e seus receptores, a angiopoetina 1 (Ang-1), o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), angiotensina II (ANG II), as prostaglandinas, eritropoietinas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), a angiogenina, interleucina 8 (IL-8), dentre outros (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004; HOEBEN et al., 2004; KARAMYSHEVA, 2008; KAJDANIUK et al., 2011).

Apesar de nem todos esses fatores serem específicos para ECs, e somente alguns deles serem capazes de influenciar diretamente essas células em cultura, é bem reconhecido na literatura que o evento crucial para dar início ao processo angiogênico, é a cascata de sinalização envolvendo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) (KARAMYSHEVA, 2008).



### 1.3 VEGF-A e receptores

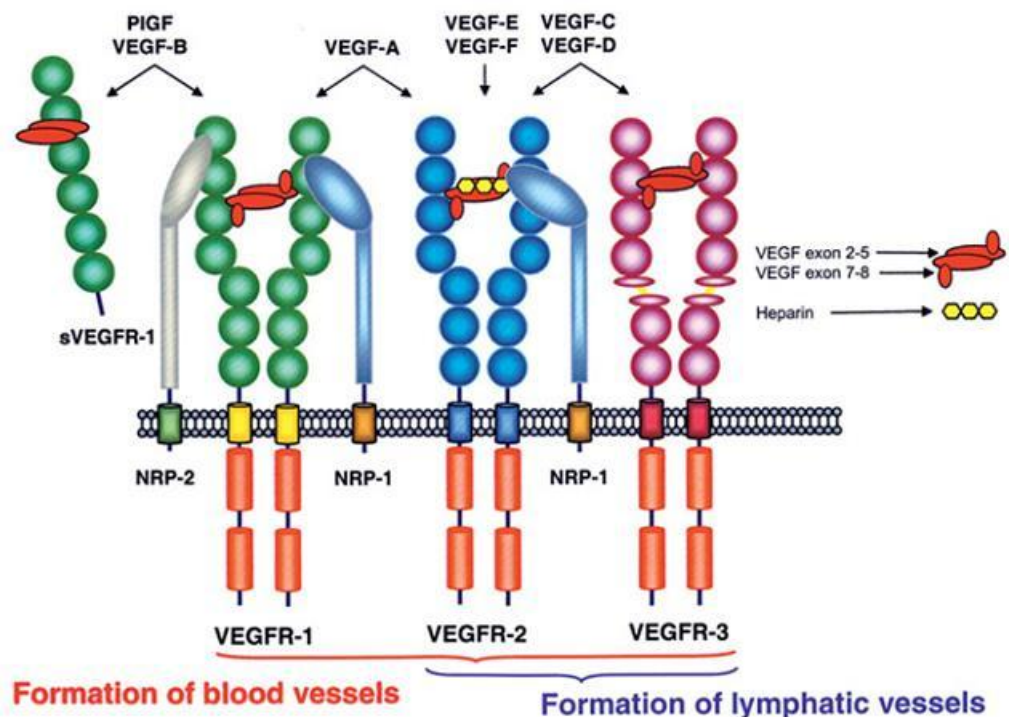
O VEGF-A é uma glicoproteína homodimérica de 45 kDa, capaz de se ligar à heparina (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003), e nos humanos, seu gene, residente no cromossomo 6p21.3, é organizado como um único gene de cerca de 14 kb composto de oito éxons, separados por sete íntrons (FERRARA, 1997; WOOLARD et al., 2009). É pertencente a uma família formada por pelo menos sete membros, o VEGF-A (também referido como VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, fator de crescimento da placenta (PIGF) e VEGFs derivados de veneno de serpente (SHIBUYA, 2008).

O VEGF-A é o fator predominante tanto na vasculogênese, que é a formação de vasos sanguíneos a partir de células progenitoras, quanto na angiogênese (SHIBUYA, 2008). Além disso, o *splicing* alternativo de determinados éxons resulta na geração de isoformas que diferem no número total de aminoácidos (CROSS; CLAESSION-WELSH, 2001), representados como VEGF-A<sub>206</sub>, VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>148</sub>, VEGF-A<sub>145</sub> e VEGF-A<sub>121</sub>. Destas isoformas, as mais abundantes *in vivo*, são VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-A<sub>189</sub> (GIACCA, 2010), sendo que a VEGF-A<sub>165</sub> é o subtipo dominante em termos de quantidade e atividade biológica (HO; KUO, 2007; SHIBUYA, 2008). As isoformas de VEGF-A são reguladoras essenciais da angiogênese e da permeabilidade vascular, desempenhando suas atividades intracelulares por meio da ativação de seus receptores, aos quais se ligam com diferentes especificidades (WOOLARD et al., 2009).

Os receptores de VEGF-A, VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (KDR/Flk-1) e VEGF-R3 (Flt-4) são do tipo tirosina-quinase e consistem de sete domínios extracelulares tipo imunoglobulina, um domínio regulador transmembrana, um domínio tirosina-quinase intracelular interrompido por um peptídeo curto e um domínio quinase de inserção, seguido de uma sequência de diversos resíduos de tirosina, envolvidos no recrutamento *downstream*

das moléculas de sinalização (CÉBE-SUAREZ; ZEHNDER-FJÄLLMAN; BALLMER-HOFER, 2006).

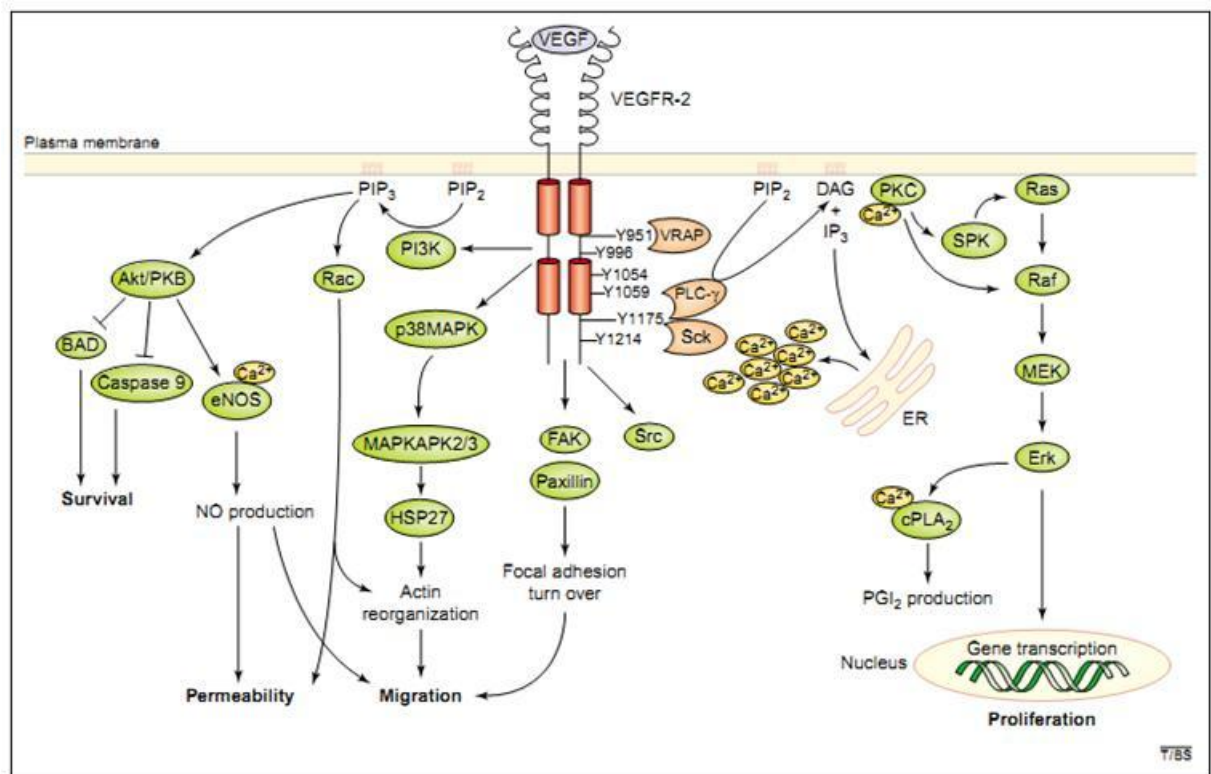
A interação entre o VEGF-A e seus receptores está representada na figura 4 e se dá da seguinte maneira: o VEGF-A e todas as suas isoformas, interagem tanto com o VEGF-R1 quanto com o VEGF-R2, desempenhando papel central na regulação da angiogênese. Já o VEGF-B e PlGF interagem seletivamente com VEGF-R1, enquanto que o VEGF-C e VEGF-D interagem com o VEGF-R3 e VEGF-R2, estimulando a linfangiogênese. O VEGF-E se liga seletivamente ao VEGF-R2. Além disso, os vários outros membros da família VEGF-A, exercem seus diversos efeitos interagindo com os co-receptores Neuropilina-1 e -2 (Nrp-1 e -2) e, pela modulação da atividade dos receptores através de suas interações com outras moléculas de superfície celular, incluindo as integrinas e proteoglicanas sulfato de heparina (HSPGs) (MATSUMOTO; MUGISHIMA, 2006; SHIBUYA, 2008; GIACCA, 2010).



**Figura 4.** Interação entre a família VEGF-A e receptores. Fonte: Cébe-Suarez, Zehnder-Fjallman e Ballmer-Hofer (2006).

O VEGF-R2, por exemplo, uma vez ligado ao VEGF-A, sofre dimerização e autofosforilação tirosina-quinase, que por sua vez, ativa várias cascatas de sinalização intracelular (Figura 5). Tanto a replicação de DNA quanto a proliferação celular parecem ser mediadas pelas vias Ras-Raf-MEK-ERK e via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), a sobrevivência celular mediada via ativação da PI3-quinase e Akt/PKB e a migração celular pela ativação da FAK e Paxillina, PI3quinase/Akt ou MAPK (HOEBEN et al., 2004; HO; KUO, 2007).

Desta maneira, ressalta-se que a sinalização do VEGF-A através do receptor VEGF-R2 é a principal via na ativação da angiogênese, induzindo à proliferação, sobrevivência, germinação e migração de ECs pelo aumento da permeabilidade endotelial (Figura 5) (LOHELA et al., 2009).



**Figura 5.** Ilustração esquemática da sinalização intracelular do VEGF-R2. A junção do ligante (VEGF-A) ao domínio extracelular induz a dimerização do receptor e autofosforilação dos resíduos tirosina intracelulares específicos. Fonte: Cross et al., (2003).

Diversos fatores são conhecidos por regular a expressão gênica do VEGF-A durante a angiogênese, incluindo o estrogênio, a hipóxia via HIF-1 $\alpha$ , vias do fator nuclear kappa B (NF-kB) (SHIBUYA, 2008), mediadores inflamatórios (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ), forças mecânicas como *shear stress* (o movimento do fluxo sanguíneo que fricciona as ECs na parede do vaso) e *shear stretch/mechanical stretch* (atrito físico da vasculatura causado pela deformação das células durante movimentos de contrações, como no caso do exercício físico) dentre outros (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004; HO; KUO, 2007).

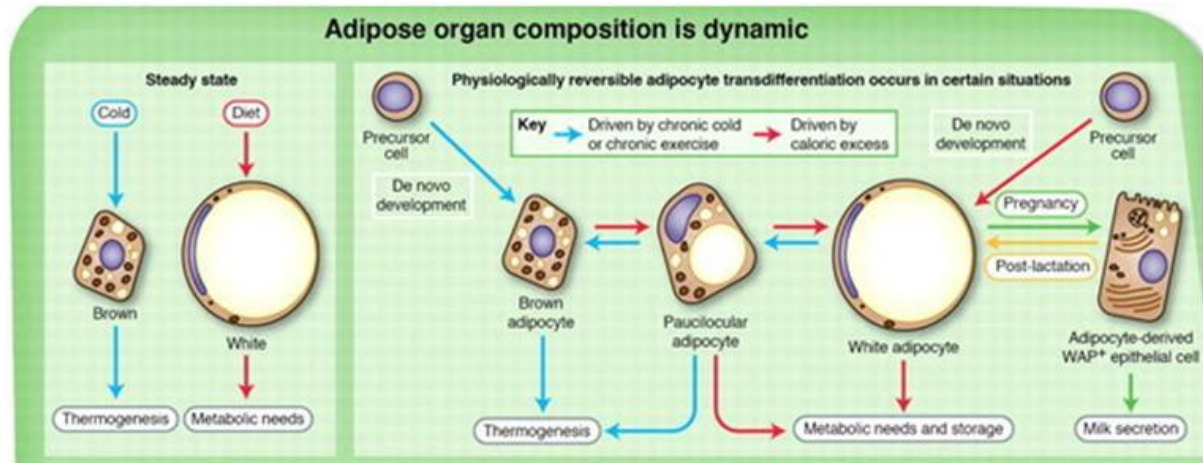
#### **1.4 Tecido adiposo e angiogênese**

Existem principalmente dois tipos de tecido adiposo (TA) em mamíferos: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM) (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). O TAB tem a habilidade de estocar e liberar energia na forma de lipídeos, além de secretar hormônios e diversas citocinas que influenciam no comportamento instintual e vias metabólicas. O TAM possui uma rede vascular de capilares mais densa e um maior número de fibras simpáticas noradrenérgicas em comparação ao TAB (SMORLESI et al., 2012).

Além disso, o TAM possui um número maior de mitocôndrias, sendo responsável pela termogênese, o que garante a manutenção da temperatura corporal quando mamíferos são expostos à temperaturas abaixo da termoneutralidade (28-30°C). Para produzir calor, os adipócitos marrons são ativados pelos nervos simpáticos, que agem nos adrenocetores beta3 (beta3AR), ocorrendo a “queima” de ácidos graxos na membrana interna da mitocôndria durante a fosforilação oxidativa para síntese de ATP, onde uma proteína mitocondrial especializada, a proteína desacopladora 1 (UCP1) causa uma “fuga” de prótons que resulta em dissipação de energia química em forma de calor (SMORLESI et al., 2012; SPIEGELMAN, 2013).

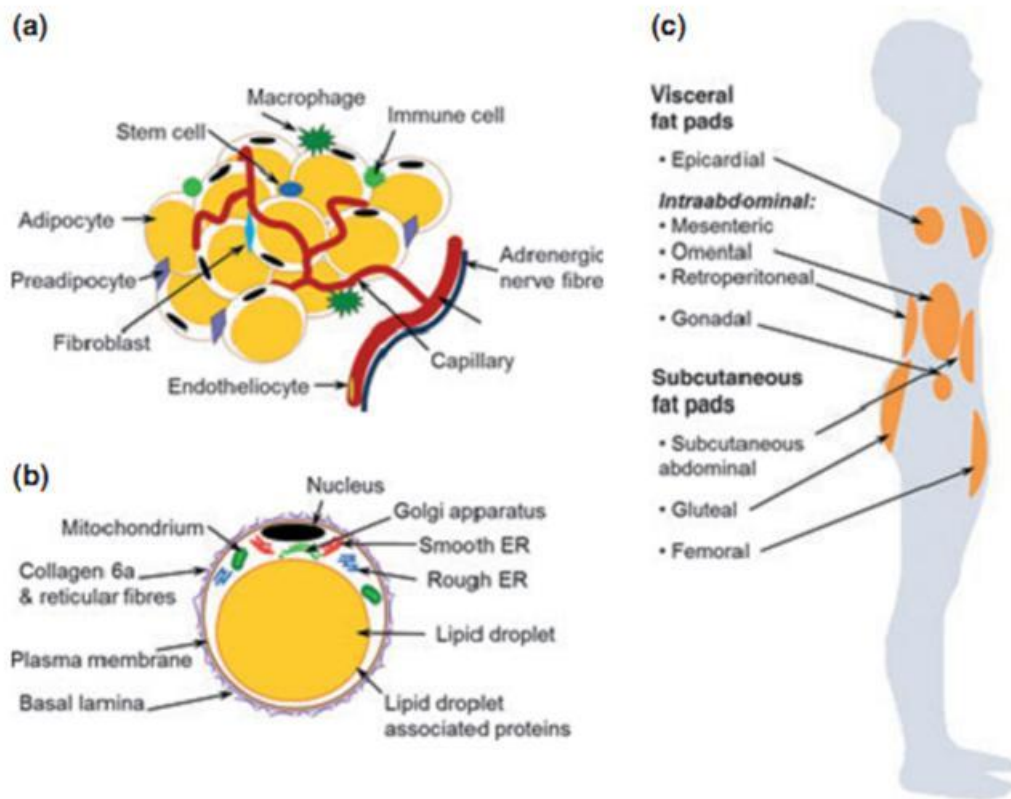
Além do TAB e TAM, atualmente já é reconhecido que alguns depósitos de gordura apresentam tanto adipócitos brancos quanto marrons. A partir de então, caracterizou-se um terceiro tipo de tecido adiposo, o adipócito “bege” ou paucilocular (também referido por outros autores como “*beige*” ou “*brite*”, em inglês). Este tecido é multilocular, assim como o TAM, podendo também ser positivo para UCP1 (CINTI, 2012), sendo que sua imunomarcagem é menos intensa do que a dos adipócitos marrons, sugerindo que o adipócito paucilocular tem uma capacidade termogênica menor que o TAM (SMORLESI et al., 2012).

Interessantemente, Smorlesi et al., (2012) propuseram a teoria da transdiferenciação: em condições fisiológicas específicas (ex. exposição crônica ao frio), os adipócitos brancos podem ser transformados em adipócitos marrons para suprir as necessidades termogênicas. De maneira inversa, os adipócitos marrons podem se transformar em adipócitos brancos quando o balanço energético é positivo e o órgão adiposo requer capacidade de estocagem aumentada. Esse fenômeno tem sido referido como “*browning*” (Figura 6) e está em grande debate atualmente, uma vez que recentemente foi descoberto que tanto os adipócitos brancos quanto marrons derivam de células endoteliais vasculares do órgão adiposo, o que dá ainda mais suporte a esta teoria. Além disso, essa teoria poderia explicar por que dois diferentes tipos de células estão distribuídos juntos, no mesmo órgão (CINTI, 2012).



**Figura 6.** Dinamismo entre as células adiposas. Evidências sugerem que a transdiferenciação pode promover mudanças na composição do órgão adiposo, que são observadas em resposta à exposição ao frio e exercício crônico, excesso de calorias e gravidez/lactação. O desenvolvimento *de novo* de adipócitos também é estimulado por estas diferentes condições. Adaptado de Cinti et al., (2012).

No entanto, entre os mamíferos, o TAB é o tipo de gordura predominante (AHIMA, 2006). O TAB possui um bem definido sistema vascular, sendo que cada adipócito está rodeado por um ou mais capilares. Além de adipócitos maduros, o TAB é composto por matriz de tecido conectivo frouxo, nervos e uma fração de células vasculares estromais, contendo pré-adipócitos, ECs, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células tronco mesenquimais, dentre outros (Figura 7) (CHRISTIAENS; LIJNEN, 2010; WRONSKA; KMIEC, 2012).



**Figura 7.** Estrutura e distribuição do tecido adiposo branco no corpo humano. (a) Tipos de células presentes no TAB. (b) Estrutura de um adipócito unilocular (branco). (c) Localização dos maiores depósitos de TAB no corpo humano. ER, retículo endoplasmático. Fonte: Wronksa e Kmiec (2012).

Em meados da década de 80, o TA foi identificado como um dos principais locais para o metabolismo dos esteroides sexuais (KERSHAW; FLIER, 2004), sendo os  $RE\alpha$  e  $RE\beta$ , também expressos nesse tecido, tanto em humanos quanto roedores (WEND; WEND; KRUM, 2012). Isto por que, os esteroides sexuais regulam o desenvolvimento e as funções do tecido adiposo. De fato, D'eon et al., (2005) demonstraram que o tratamento com E2, promove redução da lipogênese nos adipócitos de camundongos ovariectomizados. Desta forma, quando níveis circulantes de estrogênio encontram-se acima da faixa fisiológica, o metabolismo do tecido adiposo é alterado, resultando em redução da taxa lipogênica e do tamanho do adipócito (FAULDS et al., 2012). Adicionalmente, estudos em humanos e roedores relacionam o estrogênio à regulação da homeostase da glicose, visto que mulheres na

pré-menopausa são mais sensíveis a insulina e possuem maior tolerância a glicose, além de exibir maior expressão de GLUT4 em comparação à mulheres na menopausa (FAULDS et al., 2012).

Atualmente, o TA é extremamente conhecido e estudado como um órgão endócrino ativo, visto que o mesmo expressa e secreta mais de 600 fatores bioativos. Dentre estes, as adipocinas (leptina, adiponectina, visfatina, resistina, IL-6, TNF- $\alpha$  dentre outros), que agem tanto de forma autócrina ou parácrina como de forma endócrina (KERSHAW; FLIER, 2004; BLÜHER, 2013). Já foram identificadas mais de cem tipos de adipocinas, sendo a leptina e adiponectina são as mais conhecidas e estudadas (TRAYHURN, 2013).

A leptina é um dos hormônios chave na modulação central do metabolismo, regulando a ingestão alimentar e a homeostase energética, além de ser definida como potente fator angiogênico. A leptina é secretada do tecido adiposo em proporção direta à quantidade de gordura, sendo que a ovariectomia, reduz sua sensibilidade em comparação a fêmeas intactas, um efeito que pode ser reestabelecido pelo tratamento com E2 (CAO, 2007; FAULDS et al., 2012).

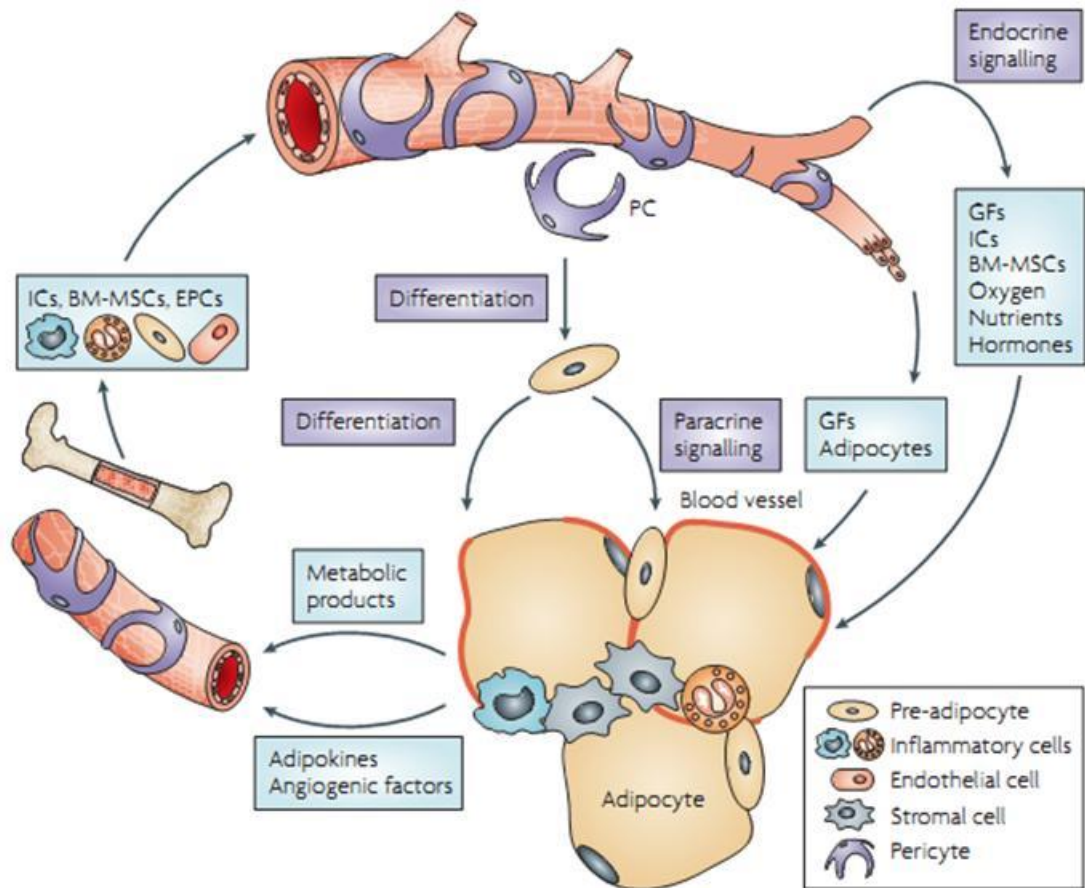
A adiponectina é uma abundante proteína circulante no plasma, secretada por adipócitos maduros, medeia diversos benefícios na vasculatura e atua regulando o metabolismo da glicose, melhorando a sensibilidade a insulina. Desta forma, os níveis de adiponectina correlacionam-se negativamente com o percentual de gordura corporal, distribuição central de gordura, insulina plasmática em jejum. Adicionalmente, a adiponectina parece contribuir para a angiogênese, exercendo efeitos protetores na função vascular, através de modulação nas células endoteliais e células musculares lisas, regulação da eNOS, fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias (GOLDSTEIN; SCALIA, 2004; CAO, 2007; CHRISTIAENS; LIJNEN, 2010).



Sendo assim, as adipocinas desempenham importante papel na regulação do controle da saciedade, distribuição de gordura corporal, sensibilidade e secreção da insulina, gasto energético, inflamação, pressão arterial e função endotelial do tecido adiposo (KERSHAW; FLIER, 2004; BLÜHER, 2013). No entanto, alterações em sua secreção podem representar uma conexão entre disfunção do tecido adiposo e desordens metabólicas e cardiovasculares, relacionadas à obesidade (BLÜHER, 2013).

O TA possui uma plasticidade única, devido a sua rápida e dinâmica habilidade de se expandir ou de se reduzir (SUN et al., 2012). Sabendo-se que este tecido possui relativamente uma densa rede de capilares sanguíneos, a expansão dos estoques de gordura, especialmente quando envolve a diferenciação de novos adipócitos, requer o contínuo remodelamento dessa rede de vasos. Esse remodelamento garante o suprimento do TA com nutrientes e oxigênio, além de garantir o transporte de ácidos graxos e de adipocinas (HAJER; VAN HAEFTEN; VISSEREN, 2008). Para tal, a vasculatura se ajusta, através da ativação do processo angiogênico no caso de hiperplasia e, dilatação e remodelamento de capilares existentes para hipertrofia do adipócito (LIJNEN, 2008). Diante disso, nota-se que a adipogênese está intimamente associada à angiogênese (HAJER; VAN HAEFTEN; VISSEREN, 2008).

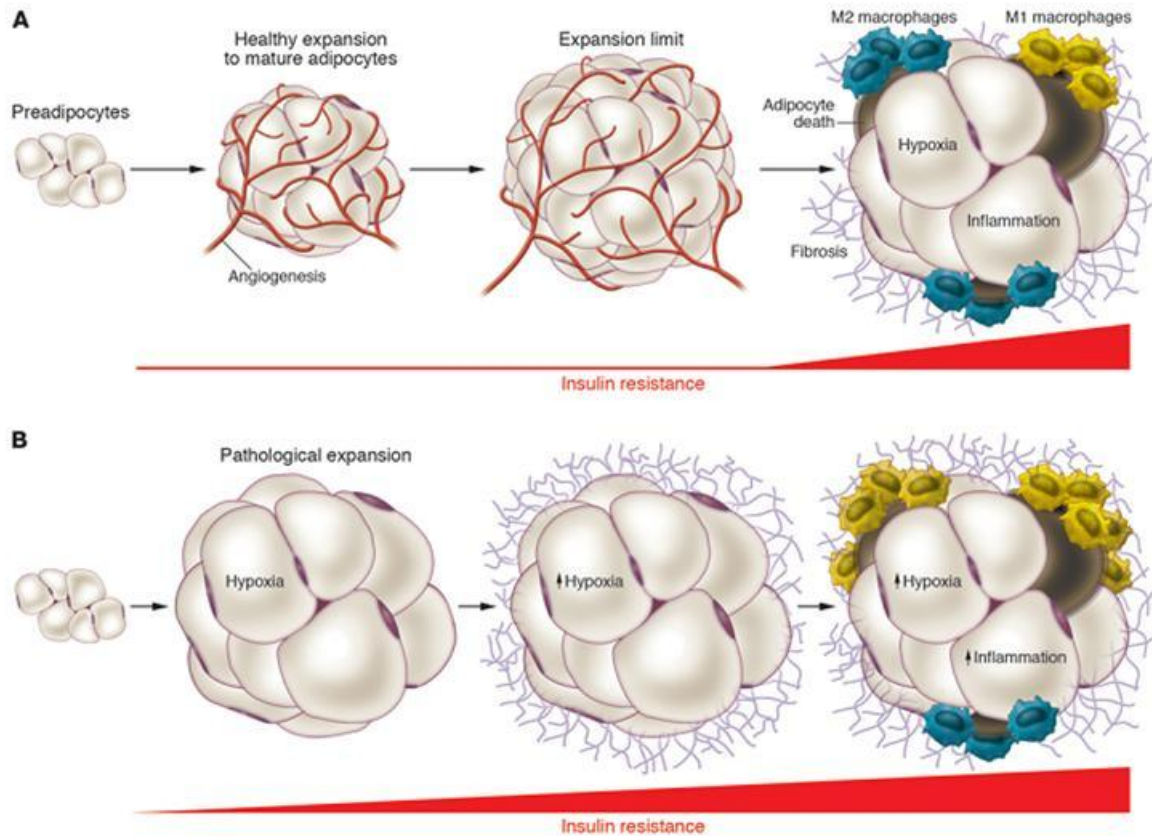
Existem diversos mecanismos pelos quais os vasos angiogênicos contribuem para manutenção e desenvolvimento do tecido adiposo, como demonstrado na figura 8.



**Figura 8.** Funções da vasculatura no tecido adiposo. O crescimento de vasos sanguíneos no TA fornece oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento (GF), hormônios, células inflamatórias (ICs) e células lisas mesenquimais da medula óssea (BM-MSCs) para manutenção das funções homeostáticas dos adipócitos e expansão do TA. Fonte: Cao (2010).

Tanto a hiperplasia quanto a hipertrofia dos adipócitos podem contribuir para a expansão do TA (LIJNEN, 2008). Todavia, há uma importante distinção entre uma expansão saudável e uma expansão patológica do mesmo, como na obesidade crônica, por exemplo. A expansão saudável é o alargamento da massa de gordura, por meio do recrutamento de células precursoras de adipócitos que se diferenciam em pequenos adipócitos, juntamente com o recrutamento de outros tipos de células estromais, dentro de uma taxa apropriada, com subsequente vascularização, mínima indução da MEC e mínima inflamação. Por outro lado, a expansão patológica do TA, é o rápido crescimento da massa de gordura por meio do alargamento de células de gordura existentes, com um alto grau de infiltração principalmente de macrófagos M1 (o que conduz à inflamação), limitado desenvolvimento de vasos

sanguíneos e fibrose massiva (proveniente da hipóxia), como demonstrado na figura 9 (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011)



**Figura 9.** (A) Expansão saudável do TA (B) Expansão patológica do TA. Fonte: Sun, Kusminski e Scherer (2011).

A expressão de genes envolvidos na angiogênese parece ser *upregulated* durante o ganho de peso em animais enquanto a inibição da angiogênese reduz a deposição de gordura em vários modelos de obesidade em camundongos (FRAYN et al., 2003). Por outro lado, alguns estudos postulam que a angiogênese é deficiente no TA de camundongos obesos, o que propicia uma redução na densidade capilar, culminando na redução do fluxo sanguíneo no TA (YE, 2011). Ainda neste contexto, Pasarica et al., (2009) em estudo com sujeitos obesos ou com sobrepeso, e com reduzida oxigenação tecidual, encontraram diminuição na densidade capilar e redução na expressão de VEGF-A no tecido adiposo subcutâneo desses sujeitos. Desta forma, nota-se que ainda é controverso o efetivo papel da angiogênese na obesidade, no

entanto, parece que o desenvolvimento do suprimento vascular é uma etapa limitante na expansão do TA (YE, 2011).

O VEGF-A vem demonstrando papel importante no controle do metabolismo e funções do TA (ELIAS; FRANCKHAUSER; BOSCH, 2013). Entre todos os tecidos adiposos examinados do corpo, o visceral é o que expressa os mais altos níveis de VEGF-A, sendo que este possui papel central no crescimento e desenvolvimento do TA (CAO, 2007). A maior parte de sua expressão e secreção nesse tecido é atribuída aos adipócito em ratos e camundongos (HAUSMAN; RICHARDSON, 2004).

Diante disso, a angiogênese no TA parece ser regulada por fatores de crescimento produzidos pelo próprio tecido (FRAYN et al., 2003). O crescimento dos adipócitos produz outros fatores angiogênicos além do VEGF-A, incluindo a leptina, o FGF-2, HGF, IGF, TNF- $\alpha$  e  $\beta$ , resistina, neuropeptído y (NPY) dentre outros. Em adicional, a própria leptina regula a expressão do RNAm de VEGF-A pela ativação da via de sinalização Jak/Stat3, além de induzir a atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP9, o que indiretamente facilita a angiogênese (CAO, 2007).

A hipóxia, proveniente da redução do fluxo sanguíneo, é um dos maiores estímulos para expressão do VEGF-A (FERRARA, 1999; SHIBUYA, 2008), através de sua ativação pelo HIF-1 $\alpha$  (FORSYTHE et al., 1996), o principal mediador de sinalização da hipóxia (YE, 2011). A expressão de HIF-1 $\alpha$  mostrou-se aumentada no TA de pacientes obesos, sendo que sua expressão foi reduzida depois de perda de peso induzida por cirurgia (YE, 2011). No entanto, Ye et al., (2007) demonstraram que a hipóxia não aumenta a expressão de VEGF-A em camundongos *ob/ob* e Pang et al., (2008), demonstraram que a densidade capilar está reduzida em camundongos obesos.

Além disso, e neste contexto, Furukawa et al., (2004) demonstraram que espécies reativas de oxigênio (EROs) estão aumentadas no TA de camundongos obesos, acompanhada

por um aumento na expressão de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato oxidase (NADPH oxidase) e diminuição de enzimas oxidantes. Adicionalmente, a ovariectomia, por exemplo, além de promover o massa da corporal e depósitos de gordura, promove o aumento nos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado de ratas, ao passo que diminui as moléculas antioxidantes (RODRIGUES et al., 2013).

Desta forma, a expansão patológica do TA pode levar a uma série de efeitos negativos com a hipóxia crônica, tais como a indução da infiltração de macrófagos, lipólise nos adipócitos, indução ao estresse de retículo endoplasmático e estresse oxidativo, inibição da função mitocondrial, inibição da expressão de adiponectina nos adipócitos, dentre outros (YE, 2011).

Diante deste quadro, o aumento descompensado da massa do TAB é associado à profundas mudanças histológicas e biomecânicas, características da inflamação e disfunção endotelial (AHIMA, 2006). A distribuição e acumulação central do tecido adiposo, principalmente no compartimento visceral, o concomitante estado dislipidêmico de resistência à insulina e a redução do gasto energético, tem sido apontados como importantes componentes para o desencadeamento de anormalidades metabólicas, associadas a doenças cardíacas, obesidade, hipertensão, aterosclerose, hipercolesterolemia, diabetes tipo 2, acidente vascular cerebral, esteatose hepática, desordens endometriais e câncer (TCHERNOF; POEHLMAN; DESPRÉS, 2000; KERSHAW; FLIER, 2004; POEHLMAN, 2005; CAO, 2007).

Em suma, diante de todas as desordens provenientes das disfunções do TA, ainda são escassos os estudos sobre os mecanismos e os fatores de regulação da angiogênese e expressão do VEGF-A no tecido adiposo. Portanto, é de grande interesse conhecer os efeitos provenientes da ovariectomia na vasculatura desse tecido e o papel do treinamento físico perante essas alterações.

## 1.5 Exercício físico e angiogênese

Diante de tantas evidências demonstrando os efeitos deletérios da deficiência de estrogênio, cada vez mais aumentam os estudos que buscam ferramentas para a prevenção e tratamento desses efeitos. Nesse contexto, ao longo dos anos, a terapia de reposição hormonal (TRH) foi preconizada e também utilizada como sendo uma importante ferramenta para diminuir a severidade e a frequência dos sintomas e efeitos negativos da menopausa (SUDOH et al., 2001; CHRISTODOULAKOS et al., 2004; BECHLIOULIS et al., 2009). Por outro lado, ainda existem conflitos na literatura sobre o uso da TRH, visto que a mesma tem sido associada ao risco aumentado de desenvolvimento de tumores, como câncer de ovário, do endométrio e câncer de mama (COLDITZ et al., 1995; RODRIGUEZ et al., 2001).

O exercício físico, por sua vez, têm se destacado pelo seu papel fundamental principalmente na diminuição de incidência de eventos cardiovasculares. Isto por que, o treinamento físico é capaz de promover a melhora da função vascular em pacientes com doença arterial coronária, melhora da disposição física, diminuição da massa corporal e pressão arterial, melhora da sensibilidade a insulina e de diversas variáveis inflamatórias (LAUFS et al., 2004).

Avila et al., (2010) demonstraram que a combinação de um programa de treinamento resistido (TR) moderado, por exemplo, juntamente com a perda de peso estimulada por dieta é capaz de diminuir a massa corporal, reduzir o tecido adiposo intermuscular e atenuar a redução da massa magra em indivíduos idosos obesos e com sobrepeso. Neste contexto, Teixeira et al., (2003) demonstrou que o TR promove aumento na massa muscular e aumento do gasto energético total, oxidação lipídica e induz a diminuição da gordura abdominal total de mulheres na pós-menopausa.

O exercício de resistência progressivo ou condicionamento de força é geralmente definido como o exercício em que a resistência contra a qual um músculo gera força é progressivamente aumentada ao longo dos treinos, envolvendo poucas contrações contra uma carga elevada (EVANS, 2004).

Segundo Kramer et. al., (2002):

A progressão da sobrecarga é o aumento gradual do estresse aplicado sobre o corpo durante o exercício. Esse aumento sistematizado é extremamente necessário para propiciar melhora do desempenho e o mesmo pode ser realizado através da alteração de uma ou mais das seguintes variáveis:

1. A intensidade do exercício (ex. resistência relativa ou absoluta/ a carga de um determinado exercício/movimento pode ser aumentada);
2. O total de repetições realizadas na intensidade atual de treino pode ser aumentada;
3. A velocidade das repetições/o tempo com cargas submáximas podem ser alteradas de acordo com os objetivos do treinamento;
4. Os períodos de descanso podem ser encurtados para melhorias na resistência ou aumentados para melhorias na força e potência;
5. O volume de treino (o trabalho total representado como o número total de repetições realizadas) pode ser aumentado gradualmente.

Além disso, Kraemer et al., (2002) também destacam que todas as adaptações ao treinamento são específicas ao estímulo aplicado e determinadas por vários fatores, que incluem a) ações dos músculos envolvidos, b) velocidade do movimento, c) amplitude do movimento, d) grupos musculares treinados, e) sistemas energéticos envolvidos e f) intensidade e volume de treinamento. O corpo humano se adapta rapidamente ao programa de

TR, por isso pelo menos algumas dessas alterações são necessárias a fim de garantir a contínua progressão no desempenho.

Uma série de estudos utilizando o protocolo de treinamento resistido em escada mostrou em ratas Ovx, ser eficiente na diminuição da ingestão alimentar, massa corporal (DOMINGOS et al., 2012; STOTZER, 2013), percentual de gordura e melhora no perfil lipídico (LEITE et al., 2009). Além disso, o TR foi eficiente em prevenir a esteatose hepática através de alteração na expressão gênica de moléculas relacionadas ao metabolismo lipídico hepático (DOMINGOS et al., 2012) e diminuir a expressão de genes lipogênicos, inflamatórios, macrófagos e citocinas pró inflamatórias no tecido adiposo visceral de ratas Ovx (STOTZER, 2013). Por outro lado, este protocolo de TR não preveniu o aumento de biomarcadores de estresse oxidativo no fígado de ratas Ovx (RODRIGUES et al., 2013).

O tipos de treinamento físico no geral, estão associados a níveis reduzidos de estresse oxidativo vascular, pelo menos em parte, via atividade aumentada da eNOS e da superóxido dismutase (SOD) extracelular, que por sua vez, pode exercer efeitos vasculares benéficos (LAUFS et al., 2004). Entretanto, esse efeito benéfico está relacionado não somente com o tipo de treinamento, mas com o volume, intensidade e período de recuperação do mesmo (EVANS, 2004). Desta maneira, já tem sido documentado que o exercício físico, dependendo desses parâmetros, também pode produzir uma quantidade exacerbada de radicais livres, afetando diversos tecidos (MATAIX et al., 1998).

Outra vertente com relação aos efeitos dos exercícios físico, diz respeito a sua influência nas respostas imunológicas e inflamatórias. Essas respostas ocorrem através de mudanças nos níveis séricos de algumas citocinas e mediadores dessas reações, incluindo os fatores de crescimento (CZARKOWSKA-PACZEK et al., 2011). Laufs et al., (2004) demonstraram que três semanas de treinamento em esteira, 5 vezes na semana durante 30



minutos, promoveu o aumento de células progenitoras endoteliais, inibição da formação neointima e aumento da angiogênese na artéria carótida de camundongos.

Um estudo de Rivilis et al., (2002) mostrou que o estiramento dos sarcômeros (para mimetizar *shear stretch*) do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos, promoveu aumento da concentração proteica de VEGF-A. Nesse contexto, o treinamento físico tem demonstrado aumentar os níveis de RNAm de VEGF-A, tanto em humanos quanto animais.

É sabido que o exercício agudo em ratos aumenta a expressão do RNAm do VEGF-A de 3 a 5 vezes em resposta ao exercício sistêmico além de aumentar o RNAm dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2. Em humanos também há aumento da expressão do RNAm de VEGF-A, VEGFR-1 e VEGFR-2, porém, o curso do tempo de respostas é diferente dos descritos em ratos (GAVIN et al., 2004).

Um estudo de Gustafsson et al., (2005) com humanos mostrou que no tecido muscular esquelético, o exercício agudo submáximo com entrega de oxigênio reduzida, aumenta a expressão do VEGF-A. Em adicional, os autores Mac Gabhann, Ji e Popel (2007) reforçam que o exercício moderado ou intenso faz com que algumas regiões do tecido muscular tornem-se hipóxicas, além de aumentar a tensão de cisalhamento (*shear stress*) na parede dos capilares, induzindo a angiogênese através da expressão do VEGF-A.

Em suma, são muito limitados os estudos não somente sobre a influência da ovariectomia, bem como a influência do treinamento resistido na atividade angiogênica do tecido adiposo através do VEGF-A. Nesse contexto, torna-se compreensível entender por que o estrogênio tem sido alvo de inúmeras pesquisas. Entender como a redução nos seus níveis afeta fisiológica e metabolicamente a função não só das gônadas mas, de outros sistemas e órgãos permite o desenvolvimento de intervenções tanto farmacológicas como não farmacológicas de prevenção e controle dos efeitos deletérios do declínio dos hormônios ovarianos.

Desta forma, nós hipotetizamos que a ovariectomia promoverá alterações negativas na morfologia e na angiogênese do tecido adiposo visceral de ratas, e que o treinamento resistido será capaz de prevenir essas alterações.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar os efeitos da ovariectomia (Ovx) e do treinamento resistido (TR) na angiogênese e morfologia do tecido adiposo visceral (TAV) de ratas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Verificar os efeitos da Ovx e TR nos parâmetros corporais e fisiológicos.
- Verificar os efeitos da Ovx e TR na expressão gênica do VEGF-A e seu receptor VEGF-R2 no TAV de ratas.
- Analisar os efeitos da Ovx e TR na concentração proteica do VEGF-A no TAV de ratas.
- Analisar os efeitos da Ovx e TR no tamanho e no número de adipócitos do TAV de ratas.
- Avaliar os efeitos da Ovx e TR na densidade microvascular do TAV de ratas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizadas 24 ratas *Sprague-Dawley*, provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araraquara, com oito semanas de idade, pesando inicialmente  $218,34 \pm 2,49$  (média  $\pm$  erro padrão da média).

Durante o período experimental, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício desta universidade, em gaiolas coletivas (três animais por gaiola), com o assoalho recoberto com serragem e receberam água e ração *ad libitum*, sob condições constantes de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade e iluminação em ciclo invertido (01:00- 13:00h: claro; 13:00- 01: 00h: escuro).

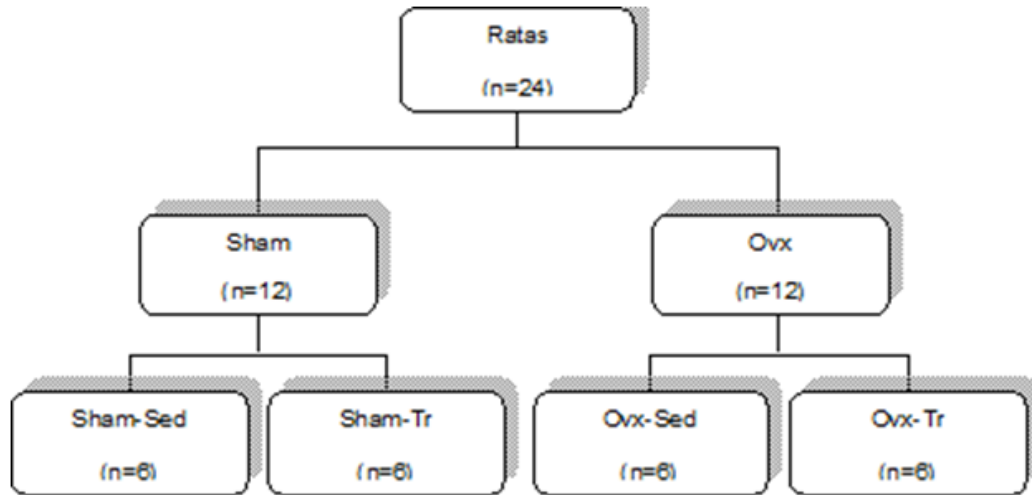
Todos os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, (Protocolo n.008/2010) e conduzidos de acordo com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América (NATIONAL RESEARCH COUNCIL'S, 1996).

Após a chegada, todos os animais permaneceram por três semanas em condição de aclimação ao biotério e ao ciclo invertido. Após este período, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais.

#### 3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais (seis ratas por grupo): 1) Sham operado sedentário (Sham-Sed); 2) ovariectomizado sedentário

(Ovx-Sed); 3) Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e 4) Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). A figura 10 apresenta o esquema de distribuição das ratas e desenho experimental do estudo.



**Figura 10.** Esquema de distribuição das ratas em grupos.

### 3.2.1 Grupos Sedentários

Os animais dos grupos sedentários (Sham-Sed e Ovx-Sed) foram mantidos em suas gaiolas durante todo o período experimental do estudo sem nenhum tipo de exercício físico sistemático.

### 3.2.2 Grupos treinamento resistido

Os animais dos grupos treinamento resistido (Sham-Tr e Ovx-Tr) foram submetidos a dez semanas de treinamento resistido progressivo em escada como descrito no item 3.4.

### 3.3 Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia e da operação sham

A ovariectomia (Ovx) e a sham operação foram realizadas quando as ratas completaram 10 semanas de idade (aproximadamente 250 g de massa corporal), de acordo com a técnica descrita por Kalu (1991).

Inicialmente as ratas foram anestesiadas com uma mistura de Ketamina-Xilazina (61,5-7,6 mg/kg, intraperitoneal), tendo seus reflexos testados para dar início aos procedimentos da Ovx. Durante todos os procedimentos da Ovx as ratas foram mantidas sobre o efeito anestésico. Primeiramente, foi realizada uma pequena incisão bilateral de 1,0-1,5 cm através da pele e da camada muscular, entre a última costela e a coxa, em paralelo com a linha corporal do animal. A cavidade peritoneal foi aberta e feita uma ligadura abaixo da fimbria. Os ovários foram removidos e a incisão feita na pele e músculos suturados. Após isso, foi ministrado antibiótico (Pentabiótico – para animais de pequeno porte) e pelas próximas 72 horas após a Ovx as ratas foram mantidas em caixas individuais. Posteriormente a este período as ratas foram novamente agrupadas nas caixas coletivas referentes aos seus grupos, onde permaneceram até o fim do experimento. Foi respeitado um período de 21 dias de recuperação pós-cirurgia para dar início aos procedimentos do protocolo de treinamento resistido no grupo Ovx-Tr. Foi realizado o controle do ciclo estral, através do esfregaço vaginal, o que nos garantiu que as ratas Ovx não estavam mais ciclando (permaneceram na fase diestro) e o procedimento cirúrgico foi realizado com sucesso (dados já descritos na tese de doutorado de Stotzer, 2013).

A Sham operação foi realizada por meio dos mesmos procedimentos da Ovx, exceto que não foi realizada a ligadura abaixo da fimbria e nem os ovários foram removidos, e sim apenas expostos e devolvidos ao local de origem. Vale ressaltar que todos os animais sham

operados e ovariectomizados tiveram o mesmo tempo de exposição aos procedimentos cirúrgicos (92 dias) até a data da eutanásia.

### **3.4 Treinamento resistido**

Esta pesquisa utilizou e adaptou o protocolo de treinamento resistido de Hornberger e Farrar (2004). Inicialmente, as ratas foram adaptadas ao protocolo de treinamento resistido que exigia que os animais escalassem uma escada vertical (1,10 x 0,18 m, 2 cm de espaçamento entre os degraus da grade, inclinação de 80°) com pesos atados as suas caudas (Figura 11). O tamanho da escada fazia com que os animais realizassem de 8 a 12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi atado à porção proximal da cauda com uma fita auto-adesiva. Com o aparato fixado a cauda as ratas eram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada. Caso necessário um estímulo com pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento. No topo da escada as ratas alcançavam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansavam durante 120 segundos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem estímulo de pinça na cauda. Foram realizadas três sessões de adaptação (familiarização) com intervalo de 48 horas entre as sessões.



**Figura 11.** Escada utilizada para o treinamento resistido.

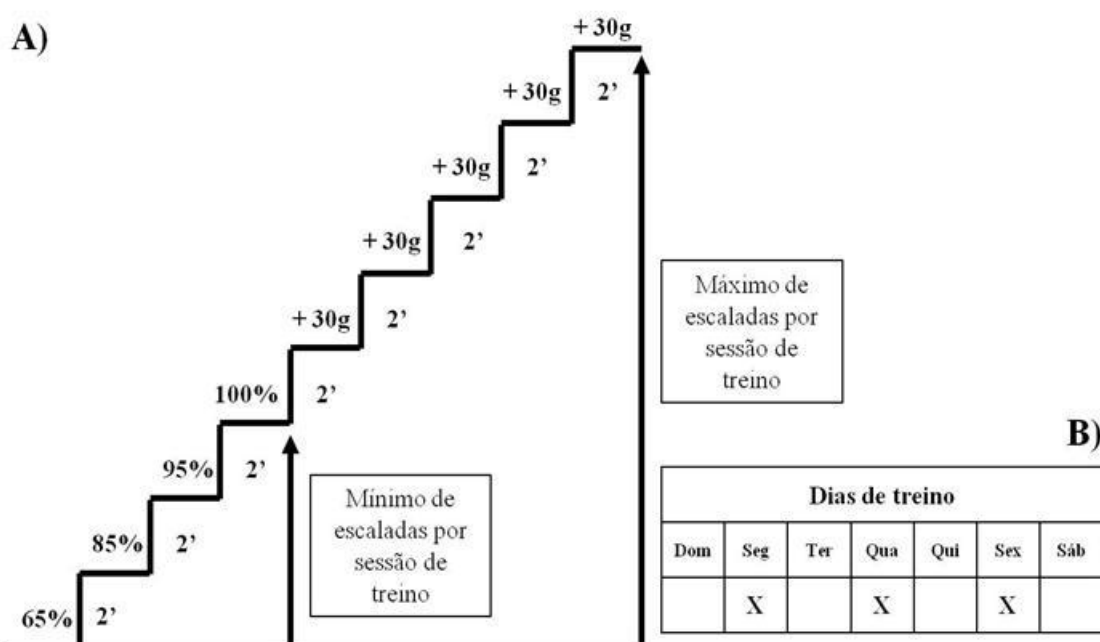
Três dias após a última sessão de familiarização foi realizada a primeira sessão de treinamento que consistiu de 4 a 8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas. A escalada inicial consistiu em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal atado em sua cauda. Após completar o carregamento desta carga inicial com sucesso, um peso adicional de 30g era adicionado ao aparato. Este procedimento foi sucessivamente repetido com um número máximo de oito escaladas, até que se alcançasse uma sobrecarga que não permitia que a rata escalasse toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguia progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento (carga máxima) da rata para aquela sessão de treinamento. Este valor máximo foi utilizado para a elaboração da carga de carregamento utilizada na próxima sessão de treinamento.

As sessões de treinamento seguintes consistiram de quatro escalas na escada, com 65%, 85%, 95% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subsequentes em um número máximo de cinco eram



adicionados 30g em cada nova escalada, até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada (Figura 12). O intervalo de recuperação entre as escaladas foi fixo de 120 segundos.

As sessões de treino foram realizadas três vezes por semana, todas as segundas, quartas e sextas-feiras durante dez semanas. O início das sessões de treino sempre ocorreu às 15 horas.



**Figura 12.** A) Organização da carga de carregamento por sessão de treino; B) dias de treino na semana.

### 3.5 Controle da ingestão alimentar e da massa corporal

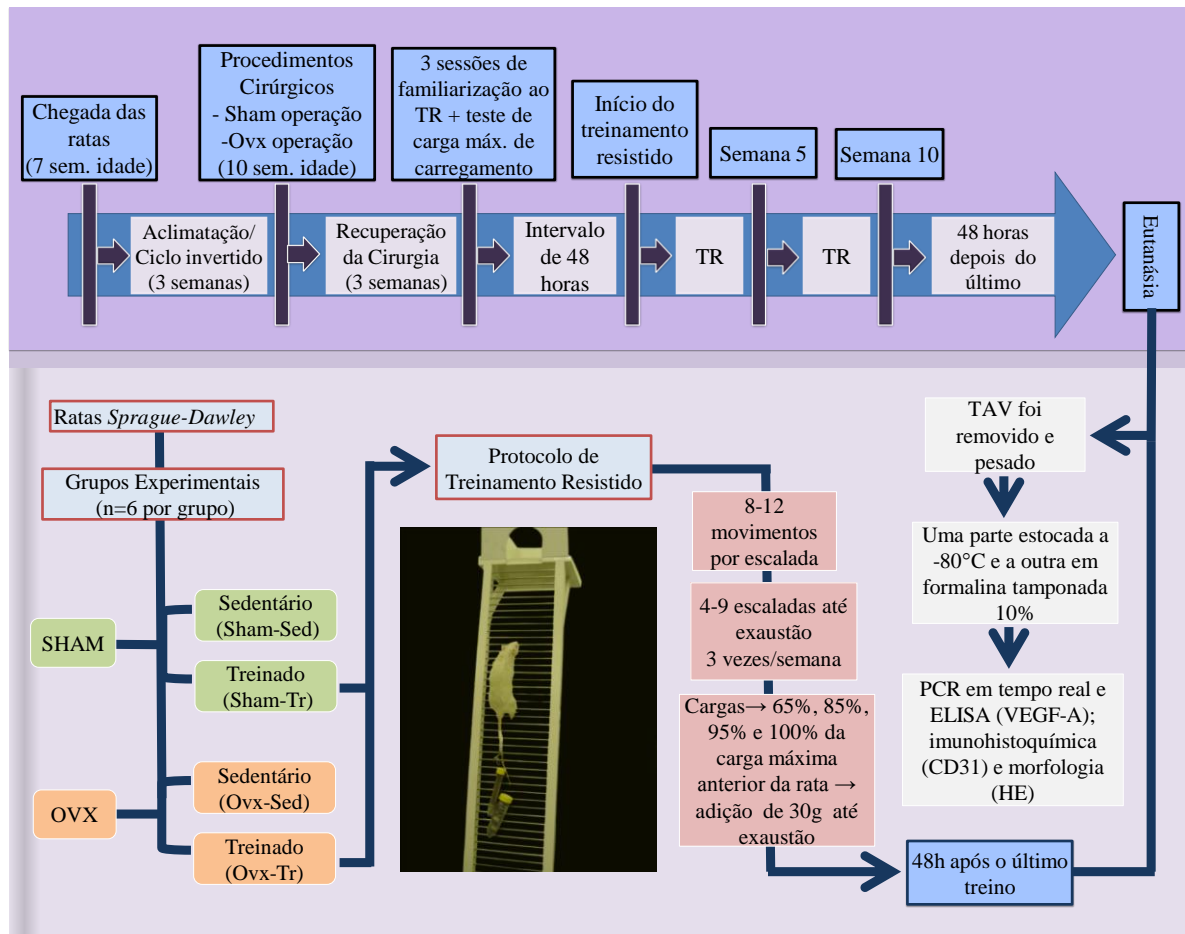
A ingestão alimentar (gramas de ração consumida por gaiola) foi monitorada diariamente sempre no mesmo horário do dia, entre 17h00min e 17h30min e a massa corporal verificada três vezes na semana, todas as segundas, quartas e sextas-feiras sempre no mesmo horário entre 16h00min e 17h00min. Ambos os procedimentos foram realizados durante todo o período experimental.

### 3.6 Eutanásia dos animais e retirada dos tecidos

Ao término do período experimental os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina. Os grupos treinamento foram eutanasiados 48 horas após a última sessão de treinamento. Em seguida, os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica, com as patas presas e mantidas em extensão, para assim efetuar a retirada do tecido adiposo visceral e útero. Todos os tecidos foram pesados em balança de precisão, imediatamente após sua retirada.

Após a pesagem, uma parte do tecido adiposo visceral foi imediatamente armazenada em formalina tamponada 10%, para posteriores análises histológicas e a outra, foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido, e posteriormente, armazenada em *freezer* - 80°C, para análises em qPCR e ELISA.

### 3.7 Resumo do desenho experimental



**Figura 13.** Linha do tempo e esquema resumindo o desenho experimental. TR: treinamento resistido; TAV: tecido adiposo visceral.

### 3.8 Quantificação da expressão gênica

A análise da expressão gênica de VEGF-A e VEGF-R2 foi realizada pela quantificação do seu RNAm por Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real (PCR-RT).

Foi utilizado o RPLPO (grande proteína ribossomal) como gene de referência.

### 3.8.1 Procedimentos gerais

Para reduzir a presença de ribonucleases (RNAses), foram adotados os seguintes cuidados em todos os procedimentos: utilização de material esterilizado descartável; autoclavagem da vidraria, eppendorfs e ponteiros utilizadas; manipulação de amostras e materiais com luvas; utilização de água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) e autoclavada.

### 3.8.2 Extração do RNA total

Amostras de 50-100mg do tecido adiposo visceral foram homogeneizadas em 1mL de TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, California) com um homogeneizador (homogeneizador *Power Gen – Fisher Scientific 1000*).

O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante: Após a homogeneização, as amostras permaneciam por 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionava-se 200 µL de clorofórmio às amostras e agitava-se por 15 segundos no vortex. Logo após, as amostras permaneciam em temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugavam-se (*Eppendorf 5804R*) as amostras por 15 minutos, a 12000rpm, a 4°C. Depois da centrifugação, transferia-se o sobrenadante (500 µL) para um microtubo limpo. Eram adicionados 500 µL de isopropanol e a amostra era agitada por inversão manual, permanecendo por 10 minutos em temperatura ambiente.

A seguir, a amostra era centrifugada por 10 minutos a 12000rpm (4°C) para formação do *pellet*. O sobrenadante era descartado com cuidado por inversão manual e ao *pellet* era acrescentado 1mL de etanol 75%. Após nova centrifugação, por 5 minutos a 7500rpm (4°C), novamente o sobrenadante era descartado com cuidado por inversão manual, e caso

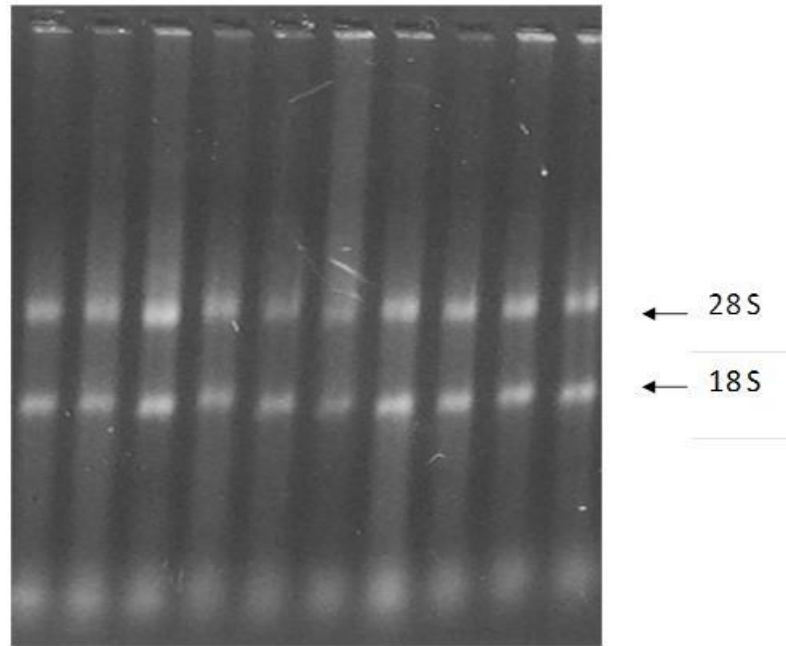
necessário o restante de etanol 75% era aspirado com auxílio de uma pipeta. Posteriormente, o microtubo contendo o *pellet* era colocado para secagem por 5-10 minutos em estufa a 37 °C. Após esse tempo, acrescentava-se 30-60 µL de água tratada com dietil pirocarbonato (água DEPC) 0,1%. As amostras eram então congeladas e armazenadas no freezer a -80 °C até o momento das análises.

### **3.8.3 Quantificação do RNA total**

Para quantificação do grau de pureza do RNA total foi realizada leitura em espectrofotômetro (Nanodrop 2000) a uma absorvância de 260nm e determinado pelas razões 260nm/280nm e 230/280, considerando-se adequados os valores entre 1,8 e 2,0. Foi utilizada a seguinte fórmula para determinar a concentração de RNA total (µg/µL): concentração µg/µL =  $(A_{260} \times 40 \times \text{diluição da amostra}) \times 1000^{-1}$ .

### **3.8.4 Determinação da integridade do RNA**

A integridade do RNA foi confirmada pela visualização em luz ultravioleta do padrão de eletroforese das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, em gel de agarose 1% revelado com brometo de etídio (Figura 14).



**Figura 14.** Exemplo de um gel de agarose (1%) com amostras do tecido adiposo visceral, corado com brometo de etídeo, indicando a integridade do RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 28S e 18S.

### 3.8.5 Transcrição Reversa

Inicialmente, as amostras de RNA total foram tratadas com DNase – Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, California*) de acordo com as especificações do fabricante. Ao RNA total (1 $\mu$ g), adicionava-se solução tampão (1 $\mu$ L, 10x DNase I Reaction Buffer), enzima (1 $\mu$ L DNase I, Amp Grade) e quantidade suficiente para 10 $\mu$ L de água tratada com DEPC. A amostra era encubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Logo após, adicionava-se EDTA (1 $\mu$ L) e a amostra permanecia em banho seco a 65 °C por 10 minutos.

Logo após o tratamento com DNase, adicionava-se 0,5  $\mu$ L do Primer Oligo (dT) (*Promega Corporation, Madison, WI USA*) e a amostra permanecia em banho seco a 70 °C por 5 minutos.

A seguir, eram adicionados:

- 2,5 µL de M-MLV 5x tampão de reação (*Promega Corporation, Madison, WI USA*):
- 0,625 µL dATP 10mM
- 0,625 µL dCTP 10mM
- 0,625 µL dGTP 10mM
- 0,625 µL dTTP 10mM
- 0,5 µL M-MLV transcriptase reverse (TR)

As amostras em seguida foram encubadas em banho seco a 37 °C por 60 minutos e, posteriormente estocadas a -80 °C até o momento das análises.

### **3.8.6 Reação em cadeia da polimerase – tempo real (PCR-RT)**

Foram utilizados os seguintes reagentes para cada amostra de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) (40ng/µL), em duplicata.

- 5 µL de água livre de nuclease
- 0,5 µL primer forward
- 0,5 µL primer reverse
- 0,25 µL de cDNA
- 6,25 µL SYBR<sup>®</sup> Green (Fermentas)
- Volume final 12,5 µL

A quantificação do RNAm das amostras de todos os grupos experimentais foi realizada em duplicata no sistema de detecção PCR em tempo real CFX96 (*Bio-Rad, San Francisco, USA*) e os ciclos consistiram de 95 °C por 10 minutos, seguidos de 42 ciclos de

amplificação a 95 °C por 15 segundos; temperatura de anelamento (Tm) 56-62,3 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos. As Tm dos primers foram previamente padronizadas.

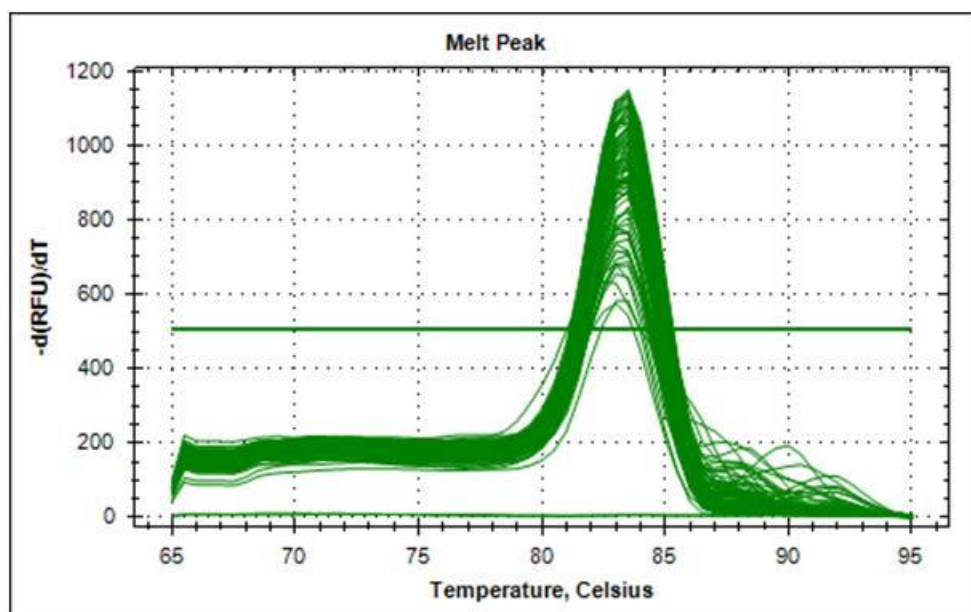
As seqüências de bases dos nucleotídeos utilizados estão apresentadas na tabela 2.

**Tabela 2.** Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados

Genes	Foward (5'-3')	Reverse (5'- 3')	Referência
RPLPO	AGGGTCCTGGCTTTGTCTGTGG	AGCTGCAGGAGCAGCAGTGG	Heinemeier et al., 2007
VEGF-A	TGAGACCCTGGTGGACATCTT	CACACAGGACGGCTTGAAGA	Iemitsu et al., 2006
VEGF-R2	CCACCCAGAAATGTACCAAAC	AAAACGCGGGTCTCTGGTT	Hatano et al., 2011

RPLPO, grande proteína ribossomal; VEGF-A, fator de crescimento endotelial vascular; VEGF-R2, receptor- 2 do fator de crescimento endotelial vascular.

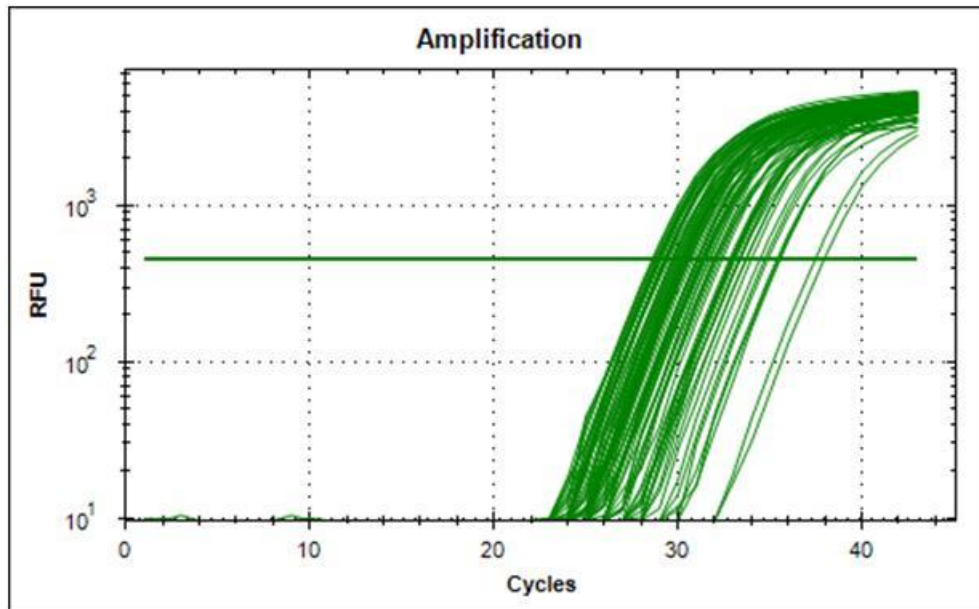
Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de MELT. Um exemplo de curva de MELT está representado na figura 15.



**Figura 15.** Exemplo de curva de MELT original representativa dos ciclos do PCR-RT. Gene de referência RPLPO.



Os valores de threshold cycle (Ct) e as curvas de MELT foram obtidos pelo *Software* do termociclador *CFX96 Bio-Rad*. O Ct é o ponto onde a reação cruza o limiar de detecção durante a fase exponencial da amplificação (Figura 16).



**Figura 16.** Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT. Gene de referência RPLPO

A influência da ovariectomia, do treinamento ou a da associação de ambos sobre a expressão dos genes selecionados foi avaliada pelo método de quantificação relativa - delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). Depois de calculada a média dos Ct de cada gene foram calculados:

- Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) = Ct RPLPO - Ct do gene alvo;
- Cálculo da média S: Média do  $\Delta Ct$ ;
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{média S}$ .

Os  $\Delta\Delta Ct$  dos grupos Sham-Sed, Ovx-Sed, Sham-Tr e Ovx-Tr foram calculados em relação ao Sham-Sed. O valor em unidade arbitrária (UA) da expressão dos genes alvos (VEGF-A e VEGF-R2) foram calculados por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Com os valores UA, foram realizados os testes estatísticos.

### **3.9 Análise da concentração proteica**

#### **3.9.1 Extração das proteínas totais**

Para a extração das proteínas totais, aproximadamente 100mg de tecido adiposo foram homogeneizados (Homogeneizador *ULTRA TURRAX T10 Basic IKA*) em tampão de lise (10Mm Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 1Mm EGTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0,1% SDS, 0,5% ácido deoxicólico, 0,2 mM PMSF e inibidor de protease, Sigma P8340). Os extratos foram centrifugados a 13000 x g a 4°C, por 20 minutos (Centrífuga Sigma 1-14K) e o sobrenadante foi transferido para novo tubo e estocado a -20°C para posterior dosagem do conteúdo de VEGF-A.

#### **3.9.2 Determinação da concentração de VEGF-A**

Para dosagem de VEGF-A foi utilizado o método ELISA (do inglês *enzyme-linked immunoabsorbent assay*) (*Rat VEGF mini ELISA Development kit*, Peprotech). Um placa de 96 poços foi inicialmente sensibilizada com o anticorpo de captura, diluído em PBS 1X a uma concentração de 0,5ug/ml. A placa foi selada e mantida *overnight* em temperatura ambiente (T.A.). No dia seguinte, a placa foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem (0,05% tween-20 em PBS 1X) e então, para o bloqueio de ligações inespecíficas, adicionou-se o tampão de bloqueio (1% BSA em PBS 1X) por 1h e 30min. Após novas lavagens, foram adicionados em seus respectivos poços, tanto as amostras (homogeneizado de proteínas) quanto o padrão VEGF-A, diluído em diluente (0,05% tween-20, 0,1% BSA em PBS 1X) em diferentes concentrações (2ng/ml até zero). Em dois poços, foi adicionado somente diluente para a caracterização do branco. A placa foi incubada por 2 horas em T.A. Após lavagens da placa,

foi adicionado o anticorpo de detecção biotilado, e incubado por 2 horas em T.A. Ao fim da incubação e após novas lavagens, foi adicionado o conjugado avidina-peroxidase, em uma diluição de 1:2000. Incubou-se por 30 minutos em T.A. e por fim, para revelação, foi acrescido o substrato ABTS (Sigma Aldrich, A3219). A leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda de 405nm, em leitor de placa (*SpectraMax M5, Molecular Devices*). A concentração de VEGF-A nas amostras foi normalizada em relação à concentração da proteína total nessas mesmas amostras (*BCA Protein Assay Kit – Pierce Biotechnology, Rockfor, Illinois, USA*), sendo por isso, expressa em ng de VEGF-A por mg de proteína.

### **3.10 Análises Histológicas**

Uma parte do tecido adiposo visceral foi fixado em formalina tamponada (10%) por 24 horas. Após fixação, os tecidos foram processados através de uma bateria de desidratação, em concentrações crescentes de etanol (80%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III e 100% IV), diafanização em banhos de xilol, impregnação, e por fim, inclusão em Paraplast (*Histosec® - Merck*). Após inclusão, os fragmentos foram seccionados em 5 µm de espessura em micrótomo (*Micron® HM360*), e estendidos sobre lâminas previamente tratadas com *Poly-L-lysine* (P8920, Sigma) para melhor aderência do corte à lâmina.

#### **3.10.1 Coloração com Hematoxilina e eosina (HE)**

Após os procedimentos descritos acima, duas lâminas de cada animal passaram por processo de desparafinização em xilol, seguida por alcoolização em álcool etílico e hidratação em água destilada, sendo finalmente os cortes, corados por HE. Após coloração, os cortes

foram desidratados em álcool e diafanizados em xilol, e em sequência, foi feita a montagem das lâminas utilizando o Permount (*Fisher Scientific*) para fixação de lamínula. Posteriormente, realizou-se a digitalização das imagens e a quantificação da hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos (como detalhado ao final do tópico 3.10.2).

### 3.10.2 Imunohistoquímica (IHQ)

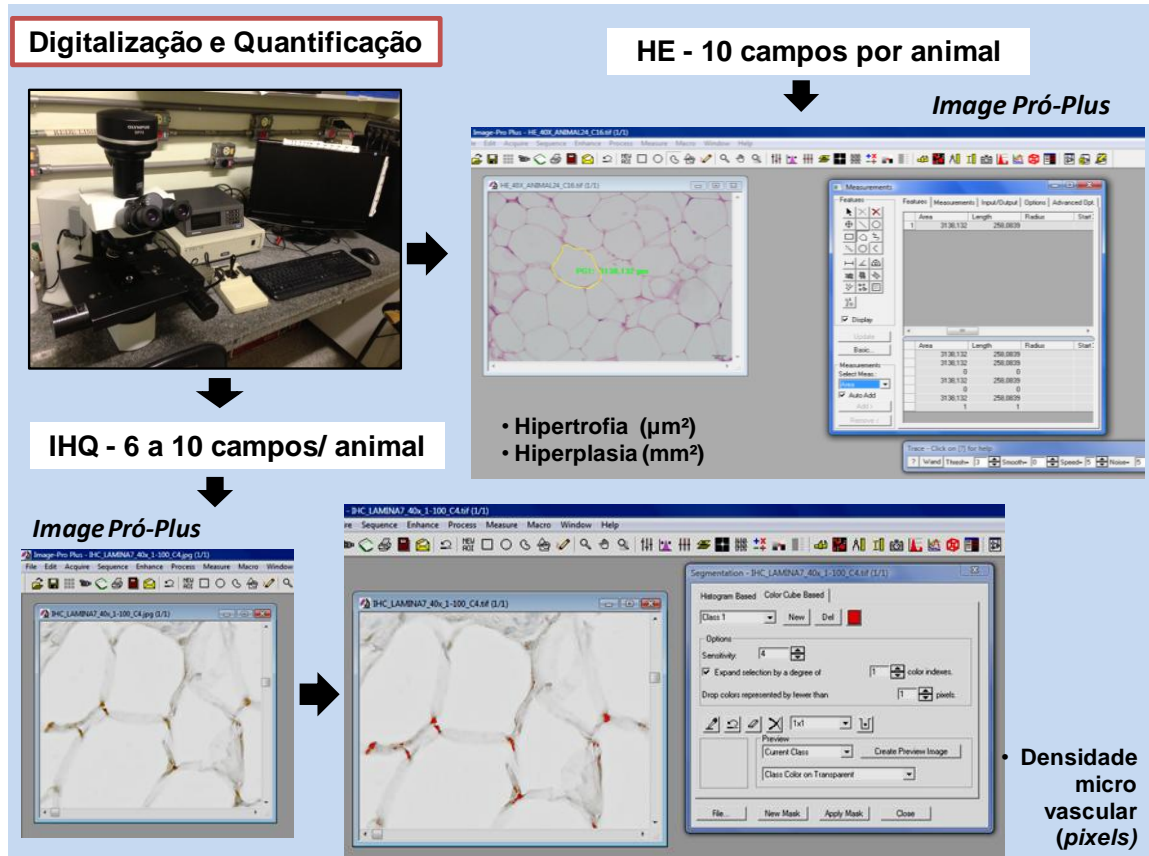
Para a imunohistoquímica, foi utilizado um marcador de células endoteliais (CD31 ou PECAM) para análise da densidade microvascular no tecido adiposo visceral das ratas. Para tal, outras lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por aproximadamente 1 hora, para a desparafinização das mesmas. Em seguida, as lâminas foram hidratadas por imersão em xilol, álcool etílico (100% II, 100% I, 80% e 70%) e água corrente. Foi feita a recuperação antigênica por meio do aquecimento dos cortes em tampão citrato de sódio (pH 6.0), durante 10 minutos, através da utilização de um banho a vapor. Ao final, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente (T.A.) durante 20 minutos.

Posteriormente a esta etapa, foram realizadas as primeiras três lavagens das lâminas com TBS-T (TBS + *tween* 20). Após isto, foi feito o isolamento dos cortes com caneta hidrofóbica. Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diluído em PBS1X a 3%. Depois de novas lavagens, foi realizado bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, durante 30 minutos. Para tal, utilizou-se o *normal horse serum*, componente do kit utilizado neste experimento (*ImmPRESS™ Anti-Rat Ig/ anti-Mouse Ig,(peroxidase), Polymer Detection Kit*). Posteriormente ao bloqueio, incubou-se o anticorpo primário *overnight* em geladeira (anticorpo monoclonal de camundongo anti-rato CD31, diluição 1:100 (ab24590 – *Abcam, Inc.*). O controle negativo foi obtido por omissão do anticorpo primário. No dia seguinte, o material foi lavado e em seguida, aplicou-

se o anticorpo secundário ligado à peroxidase (*ImmPRESS kit*), o qual foi incubado por 30 minutos.

Após incubação do secundário, o material foi lavado e revelado com a aplicação do cromógeno (DAB) durante 20 segundos. Imediatamente após esse tempo, os cortes foram lavados em água destilada para neutralizar a reação do cromógeno. Em sequência, foram contra-corados com hematoxilina (não diluída), durante 5 segundos. Por fim, realizou-se a bateria de desidratação, utilizando concentrações crescentes de alcoóis, posterior diafanização em xilol, e por fim, a montagem das lamínulas nas lâminas, com Permount (*Fisher Scientific*).

As lâminas coradas com HE e imunomarcadas com o CD31 (IHQ) foram digitalizadas pela utilização de um microscópio de luz (Olympus®, modelo BX51) acoplado à câmera fotográfica (Olympus® DP72) (Figura 17), com o auxílio de um programa de computador (DP72-BSW). Para HE foram digitalizadas aleatoriamente 10 campos para cada animal e para IHQ foram digitalizados de 6 a 10 campos (aumento de 400X - 20 $\mu$ m). Posteriormente, foi utilizado o *software Image-Pro® Plus 6.0 (Media Cybernetics)* para quantificação da área ( $\mu$ m<sup>2</sup>) e densidade (mm<sup>2</sup>) dos adipócitos (HE) bem como da densidade microvascular (IHQ - *pixels*) (Figura 17).



**Figura 17.** Figura representativa demonstrando o microscópio acoplado à câmera fotográfica e computador, utilizados para digitalização das imagens; e o software Image-Pro Plus usado para quantificação do tamanho e número dos adipócitos (HE) bem como da densidade microvascular dos mesmos (IHQ).

#### 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente todos os dados foram submetidos aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância. Apresentando distribuição normal e homocedasticidade, foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA *two way*, para as variáveis ovariectomia e treinamento resistido. O pós-teste de *Tukey* foi aplicado no caso de alguma significância. Todos os dados foram analisados no programa STATISTICA® 7.0 (*Stat Soft*), adotando-se um nível de significância estatística de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeitos da ovariectomia e treinamento resistido nos parâmetros corporais e fisiológicos

A tabela 3 e a figura 18 apresentam a evolução da massa corporal (g) de todos os grupos, durante as 10 semanas do período experimental. Ao longo das semanas 1, 5 e 10, houve aumento na massa corporal do grupo Ovx-Sed ( $p=0,024$ ,  $p=0,0001$ ,  $p=0,0002$ , respectivamente) em comparação ao grupo Sham-Sed. No entanto, durante as respectivas semanas, o treinamento não preveniu esse aumento (Ovx-Tr *versus* Ovx-Sed). Apesar de não ter havido diferença na massa corporal entre o Sham-Sed e Sham-Tr nas semanas 1 e 5, ao final de 10 semanas de experimento, o treinamento diminuiu a massa corporal do grupo Sham-Tr ( $p=0,009$ ).

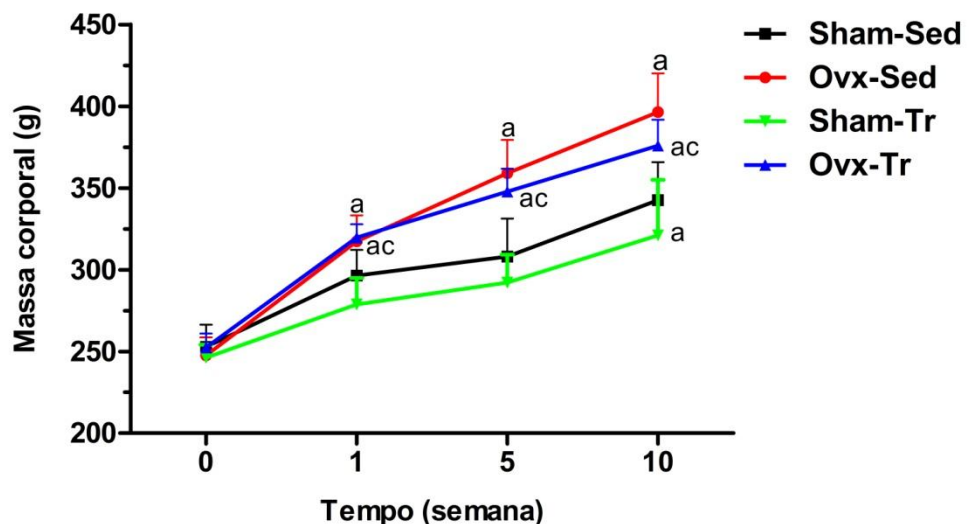
A massa do útero foi utilizada para ilustrar os efeitos fisiológicos da Ovx e confirmar a eficácia do procedimento cirúrgico. Desta forma, ao final do período experimental, a Ovx resultou em diminuição da massa do útero ( $p=0,0001$ ) em relação ao Sham-Sed (Tabela 3). Não houve diferenças nestas variáveis entre o grupo Ovx-Tr e Ovx-Sed. No entanto, a massa do útero do grupo Ovx-Tr ( $p=0,0002$ ) foi menor em comparação ao Sham-Tr.



**Tabela 3.** Efeitos da ovariectomia e treinamento resistido sobre os parâmetros corporais e fisiológicos.

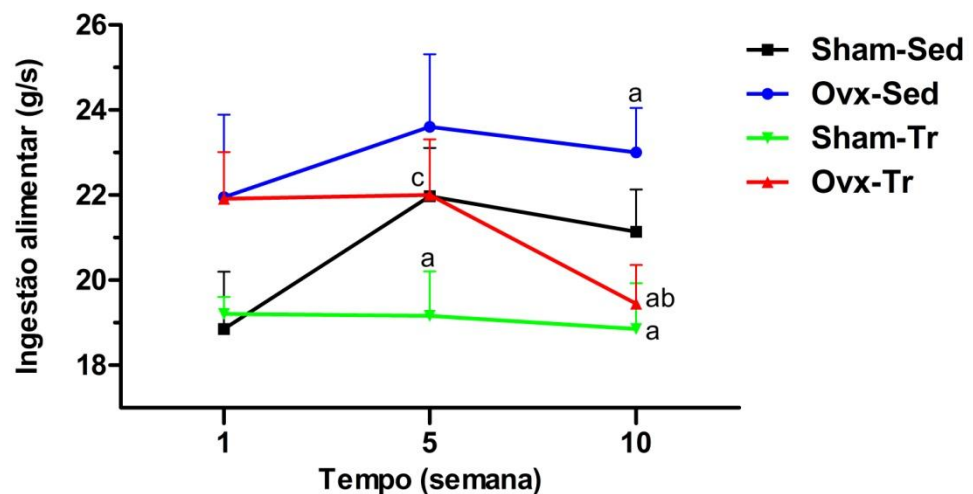
	Sham-Sed	Ovx-Sed	Sham-Tr	Ovx-Tr
<b>Massa corporal (g)</b>				
Inicial	252,75±14,71	248,3±10,57	246,28±7,80	252,60±8,88
Semana 1	296,43±15,59	317,40±15,86 <sup>a</sup>	278,88±16,06	319,60±8,12 <sup>ac</sup>
Semana 5	308,00±23,33	359,10±20,28 <sup>a</sup>	292,13±17,15	348,00±14,72 <sup>ac</sup>
Semana 10	342,57±23,21	396,33±23,68 <sup>a</sup>	305,57±15,99 <sup>a</sup>	375,88±15,92 <sup>ac</sup>
<b>Ingesta alimentar (g/s)</b>				
Semana 1	19,99±1,75	22,50±1,75	19,29±0,40	21,61±1,28
Semana 5	21,97±1,13	23,60±1,71	19,15±1,04 <sup>a</sup>	22,00±1,31 <sup>c</sup>
Semana 10	21,13±0,99	23,00±1,04 <sup>a</sup>	18,85±1,07 <sup>a</sup>	19,45±0,90 <sup>ab</sup>
<b>Massa do útero (g)</b>				
	0,83±0,35	0,18±0,06 <sup>a</sup>	0,76±0,36	0,15±0,01 <sup>ac</sup>

Valores são médias ± desvio padrão da média; n = 6 ratas por grupo. Grupos Sham operado sedentário (Sham-Sed); Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). g= grama; s= semana; a, diferente de Sham-Sed (p<0,05)  
 b, diferente de Ovx-Sed (p< 0,05)  
 c, diferente de Sham-Tr ( p< 0,05)



**Figura 18.** Massa corporal. Os valores são média ± desvio padrão da média; n=6 ratas por grupo; Grupos Sham operado sedentário (Sham-Sed); Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). g=grama; a, diferente de Sham-Sed; b, diferente de Ovx-Sed; c, diferente de Sham-Tr. p < 0,05.

A tabela 3 e a figura 19 mostram que não houve diferença na ingestão alimentar entre os grupos na primeira semana de experimento. Na semana 5 apesar de não ter havido aumento na ingestão das ratas Ovx-Sed em relação às ratas Sham-Sed, houve aumento na ingestão do grupo Ovx-Tr ( $p=0,004$ ) em comparação ao Sham-Tr. Em contraponto, o treinamento diminuiu a ingestão alimentar do grupo Sham-Tr ( $p=0,004$ ) comparado ao Sham-Sed. No entanto, ao final da última semana de experimento, houve aumento da ingestão alimentar das ratas Ovx-Sed ( $p=0,016$ ) em comparação às ratas Sham-Sed. Houve diminuição da ingestão alimentar do grupo Ovx-Tr em comparação ao Ovx-Sed, inclusive em comparação ao Sham-Sed ( $p=0,0001$ ,  $p=0,031$ , respectivamente). Além disso, também houve diminuição da ingestão alimentar do grupo Sham-Tr ( $p=0,002$ ) em comparação ao Sham-Sed.



**Figura 19.** Ingestão Alimentar. Os valores são média  $\pm$  desvio padrão da média;  $n=6$  ratas por grupo; Grupos Sham operado sedentário (Sham-Sed); Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). g=grama; s= semana. a, diferente de Sham-Sed; b, diferente de Ovx-Sed; c, diferente de Sham-Tr.  $p < 0,05$ .

## 5.2 Expressão Gênica de VEGF-A e de seu receptor VEGF-R2

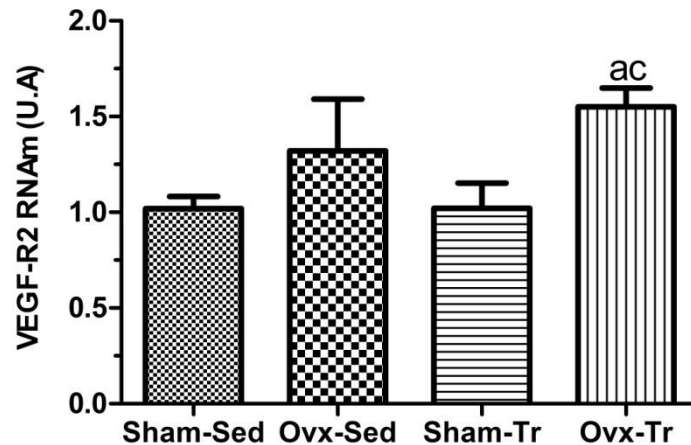
A análise por PCR-RT demonstrou a diminuição na expressão gênica do VEGF-A no tecido adiposo visceral (TAV) do grupo Ovx-Sed ( $p=0,0004$ ) em comparação ao Sham-Sed (Figura 20). No entanto, o treinamento resistido foi eficiente em evitar essa diminuição por meio do aumento da sua expressão (Ovx-Tr,  $p=0,0002$  *versus* Ovx-Sed). Além disso, esse aumento na expressão gênica do VEGF-A no grupo Ovx-Tr também foi maior em comparação tanto ao Sham-Sed quanto ao Sham-Tr ( $p=0,010$ ,  $p=0,0008$ , respectivamente). No entanto, não houve diferença na expressão do VEGF-A entre os grupos que não foram ovariectomizados (Sham-Sed *versus* Sham-Tr).



**Figura 20.** Expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) no tecido adiposo visceral de ratas. Grupos Sham operado sedentário (Sham-Sed); Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). u.a = unidade arbitrária. Valores são médias  $\pm$  desvio padrão da média ( $n= 5-6$  por grupo). a, diferente de Sham-Sed; b, diferente de Ovx-Sed; c, diferente de Sham-Tr.  $p < 0,05$ .

Diferentemente do VEGF-A, a expressão do seu receptor VEGFR-R2 no TAV, não apresentou alteração significativa diante da ovariectomia em comparação ao Sham-Sed (Figura 21). Da mesma maneira, não houve diferença significativa na expressão desse gene no Ovx-Tr quando comparado ao Ovx-Sed. Em contraponto, houve aumento significativo na

expressão do VEGF-R2 no grupo Ovx-Tr em comparação ao grupo Sham-Sed e Sham-Tr ( $p=0,0005$ ,  $p=0,0003$ , respectivamente). Similarmente à expressão do VEGF-A, não houve diferença na expressão do VEGF-R2 entre os grupos Sham-Sed e Sham-Tr.

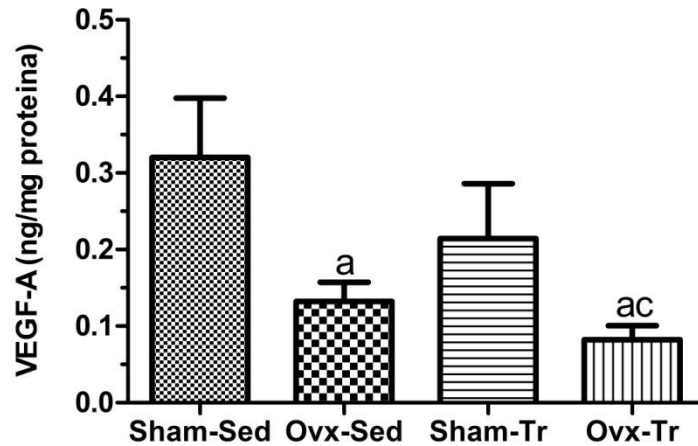


**Figura 21.** Expressão gênica do receptor-2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-R2) no tecido adiposo visceral de ratas. Sham operado sedentário (Sham-Sed); Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). u.a = unidade arbitrária. Valores são médias  $\pm$  desvio padrão da média ( $n = 5-6$  por grupo). a, diferente de Sham-Sed; b, diferente de Ovx-Sed; c, diferente de Sham-Tr.  $p < 0,05$ .

### 5.3 Análise da concentração de VEGF-A por ELISA

Com relação à concentração proteica de VEGF-A, assim como na expressão de RNAm, nota-se que houve significativa diminuição de sua expressão no grupo Ovx-Sed ( $p=0,0009$ ) quando comparado ao grupo Sham-Sed, denotando o efeito da ovariectomia na expressão do VEGF-A no TAV também a nível proteico (Figura 22). Entretanto, diferentemente do que ocorreu com o RNAm de VEGF-A, não houve aumento na concentração proteica de VEGF-A no grupo Ovx-Tr em comparação ao Ovx-Sed. Houve diminuição na concentração de VEGF-A no grupo Ovx-Tr em comparação aos grupos Sham-Sed e Sham-Tr ( $p=0,0003$ ,  $p=0,0175$ , respectivamente). Além disso, assim como na expressão

gênica, não houve diminuição na concentração de VEGF-A entre os grupos Sham-Sed e Sham-Tr.



**Figura 22.** Concentração proteica de VEGF-A por ELISA, no tecido adiposo visceral de ratas. Grupos Sham operado sedentário (Sham-Sed); Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). Valores são médias  $\pm$  desvio padrão da média (n = 4-6 por grupo). a, diferente de Sham-Sed; b, diferente de Ovx-Sed; c, diferente de Sham-Tr.  $p < 0,05$ .

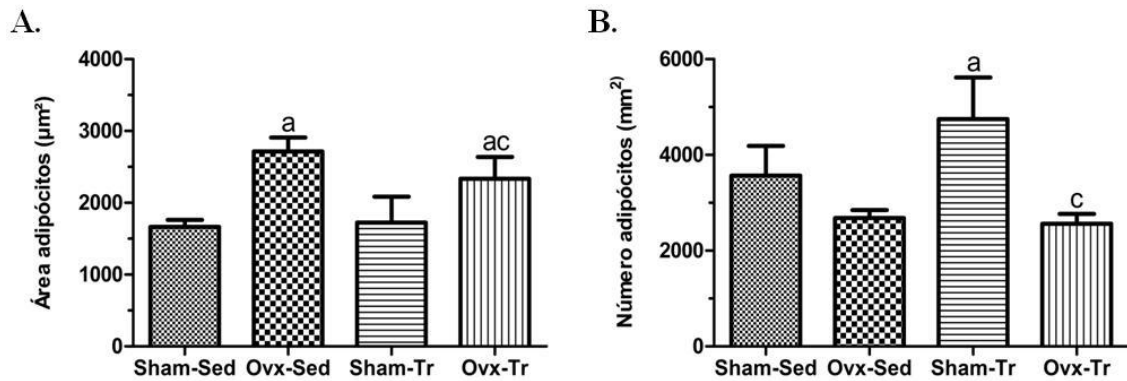
## 5.4 Análises histológicas do tecido adiposo visceral

### 5.4.1 Morfologia do tecido adiposo visceral (HE)

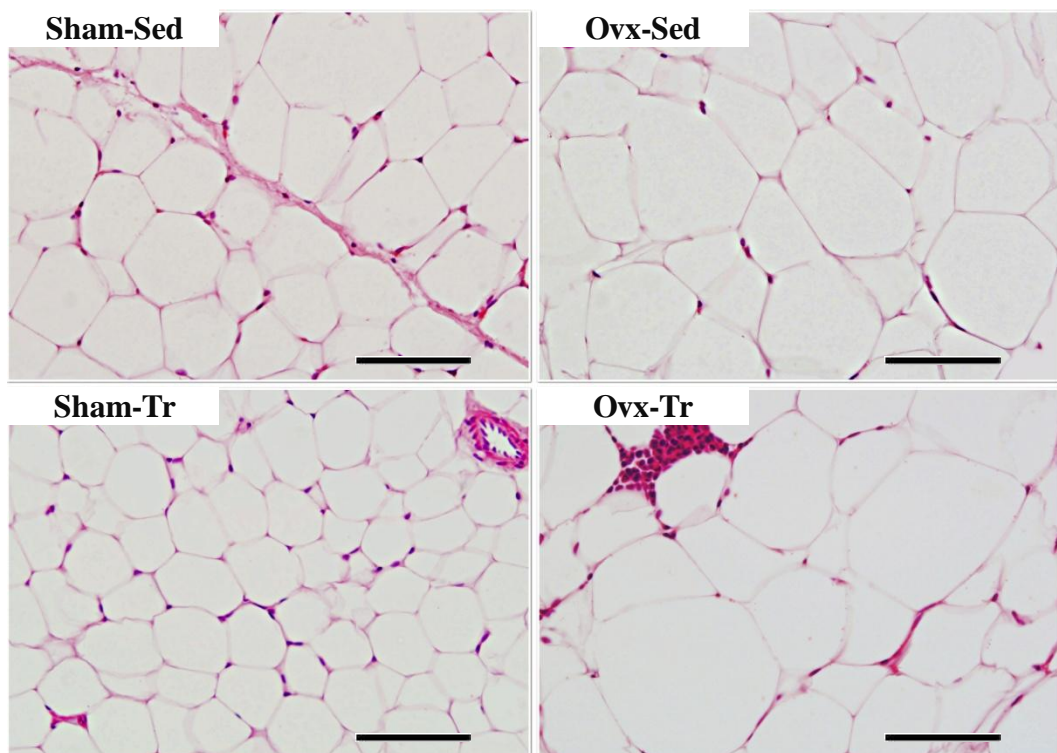
As figuras 23A e 24 demonstram que nas ratas Ovx-Sed houve aumento no tamanho (hipertrofia) dos adipócitos em comparação às Sham-Sed ( $p=0,0003$ ). No entanto, o treinamento não preveniu esse aumento (Ovx-Tr *versus* Ovx-Sed). Houve aumento no tamanho dos adipócitos das ratas Ovx-Tr em comparação às Sham-Sed e Sham-Tr ( $p=0,013$ ,  $p=0,018$ , respectivamente). No entanto, não houve diferença entre o tamanho dos adipócitos do grupo Sham-Sed *versus* Sham-Tr.

As figuras 23B e 24 demonstram que não houve diferença no número (hiperplasia) de adipócitos do grupo Ovx em relação ao Sham, apesar de ter havido considerável tendência à diminuição. No entanto, a densidade de adipócitos é menor no grupo Ovx-Tr ( $p=0,0004$ )

quando comparado ao Sham-Tr. Por outro lado, houve aumento na densidade de adipócitos no grupo Sham-Tr ( $p=0,034$ ) em comparação ao Sham-Sed.



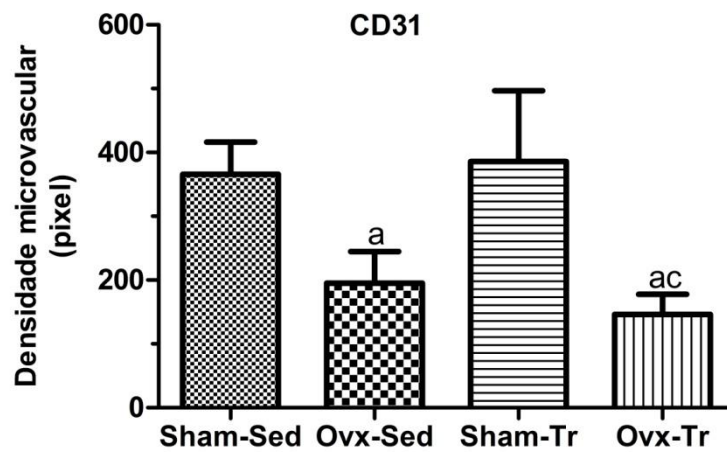
**Figura 23.** Morfologia do TAV. Área dos adipócitos (A); Número de adipócitos (B). Valores são médias  $\pm$  desvio padrão da média, ( $n = 5-6$  ratas por grupo). Sham operado sedentário (Sham-Sed); Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). a, diferente de Sham-Sed; b, diferente de Ovx-Sed; c, diferente de Sham-Tr.  $p < 0,05$ .



**Figura 24.** Morfologia do TAV. Fotomicrografias representativas dos adipócitos dos grupos correspondentes. Coloração HE. Sham operado sedentário (Sham-Sed); Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). Barra correspondente a 20 $\mu\text{m}$  (aumento de 400x).  $p < 0,05$ .

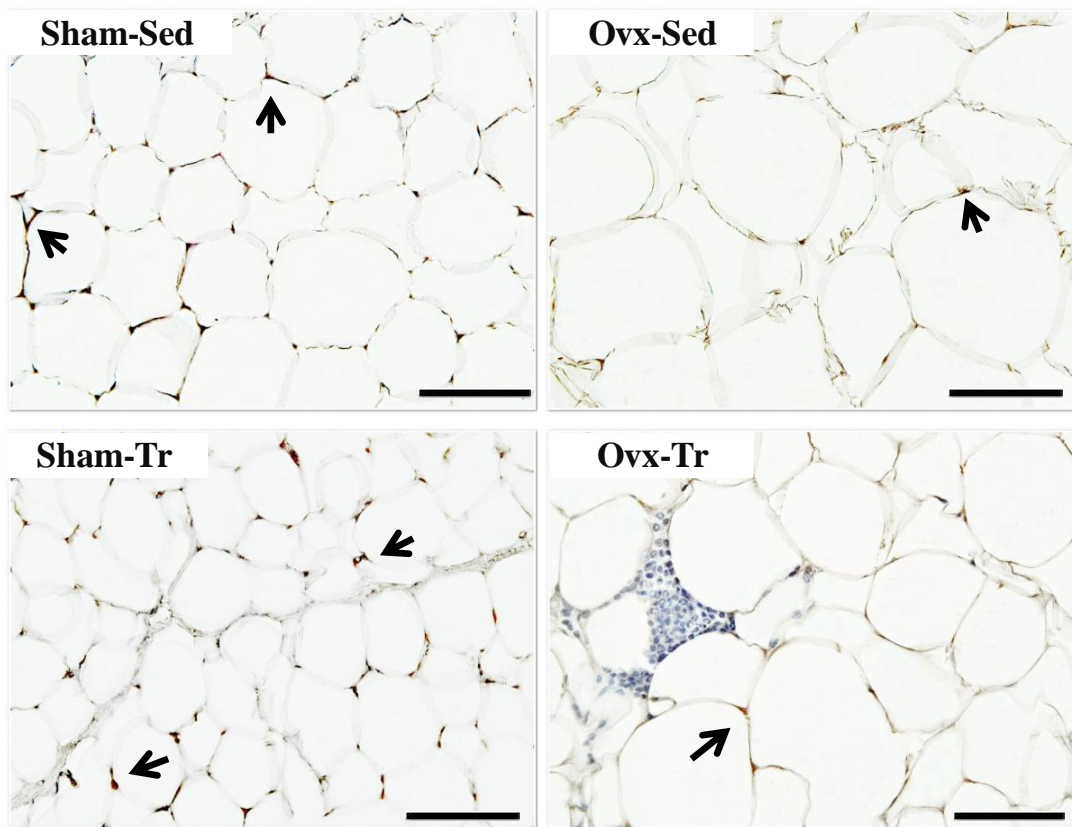
#### 5.4.2 Densidade vascular do tecido adiposo visceral

Houve diminuição na densidade de vasos das ratas Ovx-Sed ( $p=0,018$ ) em comparação às ratas Sham-Sed (Figuras 25 e 26). No entanto, o treinamento não evitou essa diminuição, não havendo diferença entre as ratas Ovx-Sed e Ovx-Tr. Houve diminuição na densidade de vasos do grupo Ovx-Tr em relação ao Sham-Tr e Sham-Sed ( $p=0,001$ ,  $p=0,003$ ). Em adicional, não houve diferença na densidade vascular entre os grupos Sham-Sed e Sham-Tr.



**Figura 25.** Densidade microvascular do TAV. Imunomarcção com o CD31. Valores são médias  $\pm$  desvio padrão da média, ( $n = 5-6$  ratas por grupo). Sham operado sedentário (Sham-Sed); Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). a, diferente de Sham-Sed; b, diferente de Ovx-Sed; c, diferente de Sham-Tr.  $p < 0,05$ .





**Figura 26.** Densidade microvascular do TAV. Fotomicrografias de análise imunohistoquímica dos adipócitos, imunomarcados com o CD31, coloração castanha (setas pretas). Sham operado sedentário (Sham-Sed); Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). Foram mensuradas 6 - 12 seções histológicas por animal. Barra correspondente a 20 $\mu$ m (aumento de 400x).  $p < 0,05$ .



## 6 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram que a ovariectomia (Ovx) promoveu hipertrofia dos adipócitos e diminuição da microdensidade vascular no tecido adiposo visceral (TAV) de ratas e o nosso protocolo de treinamento resistido (TR) não preveniu esses efeitos.

A insuficiência de estrogênio em mulheres na pós-menopausa, contribui para o declínio da massa muscular e da densidade óssea, com a redistribuição de gordura subcutânea para a área visceral e, portanto, para o aumento do risco de doenças cardiovasculares (MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009). Animais ovariectomizados têm sido utilizados como modelos para estudar os efeitos da deficiência dos hormônios ovarianos. Está bem estabelecido que a Ovx promove significativa redução nos níveis de  $17\beta$ -estradiol (E2) em animais, e que esta redução pode promover hiperfagia e aumento da massa corporal (SHINODA, et al., 2002; BABAEI et al., 2010; XU et al., 2012). De fato, no presente estudo, demonstramos que a Ovx resultou em um balanço energético positivo, por meio do aumento da ingestão alimentar bem como da massa corporal das ratas.

Além do balanço energético positivo, a taxa acelerada para estocagem de energia em consequência da privação de estrogênio, também ocorre devido a uma diminuição na taxa metabólica basal, diminuição da termogênese, bem como da atividade voluntária (HEINE et al., 2000; SAENGSIRISUWAN et al., 2009). O estrogênio é capaz de modular a ingestão alimentar e a massa corporal, por meio dos seus receptores localizados no sistema nervoso central (SNC). Ao que parece, grande parte desses receptores estão concentrados na região do núcleo paraventricular (PVN), todavia não estão restritos somente a esta área. Ademais, há evidências de que existe uma interação entre o estrogênio e a colecistoquinina (CCK), um hormônio peptídeo, liberado pelo intestino delgado durante as refeições, promovendo diminuição da ingestão alimentar (BUTERA, 2010; ECKEL, 2011). Em adicional, a leptina

secretada pelos adipócitos atua transferindo sinais catabólicos ao cérebro, também contribuindo para diminuição da ingestão e aumento do gasto energético (FAULDS et al., 2012).

Diversos estudos têm evidenciado a efetiva modulação do estrogênio sobre a expressão e os níveis de VEGF-A e seus receptores em diversas células e tecidos (BAUSERO, et al., 2000; CHRISTODOULAKOS et al., 2004; HERVÉ et al., 2006; FRASER et al., 2008; WALTER; ROGERS; GIRLING, 2010; SUN et al., 2012; XU et al., 2012). No entanto, apesar dos adipócitos expressarem muito mais VEGF-A do que as células estromais vasculares, que incluem macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (YE, 2011), ainda são escassos os estudos que observam a modulação da Ovx nos níveis de VEGF-A e VEGF-R2 no TAV de ratas. Curiosamente, nosso estudo mostrou que a Ovx diminui tanto a expressão gênica quanto a concentração proteica de VEGF-A, sugerindo uma efetiva modulação dos hormônios ovarianos nos níveis de VEGF-A no TAV.

Hervé et al., (2006) demonstraram que o E2, através da modulação do VEGF-A, aumenta a expressão de VEGF-R2 em células endoteliais dos capilares do endométrio de camundongos. No presente estudo, a Ovx não alterou a expressão gênica do VEGF-R2. Aparentemente estes resultados sugerem que o estrogênio não modula diretamente o VEGF-R2 no TAV, uma vez que o VEGF-A esteja diminuído. Outra hipótese seria que a expressão do VEGF-R2 não foi reduzida por influência de algum mecanismo compensatório, na tentativa de aumentar a sensibilidade e eficiência desse receptor e suprir a redução da expressão do VEGF-A. Para uma possível confirmação deste comportamento, seriam necessárias análises mais específicas, as quais não foram realizadas neste estudo.

Recentes estudos com modelos experimentais que superexpressam VEGF-A no tecido adiposo relataram que o mesmo exerce papel protetor essencial contra a fase inicial da obesidade e resistência à insulina induzida por dieta rica em gordura (ELIAS et al., 2012;

SUN et al., 2012). Estes trabalhos sugerem a importância do VEGF-A na manutenção da função desse tecido e que sua deficiência pode ser um preditor no desequilíbrio de sua homeostase.

Isso por que, determinadas alterações na massa do TA, como em casos de expansão, podem alterar consideravelmente a morfologia e as funções dos adipócitos ao que se refere tanto à sua sinalização endócrina e metabólica, quanto à secreção de fatores pró-angiogênicos (ARNER et al., 2010; CAO, 2010). Um estudo de D'Eon et al., (2005) com ratas Ovx demonstrou que o tratamento com o E2 diminui a massa adiposa dos depósitos de gordura intra-abdominal e que essa diminuição coincide com a redução no tamanho dos adipócitos. Neste sentido, nosso estudo demonstrou que a Ovx causa a hipertrofia dos adipócitos. Klöting et al., (2010) em estudo com indivíduos obesos e resistentes à insulina, observaram hipertrofia dos adipócitos tanto no tecido adiposo visceral omental quanto subcutâneo desses indivíduos. Curiosamente, em estudo recente, Sun et al., (2012) demonstraram que a superexpressão de VEGF-A em camundongos transgênicos submetidos a 8 semanas de dieta hipercalórica, promoveu o aumento do gasto energético e diminuição da hipertrofia dos adipócitos no TAB.

Weisberg et al., (2003) sugerem que o tamanho do adipócito é um forte preditor do percentual de macrófagos no tecido adiposo. Corroborando com isto, um estudo recente do nosso grupo e mesmas condições metodológicas do presente trabalho, observou em ratas Ovx e adipócitos hipertrofiados, um aumento significativo da expressão gênica tanto de citocinas e macrófagos pró-inflamatórios quanto de genes lipogênicos no TAV (STOTZER, 2013). Sendo assim, a Ovx parece também promover expressivas perturbações no metabolismo deste tecido.

Desta forma, os adipócitos hipertróficos estão sujeitos a múltiplos estressores citotóxicos que incluem o estresse do retículo citoplasmático, hipóxia, Tnf- $\alpha$  aumentado, espécies reativas de oxigênio (EROs) e ácidos graxos livres (CINTI et al., 2005). Neste

sentido, em outro estudo de nosso grupo, Rodrigues et al., (2013), demonstraram que a Ovx causa significativo aumento nos biomarcadores de estresse oxidativo e diminuição de moléculas antioxidantes no fígado.

Apesar de não termos encontrado diferença significativa, houve uma diminuição de 25% na densidade dos adipócitos das ratas Ovx com expressiva correlação negativa ( $R = -0,72$ ) entre a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos no TAV dessas ratas. Esses resultados, juntamente com a hipertrofia observada, são preocupantes visto que estudos demonstram que indivíduos com adipócitos hipertrofiados e adipogênese reduzida, possuem potencial para o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo 2 (DUBOIS et al., 2006; ISAKSON et al., 2009). Neste contexto, Hoffstedt et al., (2010) em estudo com humanos, demonstraram que independentemente da massa corporal e sexo, a hiperplasia das células adiposas viscerais foram significativamente associadas a um ótimo perfil de glicose, insulina e lipídeos, sem evidência de diabetes ou dislipidemia, quando comparado à hipertrofia dos adipócitos desses indivíduos. No entanto, parece que o aumento no tamanho da célula de gordura, e principalmente associado à redução na capacidade adipogênica das células progenitoras de diferentes depósitos de gordura, que ocorrem durante o curso da obesidade, podem contribuir para a disfunção do tecido adiposo (KLÖTING et al., 2010).

Pudemos observar até então, no presente estudo, que a Ovx causou hipertrofia dos depósitos de gordura visceral, e que estes depósitos possuem níveis reduzidos de VEGF-A, sugerindo não ter havido efetiva concretização do processo angiogênico neste tecido. É necessário ressaltar que, tanto para expansão quanto para a adipogênese do TA, torna-se essencialmente necessária a ativação do processo de neovascularização a fim de garantir a oxigenação e, portanto, nutrição adequada desse tecido (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). Uma vez que isso não ocorre, o tecido pode entrar em estado hipóxico (YE, 2011).

Pang et al., (2008) demonstraram que a densidade vascular encontra-se reduzida no TAB de camundongos obesos (*ob/ob*) e que esta redução associa-se à infiltração de macrófagos, sugerindo que a angiogênese está reduzida no tecido adiposo durante a obesidade. Neste contexto, em nosso estudo, observamos que a Ovx promoveu expressiva diminuição da densidade vascular do TAV, provavelmente em decorrência dos níveis reduzidos de VEGF-A, sugerindo que, possivelmente esse tecido encontra-se em estado hipóxico. Por outro lado, Sun et al., (2012), demonstraram que a superexpressão de VEGF-A, promove angiogênese e supressão da hipóxia e fibrose do TAB em camundongos tratados com dieta rica em gordura.

Desta forma, acreditamos que a Ovx, culminando no aumento da massa corporal, hipertrofia dos adipócitos e diminuição da angiogênese, possa ter contribuído para um desequilíbrio tanto no metabolismo quanto na vascularização, e, portanto, na homeostase do TAV das ratas do nosso estudo.

Diante dos efeitos negativos observados na pós-menopausa e em modelos de Ovx, cada vez mais estudos têm sido realizados, visando encontrar estratégias que possam prevenir ou minimizar esses efeitos. Com base nisso, algumas modalidades de exercícios físicos tem sido recomendadas, incluindo os exercícios contínuos e intermitentes, exercícios de flexibilidade e treinamento resistido (LEITE et al., 2010). Todavia, dentre todos, pouco se sabe sobre a intervenção do treinamento resistido de alta intensidade sobre esses parâmetros, principalmente no TAV.

Pudemos observar resultados interessantes sobre o protocolo de treinamento resistido (TR) e tecido adiposo tanto nas ratas Ovx quanto ratas não-ovariectomizadas (não-Ovx). Inicialmente, quando ratas não-Ovx foram submetidas ao TR, sua ingestão alimentar e massa corporal estavam reduzidas e estáveis em relação aos demais grupos, durante todo o período de treinamento. Ao final de 10 semanas, de fato, o TR diminuiu significativamente a massa

corporal dessas ratas em relação às sedentárias. No entanto, curiosamente observamos um aumento expressivo no número de adipócitos do tecido adiposo visceral dessas ratas. Diante disto, especulamos que possa ter ocorrido um fenômeno denominado "*browning*" dos adipócitos, que se caracteriza na transdiferenciação do adipócito branco em marrom, e que parece estar relacionado não somente ao estímulo da exposição ao frio, como também ao estímulo adrenérgico advindo do exercício físico (CINTI, et al., 2012; DE MATTEIS et al., 2013). Neste contexto, parece que esse processo de transdiferenciação pode ter corroborado para a homeostase metabólica desses animais, aumentando o gasto energético e controlando a ingestão alimentar e massa corporal.

Barbatelli et al., (2010) demonstraram que em camundongos nocauteados para receptores adrenérgicos beta3 no tecido adiposo branco (TAB), não apresentaram o fenômeno da transdiferenciação. No entanto, animais com menor plasticidade do tecido adiposo, isto é, menor capacidade de transdiferenciação, tem maiores chances de desenvolver obesidade e diabetes tipo 2 (FELDMANN et al., 2009). Outro fator importante e recentemente descoberto que corrobora com este fenômeno, é a produção do hormônio irisina pelo músculo esquelético durante o exercício físico. Tem sido demonstrado que este hormônio induz a transdiferenciação do tecido adiposo branco em camundongos além de melhorar o quadro de resistência insulínica e obesidade de camundongos com obesidade induzida pela dieta (BOSTRÖM et al., 2012). As investigações do presente estudo são limitadas em relação aos parâmetros citados acima, no entanto, parece conveniente especular que esse protocolo de TR foi positivo para homeostase do TAV visceral das ratas não-Ovx.

Os mecanismos pelos quais o TR modula os níveis de VEGF-A e angiogênese no tecido adiposo são praticamente escassos. No entanto, existem estudos com exercício aeróbio agudo e crônico, principalmente agudo, demonstrando que o exercício/treinamento modulam

os níveis de VEGF-A e angiogênese no músculo esquelético (ASANO et al., 1998; GUSTAFSSON et al., 1999; GAVIN et al., 2000; BIROT et al., 2003; GAVIN et al., 2004).

Curiosamente, apesar de termos encontrado hiperplasia dos adipócitos do TAV do grupo Sham-Tr em relação ao Sham-Sed, não foi observado aumento da angiogênese ao final das 10 semanas de treinamento. Não foram mensuradas as respostas agudas nestas variáveis, tampouco ao longo dos dias de treinamento, mas é possível que tenha havido diferentes tipos de modulações nas mesmas, desde o início até o último dia de treino. Isto por que, Richardson et al., (2000) em estudo com humanos, realizando extensão do joelho através de ergômetro, observaram nos músculos do quadríceps, um aumento expressivo no RNAm de VEGF-A numa única sessão de exercício (agudo), e depois de 8 semanas de treinamento (crônico) esses níveis foram totalmente atenuados. Interessantemente, Lloyd et al., (2003) em programa de 24 dias de treinamento em esteira com ratos, encontrou aumento na expressão gênica e níveis proteicos de VEGF-A no músculo esquelético (gastrocnêmio branco) somente durante a fase inicial do treinamento e esses níveis diminuíram gradualmente com o progresso do treino, retornando aos valores iniciais. No entanto, a angiogênese foi observada somente a partir do dia 12 de treinamento, o que sugere que o VEGF-A contribui para angiogênese durante a fase inicial do programa de treino. Mediante os nossos achados e os trabalhos descritos acima, nós especulamos que nosso protocolo de treinamento promoveu comportamento similar, mesmo se tratando de metodologias e tecidos diferentes. Ao que parece, ocorre uma adaptação do VEGF-A frente ao treinamento crônico, sendo este então, atenuado no estado treinado, o que caracteriza um possível mecanismo de *feedback* negativo. Estudos mais específicos são necessários para se caracterizar o processo angiogênico no TAV mediante um programa de treinamento resistido agudo e/ou crônico.

A partir de agora iremos descrever os efeitos do TR nas ratas Ovx. A associação do treinamento com a ovariectomia apresentou efeitos distintos aos observados em ratas não-

Ovx. O TR ao final de 10 semanas foi capaz de controlar o perfil hiperfágico observado nas ratas Ovx, no entanto, não diminuiu a massa corporal dessas ratas. Leite et al., (2009) estudando a Ovx e TR, também não observaram diferença na massa corporal das ratas, no entanto, encontraram diminuição no conteúdo lipídico de diferentes depósitos de gordura, e melhora no perfil lipídico dessas ratas. Por outro lado, no nosso estudo, não observamos redução no tamanho e nem no número dos adipócitos, sugerindo que provavelmente o conteúdo lipídico dos depósitos de gordura do TAV não deve ter sido alterado com o treinamento. O ganho de massa corporal, hipertrofia do adipócito e resistência a insulina, por exemplo, parecem estar associadas à uma atividade reduzida do sistema nervoso central (SNC) e reduzido *turnover* de noradrenalina no TAM (DE MATTEIS et al., 2013), sugerindo diminuição da termogênese e gasto energético, que poderia explicar o porquê de não termos observado mudanças na massa e hipertrofia dos adipócitos frente ao TR.

Apesar das diferenças metodológicas, estudos demonstram a efetividade do TR em promover aumento da força muscular, diminuição da massa corporal total e do percentual de massa adiposa de mulheres na pós-menopausa (TEIXEIRA et al., 2003; BOCALINI et al., 2009; FJELDSTAD et al., 2009). Estes resultados contrastam com os nossos, visto que nosso protocolo não foi eficiente em prevenir o aumento da massa corporal e aumento dos adipócitos das ratas Ovx. Neste contexto, Orsatti et al., (2008) em protocolo de 12 semanas de TR, três séries de 8 a 12 repetições a 60-80% de 1 repetição máxima (1RM), com 90 a 120 segundos de descanso entre as séries, demonstrou que apesar de ter promovido aumento da massa muscular, não houve alteração na massa corporal total e massa de gordura, em mulheres na pós- menopausa.

Curiosamente, Pighon et al., (2009) em protocolo TR em escada, com cargas progressivas, 4 vezes na semana, com e/ou sem restrição alimentar e no período de 8 semanas, demonstraram que a combinação do programa de treinamento resistido juntamente com a



restrição alimentar, reduziu a massa corporal, triacilgliceróis no fígado, redução na acumulação lipídica nos adipócitos e melhora da sensibilidade à insulina de ratas ovariectomizadas. Por outro lado, esse comportamento não se manteve quando a restrição alimentar foi abolida e somente o TR foi mantido, sugerindo a importância de se associar o programa de TR a um programa de restrição alimentar, o que poderia explicar nossos resultados. Adicionalmente, Avila et al., (2010) demonstraram que o TR moderado durante perda de peso induzida por dieta, melhora a composição de massa muscular e reduz a massa corporal total de adultos obesos e com sobrepeso, sendo que essas mudanças não foram observadas somente com o programa de perda de peso.

Diante disso, podemos especular que o TR é um componente importante contra os efeitos deletérios da menopausa, no entanto, o nosso protocolo de treinamento resistido por si só, parece não ter sido eficiente em prevenir as alterações na massa corporal total e morfologia dos adipócitos do TAV de ratas Ovx. Desta forma, denota-se a importância em se estabelecer um programa de treinamento com volume, carga, intensidade e período de descanso adequados diante do objetivo a ser alcançado. Adicionalmente, a associação da restrição alimentar e TR parece ser mais efetivo no controle da homeostase energética de ratas Ovx.

Czarkowska-Paczack et al., (2011) mostraram que 6 semanas de treinamento em esteira causa upregulation do RNAm de VEGF-A, no entanto, o mesmo não ocorreu com seus níveis proteicos. Similarmente, em nosso estudo, o TR mostrou-se capaz de restaurar a expressão do RNAm de VEGF-A no TAV, antes reduzida frente a ovariectomia, mas em contra partida não preveniu a diminuição nos níveis proteicos de VEGF-A. Os níveis de sinalização proteica determinam o fenótipo celular bem como sua plasticidade em resposta a sinais externos. Entretanto, essa discrepância entre níveis de RNAm e proteína, sugere a importância de mecanismos de controle adicionais, além da regulação transcricional

(PRADET-BALADE et al., 2001; CZARKOWSKA-PACZACK et al., 2011). Não é possível afirmar quais mecanismos tenham promovido a diferença entre a expressão gênica e concentração proteica de VEGF-A, frente ao treinamento resistido nas ratas Ovx. No entanto, atualmente é evidenciado que pequenas moléculas de RNA, os chamados microRNAs (miRNAs), possuem a habilidade de suprimir a expressão gênica tanto pela ligação em regiões-alvo do RNAm quanto pela inibição da tradução ou degradação do RNAm (MCGREGOR; CHOI, 2011), em diferentes tipos de células, como tecido muscular esquelético (DRUMMOND et al., 2008) e tecido adiposo (MCGREGOR; CHOI, 2011). Isto por que, em mamíferos, diferentes condições fisiológicas podem modular esse *turnover*, visto que miRNAs podem funcionalmente interagir com uma variedade de fatores, incluindo a apoptose, fatores de crescimento, exposição hormonal, estresse, fumo, nutrição, exercício físico, dentre outros (BEVILACQUA et al., 2003; WANG; CUI, 2012).

O treinamento resistido moderado promove repetida e moderada exposição ao estresse oxidativo, estimulando à adaptações que reduzem o insulto oxidativo, como a redução de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e aumento na produção de células enzimáticas antioxidantes (FENSTER et al., 2002). Em contraponto, Margonis et al., (2007) demonstraram em protocolo de treinamento resistido em humanos, volume/intensidade aumentados progressivamente até a condição *overtraining*, induziu a respostas pronunciadas nos biomarcadores de estresse oxidativo de maneira proporcional à carga de treinamento.

No entanto, apesar de não termos realizado nenhuma análise do estresse oxidativo no TAV dessas ratas, nos parece sensato especular que este protocolo de treinamento resistido de alta intensidade, associado aos efeitos deletérios da condição ovariectomia, causou uma somatização desses efeitos, caracterizando-se similarmente à condição “*overtraining*”. Essa nossa linha de raciocínio baseia-se em resultados recentes encontrados por nosso grupo, o qual demonstrou que este protocolo, além de não ter sido capaz de prevenir os danos

oxidativos hepático promovidos pela Ovx, promoveu o aumento dos marcadores de estresse oxidativo no fígado das ratas (RODRIGUES et al., 2013). Sendo assim, acreditamos ser necessário mais estudos envolvendo a metodologia deste programa de treinamento resistido e tecido adiposo, a fim de entender as diferenças encontradas entre os animais não-Ovx e Ovx.

Em conclusão, os principais resultados deste trabalho evidenciaram que a Ovx promoveu a hipertrofia dos adipócitos, a redução nos níveis de VEGF-A e na densidade microvascular dos adipócitos no TAV de ratas. No entanto, o nosso protocolo de treinamento resistido, que foi empregado como possível ferramenta não farmacológica para prevenção dessas alterações, contrariando nossa hipótese, não foi eficiente em preveni-las. Sugerimos que em trabalhos futuros, sejam priorizados o entendimento do treinamento resistido e tecido adiposo em ratas Ovx, através de adaptações nas variáveis intensidade/volume/frequência de treinamento resistido, associadas a dieta padrão e/ou dieta restrita e ao tratamento com o hormônio estradiol, juntamente com os eventos moleculares e fisiológicos envolvidos.

## 7 BIBLIOGRAFIA

AHIMA, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 14 Suppl 5, n. August, p. 242S–49S, ago. 2006.

ARNER, E. et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 105–9, jan. 2010.

ASANO, M. et al. Increase in serum vascular endothelial growth factor levels during altitude training. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 162, n. 4, p. 455–9, abr. 1998.

AVILA, J. J. et al. Effect of moderate intensity resistance training during weight loss on body composition and physical performance in overweight older adults. **European journal of applied physiology**, v. 109, n. 3, p. 517–25, jun. 2010.

BABAEI, P. et al. Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on visceral adipose tissue and serum adiponectin levels in rats. **Menopause international**, v. 16, n. 3, p. 100–4, set. 2010.

BARBATELLI, G. et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 298, n. 6, p. E1244–53, jun. 2010.

BAUSERO, P. et al. Vascular endothelial growth factor is modulated in vascular muscle cells by estradiol, tamoxifen, and hypoxia. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 279, n. 5, p. H2033–42, nov. 2000.

BECHLIOULIS, A. et al. Menopause and hormone therapy: from vascular endothelial function to cardiovascular disease. **Hellenic journal of cardiology : HJC**, v. 50, n. 4, p. 303–15, 2009.

BEVILACQUA, A. et al. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. **Journal of cellular physiology**, v. 195, n. 3, p. 356–72, jun. 2003.

BIROT, O. J. G. et al. Exercise-induced expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. **The Journal of physiology**, v. 552, n. Pt 1, p. 213–21, 1 out. 2003.

BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 19, n. 4, p. 833–42, abr. 2005.

BLÜHER, M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 27, n. 2, p. 163–77, abr. 2013.

BOCALINI, D. S. et al. Strength training preserves the bone mineral density of postmenopausal women without hormone replacement therapy. **Journal of aging and health**, v. 21, n. 3, p. 519–27, jun. 2009.

BOSTRÖM, P. et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463–8, 26 jan. 2012.

BULUT, D. et al. Hormonal status modulates circulating endothelial progenitor cells. **Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society**, v. 96, n. 5, p. 258–63, maio 2007.

BUTERA, P. C. Estradiol and the control of food intake. **Physiology & behavior**, v. 99, n. 2, p. 175–80, 9 fev. 2010.

CAO, Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 9, p. 2362–8, set. 2007.

CAO, Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 9, n. 2, p. 107–15, fev. 2010.

CÉBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJÄLLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 63, n. 5, p. 601–15, mar. 2006.

CHEN, Z. et al. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. **The Journal of clinical investigation**, v. 103, n. 3, p. 401–6, fev. 1999.

CHOW, R. W. Y.; HANDELSMAN, D. J.; NG, M. K. C. Minireview: rapid actions of sex steroids in the endothelium. **Endocrinology**, v. 151, n. 6, p. 2411–22, jun. 2010.

CHRISTIAENS, V.; LIJNEN, H. R. Angiogenesis and development of adipose tissue. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 318, n. 1-2, p. 2–9, 29 abr. 2010.

CHRISTODOULAKOS, G. et al. Effect of hormone therapy, tibolone and raloxifene on circulating vascular endothelial growth factor in Greek postmenopausal women. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 151, n. 2, p. 187–92, ago. 2004.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 11, p. 2347–55, nov. 2005.

CINTI, S. The adipose organ at a glance. **Disease models & mechanisms**, v. 5, n. 5, p. 588–94, set. 2012.

CLAPP, C. et al. Peptide hormone regulation of angiogenesis. **Physiological reviews**, v. 89, n. 4, p. 1177–215, out. 2009.

COLDITZ, G. A. et al. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. **The New England journal of medicine**, v. 332, n. 24, p. 1589–93, 15 jun. 1995.

CONFERENCE, N. I. H. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference statement: management of menopause-related symptoms. **Annals of internal medicine**, v. 142, n. 12 Pt 1, p. 1003–13, 21 jun. 2005.

CROSS, M. J. et al. VEGF-receptor signal transduction. **Trends in biochemical sciences**, v. 28, n. 9, p. 488–94, set. 2003.

CROSS, M. J.; CLAESSEON-WELSH, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. **Trends in pharmacological sciences**, v. 22, n. 4, p. 201–7, abr. 2001.

CUI, J.; SHEN, Y.; LI, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. **Trends in molecular medicine**, v. 19, n. 3, p. 197–209, mar. 2013.

CZARKOWSKA-PACZEK, B. et al. The influence of physical exercise on the generation of TGF- $\beta$ 1, PDGF-AA, and VEGF-A in adipose tissue. **European journal of applied physiology**, v. 111, n. 5, p. 875–81, maio 2011.

D'EON, T. M. et al. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 43, p. 35983–91, 28 out. 2005.

DE MATTEIS, R. et al. Exercise as a new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, v. 23, n. 6, p. 582–90, jun. 2013.

DOMINGOS, M. M. et al. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. **European journal of applied physiology**, v. 112, n. 4, p. 1437–44, abr. 2012.

DRUMMOND, M. J. et al. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 295, n. 6, p. E1333–40, dez. 2008.

DUBOIS, S. G. et al. Decreased expression of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 14, n. 9, p. 1543–52, set. 2006.

ECKEL, L. A. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 4, p. 517–24, 26 set. 2011.

ELIAS, I. et al. Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 61, n. 7, p. 1801–13, jul. 2012.

ELIAS, I.; FRANCKHAUSER, S.; BOSCH, F. New insights into adipose tissue VEGF-A actions in the control of obesity and insulin resistance. **Adipocyte**, v. 2, n. 2, p. 109–112, 1 abr. 2013.

EVANS, W. J. Protein nutrition, exercise and aging. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 6 Suppl, p. 601S–09S, dez. 2004.

FAULDS, M. H. et al. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. **The Journal of endocrinology**, v. 212, n. 1, p. 3–12, jan. 2012.

FELDMANN, H. M. et al. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. **Cell metabolism**, v. 9, n. 2, p. 203–9, fev. 2009.

FENSTER, C. P. et al. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. **Obesity research**, v. 10, n. 9, p. 964–8, set. 2002.

FERRARA, N. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 4–25, 1 fev. 1997.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. **Kidney international**, v. 56, n. 3, p. 794–814, set. 1999.

FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 669–76, jun. 2003.

FJELDSTAD, C. et al. Whole-body vibration augments resistance training effects on body composition in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 63, n. 1, p. 79–83, 20 maio 2009.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 442–47, 23 jan. 1987.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 192–203, 6 nov. 2007.

FORSYTHE, J. A. et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. 9, p. 4604–13, out. 1996.

FRASER, H. M. et al. The role of vascular endothelial growth factor and estradiol in the regulation of endometrial angiogenesis and cell proliferation in the marmoset. **Endocrinology**, v. 149, n. 9, p. 4413–20, set. 2008.

FRAYN, K. N. et al. Integrative physiology of human adipose tissue. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 27, n. 8, p. 875–88, ago. 2003.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 15 dez. 2004.

GAO, H.; DAHLMAN-WRIGHT, K. The gene regulatory networks controlled by estrogens. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 334, n. 1-2, p. 83–90, 1 mar. 2011.

GAVIN, T. P. et al. Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 88, n. 4, p. 1192–8, abr. 2000.

GAVIN, T. P. et al. Angiogenic growth factor response to acute systemic exercise in human skeletal muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 96, n. 1, p. 19–24, jan. 2004.

GIACCA, M. Non-redundant functions of the protein isoforms arising from alternative splicing of the VEGF-A pre-mRNA. **Transcription**, v. 1, n. 3, p. 149–53, jan. 2010.

GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. Loss of bone marrow-derived vascular progenitor cells leads to inflammation and atherosclerosis. **American heart journal**, v. 146, n. 4 Suppl, p. S5–12, out. 2003.

GOLDSTEIN, B. J.; SCALIA, R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2563–8, jun. 2004.

GUSTAFSSON, T. et al. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 2 Pt 2, p. H679–85, fev. 1999.

GUSTAFSSON, T. et al. VEGF-A splice variants and related receptor expression in human skeletal muscle following submaximal exercise. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 98, n. 6, p. 2137–46, jun. 2005.

HAJER, G. R.; VAN HAEFTEN, T. W.; VISSEREN, F. L. J. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **European heart journal**, v. 29, n. 24, p. 2959–71, dez. 2008.

HAUSMAN, G. J.; RICHARDSON, R. L. Adipose tissue angiogenesis. **Journal of animal science**, v. 82, n. 3, p. 925–34, mar. 2004.

HEINE, P. A et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 23, p. 12729–34, 7 nov. 2000.

HEINEMEIER, K. M. et al. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 102, n. 2, p. 573–81, fev. 2007.

HERVÉ, M. A J. et al. Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. **The Journal of endocrinology**, v. 188, n. 1, p. 91–9, jan. 2006.



HO, Q. T.; KUO, C. J. Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 7-8, p. 1349–57, jan. 2007.

HOEBEN, A. et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacological reviews**, v. 56, n. 4, p. 549–80, dez. 2004.

HOFFSTEDT, J. et al. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. **Diabetologia**, v. 53, n. 12, p. 2496–503, dez. 2010.

HYDER, S. M. Sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer. **Endocrine-related cancer**, v. 13, n. 3, p. 667–87, set. 2006.

IEMITSU, M. et al. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 291, n. 3, p. H1290–8, set. 2006.

ISAKSON, P. et al. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1550–7, jul. 2009.

KAJDANIUK, D. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology. **Endokrynologia Polska**, v. 62, n. 5, p. 444–55, jan. 2011.

KARAMYSHEVA, A. F. Mechanisms of angiogenesis. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 7, p. 751–762, 3 ago. 2008.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–56, jun. 2004.

KLÖTING, N. et al. Insulin-sensitive obesity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 299, n. 3, p. E506–15, set. 2010.

KOH, K. K. Effects of estrogen on the vascular wall: vasomotor function and inflammation. **Cardiovascular research**, v. 55, n. 4, p. 714–26, set. 2002.

KRAEMER, W. J. et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 34, n. 2, p. 364–80, fev. 2002.

LAUFS, U. et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 220–6, 20 jan. 2004.

LEITE, R. D. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, v. 34, n. 6, p. 1079–86, dez. 2009.

LEITE, R. D. et al. Menopause: highlighting the effects of resistance training. **International journal of sports medicine**, v. 31, n. 11, p. 761–7, nov. 2010.

LIJNEN, H. R. Angiogenesis and obesity. **Cardiovascular research**, v. 78, n. 2, p. 286–93, 1 maio 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LLOYD, P. G. et al. Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 284, n. 5, p. H1668–78, maio 2003.

LOHELA, M. et al. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 2, p. 154–65, abr. 2009.

LOSORDO, D. W.; ISNER, J. M. Estrogen and Angiogenesis: A Review. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 6–12, 2001.

MAC GABHANN, F.; JI, J. W.; POPEL, A. S. VEGF gradients, receptor activation, and sprout guidance in resting and exercising skeletal muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 102, n. 2, p. 722–34, fev. 2007.

MALTAIS, M. L.; DESROCHES, J.; DIONNE, I. J. Changes in muscle mass and strength after menopause. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 9, n. 4, p. 186–97, 2009.

MARGONIS, K. et al. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. **Free radical biology & medicine**, v. 43, n. 6, p. 901–10, 15 set. 2007.

MATAIX, J. et al. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. **Free radical biology & medicine**, v. 24, n. 4, p. 511–21, 1 mar. 1998.

MATSUMOTO, T.; MUGISHIMA, H. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 13, n. 3, p. 130–5, jun. 2006.

MCGREGOR, R. A.; CHOI, M. S. microRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. **Current molecular medicine**, v. 11, n. 4, p. 304–16, jun. 2011.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **The New England journal of medicine**, v. 340, n. 23, p. 1801–11, 10 jun. 1999.

MILLER, V. M.; DUCKLES, S. P. Vascular actions of estrogens: functional implications. **Pharmacological reviews**, v. 60, n. 2, p. 210–41, jun. 2008.

MORALES, D. E. et al. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. **Circulation**, v. 91, n. 3, p. 755–63, 1 fev. 1995.

MUELLER, S. O.; KORACH, K. S. Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. **Current opinion in pharmacology**, v. 1, n. 6, p. 613–9, dez. 2001.

ORSATTI, F. L. et al. Plasma hormones, muscle mass and strength in resistance-trained postmenopausal women. **Maturitas**, v. 59, n. 4, p. 394–404, 20 abr. 2008.

PANG, C. et al. Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 295, n. 2, p. E313–22, ago. 2008.

PAQUETTE, A. et al. Effects of ovariectomy on PPAR alpha, SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 6, p. 1169–75, 2008.

PASARICA, M. et al. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 718–25, mar. 2009.

PIGHON, A. et al. Resistance training attenuates fat mass regain after weight loss in ovariectomized rats. **Maturitas**, v. 64, n. 1, p. 52–7, 20 set. 2009.

POEHLMAN, E. T. Menopause, energy expenditure, and body composition. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 84, n. 11, p. 1131, nov. 2005.

PRADET-BALADE, B. et al. Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? **Trends in biochemical sciences**, v. 26, n. 4, p. 225–9, abr. 2001.

PRIOR, B. M.; YANG, H. T.; TERJUNG, R. L. What makes vessels grow with exercise training? **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 97, n. 3, p. 1119–28, set. 2004.

RICHARDSON, R. S. et al. Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 279, n. 2, p. H772–8, ago. 2000.

RIVILIS, I. et al. Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch-versus shear stress-induced angiogenesis. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 283, n. 4, p. H1430–8, out. 2002.

RODRIGUES, M. F. C. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on oxidative stress markers in the rat liver. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 68, n. 9, p. 1247–54, set. 2013.

RODRIGUEZ, C. et al. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 285, n. 11, p. 1460–5, 21 mar. 2001.

ROGERS, N. H. et al. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2161–8, maio 2009.

SAENGSIRISUWAN, V. et al. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 58, n. 1, p. 38–47, jan. 2009.

SCHARFMAN, H. E.; MACLUSKY, N. J. Estrogen-growth factor interactions and their contributions to neurological disorders. **Headache**, v. 48 Suppl 2, p. S77–89, jul. 2008.

SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. **BMB reports**, v. 41, n. 4, p. 278–86, 30 abr. 2008.

SHINODA, M.; LATOUR, M. G.; LAVOIE, J.-M. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 26, n. 3, p. 335–43, mar. 2002.

SMORLESI, A. et al. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. **Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 13 Suppl 2, p. 83–96, dez. 2012.

SOARES, R. et al. Evidence for the notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 18, n. 9, p. 2333–43, set. 2004.

SPIEGELMAN, B. M. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 1774–82, jun. 2013.

STREHLOW, K. et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. **Circulation**, v. 107, n. 24, p. 3059–65, 24 jun. 2003.

SUDOH, N. et al. Estrogen prevents oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. **Circulation**, v. 103, n. 5, p. 724–9, 6 fev. 2001.

SUN, K. et al. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 15, p. 5874–9, 10 abr. 2012.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2094–101, jun. 2011.

TANG, J. Y. et al. Calycosin promotes angiogenesis involving estrogen receptor and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in zebrafish and HUVEC. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11822, jan. 2010.

TCHERNOF, A.; POEHLMAN, E. T.; DESPRÉS, J. P. Body fat distribution, the menopause transition, and hormone replacement therapy. **Diabetes & metabolism**, v. 26, n. 1, p. 12–20, fev. 2000.

TEIXEIRA, P. J. et al. Resistance training in postmenopausal women with and without hormone therapy. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 35, n. 4, p. 555–62, abr. 2003.

TRAYHURN, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 1–21, jan. 2013.

WALTER, L. M.; ROGERS, P. A. W.; GIRLING, J. E. Vascular endothelial growth factor-A isoform and (co)receptor expression are differentially regulated by 17 $\beta$ -oestradiol in the ovariectomised mouse uterus. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 140, n. 2, p. 331–41, ago. 2010.

WANG, J.; CUI, Q. Specific Roles of MicroRNAs in Their Interactions with Environmental Factors. **Journal of nucleic acids**, v. 2012, p. 978384, jan. 2012.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–808, dez. 2003.

WEND, K.; WEND, P.; KRUM, S. A. Tissue-Specific Effects of Loss of Estrogen during Menopause and Aging. **Frontiers in endocrinology**, v. 3, n. February, p. 19, jan. 2012.

WOOLARD, J. et al. Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. **Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)**, v. 16, n. 7, p. 572–92, out. 2009.

WRONSKA, A.; KMIEC, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 205, n. 2, p. 194–208, jun. 2012.

WYLIE-ROSETT, J. Menopause, micronutrients, and hormone therapy. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 5, p. 1223S–1231S, maio 2005.

XU, J. et al. Estrogen improved metabolic syndrome through down-regulation of VEGF and HIF-1 $\alpha$  to inhibit hypoxia of periaortic and intra-abdominal fat in ovariectomized female rats. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 8, p. 8177–85, ago. 2012.

YE, J. et al. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 293, n. 4, p. E1118–28, out. 2007.

YE, J. Adipose tissue vascularization: its role in chronic inflammation. **Current diabetes reports**, v. 11, n. 3, p. 203–10, jun. 2011.

YE, P. et al. Regulation of global gene expression by ovariectomy and estrogen in female adipose tissue. **Obesity research**, v. 13, n. 6, p. 1024–30, jun. 2005.

ZHAO, C.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J.-Å. Estrogen signaling via estrogen receptor {beta}. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 51, p. 39575–9, 17 dez. 2010.