



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



**ULIANA SBEGUEN STOTZER**

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE  
O METABOLISMO LIPÍDICO, A INFLAMAÇÃO E  
A MORFOMETRIA DO TECIDO ADIPOSO  
DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**São Carlos  
2013**



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



**ULIANA SBEGUEN STOTZER**

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE  
O METABOLISMO LIPÍDICO, A INFLAMAÇÃO E  
A MORFOMETRIA DO TECIDO ADIPOSE  
DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas associação ampla UFSCar/Unesp da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutora.

Área de concentração: Biologia Molecular do Exercício.

Orientadora: Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo.

Apoio Financeiro: CNPq.

**São Carlos  
2013**

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

S888etr

Stotzer, Uliana Sbeguen.

Efeitos do treinamento resistido sobre o metabolismo lipídico, a inflamação e a morfometria do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas / Uliana Sbeguen Stotzer. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
99 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fisiologia do exercício físico. 2. Ovariectomia. 3. Obesidade. 4. Tecido adiposo intra-abdominal. 5. Tecido adiposo visceral. I. Título.

CDD: 612.04 (20<sup>a</sup>)

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

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado de Uliana Sbeguen Stotzer

Dia 04/06/2013

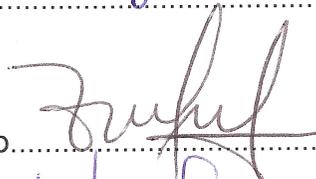
Profª. Drª. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo.....



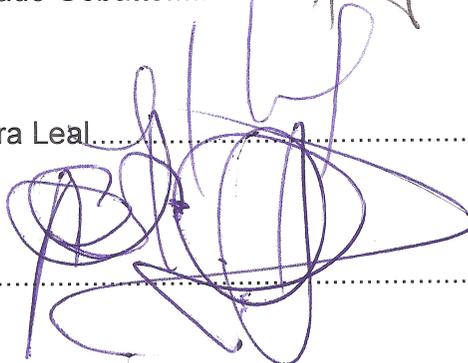
Profª. Drª. Rozangela Verlengia.....



Profª. Drª. Fulvia de Barros Manchado Gobatto.....



Profª. Drª. Ângela Merice de Oliveira Leal.....



Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto.....

Ao amor eterno, incondicional, que sustenta.  
Ao amor entre pais e filhos,  
que tudo me ensina,  
dia após dia...

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, batalhadora incansável, que um dia me abriu as portas da oportunidade, sem o que eu não conseguiria alcançar meu sonho, sonho de fazer o que idealizei ainda na adolescência, mesmo sem saber direito o que era. Obrigada por acreditar em mim, por me apoiar, me oferecer suporte e liberdade, por respeitar minhas limitações e me ensinar a superá-las, por me conduzir até este momento. Minha eterna gratidão.

Aos meus pais Maria Madalena e Siegfried (em memória). Eu jamais teria conseguido, não fossem os constantes e incansáveis apoio e incentivo. Obrigada por tudo, por terem sempre investido e acreditado em mim. Nada eu seria se não fosse vocês, minha externa gratidão.

Às minhas filhas Ana Júlia e Ana Beatriz. Renovação, esperança, direcionamento. Amor incondicional que tanto ensina, dia após dia. Obrigada pelo sorriso e alegria de cada dia, pelas palavras, pelos desenhos...obrigada por existirem. Obrigada sobretudo pela paciência e pela compreensão nos momentos que tive que me afastar, e que não foram poucos.

Aos meus irmãos Erika e Guilherme, ao meu esposo Fábio, aos meus cunhados Rodrigo e Nádia. Simplesmente...família! Por tudo, tudo, obrigada. A minha grande amiga/irmã Tatiana, indescritível! A Milena, a Márcia, amáveis amigas de infância. As amigas da época de república, a Alice, Aline, Carol, Dani Modna, Dani Monster, Denise, Helô, Lilian, Lú, Neiva, Sakê, Tati piu. República que o amor transformou em família para sempre. Ao (tio) Paulo, meu caro, Obrigada! A Cristiane, falta sua todos os dias. Como vocês são importantes na minha vida. *“enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!... é delicioso que eu saiba e sinta que eu os adoro...” (Vinícius de Moraes).*

Ao professor Sérgio, por sempre ter aberto com muita alegria as portas do seu laboratório. Aos amigos e companheiros Maria Fernanda e Matheus, por terem compartilhado os árduos períodos com os animais. A todos que também ajudaram nesta tarefa Marcão, Salsicha, Yone, Camila, Renata, Luciane, Juliano e Nuno. Aos alunos da fisiologia do exercício, Marina, Gustavo, Fabiano, Rodrigo, Natália, Zé Neto e tantos outros, sempre receptivos e com muito conhecimento para trocar. Meus eternos agradecimentos.

Às professoras Ana Cláudia Mattiello Sverzut e Isis do Carmo Kettelhut, da USP Ribeirão, por terem me recebido com tanto carinho e atenção em seus laboratórios. Obrigada pelos ensinamentos e pela paciência.

Aos alunos de iniciação científica e amigos que tanto colaboraram com meu projeto, Guilherme e Erika. Meu muito obrigada.

Aos professores Juca, Vilmar, Keiko e Gerson. A todos os professores do departamento de Fisiologia, pela atenção, respeito e conhecimento transmitido. Aos técnico Cacau, pelos ensinamentos, ajuda de sempre com os animais e pela amizade. A Diose, por tanto empenho. A Teresa, sempre ajudando e ensinando com muita disposição e ânimo. À Natália e aos técnicos do LBBM Beth e Zé Roberto, pelos auxílios no laboratório.

Aos amigos e companheiros do LBBM Márcia, Juliana, Carmen, Rita, Fernanda, Adriana, Kelli, Carol, Cintia, Vinícius, Patty, Camila, Araceli, Patrícia, Dani, Graziela, Rafaela, Natália, Antônio, Rafael, Tamires, por todos os momentos, pela convivência, ensinamentos, troca de experiências e pelas muitas conversas, cafés e risadas.

À querida Márcia, secretária da fisiologia do exercício, uma grande pessoa. Ao Thiago, João, Sabrina. A Anabelle, querida, e ao Rafael (USP).

Desculpem se me esqueci de alguém, mas gostaria de agradecer, de coração *“a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.”* (Augusto Branco).

Á todos que acreditam na pesquisa.

Ao CNPq, pela bolsa e pelo financiamento do projeto, que proporcionaram a realização deste doutorado.



(Pintura de Graham Gercken – 1960)

## RESUMO

A obesidade visceral é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares. Após a menopausa, as gorduras passam a ser depositadas preferencialmente em locais viscerais e surgem desordens no metabolismo lipídico e um quadro inflamatório crônico de baixa intensidade. O treinamento resistido (TR) possui efeitos benéficos na pós-menopausa, mas não se sabe se ele é efetivo para normalizar as desordens do tecido adiposo visceral. Para pesquisar estas respostas, ratas *Sprague-Dawley* adultas foram divididas em 4 grupos (n=6 por grupo): Sham sedentárias (SHAM), ovariectomizadas sedentárias (OVX), sham treinadas (SHAM-TR) e OVX-TR. A cirurgia foi realizada quando as ratas estavam com 250 gramas. Após 3 semanas, os grupos treinados iniciaram um programa de treinamento de 10 semanas (3x por semana) de escalada (4-9 repetições) em uma escada vertical de 1,1 m de altura com sobrecargas progressivas de 65%, 85%, 95% and 100% da carga máxima do rato. As ratas foram sacrificadas 92 dias após a ovariectomia e 48 horas após a última sessão de treino. Os tecidos adiposos mesentérico, parametrial e subcutâneo foram preparados em colidina e tetróxido de ósmio para análises morfométricas e parte do tecido mesentérico foi armazenado para análises de expressão gênica por PCR quantitativa. O treinamento resistido evitou o aumento de massa corporal provocado pela ovariectomia, consumo alimentar, eficiência alimentar e a área dos adipócitos mesentérico e subcutâneo, mas não do parametrial. Além disso, evitou a alta expressão dos genes lipogênicos PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c e de seus genes alvos ACC e SCD-1. Adicionalmente, o TR, aumentou a expressão do gene da  $\beta$ -oxidação mitocondrial CPT-1 nas ratas OVX-TR. O TR também evitou a condição inflamatória de baixa intensidade instaurada nas ratas OVX, demonstrado pelo acúmulo de macrófagos (F4/80 e CD11b), aumento de células Th1 ativadas (IFN- $\gamma$ ) e de mediadores pós-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), além de criar um ambiente anti-inflamatório (IL-10). Os resultados deste trabalho refletem um significativo efeito profilático do treinamento resistido sobre parâmetros fisiológicos e moleculares na falta dos hormônios ovarianos. Portanto, podemos sugerir que este pode ser um vantajoso tratamento de baixo custo no período pós-menopausal, se adequadamente prescrito.

**Palavras-chave:** Exercício. Ovariectomia. Inflamação. Tecido adiposo visceral. Metabolismo lipídico. Treinamento resistido. Obesidade.

## ABSTRACT

Visceral obesity is an important risk factor cardiovascular diseases. After menopause, fat distribution shifts to visceral depots leading to lipid metabolism disorders and chronic low-grade inflammation. Resistance training (RT) has beneficial effects in postmenopausal women, but its effectiveness in normalizing visceral adipose tissue disorders is not well understood. To address this questions adult female *Sprague-Dawley* rats were randomly divided into six groups (n=6 per group): sham-sedentary (SHAM), ovariectomized- sedentary (OVX), SHAM-trained (S-T), OVX-T. Sham or ovariectomy procedure was performed with 250 grams. Three weeks after the surgery, trained groups started 10 weeks of climbing in a 1.1-m vertical ladder with progressive load of 65%, 85%, 95% and 100% of rat's previous maximal overload. All animals were killed 92 days after being ovariectomized and trained animals were killed 48 hours after the last training session. Mesenteric, parametrial and subcutaneous adipose tissues were prepared for morphometric analyses in colidina and osmium tetroxide and part of mesenteric adipose tissue was stored for mRNA analyses by quantitative PCR. Resistance training prevented ovariectomy-induced higher body weight, food intake, feeding efficiency and mesenteric and subcutaneous, but not parametrial adipocyte area. In addition, RT avoided OVX-induced upregulation in the lipogenic genes PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c and its downstream targets SCD-1 and ACC gene expression. Further, RT increases the gene expression of mitochondrial  $\beta$ -oxidation enzyme CPT-1 in OVX rats. RT also prevented the chronic low-grade inflammation in OVX group, demonstrated by the presence of macrophage markers (F4/80 and CD11b), increase in activated Th1 cells (IFN- $\gamma$ ) and the proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6). RT additionally created an anti-inflammatory (IL-10) environment. The present results reflect a powerful prophylactic effects of resistance training in preventing pathological effects of estrogen deficiency, both at physiological and molecular levels. Therefore, we suggest that this may be an advantageous low cost-effective treatment at post-menopausal phase, since appropriately prescribed.

**Keywords:** Exercise. Ovariectomy. Inflammation. Visceral adipose tissue. Lipid metabolism. Resistance training. Obesity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Ilustração de três tipos distintos de células adiposas. (a) Célula adiposa branca; (b) Célula adiposa bege; (c) Célula adiposa marrom \*Gota lipídica (adaptado de Spiegelman, 2013)..... 20
- Figura 2:** Esquema ilustrando os dois possíveis mecanismos de desenvolvimento da obesidade: hiperplasia (aumento do número de células) e/ou hipertrofia (aumento do tamanho das células). MSCs células tronco mesenquimais (adaptado de Bae; Kim; Lee, 2012)..... 23
- Figura 3.** O TA em humanos. O TA visceral está associado com maior risco de diversas doenças metabólicas e mortalidade enquanto o TA subcutâneo e o marrom estão associados com um melhor metabolismo (adaptado de Tran; Kahn, 2010). ..... 25
- Figura 4.** Esquema que representa as denominação dos tipos de obesidade em relação a distribuição dos locais de depósito de gordura. A obesidade androide ou tipo maçã (esq.) evidencia depósito de gordura visceral. Na obesidade ginóide ou tipo pera (dir.), predomina o acúmulo de gordura subcutânea. Indivíduos com obesidade tipo maçã apresentam maior risco à saúde (adaptado de Harvey; Ferrier, 2012). ..... 26
- Figura 5.** Expectativa de vida no Brasil (adaptado de IBGE, 2009)..... 27
- Figura 6.** Mudanças induzidas pela obesidade na infiltração e polarização de macrófagos (Galic; Oakhill; Steinberg, 2010)..... 34
- Figura 7.** Esquema para a relação entre massa muscular, anormalidades metabólicas e inflamação. O treinamento resistido possui um efeito único sobre (1) a massa muscular e força e portanto, sobre (2) o clearance de glicose por reduzir a sarcopenia e o ganho de massa gorda. Dessa forma, o treinamento resistido pode (3) diminuir a gordura visceral e mudar a distribuição de gordura corporal assim, (iv) modificando anormalidades metabólicas e a inflamação. Os efeitos anti-inflamatórios do treinamento resistido podem ser mediado via tanto uma redução da massa de gordura visceral quanto a indução de um ambiente anti-inflamatório criado com cada sessão de exercício (Strasser; Arvandi; Siebert, 2012)..... 39
- Figura 8.** Organograma dos grupos experimentais ..... 44

<b>Figura 9.</b> Etapas do procedimento cirúrgico. (a) Anestésicos utilizados. (b) Remoção dos ovários. (c) Recolocação no útero na cavidade abdominal. (d) Recuperação pós-cirúrgico em caixas individuais em local aquecido (acervo pessoal).....	46
<b>Figura 10.</b> Modelo experimental. (a) Dimensões da escada utilizada; (b) aparatos de sobrecarga; (c) rata realizando o treinamento (acervo pessoal).....	48
<b>Figura 11.</b> Exemplo de gel de RNA. As setas vermelhas indicam amostras que perderam a integridade durante a extração e precisaram serem refeitas. Nas outras linhas é possível visualizar a integridade das bandas ribossomais 18 e 28 s (acervo pessoal). .....	51
<b>Figura 12.</b> Validação de amplificação específica para os produtos da PCR (a) Ilustração da formação de apenas um pico na curva de melting. . (b) Exemplo de confirmação da amplificação do gene esperado, identificado pela formação de apenas uma banda e no tamanho esperado, feito em gel de agarose. As amostras aplicadas no gel são o produto do qPCR.....	53
<b>Figura 13.</b> Exemplo de curvas de amplificação de PCR em tempo real ilustrando o padrão de amplificação de (a) gene constitutivo e; (b) gene alvo.....	53
<b>Figura 14.</b> Representação do resultado de coleta do esfregaço vaginal. Após o procedimento cirúrgico, as ratas pseudo- ovariectomizadas continuaram a ciclar normalmente. As ratas ovariectomizadas bilateralmente apresentaram sempre os mesmos tipos de células, característica da fase diestro. ....	55
<b>Figura 155.</b> Comparação da carga máxima incremental dos grupos SHAM-TR e ratas OVX-TR ao longo das semanas de treinamento (n=6 por grupo). SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são médias ± EPM.....	56
<b>Figura 166.</b> Comparação da eficiência alimentar entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>a</sup> p <0,05, <sup>bb</sup> p <0,001 vs OVX.....	58
<b>Figura 17.</b> Área das células adiposas (a) mesentérica, (b) parametrial e (c) subcutânea das ratas dos grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR. (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>a</sup> p <0,05, <sup>aa</sup> p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup> p <0,001 vs OVX, <sup>cc</sup> p <0,001 vs SHAM-TR.....	59
<b>Figura 18.</b> Comparação da expressão gênica de PPAR-γ entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham	

- sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX..... 60
- Figura 19.** Comparação da expressão gênica de (a) SREBP-1c, (b) SCD-1 e (c) ACC entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX, a <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR. .... 62
- Figura 20.** Comparação da expressão gênica de CPT-1 entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX, a <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR. .... 63
- Figura 21.** Comparação da expressão gênica de HSL entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX, a <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR..... 64
- Figura 22.** Comparação da expressão gênica de (a)MCP-1, (b) Osteopontina e (c) Rantes entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>a</sup>p <0,05 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX, <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR..... 65
- Figura 23.** Comparação da expressão gênica de (a) F4/80 e (b) CD11b entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>b</sup>p <0,05, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX. .... 66
- Figura 24.** Comparação da expressão gênica de IFN-γ entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX ..... 67

**Figura 25.** Comparação da expressão gênica de IL-1B (a), IL-6 (b) e TNF- $\alpha$  (c) entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX. .... 68

**Figura 26.** Comparação da expressão gênica de arginase-1 entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX, <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR. .... 69

**Figura 27.** Comparação da expressão gênica de IL-10 entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX e <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR..... 70

**Figura 28.** Comparação das relações IL-10/ TNF- $\alpha$  entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX e <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR..... 70

**Figura 29.** Função protetora do treinamento resistido sobre o tecido adiposo visceral mesentérico de ratas ovariectomizadas. (a) Nas ratas OVX, a área dos adipócitos aumenta, ocorre a infiltração e ativação de macrófagos M1 de células T helper 1 e (b) a expressão dos genes lipogênicos permanece alta, mesmo no jejum. O aumento na expressão de ACC indica formação de Malonil Coa em grande quantidade, o que inibi a CPT-1. O aumento na expressão de PPAR- $\gamma$  provavelmente está estimulando a expressão de arginase 1 nestas ratas OVX, o que parece ser um mecanismo protetor que retarda o surgimento da RI em roedores OVX. (c) O treinamento resistido normaliza todos estes parâmetros. Reduz a inflamação e adicionalmente aumenta a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10. d) Inibi a elevada expressão dos genes lipogênicos no jejum. A redução de ACC resulta em menor formação de Malonil Coa, que para de inibir a CPT-1 e aumenta nas ratas OVX treinadas, indicando maior B-oxidação mitocondrial..... 83

**Figura 30.** (a) e (b) são géis com as mesmas amostras, corrido e bloqueados da mesma forma. Porém (a) foi incubado com uma diluição nova 1:100 do anticorpo e (b) foi o

segundo uso do anticorpo na mesma diluição. (c) Teste de concentração de proteína. Observe que quanto maior a concentração, mais bandas perto de 26 KDa e menor a intensidade próximo a 55 KDa..... 97

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação dos genes de interesse por qRT-PCR. ....	52
Tabela 2. Medidas fisiológicas das ratas SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR. ....	57

## LISTA DE SIGLAS

ACC Acetil-CoA carboxilase

AG Ácido graxo

aP2 proteína do adipócito 2

CDs células dentríticas

CPT-1 Carnitina palmitoil-transferase 1

FAS ácido graxo sintetase

FVE fração vascular estromal

HSL Lipase sensível a hormônio

IFN interferon

IL interleucina

LPL lipopolisacarídeo

MCP-1 proteína-1 quimioatraente de monócitos

MSCs células tronco mesenquimais

NO óxido nítrico

RI resistência à insulina

OVX Ovariectomizadas

PPAR- $\gamma$  Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gamma

RNAm Ácido Ribonucleico mensageiro

RNases ribonucleases

RPLPO Proteína ribossomal grande

SCD-1 estearoil coenzima dessaturase-1

SREBP-1c elemento regulado por esteróis-1c

TA tecido adiposo

TAB tecido adiposo branco

TAM tecido adiposo marrom

TAP Tecido adiposo visceral perigonadal

TAS tecido adiposo subcutâneo

TAV tecido adiposo visceral

TCA ciclo do ácido carboxílico

TG triacilgliceróis

Th célula *T helper*

TNF fator de necrose tumoral

TR treinamento resistido

TRA treinamento aeróbio

TRH terapia de reposição hormonal

UCP uncoupling protein

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1</b>	<b>O Tecido Adiposo.....</b>	<b>20</b>
1.1.1	Tecido Adiposo Branco.....	22
<b>1.2</b>	<b>Aspectos fisiopatológicos da obesidade .....</b>	<b>26</b>
<b>1.3</b>	<b>Menopausa.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4</b>	<b>Metabolismo dos ácidos graxos e dos triacilgliceróis .....</b>	<b>29</b>
<b>1.5</b>	<b>Inflamação crônica de baixa intensidade.....</b>	<b>32</b>
<b>1.6</b>	<b>Exercício .....</b>	<b>35</b>
1.6.1	Princípios do treinamento físico.....	36
1.6.2	Exercício Resistido .....	38
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>42</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>42</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b>Período Experimental .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3</b>	<b>Plano experimental .....</b>	<b>44</b>
Grupos Sham (Pseudo Ovariectomizado) .....		44
Grupos Ovariectomizadas .....		45
Animais sedentários .....		45
Animais Treinados.....		45
Procedimentos Cirúrgicos da Ovariectomia (OVX) .....		45
Controle do ciclo estral .....		46
<b>3.4</b>	<b>Protocolo de treinamento .....</b>	<b>47</b>
<b>3.5</b>	<b>Sacrifício dos animais e retirada dos tecidos .....</b>	<b>49</b>
<b>3.6</b>	<b>Eficiência alimentar .....</b>	<b>49</b>
<b>3.7</b>	<b>Glicemia de jejum .....</b>	<b>49</b>
<b>3.8</b>	<b>Análise Morfométrica .....</b>	<b>50</b>
<b>3.9</b>	<b>Extração do RNA total e controle de qualidade .....</b>	<b>50</b>
3.9.1	Tratamento com DNase e Transcrição reversa.....	51
3.9.2	PCR em tempo real .....	51

<b>3.10</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Controle do ciclo estral e massa do útero .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>Carga de carregamento .....</b>	<b>55</b>
<b>4.3</b>	<b>Glicemia de jejum .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>Ingestão alimentar, massa corporal, e eficiência alimentar .....</b>	<b>56</b>
<b>4.5</b>	<b>Área dos adipócitos .....</b>	<b>58</b>
<b>4.6</b>	<b>Expressão de genes que coordenam o metabolismo lipídico .....</b>	<b>60</b>
4.6.1	Adipogênese e lipogênese .....	60
4.6.2	Principais reguladores da lipogênese .....	61
4.6.3	B-oxidação .....	62
4.6.4	Lipólise .....	63
<b>4.7</b>	<b>Expressão de genes relacionados à inflamação crônica de baixa intensidade .....</b>	<b>64</b>
4.7.1	Quimioatraentes de monócitos .....	64
4.7.2	Identificadores da presença de macrófagos .....	66
4.7.3	Ativador de macrófagos M1 .....	67
4.7.4	Citocinas inflamatórias .....	67
4.7.5	Identificador de macrófagos M2a ativados .....	69
4.7.6	Citocina anti-inflamatória .....	69
4.7.7	Relação IL-10/TNF- $\alpha$ .....	70
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>
	<b>APÊNDICE A – TENTATIVAS DE WESTERN BLOTTING .....</b>	<b>96</b>
	<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>99</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com a necessidade atual de dividir seu tempo entre várias obrigações, como trabalho, filhos, casa, quando a mulher se dá conta, já está na meia idade e uma nova etapa da vida se iniciará, a vida na pós-menopausa.

Na menopausa ocorre a interrupção permanente da atividade folicular ovariana, o que gera a insuficiência dos hormônios ovarianos, incluindo o estrogênio, um importante hormônio que regula diversos processos metabólicos, como homeostase da glicose, metabolismo lipídico, processo de recuperação do músculo esquelético e calcificação óssea. Em adição, após a menopausa ocorre redução da massa magra, aumento da massa gorda, preferencialmente a visceral fatores estes que predis põem a resistência à insulina e dislipidemia

A partir da revisão de literatura apresentada na introdução deste trabalho pretendemos fornecer, por meio de uma seleção reduzida da vasta literatura, uma visão geral dos principais pontos relacionados ao tecido adiposo, menopausa, metabolismo lipídico, inflamação crônica de baixa intensidade e treinamento resistido e dessa forma, conduzir a leitura para a necessidade que se propôs este estudo. Considerando a impossibilidade médica e/ou o receio da mulher em relação aos efeitos colaterais do tratamento de reposição hormonal pós-menopausa, este trabalho objetivou buscar, por meio da manipulação no estilo de vida sedentário/fisicamente ativo, melhorar a fisiopatologia do tecido adiposo na ausência dos hormônios ovarianos.

Considerando o importante envolvimento do tecido adiposo visceral com diversas patologias e o objetivo deste trabalho que foi estudar os efeitos do treinamento crônico neste tecido, utilizamos o modelo de ovariectomia em ratas para estudar o proposto por este estudo, devido à impossibilidade de obter amostras humanas desse tecido em situação onde a cirurgia não se faz necessária.

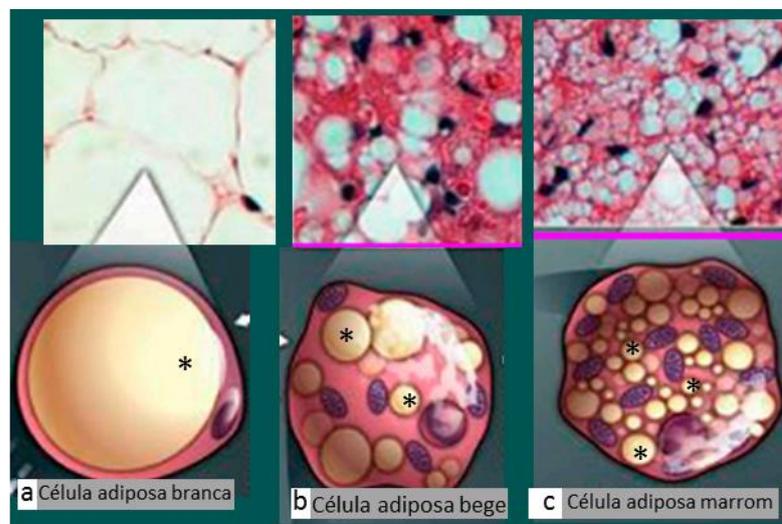
A ovariectomia de roedores é uma maneira de mimetizar a perda do hormônio ovariano humano, sendo um modelo animal amplamente utilizado em pesquisas. Utilizada na idade adulta destes animais, a ovariectomia também promove a distinção entre possíveis fatores que possam confundir os efeitos da falta dos hormônios ovarianos com efeitos provocados pelo envelhecimento.

## 1.1 O Tecido Adiposo

O tecido adiposo (TA) é o local primário de estoque de energia no corpo, além de ser um importante órgão endócrino. O TA secreta diversos hormônios e fatores envolvidos na regulação de várias funções fisiológicas, como controle da ingestão alimentar e gasto energético, resposta imunológica, reprodução, sensibilidade à insulina e crescimento vascular e esquelético (Lin et al., 2005; Majka et al., 2010)

Além de adipócitos preenchidos com lipídios, no TA são encontradas células endoteliais (que formam uma extensiva vasculatura), pericitos (células tipo mesenquimais que têm o potencial para se tornarem adipócitos, entre outras células, o que depende do meio em que se encontram), fibroblastos (fornecem apoio estrutural), pré-adipócitos (células parcialmente destinadas a se tornarem adipócitos), mastócitos (influenciam a angiogênese e o remodelamento) e células imunológicas (macrófagos e células T residentes) (Lee; Wu; Fried, 2010).

Historicamente, o TA foi dividido anatomicamente em duas categorias: TA branco (TAB) e TA marrom (TAM) (Fig 1 a e c). Estudos anatômicos mostraram que os dois tipos de TA estão presentes em diversos locais, formando um órgão adiposo de múltiplos depósitos (Smorlesi et al., 2012).



**Figura 1:** Ilustração de três tipos distintos de células adiposas. (a) Célula adiposa branca; (b) Célula adiposa bege; (c) Célula adiposa marrom \*Gota lipídica (adaptado de Spiegelman, 2013).

Os adipócitos marrons são células termogênicas fortemente reguladas pelo sistema nervoso simpático para manter a temperatura do corpo, em situações onde os mamíferos são expostos a temperaturas abaixo da termoneutralidade (faixa de temperatura ambiente onde o animal não sofre estresse nem pelo frio nem pelo calor). Os adipócitos marrons estocam triacilgliceróis em várias e pequenas gotículas lipídicas localizadas no citoplasma. Devido a isso, são capazes de catabolizar rapidamente grandes quantidades de ácidos graxos (AG). Para produzir calor os adipócitos marrons são ativados por nervos simpáticos que atuam em beta3-adrenoceptores (beta3AR) para queimar os AG somente de sua pequena esfera ao redor da mitocôndria. Neste processo, a uncoupling protein (UCP) 1 desacopla a fosforilação oxidativa, o que resulta em dissipação de energia na forma de calor, ao invés de gerar energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) (Smorlesi et al., 2012).

As células do TAB de mamíferos possuem a capacidade de armazenar e liberar energia sob a forma de lipídeos. Esta função é essencial, pois permite intervalos de jejum entre as refeições e também intervalos prolongados, como os de uma semana. Sua forma esférica permite se encaixarem perfeitamente umas nas outras, o que contribui com a sua função de armazenar, pois esta forma geométrica permite o máximo de armazenamento em um mínimo espaço. Mais de 90% do volume dos adipócitos brancos é ocupado por uma única gota citoplasmática de gordura unilocular constituída de triacilgliceróis (TG). Os adipócitos brancos, além de armazenarem TG, também são capazes de secretar hormônios e várias citocinas que influenciam o comportamento das vias metabólicas (Smorlesi et al., 2012). O armazenamento de energia em excesso aumenta o tamanho do TA, o que resulta em obesidade (Bae; Kim; Lee, 2012).

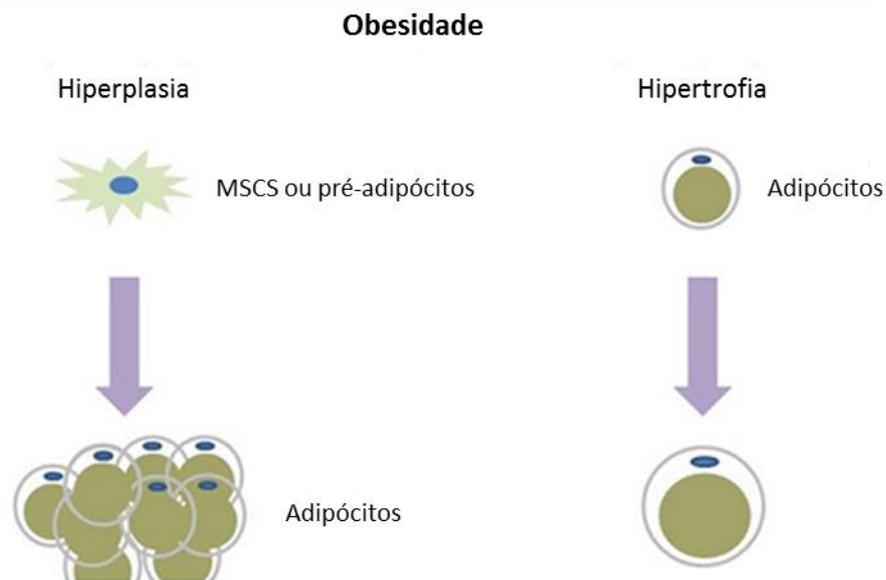
Apesar da existência de dois tipos de TA, onde até recentemente eram conhecidas apenas dois tipos de células adiposas, as brancas e as marrons, recentemente descobriu-se um terceiro tipo, que surge no meio do TAB, denominada de célula adiposa bege. (Fig. 1 b) (Spiegelman, 2013).

Anatomicamente e funcionalmente diferente da célula adiposa branca, que possui uma única e grande gota lipídica, pouca mitocôndria, minúsculo citoplasma e produtora de adipocinas, foi até recentemente confundida com a célula adiposa marrom, pois também apresenta múltiplas gotas lipídicas, muitas mitocôndrias e grande expressão de UCP-1. No entanto, difere das células adiposas marrons por não ser proveniente da mesma linhagem, semelhante a do músculo (Spiegelman, 2013).

### 1.1.1 Tecido Adiposo Branco

O TAB talvez seja o órgão com maior plasticidade no organismo, capaz de se regenerar tanto após uma remoção cirúrgica quanto após uma enorme expansão ou contração, como em resposta a um equilíbrio energético alterado. As pesquisas que investigam a plasticidade do TA a nível celular iniciaram-se há mais de 70 anos e, estimuladas pela crescente problemática que a obesidade e doenças associadas a ela estão acarretando a saúde pública mundial, continuam a crescer a cada dia (Cawthorn; Scheller; Macdougald, 2012).

A expansão do TA é resultado não apenas do aumento no tamanho dos adipócitos (hipertrofia), mas também do aumento no número de adipócitos (hiperplasia), processo que ocorre via diferenciação “*de novo*” de pré-adipócitos, que estão localizados na fração vascular estromal (FVE) do TA (Fig. 2). Acredita-se que um aumento no tamanho dos adipócitos duas ou até três vezes caracterize hipertrofia dos adipócitos. Porém quanto o excesso de energia continua por um longo período e o adipócito ultrapassa esse limite de expansão, os pré adipócitos são estimulados a proliferar e diferenciar em células maduras, o que aumenta o número de adipócitos. Se ocorrer perda de massa corporal após esse processo de hiperplasia, haverá apenas a redução no tamanho dos adipócitos, e não no número, pelo menos por um longo período. Isto explica a dificuldade de manter a redução na massa corporal. Acredita-se que após um longo período de redução de massa corporal, o número de adipócitos também possa reduzir, porém não se sabe o tempo necessário para isso ocorrer (Bae; Kim; Lee, 2012; Harvey; Ferrier, 2012).



**Figura 2:** Esquema ilustrando os dois possíveis mecanismos de desenvolvimento da obesidade: hiperplasia (aumento do número de células) e/ou hipertrofia (aumento do tamanho das células). MSCs células tronco mesenquimais (adaptado de Bae; Kim; Lee, 2012).

Explorando-se a capacidade de hiperplasia dos adipócitos (adipogênese), a estimulação forçada da diferenciação de novos adipócitos é alvo de diversos agentes insulino-sensibilizantes, que agem estimulando alguns genes chave na adipogênese, como os fatores transcripcionais proliferadores de peroxissomos (PPAR)-  $\gamma$ , uma proteína essencial tanto para a adipogênese quanto para a homeostase da glicose (Vieira et al., 2009; White; Stephens, 2010; Kim et al., 2013). Este recurso farmacêutico se baseia na teoria de que a diferenciação de novos e pequenos adipócitos é benéfica à saúde, pois reduz a produção de citocinas, uma vez que esta se dá por adipócitos hipertrofiados, além de aumentar a capacidade do TAB de estocar AG, promovendo assim a captura dos AG circulantes em excesso, o que previne a lipotoxicidade (acúmulo ectópico de gordura – como por ex., músculo esquelético, fígado e coração, o que prejudica a função desses órgãos) (Medina-Gomez; Gray; Vidal-Puig, 2007; Cawthorn; Scheller; Macdougald, 2012).

No entanto, este recurso farmacêutico deveria ser utilizado com cautela, pois se o excesso de ingestão energética permanecer por um longo período, a diferenciação de novos adipócitos resulta em obesidade severa (White; Stephens, 2010). Além disso, foi demonstrado que novos adipócitos são provenientes de células hematopoiéticas da medula óssea e não da FVE. Esses novos adipócitos provenientes de células hematopoiéticas da medula óssea alteram negativamente a função do TA. Primeiro porque se depositam preferencialmente no TA visceral (TAV). Segundo porque estes novos adipócitos favorecem um cenário metabólico

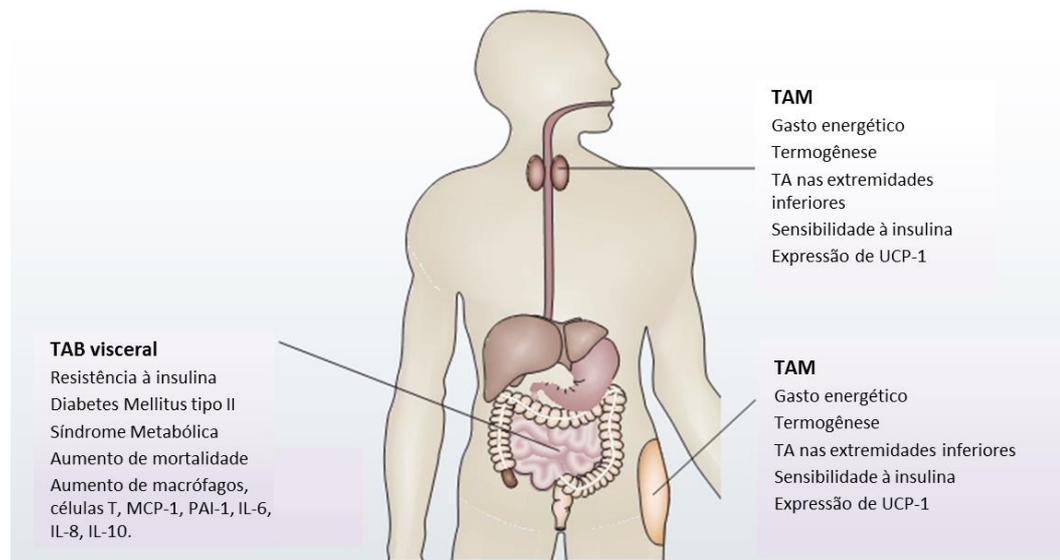
desfavorável comparado aos adipócitos convencionais. Por exemplo, diminuem a expressão de leptina, uma adipocina que participa da regulação da saciedade e gasto energético. Além disso, exibem maior expressão de citocinas inflamatórias, como a interleucina-6, que reduz a sensibilidade à insulina por inibir a sinalização do receptor de insulina, o que pode gerar um impacto sobre o metabolismo, além de outras citocinas que podem induzir o recrutamento de células inflamatórias para o TA, aumentando assim a resistência a insulina (Majka et al., 2010). Adicionalmente, esses novos adipócitos provenientes de células progenitoras da medula óssea também possuem menor expressão de genes relacionados à oxidação de lipídios e biogênese mitocondrial e peroxissomal, o que sugere menor capacidade oxidativa quando comparado com adipócitos não provenientes de células progenitoras da medula óssea. Assim, essas alterações podem explicar as mudanças desfavoráveis que acompanham o aumento da adiposidade visceral (Majka et al., 2010).

Outra adipocina derivada principalmente de adipócitos, a leptina, circula em concentrações que são proporcionais a massa de TA, possui uma importante função na regulação da ingestão calórica e do gasto energético. No entanto, sua expressão e secreção ocorrem principalmente por adipócitos subcutâneos (Tchernof; Despres, 2013).

Dessa forma os adipócitos, além de exercerem regulação energética, também realizam função endócrina, secretando diversos hormônios e fatores envolvidos na regulação de diversas funções, como ingestão de alimentos, resposta imunológica, reprodução, sensibilidade à insulina e crescimento vascular e esquelético (Lin et al., 2005).

#### 1.1.1.1 Tecido adiposo Visceral

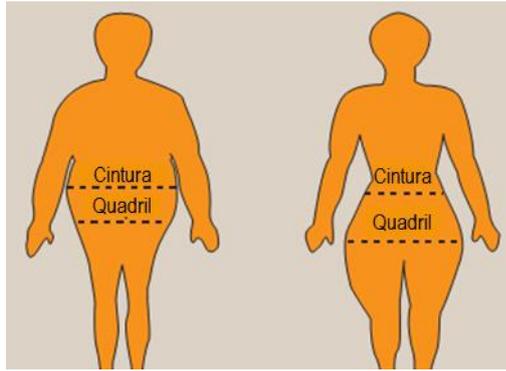
O TAB de humanos e outros mamíferos pode ser subdividido fisiologicamente em TAV e TA subcutâneo (TAS). Esta subdivisão é feita com base nas propriedades autonômicas das células que cada um desses tecidos possui. Ao contrário do TAS e do TAM que possuem a capacidade de melhorar o metabolismo, pois otimizam a homeostase da glicose e o consumo energético, o TAV pode induzir efeitos metabólicos prejudiciais (Tran; Kahn, 2010).



**Figura 3.** O TA em humanos. O TA visceral está associado com maior risco de diversas doenças metabólicas e mortalidade enquanto o TA subcutâneo e o marrom estão associados com um melhor metabolismo (adaptado de Tran; Kahn, 2010).

A obesidade visceral, conhecida também como obesidade androide ou do tipo “maça” (Fig. 4), é o principal fator de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina, que por sua vez predispõe ao aparecimento de diabetes do tipo II e doenças cardiovasculares (Mayes; Watson, 2004; Borer, 2005; Pollanen et al., 2007; Yoshioka et al., 2007; Jiang; Sacco; Ward, 2008; Orsatti et al., 2008; Pallottini et al., 2008; Gilsanz et al., 2009; Riant et al., 2009; Rogers et al., 2009; Majka et al., 2010).

Na prática clínica, a medida da circunferência da cintura, juntamente com o índice de massa corporal (IMC), calculado como o massa (peso) corporal dividido pela altura ao quadrado, pode ser útil para a identificação e adoção de medidas preventivas necessárias para um grupo de pessoas, com sobrepeso ou obesas, que possuem alto risco de doenças metabólicas (Tchernof; Despres, 2013).



**Figura 4.** Esquema que representa as denominação dos tipos de obesidade em relação a distribuição dos locais de depósito de gordura. A obesidade andróide ou tipo maçã (esq.) evidencia depósito de gordura visceral. Na obesidade ginoide ou tipo pera (dir.), predomina o acúmulo de gordura subcutânea. Indivíduos com obesidade tipo maçã apresentam maior risco à saúde (adaptado de Harvey; Ferrier, 2012).

## 1.2 Aspectos fisiopatológicos da obesidade

Como mencionado anteriormente, excesso de massa corporal e a obesidade estão relacionados com uma variedade de doenças crônicas que afetam mais de 66% da população adulta. A redução da massa corporal reduz os riscos à saúde associados com doenças crônicas e, portanto é estimulado por importantes agências de saúde (Donnelly et al., 2009) e órgãos que fomentam a pesquisa.

Resistência à insulina e obesidade são considerados fatores chave para desencadear a fisiopatologia da síndrome metabólica (Carr et al., 2004; Hamza et al., 2009). A fisiopatologia da obesidade está associada a anormalidades na sinalização endócrina do TA (Tchernof; Despres, 2013).

A obesidade é uma doença extremamente complexa que envolve uma série de interações entre fatores genéticos e ambientais. Com o objetivo de tratar e superar a obesidade, surge a necessidade de desenvolver um profundo conhecimento das bases celulares e moleculares sobre a expansão do TA, tanto em estados fisiológicos quanto patológicos, que conduzem a obesidade (Bae; Kim; Lee, 2012).

O acúmulo excessivo de tecido adiposo visceral é parte de um fenótipo que inclui disfunção na capacidade de expansão do tecido adiposo subcutâneo e armazenamento ectópico de TG. Este fenótipo está fortemente relacionado muitas alterações metabólicas, tais como: hipertrigliceridemia, maior disponibilidade de AG livres, liberação de citocinas pró-inflamatórias do tecido adiposo, inflamação e resistência à insulina (RI) do fígado, aumento

da síntese e secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) hepática, redução do *clearance* de lipoproteínas ricas em TG, presença de partículas pequenas e densas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e redução dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) colesterol (Tchernof; Despres, 2013)

Idade, sexo, genética e etnia são fatores etiológicos gerais que contribuem para determinar o local de acúmulo de gordura. Os mecanismos específicos responsáveis por aumentar o acúmulo de gordura visceral perante um balanço energético positivo e ganho de massa corporal envolvem hormônios sexuais, produção de cortisol pelo tecido adiposo abdominal, endocanabinóides, hormônio de crescimento e a frutose da dieta. Tiazolidinedionas, reposição de testosterona em homens com deficiência e a reposição de estrogênio em mulheres pós-menopausais demonstraram modular favoravelmente a distribuição de gordura corporal (Tchernof; Despres, 2013)

### 1.3 Menopausa

No Brasil, a expectativa de vida, segundo o IBGE (2009), é de aproximadamente 77,32 anos para as mulheres (Fig. 5). Como resultado do grande aumento da expectativa de vida, muitas mulheres passarão a segunda metade de suas vidas em uma condição de deficiência de hormônios ovarianos, como resultado do processo fisiológico denominado menopausa (Mauvais-Jarvis; Clegg; Hevener, 2013).



Figura 5. Expectativa de vida no Brasil (adaptado de IBGE, 2009).

A menopausa é um evento natural que ocorre em mulheres de meia idade (Daley; Stokes-Lampard; Macarthur, 2009). É caracterizada pela interrupção permanente da menstruação, resultado da perda da atividade folicular ovariana, o que gera insuficiência dos hormônios ovarianos, incluindo o estrogênio (Saengsirisuwan et al., 2009).

A falta do estrogênio provoca alterações importantes não apenas nas funções do tecido reprodutivo, mas também influencia diversos tecidos periféricos que possuem os receptores alfa e beta de estrogênio, incluindo TA, ossos, músculos esqueléticos e cardíaco e sistema nervoso central (Tsai et al., 2007; Foryst-Ludwig; Kintscher, 2010).

Além das doenças degenerativas nesses sistemas, a deficiência de estrogênio aumenta a disfunção metabólica, predispondo à obesidade, à síndrome metabólica, diabetes do tipo 2 e também certos tipos de câncer (por exemplo, de mama e de cólon, além do carcinoma hepatocelular) (Mauvais-Jarvis; Clegg; Hevener, 2013)

Redução da massa magra, aumento da massa gorda, preferencialmente a visceral, são os principais fatores que predisõem a resistência à insulina e dislipidemia (Mayes; Watson, 2004; Borer, 2005; Pollanen et al., 2007; Yoshioka et al., 2007; Jiang; Sacco; Ward, 2008; Orsatti et al., 2008; Pallottini et al., 2008; Gilsanz et al., 2009; Riant et al., 2009; Majka et al., 2010).

O efeito do hormônio estrogênio sobre depósitos de gordura não é tão importante sobre a quantidade de massa gorda quanto é sobre o local onde a gordura é depositada. A falta desse hormônio leva a um redirecionamento dos depósitos de gordura, de locais subcutâneos para locais viscerais (Davis et al., 2012; Spritzer; Oppermann, 2013). Prova do efeito determinante que o estrogênio possui sobre o local onde a gordura se deposita no corpo – subcutânea x visceral - é o resultado de tratamentos hormonais realizados em transexuais. Transexuais mulheres-homens que fazem tratamento com testosterona exibem uma progressiva mudança no padrão corporal de ginóide (pera) para androide (maça). Por outro lado, transexuais homem-mulher que realizam tratamento com estrogênio, aumentam significativamente o depósito de gordura em todos os depósitos subcutâneos (Tchernof; Despres, 2013). Além disso, os diversos estudos que realizam reposição de estrogênio confirmam a função especificamente do hormônio estrogênio (Lundholm et al., 2008; Pallottini et al., 2008; Ignacio et al., 2009; Pighon et al., 2010; Spangenburg; Wohlers; Valencia, 2012; Stubbins et al., 2012a; Stubbins et al., 2012b)

Estudos demonstraram que ovariectomia (OVX) em roedores desencadeia osteoporose (Jiang; Sacco; Ward, 2008; Songlin et al., 2009), obesidade e resistência à insulina (Riant et al., 2009; Saengsirisuwan et al., 2009). Além disso, aumenta o conteúdo lipídico ectópico no fígado, coração e músculo (Leite et al., 2009). Permanece incerto se estas anormalidades são provocadas diretamente pela falta de estrogênio ou se são um efeito secundário decorrente da obesidade ou de um efeito do maior acúmulo de gordura visceral.

Em 1998 Poehlman demonstrou que a OVX pode reduzir a taxa metabólica basal, componente mais importante do gasto energético total. A redução da taxa metabólica basal tem um forte impacto sobre a composição corporal por exemplo, aumentando a quantidade de gordura abdominal. Esse efeito foi atribuído principalmente a uma redução da massa magra que ocorre nestes animais OVX (Poehlman; Tchernof, 1998).

Estudo mais recente demonstrou que camundongos sofrem aumento da massa gorda após a OVX mesmo sem aumentarem o consumo alimentar. O aumento da massa gorda é resultado da redução da atividade física voluntária e do consumo de oxigênio associados à maior eficiência metabólica (a média do ganho de massa pela média da ingestão alimentar) (Isken et al., 2008; Rogers et al., 2009). Outro estudo mais recente feito pelo grupo de pesquisa de Rogers (2009) mostrou que 12 semanas após a remoção dos ovários ocorre aumento de massa corporal e massa gorda em animais que inicialmente possuíam estes parâmetros semelhantes aos animais não OVX. Porém, acompanhando estes animais por um período mais longo, os pesquisadores descobriram que 20 semanas após a cirurgia, tanto a massa corporal quanto a adiposa dos animais OVX novamente se iguala aos dos animais não OVX. (Vieira Potter et al., 2012).

As doenças relacionadas à menopausa geram consequências significantes, tanto para a mulher quanto as questões de saúde pública, já que atualmente as mulheres passam boa parte de suas vidas nesse estado menopausal (Lambrinoudaki et al.; Carr et al., 2004; Rogers et al., 2009; Ko; Jordan, 2011). Por isso, métodos que possam combater ou atenuar a fisiopatologia da deficiência de estrogênio sobre múltiplas doenças crônicas em mulheres está emergindo como um novo desafio terapêutico do século 21.

#### ***1.4 Metabolismo dos ácidos graxos e dos triacilgliceróis***

Os ácidos graxos (AG) existem no organismo na forma livre (não esterificados) e também são encontrados como ésteres de acila em moléculas mais complexas, como os triacilgliceróis (TG). Os AG livres, em condições normais, estão presentes em baixas quantidades no sangue. Em algumas situações, como jejum ou obesidade, podem ser encontrados em quantidades substanciais no plasma. Os AG podem ser oxidados por betaoxidação seguida pelo ciclo do ácido cítrico em muitos tecidos, especialmente fígado e músculo esquelético, para fornecer energia (Harvey; Ferrier, 2012).

O TAB possui a importante função de controlar os níveis sistêmicos de AG, através de sua expansão ou retração, e tanto a hipertrofia quanto a atrofia do TAB estão associados a danos lipotóxicos sobre a sinalização da insulina em outros tecidos (Flachs et al., 2013). A obesidade aumenta a lipólise do TA, processo onde a enzima hormônio sensível a lipase (HSL) possui função chave (Galic; Oakhill; Steinberg, 2010; Czech et al., 2013).

Além dos AG, carboidratos e proteínas obtidos em excesso pela dieta também podem ser convertidos a AG, para então serem armazenados como TG (Harvey; Ferrier, 2012). É possível dividir roedores em linhagens que são ou não geneticamente propensas a ganharem massa corporal. Quando estas duas linhagens de roedores são submetidas à alimentação com dieta hiperlipídica, os roedores susceptíveis ao ganho de a massa corporal demonstraram um perfil de risco metabólico mais desfavorável, além de menor gasto energético e menor perfil de expressão gênica pro-adipogênica. Adicionalmente, apresentaram menor expressão de enzimas relacionadas à oxidação de gordura. Algumas diferenças na composição dos AG, como maior presença de AG monoinsaturados de 16 carbonos (16:1) também foram encontrados nos roedores não resistentes à obesidade comparados aos resistentes (Cedernaes et al., 2013).

A insaturação de lipídeos é feita pelas dessaturases, que inserem duplas ligações nas cadeias de carbono dos AG e dessa forma, convertem AG saturados em AG monoinsaturados. Índices de dessaturação de AG foram fortemente associados a várias condições severas relacionadas à obesidade, especialmente a dessaturação do AG de 16 carbonos (SCD-16), que foi relacionada com obesidade e desenvolvimento da síndrome metabólica (Cedernaes et al., 2013), além de arteroesclerose. (Sampath et al., 2007; Kus et al., 2011). Portanto, tanto a composição dos AG como a atividade das dessaturases possuem um importante papel tanto na fisiopatologia quanto no metabolismo de indivíduos obesos (Cedernaes et al., 2013).

A esteroil coenzima dessaturase-1 (SCD-1) é a enzima que promove a dessaturação dos AG de 18 e 16 carbonos, C18 e C16, respectivamente. A elevada atividade SCD-1 está associada a redução da oxidação de gorduras e aumento da síntese de AG. O nocaute de SCD-1 leva à resistência à obesidade induzida pela dieta. Por estes motivos, a manipulação da SCD-1 vem sendo proposta como um potencial alvo no tratamento da obesidade (Cedernaes et al., 2013).

A homeostase de lipídeos em células animais é regulada por uma família de fatores de transcrição denominada proteína ligante do elemento regulado por esteróis (SREBP). Três SREBPs foram identificadas até o momento: SREBP-1a e SREBP-1c, que são produzidas a partir do mesmo gene, por meio da utilização de promotores alternativos. Ativam preferencialmente os genes envolvidos na lipogênese, enquanto SREBP-2 é codificada por outro gene e é o principal responsável pela regulação da transcrição de genes envolvidos na homeostase do colesterol. No núcleo, as SREBPs se ligam aos elementos regulatórios de esterol (SRE) e ativam a expressão de genes envolvidos na síntese e absorção de colesterol, AG, TG e fosfolipídios (Korczyńska et al., 2004). Ratos transgênicos para SREBP-1c desenvolveram lipodistrofia acompanhada de resistência à insulina e hiperglicemia (Nakayama et al., 2007).

Dessa forma, SREBP-1, juntamente com o receptor ativado por PPAR- $\gamma$  são importantes fatores de transcrição que controlam tanto o metabolismo lipídico (Berkemeyer, 2009) quanto a diferenciação de adipócitos (Nakayama et al., 2007). PPAR- $\gamma$  também funciona como um dos principais sinalizadores endócrino de anormalidades no TA (Hamza et al., 2009). O SREBP-1c regula a transcrição de genes associados a síntese de AG, tal como da SCD-1 e acetil-CoA carboxilase (ACC) (Bryzgalova et al., 2008). Estes três genes são alvos *downstream* de PPAR- $\gamma$  (Cedernaes et al., 2013).

Existem duas isoformas principais de ACC, denominadas ACC1 ou ACC $\alpha$ . ACC1 é a principal isoforma presente em tecidos lipogênicos, incluindo TAB, glândula mamária e fígado, sendo a responsável por converter acetil-CoA a malonil-CoA, a etapa limitante da velocidade de síntese de AG. Uma vez aumentada a síntese/atividade de ACC, ocorre aumento da síntese de TG, o que, via *feedback* negativo, reduz a  $\beta$ -oxidação (Peng et al., 2012), pois malonil-CoA inibe a carnitina palmitoil-transferase 1 (CPT-1 A), impedindo a entrada de acil-Coa na matriz mitocondrial (Harvey; Ferrier, 2012). A CPT-1 transporta os AG livres para dentro das mitocôndrias para serem oxidados (Choi et al., 2011).

Evidências recentes sugerem que o TAB de humanos e roedores realiza  $\beta$ -oxidação (Flachs et al., 2013), mas o conhecimento ainda é bastante limitado sobre a relevância/função da  $\beta$ -oxidação no TAB. Estudos recentes demonstraram que a síntese “de novo” AG no TAB a partir da  $\beta$ -oxidação possui função importante em algumas condições, como por exemplo, durante a redução de massa corporal, condição que estimula o ciclo fútil de AG, para dessa forma aumentar o gasto energético e contribuir com o processo de emagrecimento. No processo do ciclo fútil, AG que estão estocados no TA são mobilizados para sofrerem  $\beta$ -oxidação e depois são novamente armazenados. Este é um processo de alto custo energético e contribui assim, para o processo de emagrecimento (Kusminski; Scherer, 2012; Bouwman et al., 2013; Flachs et al., 2013).

Ainda é bastante limitado o conhecimento sobre a influência da falta de estrogênio sobre a regulação destas vias aqui descritas. Em roedores OVX, o aumento do TAV parece ser provocado por alterações na expressão de genes relacionados à lipogênese e lipólise. A suplementação com estrogênio inibiu o armazenamento de gordura (lipogênese) e aumentou as taxas de lipólise, restaurando a expressão de SREBP-1c e PPAR- $\gamma$  (D'eon et al., 2005). No fígado de ratas OVX, a expressão dos genes lipogênico aumentou enquanto a dos genes oxidativos foi reduzida (Domingos et al., 2012).

Em mulheres pós-menopausais, a terapia com estrogênio diminuiu a expressão de genes envolvidos na lipogênese incluindo ACC, SREBP-1c, SCD-1 e PPAR- $\gamma$  (Lundholm et al., 2008). Porém este trabalho, um dos únicos na área, não possuía um grupo de mulheres na pré-menopausa. Portanto, não é possível saber os efeitos da falta do estrogênio. Além disso, este trabalho foi feito no TAS, local onde o acúmulo de que AG é benéfico.

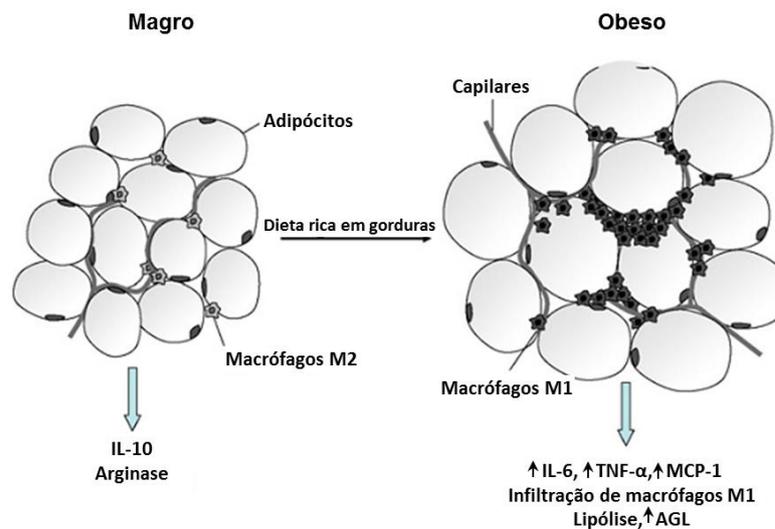
Outro estudo demonstrou que o tratamento com estrogênio realizado em camundongos que reduziram espontaneamente (por envelhecimento) a concentração endógena desse hormônio, reduziu a expressão de SREBP-1c e de seu alvo lipogênico, SCD-1 mas não de ACC1. Além disso, reduziu o acúmulo de TG no TA abdominal. Porém estes efeitos só foram observados nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (Bryzgalova et al., 2008).

### ***1.5 Inflamação crônica de baixa intensidade***

A obesidade, em particular a obesidade visceral, em humanos ou em roedores, tanto a induzida por dieta quanto a induzida por OVX, está associada à inflamação do TA (Hotamisligil, 2006; Navab; Gharavi; Watson, 2008; Rogers et al., 2009). O TA expandido expressa uma ampla variedade de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, incluindo interleucina (IL)-6, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e a proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1 ou CCL2). Essas proteínas, produzidas pelos adipócitos, recrutam células imunológicas, tais como os monócitos/macrófagos, linfócitos e células dendríticas (CDs) para o TA. Com isso ocorre o acúmulo de macrófagos dentro do TA, o que gera um ambiente de inflamação crônica tanto local quanto sistêmica que contribui para a resistência à insulina (Hagita et al., 2011; Hellmann et al., 2011).

A presença de macrófagos é identificada pela expressão de F4/80<sup>+</sup> e CD11b. Existem pelo menos dois fenótipos de macrófagos no TA: M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa). Eles não só são recrutados diferencialmente como também expressam diferentes genes (Fujisaka et al., 2009; Hagita et al., 2011).

A expansão do TA conduz a hipertrofia dos adipócitos e a liberação de citocinas que induzem aumento no recrutamento e ativação de macrófagos M1 ou “classicamente ativados” (Fig. 6). Estes macrófagos M1 são ativados por interferon (IFN) - $\gamma$  e lipopolisacarídeo (LPL). São altamente inflamatórios e possuem elevado potencial fagocitário e bactericida. Expressam CD11c e produzem citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e a interleucina (IL) -6, o que contribui para a indução da resistência à insulina. Estas células são a primeira linha de defesa contra patógenos intracelulares (vírus ou bactérias), e direcionam para uma resposta adaptativa Th1, por produzir IL-12. (Fujisaka et al., 2009; Shaul et al., 2010; Odegaard; Chawla, 2011). Estas alterações na expressão gênica conduzem à resistência a insulina (Galic; Oakhill; Steinberg, 2010).



**Figura 6.** Mudanças induzidas pela obesidade na infiltração e polarização de macrófagos (Galic; Oakhill; Steinberg, 2010).

Em contraste, os macrófagos do TA magro exibem características de uma ativação de macrófagos M2 “alternativa” (Fig. 6), com maior produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina (IL)-10. Macrófagos M2 participam do remodelamento tecidual durante o desenvolvimento e em resposta à lesão, promovendo solução para a inflamação aguda. A principal função dos macrófagos M2 parece ser a homeostase do tecido (Galic; Oakhill; Steinberg, 2010; Shaul et al., 2010).

Adicionalmente, macrófagos M2 aumentam a expressão de arginase. A arginase contribui para a produção da matriz extracelular, assim como para limitar a atividade do óxido nítrico sintase, induzida por macrófagos M1, por competir pelo mesmo substrato, a arginina, o que resulta em menor produção de óxido nítrico (NO) (Harford et al., 2011).

A infiltração de células do sistema imunológico, como as citocinas pró-inflamatórias, que incluem fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, e interferon (IFN)- $\gamma$ , exercem forte influência sobre a lipólise/lipogênese nos adipócitos. Por exemplo, TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$  reduzem a adipogênese por reduzir a expressão de PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c, ACC, SCD-1, assim como IL-6, que reduz a expressão de PPAR- $\gamma$ , ácido graxo sintetase (FAS) e da proteína do adipócito e (aP2), além do IFN- $\gamma$  que reduz a expressão de PPAR- $\gamma$ , LPL e FAS. (Czech et al., 2013)

A falta de estrogênio, um hormônio que possui propriedades anti-inflamatórias e vaso-protetoras, provoca obesidade em camundongos decorrente de redução do gasto energético e do aumento do consumo calórico. Doze semanas após a OVX, os animais

apresentaram resistência à insulina e maior recrutamento e acúmulo de macrófagos M1, ou uma possível troca de fenótipo, de macrófagos M2 para M1, principalmente no TA visceral, mas também no subcutâneo (Rogers et al., 2009).

A predominância de macrófagos M1 nesses animais foi caracterizada pelo aumento de expressão de quimioatraentes de monócitos (MCP-1, osteopontin, e RANTES), acúmulo de macrófagos pró-inflamatórios (células que expressam F4/80/CD11b/CD11c), e aumento de expressão de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e NO), o que é coincidente com o desenvolvimento da resistência à insulina. Ao mesmo tempo em que os mediadores pró-inflamatórios aumentaram, foi observada uma redução na expressão de arginase, um marcador de macrófagos M2. Essa indução do processo inflamatório ocorre sem aumento de ingestão alimentar ou de massa corporal. Portanto, é a falta dos hormônios ovarianos que promove o estado deletério de inflamação crônica (Rogers et al., 2009).

Um estudo complementar e do mesmo grupo de Rogers, 2009 confirmou que os ratos ficavam obesos 12 semanas após a OVX e que neste momento não apresentavam resistência à insulina. Além disso, o TAV perigonadal (TAP) apresentava mais células T, e também alta expressão gênica de macrófagos M2 (arginase-1) além de células T regulatórias (linfócito-T citotóxico antígeno 4). Após 20 semanas da OVX, surpreendentemente, ambos os grupos apresentaram níveis glicêmicos e massa corporal e adiposa semelhantes. Mas foi 26 semanas após a OVX, coincidente com a redução na arginase 1 e aumento na expressão de dos genes M1 (CD11c) e Th1 (IL12p40 e IFN- $\gamma$ ), que surgiu a resistência à insulina. O autor concluiu que a falta do hormônio ovariano induz a inflamação do TAV e resistência à insulina por mecanismos que incluem o balanço de mediadores inflamatórios, e não pela obesidade por si (Vieira Potter et al., 2012).

## **1.6 Exercício**

A terapia de reposição hormonal (TRH) é um método eficaz para proteger o organismo contra os efeitos da falta de estrogênio (Cummings et al., 2009; Baltgalvis et al., 2010; Pighon et al., 2011). Contudo, vem ocorrendo um importante declínio na prescrição e uso da TRH devido à grande preocupação com os efeitos adversos desse tratamento, principalmente maior risco de desenvolvimento de câncer de mama (Cummings et al., 2009;

Neilson et al., 2009; Narod, 2011). Esse declínio na prescrição da TRH aumenta a necessidade de encontrar alternativas não farmacológicas para tratar os sintomas da pós-menopausa (Pritchard, 2001; Daley et al., 2007). Existe um interesse em expansão na aplicação de intervenções sobre o estilo de vida, tais como aumento do exercício e modificações na dieta, a fim de reduzir tanto a inflamação crônica quanto o risco de desenvolver doenças (Strasser; Arvandi; Siebert, 2012).

A atual epidemia da síndrome metabólica no mundo desenvolvido é em grande parte resultado da superalimentação e da falta de atividade física (James et al., 2012). Já está bem documentado que o exercício é eficaz em aumentar o gasto energético total durante e após a sua realização (Warburton; Nicol; Bredin, 2006b; a; Zhang et al., 2006; Orsatti et al., 2008; Cooper et al., 2011), inclusive em mulheres pós-menopausais (Dipietro et al., 2006).

As recomendações para mulheres na pós-menopausa do Colégio Americano de Medicina do Esporte (2009) é que, para obter resultados positivos, sigam as mesmas orientações de mulheres pré-menopausa: trinta minutos de exercício diário, que podem ser parcelados em sessões de pelo menos dez minutos. Além disso, pelo menos duas vezes por semana deve ser realizado treinamento de força, com pelo menos oito exercícios que trabalhem todo o corpo. Neste caso, cada exercício deve ter de oito a doze repetições para se atingir resultados positivos (Eschbach, 2009).

### *1.6.1 Princípios do treinamento físico*

O treinamento físico é uma atividade sistemática que visa proporcionar alterações morfológicas, metabólicas e funcionais. O sucesso destas respostas depende da prescrição adequada deste treinamento (Nakamura; Moreira; Aoki, 2010).

Para Tubino, 1984, os cinco princípios do treinamento esportivo são: o princípio da individualidade biológica, o princípio da adaptação, o princípio da sobrecarga, o princípio da continuidade, o princípio da interdependência volume-intensidade, sendo que os 5 princípios se interrelacionam em todas as suas aplicações (Tubino, 1984).

Ainda segundo Tubino (1984) devemos seguir estes princípios básicos para prescrever corretamente o exercício, que tratam de:

1. *Princípio da individualidade biológica*: não existem duas pessoas iguais, portanto a intensidade, duração e frequência semanal devem ser individuais;
2. *Princípio da sobrecarga crescente*: para melhorar a aptidão física, a sobrecarga (frequência x volume x intensidade) do exercício deve ser cada vez maior. Nesse contexto, a constante manipulação da sobrecarga é necessária para manter a sobrecarga apropriada, que deve evoluir com o a continuidade do treinamento, até atingir um platô;
3. *Princípio da especificidade*: cada tipo de treino vai induzir um tipo diferente de adaptação metabólica e/ou fisiológica. Por exemplo, estresses com exercícios anaeróbios específicos (p. ex., treinamento de força-potência) induzem adaptações específicas de força-potência; um exercício aeróbio induz adaptações específicas do sistema aeróbio – com apenas pequenos intercâmbios benéficos entre o treinamento de força-potência e o treinamento aeróbio;
4. *Princípio da continuidade*: é a continuidade que possibilita uma melhora na aptidão por proporcionar adaptações fisiológicas e moleculares no organismo, como resultado dos esforços que foi submetido;
5. *Princípio da reversibilidade*: a interrupção do exercício leva o organismo ao retorno à situação inicial (antes do início do programa) (Mattos; Neira, 2000; Mcardle; Katch; Katch, 2011).

O exercício tem papel adjuvante no tratamento da obesidade, pois aumenta o gasto calórico. As alterações no balanço energético modificam a massa de gordura. Isso é fato, porém existem inúmeras outras complexidades (Thompson et al., 2012). O exercício é um estímulo ao corpo, que tanto fisiologicamente quanto molecularmente constitui uma enorme “orquestra” altamente coordenada e regulada. Esta “orquestra” perde completamente “o ritmo” após uma sessão de exercício e, quanto mais intensa for a sessão e/ou menos treinado for o corpo, maior será o impacto.

A atividade física influencia o TA tanto agudamente quanto cronicamente (Thompson et al., 2012). Contudo, os caminhos moleculares que cada tipo e cada intensidade,

assim como os benefícios e/ou malefícios que cada tipo de exercício proporciona apenas começam a serem iluminados, em um imenso campo obscuro do conhecimento.

Existem muitas pesquisas sobre o efeito do exercício sobre monócitos, células imaturas que podem ou não serem diferenciadas em macrófagos. Porém o efeito do exercício sobre macrófagos permanece pouco estudado (Walsh et al., 2011). Evidências recentes mostraram que o exercício possui efeitos profiláticos que podem ser, em parte, resultados do efeito anti-inflamatório que o exercício regular proporciona via redução do TA visceral ou então via aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Walsh et al., 2011).

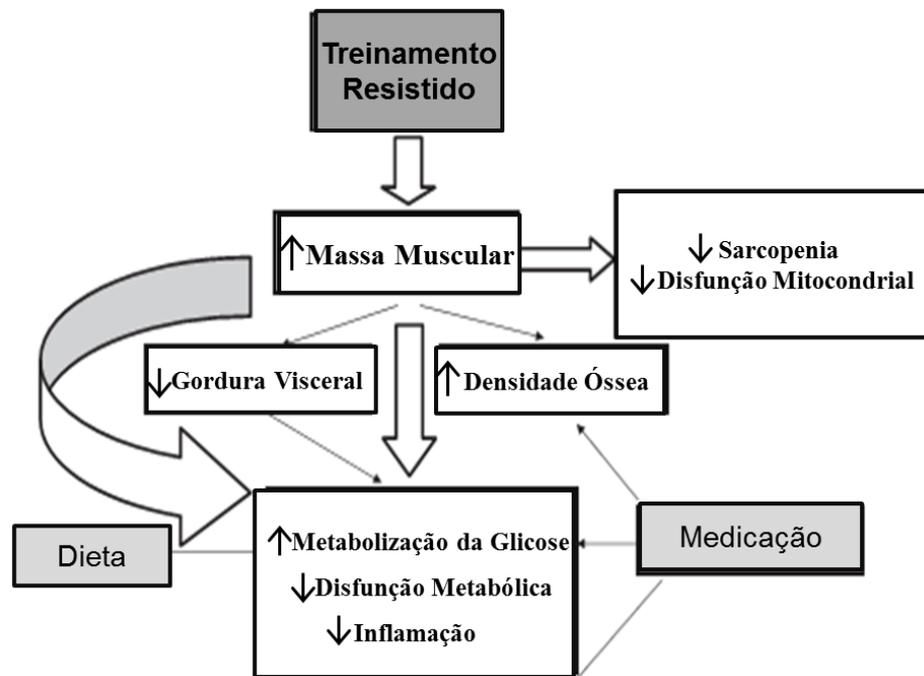
Em roedores obesos o treinamento resistido realizado em esteira reduz a inflamação do TA epididimal e as consequências metabólicas associadas a esta inflamação, como a resistência à insulina (Vieira et al., 2009), assim como a infiltração de macrófagos e a proporção de macrófagos M1/M2 no TA, mesmo sem ter ocorrido redução do TA ou da massa corporal (Kawanishi et al., 2010). Por outro lado, se o exercício for muito intenso e com um período de recuperação muito pequeno (*overtraining*), ele pode promover um estado inflamatório no TA visceral (Lira et al., 2010; Rosa et al., 2011).

### 1.6.2 *Exercício Resistido*

Como detalhado anteriormente neste trabalho, após a menopausa existe um grande declínio na quantidade de massa magra. Isso gera um menor gasto energético e talvez esta seja a causa do aumento de massa gorda na ausência do estrogênio. Esse conjunto de alterações pode levar a desordens metabólicas e a um estado inflamatório crônico de baixa intensidade.

Na maior parte das vezes, as recomendações para tratar ou prevenir o sobrepeso e a obesidade utilizando o exercício são direcionadas para o treinamento aeróbio (TRA), uma vez que o TRA é associado com consumo de energia muito maior durante a sessão de exercícios do que o treinamento resistido (TR). Embora a massa corporal não se altere muito com o TR - assume-se que o seu principal efeito sobre a composição corporal seja uma substituição da massa gorda para a muscular - a manutenção de uma grande massa muscular conquistada com o TR pode reduzir os fatores de risco relacionados à obesidade - ou

seja, dislipidemia, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Fig. 7) (Strasser; Arvandi; Siebert, 2012).



**Figura 7.** Esquema para a relação entre massa muscular, anormalidades metabólicas e inflamação. O treinamento resistido possui um efeito único sobre (1) a massa muscular e força e portanto, sobre (2) o clearance de glicose por reduzir a sarcopenia e o ganho de massa gorda. Dessa forma, o treinamento resistido pode (3) diminuir a gordura visceral e mudar a distribuição de gordura corporal assim, (iv) modificando anormalidades metabólicas e a inflamação. Os efeitos anti-inflamatórios do treinamento resistido podem ser mediado via tanto uma redução da massa de gordura visceral quanto a indução de um ambiente anti-inflamatório criado com cada sessão de exercício (Strasser; Arvandi; Siebert, 2012).

Estudos transversais mostram que a força muscular é inversamente relacionada à síndrome metabólica e também a mortalidade provocada pelas mais variadas causas. O TR é capaz de aumentar a massa muscular e reduzir a gordura abdominal e visceral, prejuízos já reconhecidos com o avançar da idade. Os possíveis mecanismos incluem aumentos na taxa metabólica de repouso e na atividade simpática, assim como redução da lipogênese hepática. Os efeitos anti-inflamatórios que o TR crônico pode proporcionar podem ser mediados tanto via redução da massa de gordura visceral (com subsequente redução de adipocinas) quanto por meio da indução de um ambiente anti-inflamatório criado por cada sessão de exercício (Strasser; Arvandi; Siebert, 2012).

O exercício, especialmente o resistido de alta intensidade, mostrou aumentar a força do músculo esquelético (Ryan et al., 1998; Bemben et al., 2000; Renno et al., 2007; Holm et al., 2008), além de aumentar o gasto energético total e no repouso, reduzir a gordura

abdominal total e o risco de quedas e fraturas (Orsatti et al., 2008) em mulheres pós-menopausais.

O efeito do TR sobre a inflamação do TA foi investigado em diversos estudos com humanos. Contudo, estes estudos utilizaram apenas o TAS. O TAV é um depósito de gordura muito mais importante do que o TAS em relação à inflamação crônica, como explicado anteriormente. Considerando a grande dificuldade de obter TAV de seres humanos treinados, roedores são um modelo animal ideal (You et al., 2013).

A OVX em roedores é uma maneira de mimetizar a perda da atividade ovariana humana, sendo um modelo animal amplamente utilizado em pesquisa (Jiang; Sacco; Ward, 2008; Rogers et al., 2009; Vieira Potter et al., 2012). Por isso utilizamos neste estudo a OVX para estudar as consequências metabólicas e inflamatórias da menopausa humana. Estudos anteriores de nosso grupo com ratas OVX demonstraram que o TR é capaz de reduzir o conteúdo de lipídios no fígado, músculos e depósitos de gordura visceral e retroperitoneal (Leite et al., 2009), aumentar a área do músculo sóleo, impedir o aumento provocado pela falta de estrogênio sobre o conteúdo de glicogênio hepático e muscular (Prestes et al., 2011), reestabelecer a expressão gênica de moléculas relacionadas à  $\beta$ -oxidação e a lipogênese no fígado (Domingos et al., 2012), assim como a atividade de MMP-2 nos músculos das patas inferiores (Prestes et al., 2009) e no tendão calcâneo (Pereira et al., 2010) Nos ossos, além da atividade de MMP-2, o TR também melhorou outros parâmetros, como densidade mineral e óssea e, carga máxima e carga de fratura (Shiguemoto et al., 2012).

O TR melhorou o perfil do metabolismo lipídico no fígado (Pighon et al., 2011; Domingos et al., 2012) e no músculo esquelético (Liu et al., 2012) de ratas OVX, o que resultou em menor acúmulo de gordura ectópica nesses locais. Porém o metabolismo lipídico no TAB também possui um papel fundamental no controle das concentrações de AG sistêmicos e ectópicos e pelo nosso conhecimento ainda não foram investigados.

Em relação à inflamação crônica do TAV, existe um número relativamente grande de trabalhos que demonstraram que o TR reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias no TAV de roedores obesos, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12 e MCP-1, além de aumentar a expressão de citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10. Aparentemente, estas alterações são independentes da redução de massa corporal (You et al., 2013). Porém, pelos resultados das pesquisas realizadas no pubmed, nenhum artigo investigou as respostas inflamatórias ao TR do TAV na ausência do estrogênio.

Estas reflexões apontam para a importância de estudar os efeitos do TR sobre o metabolismo lipídico e a inflamação crônica de baixa intensidade no TAV de ratas OVX. Atualmente esses mecanismos permanecem desconhecidos. Nossa hipótese foi que o TR seja eficaz em amenizar ou até mesmo reestabelecer os efeitos deletérios da falta dos hormônios ovarianos relacionados tanto aos desajustes no metabolismo lipídico quanto à inflamação crônica de baixa intensidade, o que pode representar uma estratégia não farmacológica para mulheres pós-menopausais que não podem ou não desejam fazer a reposição hormonal.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 *Geral*

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de 29 sessões de treinamento resistido sobre parâmetros fisiológicos e moleculares do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas.

### 2.2 *Específicos*

Avaliar os efeitos do TR em ratas OVX ou não OVX sobre;

- massa corporal;
- massa gorda;
- ingestão alimentar;
- eficiência metabólica;
- carga de treino;
- morfometria dos adipócitos viscerais (mesentérico e parametrial) e subcutâneo (gluteal);
- expressão gênica de marcadores lipogênicos (PPAR- $\gamma$ , SCD-1, SREBP-1c e ACC), oxidativo (CPT-1) e lipolítico (HSL);
- expressão gênica de marcadores (F4/80 e CD11b) e quimioatraentes (MCP-1, osteopontina e Rantes) de macrófagos;
- expressão gênica de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ );
- expressão gênica marcadores anti-inflamatórios (IL-10 e arginase 1);

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizadas 24 ratas *Sprague Dawley*, provenientes do Biotério central da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp) com massa corporal inicial de  $180 \pm 4$  gramas. Não utilizamos camundongos pela dificuldade de fazer estes animais realizarem o protocolo de exercício descrito neste trabalho. As ratas foram agrupadas em gaiolas coletivas contendo cinco ratas cada e foram mantidas no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício, do departamento de Ciências Fisiológicas desta universidade em temperatura ambiente entre 22 e 24°C. A luz foi controlada em ciclo claro-escuro de 12 horas (claro iniciado às 06h00min). A água e a comida foram administradas *ad libitum*. O experimento foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996). A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em experimentação animal da UFSCar (Protocolo no. 008/2010).

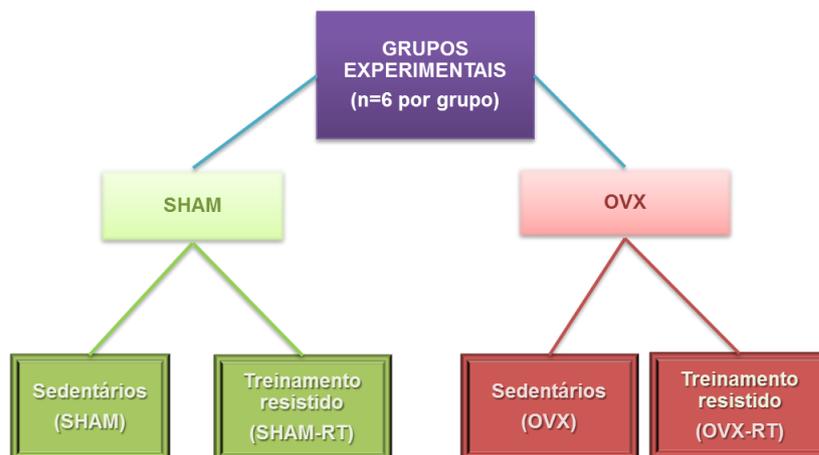
#### 3.2 Período Experimental

As ratas chegaram ao nosso laboratório 7 semanas após o nascimento e foram aleatoriamente distribuídas em 6 caixas coletivas. Uma semana após terem chegado, tiveram seu ciclo claro/escuro invertido (13h -1h escuro). O procedimento de ovariectomia ou pseudo ovariectomia (grupo sham) foi realizado quando as ratas estavam com 10 semanas de vida (aproximadamente 250g), considerados animais adultos jovens (Souza et al., 2007; Horcajada et al., 2008; Seidlova-Wuttke et al., 2008). No grupo treinamento, o período de recuperação antes do início do treinamento foi de 21 dias. Todos os animais foram sacrificados 92 dias após a ovariectomia, ou seja, com 23 semanas de vida.

### 3.3 Plano experimental

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos experimentais (6 animais por grupo) (Fig. 8):

- 1) sham sedentárias (SHAM);
- 2) ovariectomizadas sedentárias (OVX);
- 3) sham treinamento resistido (SHAM-TR);
- 4) ovariectomizadas treinamento resistido (OVX-TR)



**Figura 8.** Organograma dos grupos experimentais

#### *Grupos Sham (Pseudo Ovariectomizado)*

Os animais dos grupos SHAM (SHAM e SHAM-TR) foram submetidos a uma pseudo ovariectomia, procedimento que mimetiza o procedimento cirúrgico da ovariectomia, porém após exposto, o ovário é recolocado intacto ao seu local natural.

### *Grupos Ovariectomizadas*

As ratas dos grupos ovariectomizadas (OVX e OVX-TR) foram submetidas à cirurgia bilateral de remoção dos ovários (ovariectomia) como descrito adiante.

### *Animais sedentários*

Os animais denominados sedentários (SHAM e OVX) foram assim classificados por não realizarem qualquer tipo de treinamento, permanecendo em suas caixas durante todo o período do experimento.

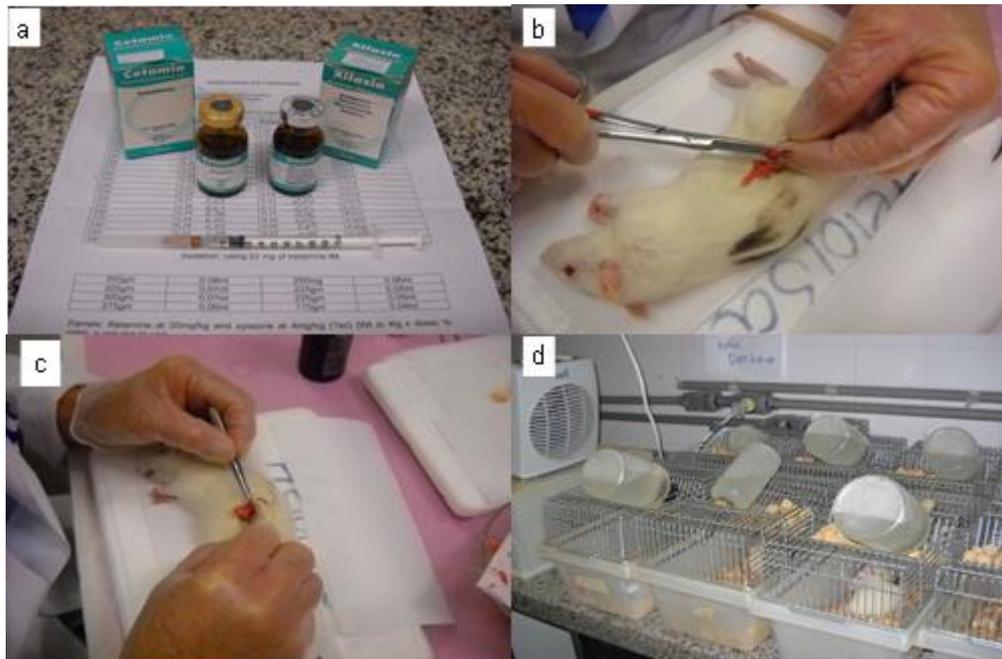
### *Animais Treinados*

Os animais dos grupos treinamento resistido (SHAM-TR e OVX-TR) realizaram 3 sessões de treino por semana e totalizaram 29 sessões de treino em 10 semanas de treinamento resistido.

### *Procedimentos Cirúrgicos da Ovariectomia (OVX)*

As ratas ovariectomizadas (OVX e OVX-TR) sofreram a remoção bilateral dos ovários segundo o modelo proposto por Kalu (1991). As ratas foram inicialmente anestesiadas com ketamina e xylazina (Fig. 9a), tendo seus reflexos testados. A ausência de reflexos permitia o início aos procedimentos cirúrgicos. Foi feita uma pequena incisão bilateral de 1-1,5 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, os ovários foram expostos e, após uma ligadura abaixo da fimbria, foram removidos (Fig. 9b). Após a remoção dos

ovários, o útero foi recolocado em seu local anatômico (Fig. 9c) e músculos e pele foram suturados. Nas 24 horas seguintes da OVX as ratas foram mantidas em caixas individuais, tratadas com analgésico e aquecidas (Fig. 9d). Cinco dias após a cirurgia foram novamente agrupadas em caixas coletivas 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 TF-OVX (Kalu, 1991).



**Figura 9.** Etapas do procedimento cirúrgico. (a) Anestésicos utilizados. (b) Remoção dos ovários. (c) Recolocação no útero na cavidade abdominal. (d) Recuperação pós-cirúrgico em caixas individuais em local aquecido (acervo pessoal).

### *Controle do ciclo estral*

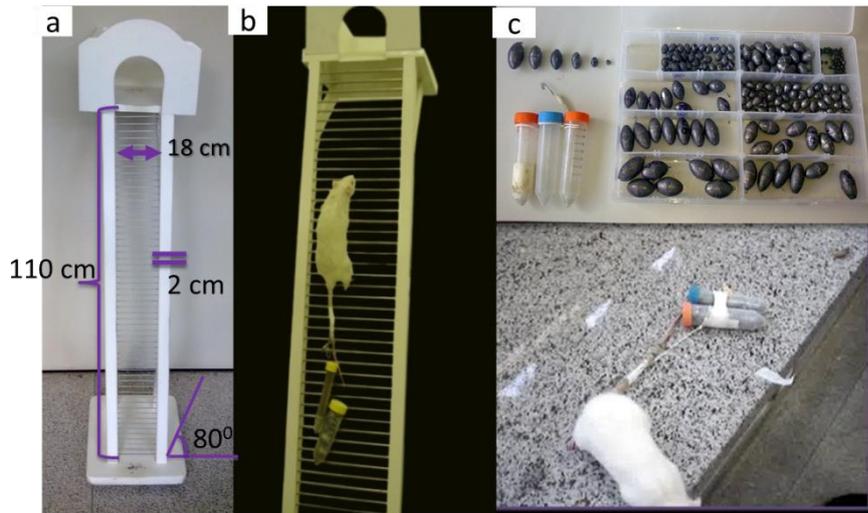
O controle do ciclo estral das ratas foi feito através da técnica do esfregaço vaginal realizado diariamente (Marcondes; Bianchi; Tanno, 2002), a partir da segunda semana após a pseudo-ovariectomia, para garantir que as ratas pseudo-ovariectomizadas estavam em uma condição diferente das ovariectomizadas, ou seja, se continuavam ciclando, assim como para verificar o sucesso da OVX. A coleta foi mantida até um mês antes da data do sacrifício, já que estes dados não são o objetivo primário deste estudo e o estresse promovido pela coleta do material poderia interferir nos resultados deste estudo.

### 3.4 *Protocolo de treinamento*

O treinamento adaptou o protocolo de Hornberger e Farrar (Hornberger; Farrar, 2004). As adaptações foram:

- a) realizado no início da fase escura, ao invés da fase clara, porque rato é ativo principalmente nos períodos de escuridão e torna-se inativo em períodos de luz (Richter, 1978).
- b) Realizado 3 vezes por semana– segunda, quarta e sexta feira, ao invés de a cada 72 horas, o que torna o modelo mais com o treinamento realizado em academia e ;
- c) Aumento da sobrecarga utilizada nas 4 primeiras séries de cada dia de treino, de 50%,75%,90% e 100% para 65%, 85%, 95% e 100% da carga máxima, como resultado de observação de estudos anteriores onde as ratas, aparentemente, fadigavam por exaustão mental e não muscular, em decorrência do elevado número de séries que elas realizavam por sessão de treino.

Como os treinos foram realizados no escuro, foi utilizada uma luz infravermelha de 150W para possibilitar a visão do treinador. O treinamento consistiu de subidas em uma escada de 1,10m de altura por 0,18m de largura e espaçamento de 2cm entre os degraus da grade, com 80° de inclinação com uma carga fixada em sua cauda (Fig.10 a e b), realizado 3 vezes por semana (segunda, quarta e sexta). O tamanho da escada obrigava os animais fazerem de 8 a 12 movimentos por escalada (série). O aparato de carga, composto por tubos cônicos contendo pesos em seu interior, foram fixados à parcela proximal da cauda com uma tira adesiva (1,5cm, 3M Tartan) (Fig. 10 c).



**Figura 10.** Modelo experimental. (a) Dimensões da escada utilizada; (b) aparatos de sobrecarga; (c) rata realizando o treinamento (acervo pessoal).

Na primeira semana do protocolo de escalada foi realizada a familiarização das ratas ao treinamento resistido. As ratas eram colocadas na parte inferior da escada e adaptadas ao ato de escalar. Inicialmente, foram motivadas a escalar aplicando-se em sua cauda um estímulo “*tipo pinça*” com as mãos para iniciar o movimento. No topo da escada, encontravam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansavam por 120 segundos. Este procedimento era repetido até que as ratas voluntariamente subissem a escada três vezes consecutivas, sem o incentivo da pinçada na cauda.

Na segunda feira da segunda semana do protocolo de escalada, os grupos treinados começaram o treinamento de exercício resistido com sobrecargas progressivas, até a exaustão. A primeira sessão de treinamento teve o objetivo de determinar a carga máxima inicial de cada rata. Para tanto, o animal realizava de quatro a oito escaladas com sobrecargas progressivamente mais pesadas. Na primeira escalada foi aplicada uma sobrecarga de 75% da massa corporal da rata. Após completar o carregamento desta carga com sucesso, uma massa adicional de 30 gramas foi adicionado ao aparato. Este procedimento foi repetido sucessivamente até que a rata não conseguisse mais escalar toda a escada. Assim, a maior sobrecarga carregada com sucesso até o topo da escada foi considerada a carga máxima das ratas para a próxima sessão de treinamento.

As próximas sessões de treinos consistiram de quatro até nove escaladas. Durante as primeiras quatro escaladas, as ratas carregaram 65%, 85%, 95% e 100% de sua carga máxima, determinada na última sessão de treinamento. Durante as escaladas subsequentes, um adicional de 30 gramas foi adicionado até que a rata ou não conseguisse mais escalar a escada

por completo ou completasse nove escaladas. A sobrecarga utilizada na última escalada completa que a rata conseguiu realizar era a nova carga máxima da rata para a próxima sessão de treinamento. O treinamento sempre foi realizado na presença dos mesmos observadores. Este modelo experimental, sem as adaptações aqui descritas, tem sido usado com sucesso por nosso grupo (Leite et al., 2009; Prestes et al., 2009).

### ***3.5 Sacrifício dos animais e retirada dos tecidos***

Ao término do período experimental os animais ficaram em jejum durante a noite e foram sacrificados pela manhã por decapitação em guilhotina. Os grupos treinamento resistido foram sacrificados 48 horas após a última sessão de treino. Em seguida, os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica, com as patas presas e mantidas em extensão, para assim efetuar a retirada das gorduras mesentérica, parametrial e subcutânea gluteal. Todos os tecidos foram pesados úmidos em balança de precisão. A massa do útero úmido e seco também foi usado para confirmar o sucesso da ovariectomia. Após a pesagem, parte dos tecidos retirados, que seriam destinados as análises em qRT-PCR, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer -80°C.

### ***3.6 Eficiência alimentar***

A eficiência alimentar foi determinada por meio do cálculo semanal entre a média do aumento de massa corporal pela média do consumo alimentar.

### ***3.7 Glicemia de jejum***

Foi determinada utilizando monitor com tiras de teste para determinação da glicemia (glicosímetro) por fotômetro de refletância da marca Accu-Chek®, Laboratório Roche Diagnósticos, Alemanha. Os resultados foram expressos em mg/dL.

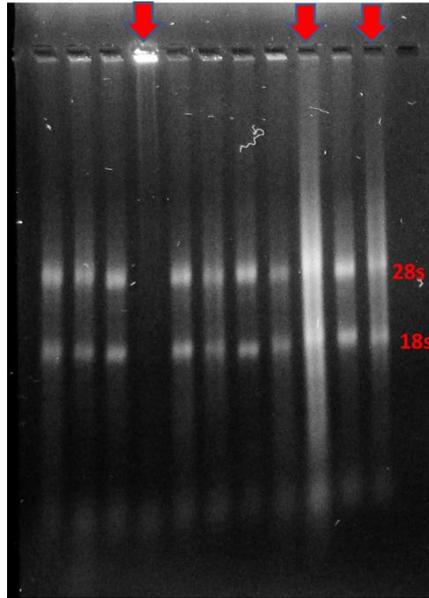
### 3.8 *Análise Morfométrica*

Imediatamente após a remoção do tecido adiposo mesentérico e subcutâneo, aproximadamente 100 mg de cada tecido foi colocado em fixador tampão de colidina 0,2 M, contendo 1% de tetróxido de ósmio e colocados em estufa a 37°C por um período de 24 horas. As células foram lavadas e suspensas em solução salina morna e imediatamente espalhadas em lâminas, para posterior medida da área dos adipócitos (HIRSCH & GALLIAN, 1968).

Para a medida referente às áreas de triglicerídeo das células dos tecidos adiposos, foi utilizado um sistema de microscopia ótica e o software Image Pro-plus 3.02. Este procedimento permite uma observação constante da quantidade de células medidas. Utilizamos aproximadamente 100 células por animal e cinco animais por grupo, o que totaliza 500 áreas de adipócitos por grupo de animais, por tecido. Os valores médios e os respectivos erros padrão foram expressos em  $\mu\text{m}$  (MANZONI & DUARTE, 2005).

### 3.9 *Extração do RNA total e controle de qualidade*

Amostras de 100mg do tecido adiposo mesentérico foram homogeneizadas com um homogeneizador Power Gen1000 (Fisher Scientific) em TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, California). O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante, quantificado por leitura a 260nm e verificado o grau de pureza (260nm/280nm e 260/230) por espectrofotometria. Somente amostras que apresentaram a razão 260nm/280nm e 260/230 acima de 1,8 e bandas bem definidas, sem arraste no gel, foram utilizadas. A integridade do RNA foi visualizada com brometo de etídeo por eletroforese em gel de agarose (Fig. 11). As setas em vermelho ilustram extrações que não foram bem sucedidas e necessitaram serem refeitas.



**Figura 11.** Exemplo de gel de RNA. As setas vermelhas indicam amostras que perderam a integridade durante a extração e precisaram serem refeitas. Nas outras linhas é possível visualizar a integridade das bandas ribossomais 18 e 28 s (acervo pessoal).

### 3.9.1 Tratamento com DNase e Transcrição reversa

Para remover possíveis contaminações com DNA genômico, 2 $\mu$ g de RNA total de cada amostra foram tratados com DNase I, *Amplification Grade* (Invitrogen Corporation, Califórnia, USA), seguindo as especificações do fabricante. O RNA total tratado foi reversamente transcrito em cDNA usando Oligo(dT) e M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI) também de acordo com o manual do fabricante.

### 3.9.2 PCR em tempo real

A quantificação do RNAm das amostras de todos os grupos experimentais foi realizada em duplicata no sistema de detecção PCR em tempo real CFX 96 (Bio-Rad, San Francisco, USA) a partir de aproximadamente 20ng de cDNA, 0,4  $\mu$ M de cada iniciador e 10  $\mu$ L de SsoFast™ Eva Green ® (Bio-rad, San Francisco, EUA) e água suficiente para completar um volume total de reação de 20  $\mu$ L. As sequências específicas dos primers de cada gene estão listadas na Tabela 1. O programa de ciclos térmicos utilizado foi: 95°C durante 30

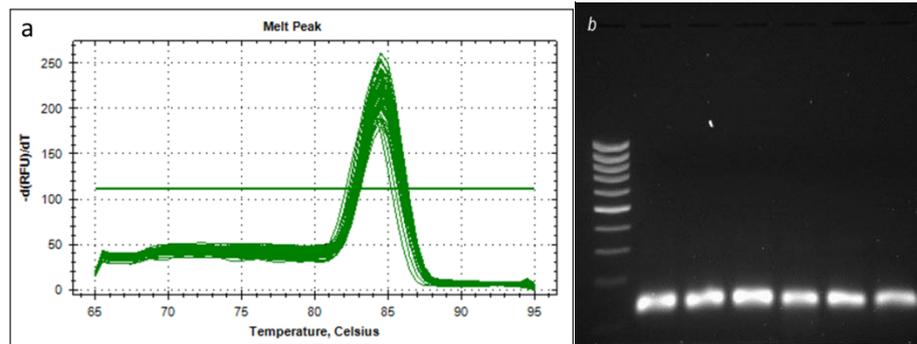
seg, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 57-61°C durante 30 s (temperatura de anelamento específica para cada par de primers), e 72°C durante 30 segundos.

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação dos genes de interesse por qRT-PCR.

Genes	Sense primer (5'–3')	Antisense primer (5'–3')	NCBI Refseq
SCD-1	TGCTGATGTGCTTCATCCTG	GGGAAACCAGGATATTCTCC	NM_009127.4
PPAR- $\gamma$	AAGGGGCCTGGACCTCTGCTG	ATAAGGCGGGACGCAGGCT	NM_001145366.1
SREBP-1c	TGCCCTAAGGGTCAAAACCA	TGGCGGGCACTACTTAGGAA	NM_001276708.1
ACC	ACAGAGATGGTGGCTGATGTC	GATCCCCATGGCAATCTG	NM_022193.1
CPT-1	ACGTTGGACGAATCGGAGC	AAAGCATCTTCCATGCAGCAG	NM_031559.2
HSL	GCGCCTATTCAGGGACAGA	CCAGGAAGGAGTTGAGCCAT	NM_012859.1
F4/80	TGGAATGCATAATCGCTGCT	CAAGGAGGGCAGAGTTGATC	NM_001007557.1
CD11b	CAGATCAACAAGGTGACCATATGG G	CATCATGTCCTTGACTGTGCGTTT G	NM_012711.1
MCP-1	AGCCAGATGCAGTTAATGCCC	ACACCTGCTGCTGGTGATTCTC	NM_031530.1
RANTES	CCATATGGCTCGGACACCACTC	CACTTCTTCTCTGGGTTGGCAC	NM_031116.3
Osteopontina	GAGTTTGGCAGCTCAGAGGA	TCTGCTTCTGAGATGGGTCA	NM_012881.2
IFN- $\gamma$	GAAGTGGCAAAAGGACGGTA	CTGATGGCCTGGTTGTCTTT	NM_138880.2
IL-1 $\beta$	CTCCATGAGCTTTGTACAAGG	TGCTGATGTACCAGTTGGGG	NM_012589.1
IL-6	TTCCAGCCAGTTGCCTTCTT	TGTTGTGGGTGGTATCCTCTGT	NM_012589.1
Arg-1	AAAGCCCATAGAGATTATCGGAGC G	AGACAAGGTCAACGCCACTGCC	NM_017134.2
IL-10	CAGCTGCGACGCTGTCATCGA	GCAGTCCAGTAGATGCCGGGTG	NM_012854.2
TNF- $\alpha$			Adquirido na Quiagen
RPLPO	AGGGTCCTGGCTTTGTCTGTGG	AGCTGCAGGAGCAGCAGTGG	NM_022402.2

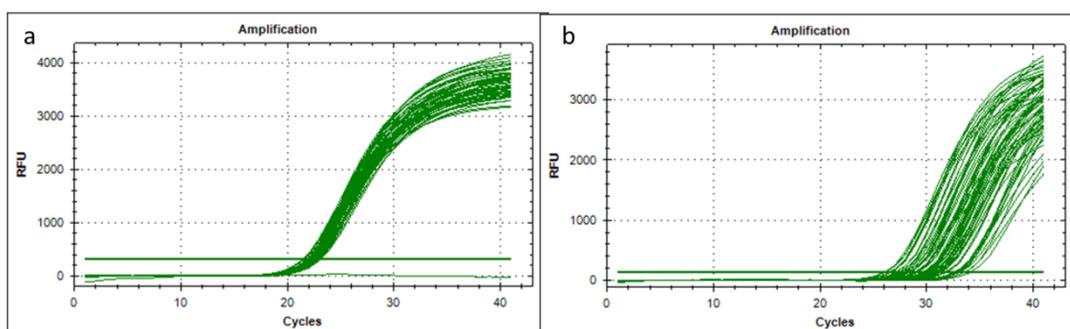
SCD-1 = esteroil coenzima A dessaturase-1; PPAR- $\gamma$  = receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gamma; SREBP-1c = proteína ligante do elemento regulatório do esteroil; ACC = acetil-CoA carboxilase; CPT-1 = Carnitina palmitoil-transferase 1; HSL = lipase sensível a hormônio; IL- interleucina-; MCP-1 proteína-1 quimioatratante de monócitos; IFN-  $\gamma$  interferon-gama; TNF- $\alpha$  fator de necrose tumoral-alfa; RPLPO = proteína ribossomal grande.

A especificidade dos produtos de amplificação foi confirmada tanto através da formação de apenas um pico nas curvas de melting (Fig. 12a) quanto pela amplificação de apenas uma banda de tamanho específico (confirmado com padrão de baixa massa molecular de DNA - Low DNA Mass™ Ladder, Invitrogen Corporation, Califórnia, USA) do produto de PCR visualizada em gel de agarose a 2% (Fig. 12c). Como gene constitutivo inicialmente testamos o GAPDH e depois a  $\beta$ -actina, porém nenhum desses dois genes foi estável inter- e intra-grupos (Vandesompele et al., 2002). O terceiro candidato foi o RPLPO, que se mostrou adequado a ser gene constitutivo nas condições experimentais e no tecido analisado neste trabalho, por isso foi usado como gene normalizador.



**Figura 12.** Validação de amplificação específica para os produtos da PCR (a) Ilustração da formação de apenas um pico na curva de melting. . (b) Exemplo de confirmação da amplificação do gene esperado, identificado pela formação de apenas uma banda e no tamanho esperado, feito em gel de agarose. As amostras aplicadas no gel são o produto do qPCR.

A influência do treinamento, da ovariectomia ou a da associação de ambos sobre a expressão dos genes selecionados foi avaliada pelo método de quantificação relativa. Os dados foram analisados usando a equação de Livak e Schmittgen, onde a variação na expressão de cada gene é igual a  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . O ciclo limiar ( $C_T$ ), determinado pela linha horizontal que pode ser observada na Fig. 13, indica o número do ciclo onde a reação de amplificação atinge o limiar fixado. A variação do  $C_T$  ( $\Delta C_T$ ) é então calculada através da subtração do  $C_{T\text{gene alvo}}$  (exemplificado pela figura 14 a) pelo  $C_{T\text{gene constitutivo}}$  (exemplificado pela figura 14 a). Posteriormente é calculado o  $\Delta\Delta C_T$ , que é a subtração do  $\Delta C_T$  pela média do  $\Delta C_{T\text{grupo controle}}$ , neste caso foi utilizado a média do  $\Delta C_T$  do grupo SHAM. O negativo desse resultado ( $-\Delta\Delta C_T$ ) é então elevado a potência de 2 ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) (Livak; Schmittgen, 2001). Desta forma os dados estavam preparados para passarem por tratamento estatístico convencional.



**Figura 13.** Exemplo de curvas de amplificação de PCR em tempo real ilustrando o padrão de amplificação de (a) gene constitutivo e; (b) gene alvo.

### 3.10 Análise estatística

Os resultados foram inicialmente submetidos aos testes de homogeneidade (teste de Levene) e normalidade. Com as variáveis apresentando distribuição normal e homocedasticidade, foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two way (considerando as variáveis OVX e TR). Quando as médias dos grupos foram diferentes ( $p \leq 0.05$ ), a análise post-hoc (Tukey's test) para comparações múltiplas foi realizada. As análises estatísticas foram feitas usando o programa estatístico InStat 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA, 1998). A apresentação dos resultados foi feita pela média $\pm$ erro padrão da média.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Controle do ciclo estral e massa do útero

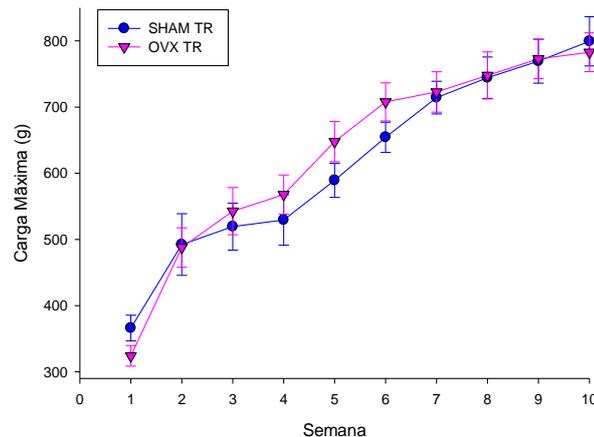
Para confirmar o sucesso da ovariectomia, continuamos a coleta do esfregaço vaginal por até um mês antes do sacrifício. As ratas dos grupos SHAM continuaram com o ciclo normal (Fig.14), que durava de 4 a 5 dias, com pequenas variações individuais. As ratas dos grupos OVX apresentaram esfregaço vaginal sempre com as mesmas células, permanecendo na fase diestro. O massa do útero também confirma o sucesso da ovariectomia (tabela 2). Obtivemos sucesso em 100% das ovariectomias deste estudo.



**Figura 14.** Representação do resultado de coleta do esfregaço vaginal. Após o procedimento cirúrgico, as ratas pseudo-ovariectomizadas continuaram a ciclar normalmente. As ratas ovariectomizadas bilateralmente apresentaram sempre os mesmos tipos de células, característica da fase diestro.

### 4.2 Carga de carregamento

Houve um incremento gradual na carga máxima de carregamento das ratas durante todo o período experimental. O grupo SHAM-TR aumentou 199% a carga de carregamento durante o período de treinamento (de 406,5g para 808,5g), enquanto o grupo OVX-TR aumentou em 235% ( de 331,8g para 779,2g). No entanto, não ocorreu diferença entre nas cargas máximas das ratas SHAM-TR e OVX-TR (Fig. 15).



**Figura 155.** Comparação da carga máxima incremental dos grupos SHAM-TR e ratas OVX-TR ao longo das semanas de treinamento (n=6 por grupo). SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são médias  $\pm$  EPM.

### 4.3 Glicemia de jejum

Não houve diferença significativa entre os grupos sedentários, ovariectomizadas ou não. Entretanto, o grupo SHAM-TR apresentou valor glicêmico menor que os grupos OVX e OVX-TR (tabela 2).

### 4.4 Ingestão alimentar, massa corporal, e eficiência alimentar

A ingestão alimentar era maior no grupo OVX comparado a todos os outros grupos. O treinamento resistido reduziu a ingestão alimentar, tanto no grupo SHAM-RT quanto no OVX-RT, comparados aos grupos SHAM e OVX, respectivamente. O grupo SHAM-RT apresentou a menor ingestão alimentar entre os grupos (Tabela 2).

A massa corporal das ratas também pode ser utilizada como demonstrativo do sucesso da ovariectomia (Cao et al., 2013; Zengin et al., 2013). Já está bem relatado que dependente (Saengsirisuwan et al., 2009; Pighon et al., 2011; Elbassuoni; Ragy; Aziz, 2012) ou independentemente (Heine et al., 2000; Jones et al., 2001; Rogers et al., 2009; Vieira Potter et al., 2012) do aumento do consumo alimentar, roedores ovariectomizadas aumentam a massa corporal.

Inicialmente, não havia diferença na massa corporal entre os grupos. Três semanas após a ovariectomia, as ratas ovariectomizadas apresentaram massa corporal maior do que grupos SHAM (Tabela 2). Neste momento, os grupos treinados iniciaram o protocolo de exercício resistido.

O período de treinamento consistiu de 10 semanas. Ao final desse período, as ratas OVX apresentaram massa corporal maior do que a dos outros grupos. As ratas do grupo OVX-RT apresentaram massa corporal menor do que as ratas OVX. A massa corporal das ratas SHAM-TR era menor do que a dos outros grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Medidas fisiológicas das ratas SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR.

	SHAM	OVX	SHAM-TR	OVX-TR
Massa do útero (g/100g massa corporal)	0,203±0,01	0,054±0,08 <sup>aa</sup>	0,195±0,03 <sup>bb</sup>	0,044±0,02 <sup>aa,cc</sup>
Ingestão Alimentar (g)	21,19±0,1	23,13±0,2 <sup>aa</sup>	19,57±0,2 <sup>a,bb</sup>	20,62±0,3 <sup>bb,c</sup>
Massa corporal inicial (g)	252,7±7	244,8±12	244,3±7	250,3±7
Massa corporal pré-TR (g)	291,7±4	319,5±4 <sup>aa</sup>	278,3±7 <sup>bb</sup>	318,7±2 <sup>aa,cc</sup>
Massa corporal final (g)	336,3±7	392,7±7 <sup>aa</sup>	301,3±5 <sup>aa,bb</sup>	367,1±4 <sup>a,b,cc</sup>
Glicemia de jejum (mg/dL)	155,2±3	163,6±2	147,2±4 <sup>bb</sup>	161,8±1 <sup>c</sup>

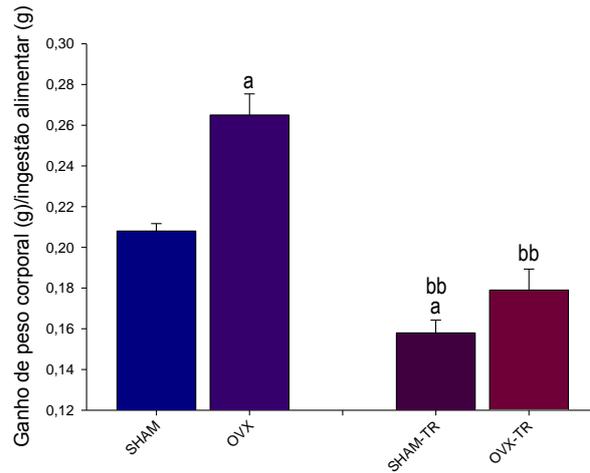
Valores são média ± erro padrão da média; N=6 em cada grupo.

<sup>a</sup>p<0,05 <sup>aa</sup>p<0,001 vs SHAM

<sup>b</sup>p<0,05 <sup>bb</sup>p<0,001 vs OVX

<sup>c</sup>p<0,05 <sup>cc</sup>p<0,001 vs SHAM-TR

A eficiência alimentar era maior nas ratas do grupo OVX, comparado a todos os outros. Porém o treinamento resistido reduziu a eficiência alimentar dos grupos SHAM-TR e OVX-TR, comparados aos seus respectivos grupos sedentários. A eficiência alimentar era semelhante entre os grupos OVX-TR e os grupos SHAM. Mas era menor no grupo SHAM-TR comparado ao grupo SHAM (Fig. 16).

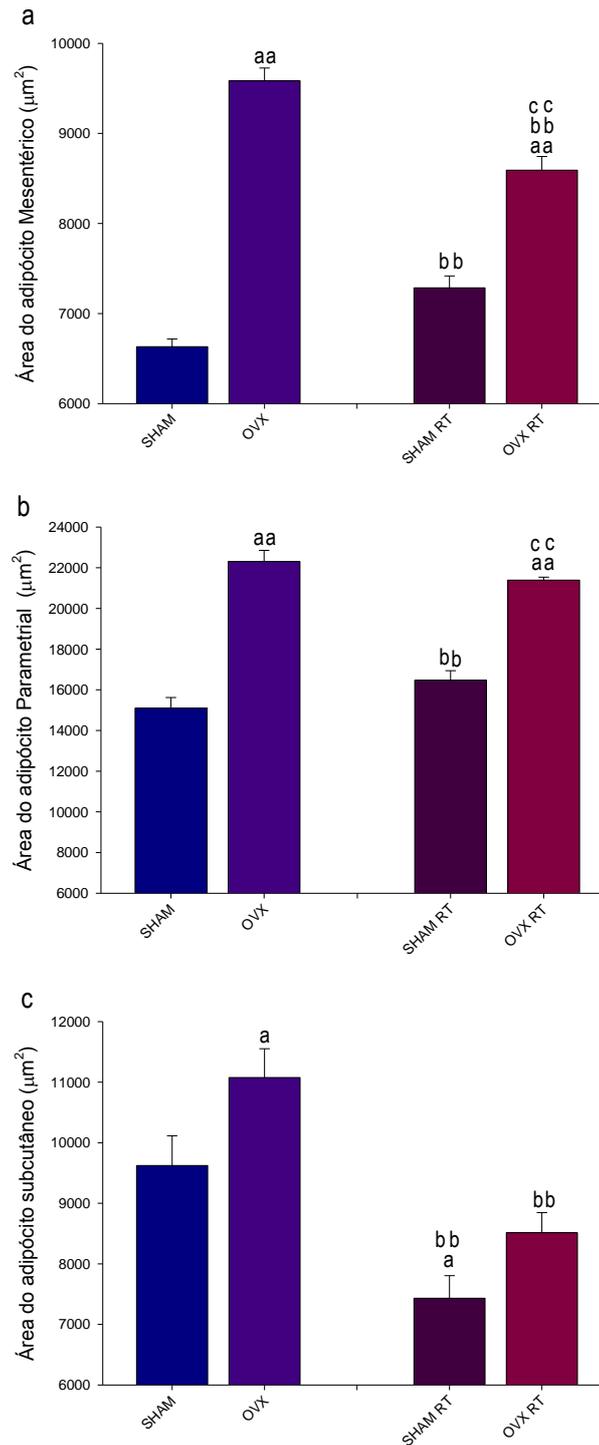


**Figura 166.** Comparação da eficiência alimentar entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX.

#### 4.5 Área dos adipócitos

O tamanho dos adipócitos dos tecidos adiposos mesentérico (Fig.17 a) e parametrial (Fig. 17 b) viscerais, assim como dos adipócitos do tecido adiposo gluteal subcutâneo (Fig. 17c) era maior no grupo OVX comparado ao grupo SHAM. No entanto, comparando estes dois grupos, o aumento foi maior no adipócitos viscerais (45 e 48%, respectivamente) em comparação com os adipócitos subcutâneos (15%).

O grupo OVX-TR apresentou a menor área de adipócitos do tecido adiposo visceral mesentérico, mas não dos adipócitos do tecido adiposo parametrial, comparado ao grupo OVX. A área de adipócitos do tecido adiposo subcutâneo era igual entre os grupos OVX-TR e os grupos SHAM. Entre os grupos SHAM, a área dos adipócitos viscerais e subcutâneos era menor no grupo treinado.



**Figura 17.** Área das células adiposas (a) mesentérica, (b) parametrial e (c) subcutânea das ratas dos grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR. (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX, <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR.

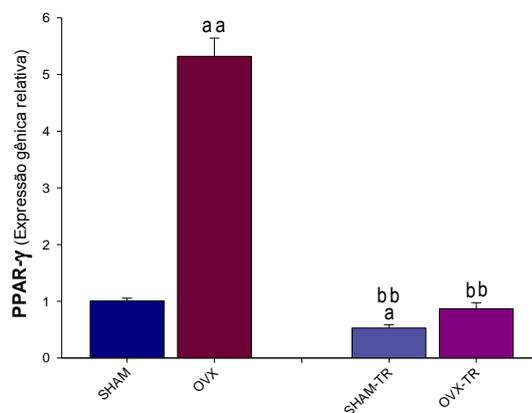
Apesar da área de ambos os tecidos adiposos viscerais analisados (mesentérico e parametrial) terem aumentado similarmente na ausência do estrogênio, o treinamento resistido demonstrou exercer um maior efeito sobre a área dos adipócitos mesentéricos. Com

o objetivo de estudar os mecanismos moleculares envolvidos nessa regulação, tanto do tamanho do adipócito, assim como das consequências inflamatórias associadas a essa modulação, e considerando a importância do TAV sobre o quadro inflamatório crônico, realizamos análises de expressão gênica do tecido adiposo visceral mesentérico.

#### 4.6 Expressão de genes que coordenam o metabolismo lipídico

##### 4.6.1 Adipogênese e lipogênese

A ovariectomia aumentou a expressão gênica do PPAR- $\gamma$ , o principal regulador da adipogênese (diferenciação de novos adipócitos), mas que também possui função sobre a lipogênese (síntese de AG e TG) no grupo OVX comparado ao grupo SHAM. O treinamento resistido impediu completamente este aumento no grupo OVX-TR, comparado ao grupo SHAM. O treinamento resistido também reduziu a expressão desse gene no grupo SHAM-TR, comparado ao grupo SHAM. Não houve diferença na expressão PPAR- $\gamma$  entre dois grupos treinados, no TA mesentérico (Fig. 18).



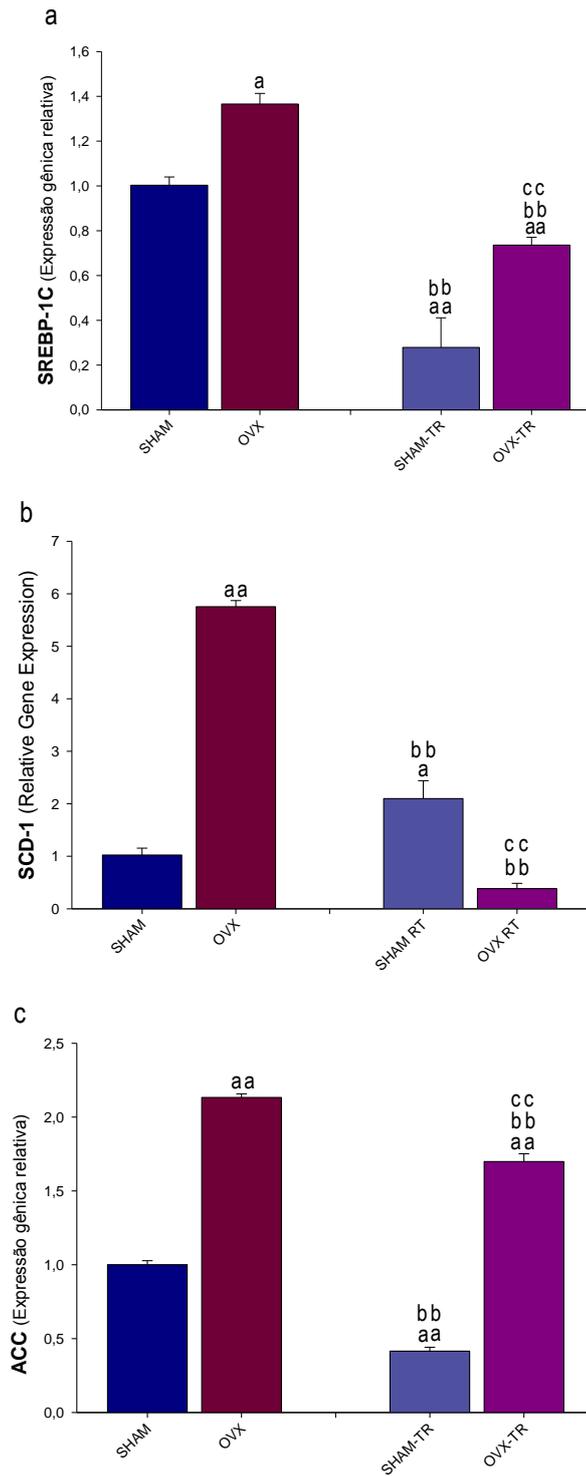
**Figura 18.** Comparação da expressão gênica de PPAR- $\gamma$  entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX.

#### 4.6.2 Principais reguladores da lipogênese

O ovariectomia também aumentou a expressão gênica do fator de transcrição lipogênico SREBP-1c (Fig. 19a) assim como de seus alvos *downstream* SCD-1 (Fig. 19b) e ACC (Fig. 19c) no grupo OVX comparado ao grupo SHAM. O treinamento resistido evitou o aumento provocado pela ovariectomia da expressão SCD-1 e reduziu a expressão de SREBP-1c no grupo OVX-TR comparado ao grupo SHAM. Mas a expressão de ACC era maior no grupo OVX-TR comparado ao grupo SHAM. No entanto, era menor no grupo OVX-TR comparado ao grupo OVX.

O treinamento resistido também melhorou, apesar da menor proporção, o metabolismo lipogênico nas ratas SHAM, uma vez que a expressão de SREBP-1c e de seu gene alvo ACC era menor no grupo SHAM-TR do que no grupo SHAM. No entanto, a expressão de SCD-1 era maior grupo SHAM-TR do que no grupo SHAM (Figs. 19 a,b e c, respectivamente).

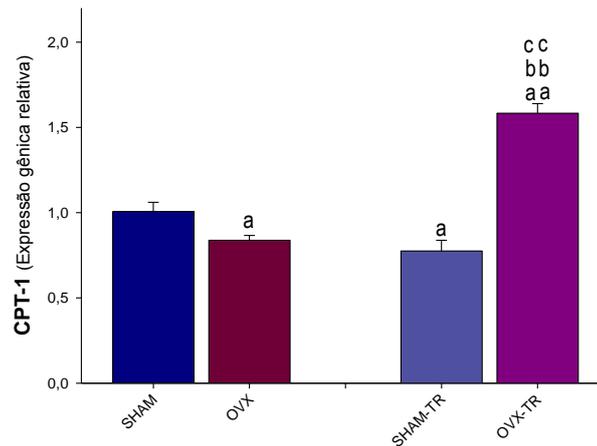
Entre os grupos treinados, a expressão SREBP-1c e de seu gene alvo ACC era maior era maior grupo OVX-TR do que no grupo SHAM-TR. Já a expressão de SCD-1 era menor no grupo OVX-TR do que no grupo SHAM-TR (Figs. 19 a,b e c, respectivamente).



**Figura 19.** Comparação da expressão gênica de (a) SREBP-1c, (b) SCD-1 e (c) ACC entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX, <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR.

#### 4.6.3 B-oxidação

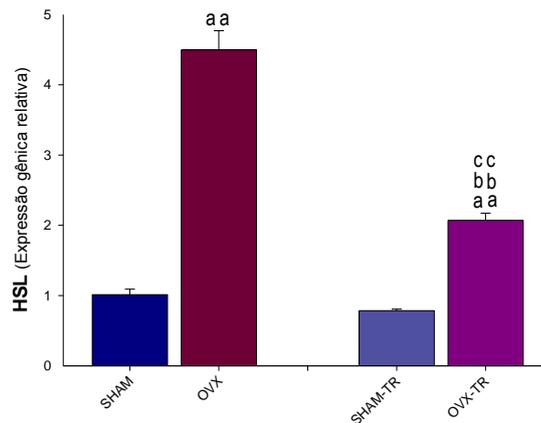
A expressão do gene CPT-1, cujo produto é responsável por transportar os AG livres para dentro das mitocôndrias para serem oxidados, estava reduzido nas ratas OVX e SHAM-TR, em comparação ao grupo SHAM. O grupo OVX-TR era o que mais expressava CPT-1 (Fig. 20).



**Figura 20.** Comparação da expressão gênica de CPT-1 entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX, <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR.

#### 4.6.4 Lipólise

A enzima com função chave na liberação de TG armazenados para serem liberados na corrente sanguínea, HSL, aumentou nos grupo OVX e OVX-TR, comparados ao grupo SHAM. No entanto, sua expressão era menor no grupo OVX-TR comparado ao grupo OVX. O grupo OVX-TR expressava mais HSL do que o grupo SHAM-TR. Não havia diferença entre os grupos SHAM e SHAM-TR (Fig. 21).



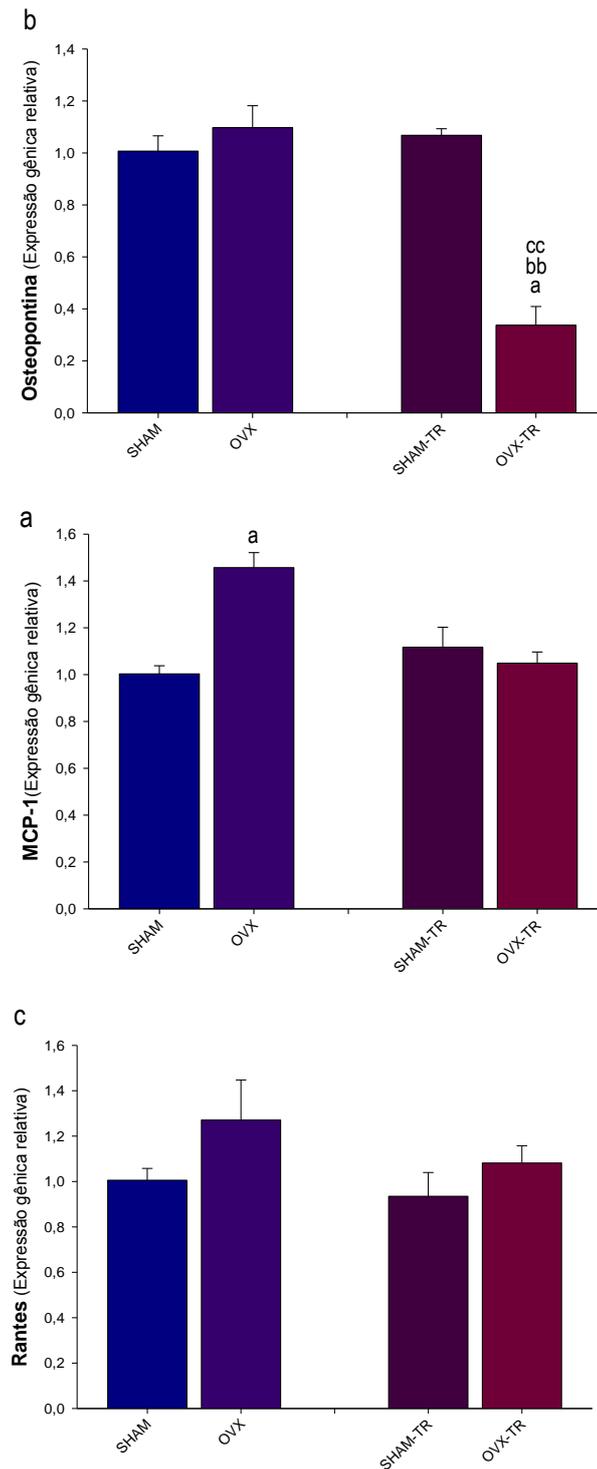
**Figura 21.** Comparação da expressão gênica de HSL entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX, a <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR.

Estes resultados indicam os potenciais benefícios do treinamento resistido como uma estratégia alternativa para controlar os efeitos da deficiência de estrogênio no metabolismo lipídico.

#### 4.7 Expressão de genes relacionados à inflamação crônica de baixa intensidade

##### 4.7.1 Quimioatraentes de monócitos

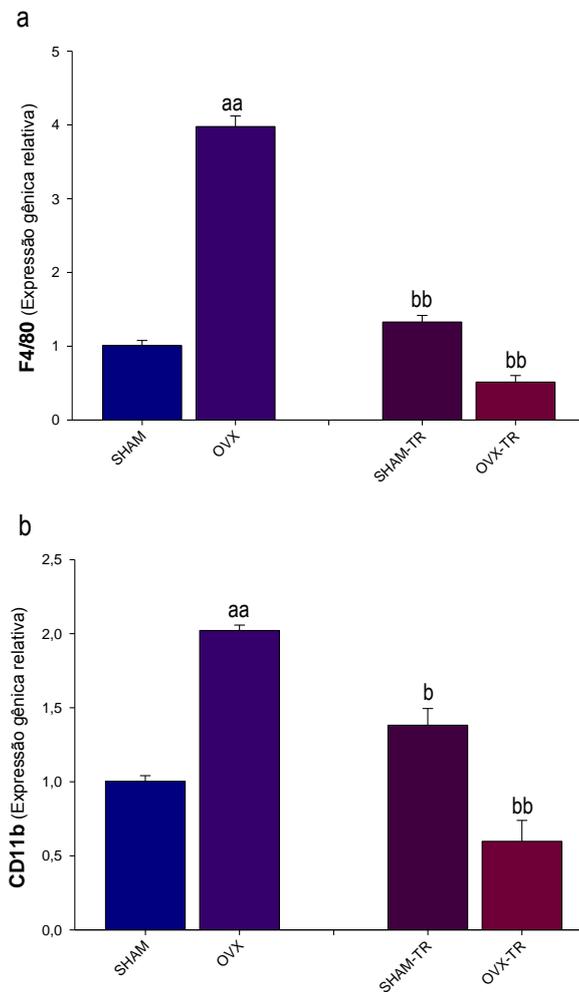
A expressão de genes codificantes de moléculas quimioatraentes de monócitos praticamente não foi alterada no TAV mesentérico por nenhuma das intervenções, com exceção da expressão gênica do principal quimioatraente de monócitos MCP-1 (Lumeng; Bodzin; Saltiel, 2007) (Fig. 22a), que era maior no grupo OVX, e da osteopontina (Fig. 22b), que era menor no grupo OVX-TR, comparado aos outros grupos.



**Figura 22.** Comparação da expressão gênica de (a)MCP-1, (b) Osteopontina e (c) Rantes entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>a</sup>p < 0,05 vs SHAM, <sup>bb</sup>p < 0,001 vs OVX, <sup>cc</sup>p < 0,001 vs SHAM-TR.

#### 4.7.2 Identificadores da presença de macrófagos

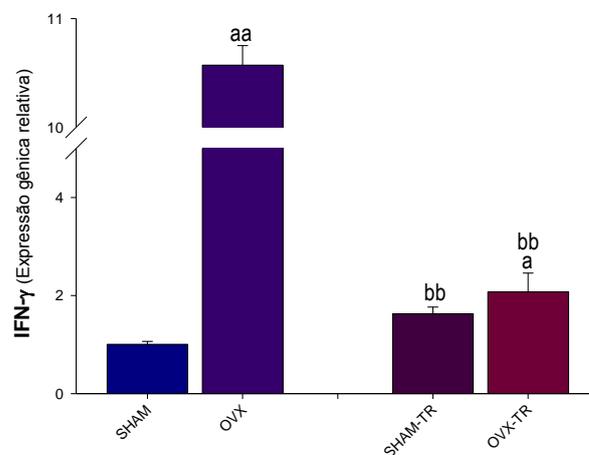
Apesar da expressão dos genes que recrutam macrófagos não estar alterada, a expressão dos genes que identificam a presença de macrófagos, F4/80<sup>+</sup> e CD11b, era maior no grupo OVX em relação aos outros grupos. Contudo, os dois grupos treinados, SHAM-TR e OVX-TR, expressavam a mesma quantidade desses genes comparados ao grupo SHAM. Também não havia diferença entre os grupos treinados SHAM-TR e OVX-TR. (Fig. 23 a e b, respectivamente).



**Figura 23.** Comparação da expressão gênica de (a) F4/80 e (b) CD11b entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>b</sup>p <0,05, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX.

#### 4.7.3 Ativador de macrófagos M1

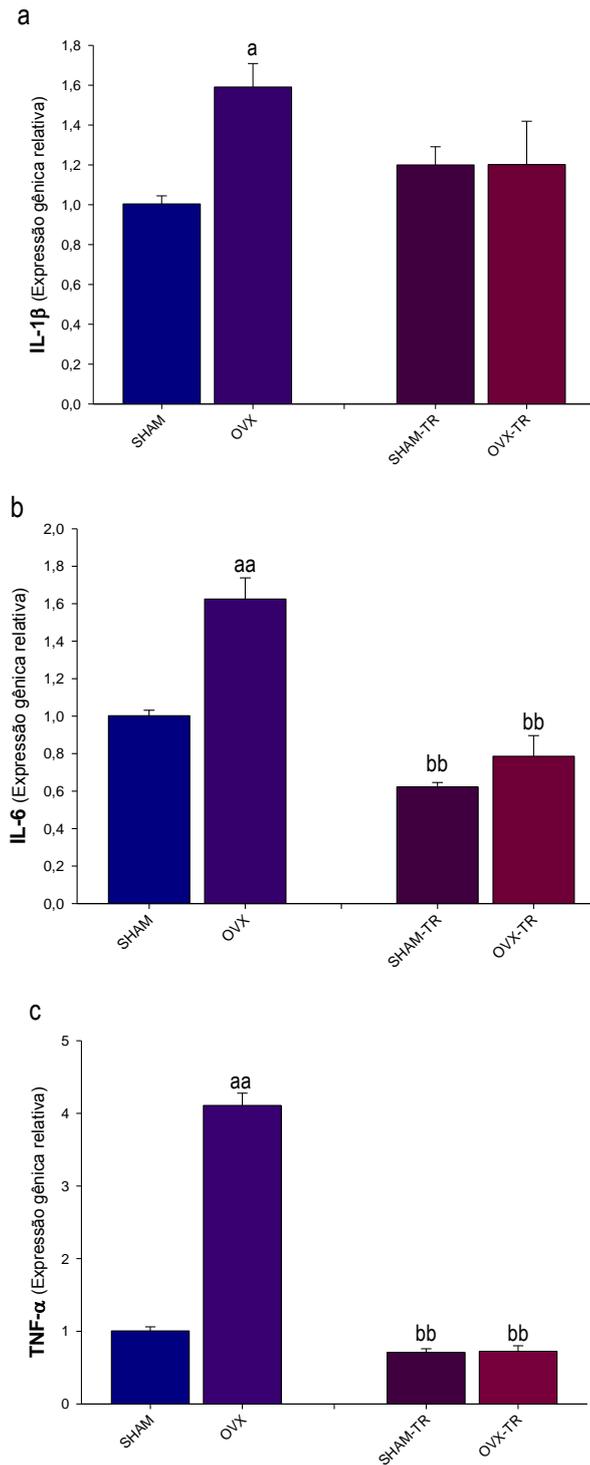
A ovariectomia também aumentou a expressão do gene IFN- $\gamma$ , um ativador de macrófagos M1, no grupo OVX comparado ao grupo SHAM. A expressão desse gene era menor no grupo OVX-TR comparado ao grupo OVX. Porém a expressão de IFN- $\gamma$  era maior no grupo OVX-TR em relação ao grupo SHAM, mas era igual em relação ao grupo SHAM-TR. Não havia diferença na expressão de IFN- $\gamma$  entre os grupos SHAM (Fig. 24).



**Figura 24.** Comparação da expressão gênica de IFN- $\gamma$  entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX

#### 4.7.4 Citocinas inflamatórias

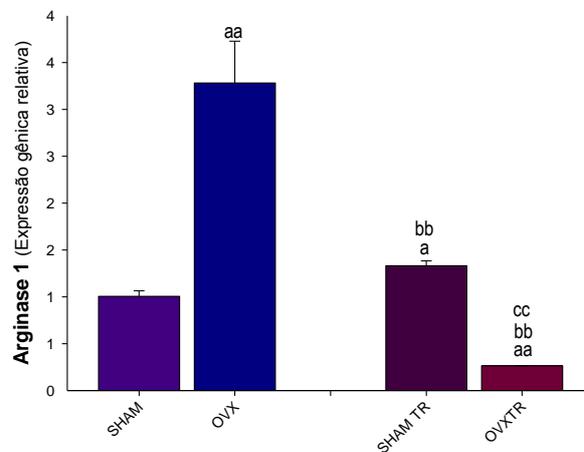
A expressão de citocinas inflamatórias, IL-1B, IL-6 e TNF- $\alpha$ , era maior no grupo OVX comparado a todos os outros grupos. No entanto, não havia diferença em nenhum desses genes entre os grupos SHAM, SHAM-TR e OVX-TR.



**Figura 25.** Comparação da expressão gênica de IL-1 $\beta$  (a), IL-6 (b) e TNF- $\alpha$  (c) entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX.

#### 4.7.5 Identificador de macrófagos M2a ativados

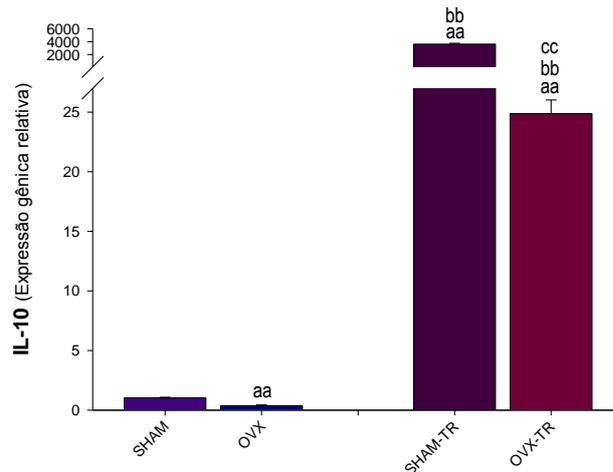
A expressão gênica de arginase-1, feita por macrófagos ativados alternativamente M2a, era maior no grupo OVX comparado a todos os outros grupos. No entanto, era menor no grupo OVX-TR comparado a todos os outros grupos. A expressão era maior no grupo SHAM-TR em relação ao grupo SHAM. (Fig. 26).



**Figura 26.** Comparação da expressão gênica de arginase-1 entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média ± EPM. <sup>a</sup>p <0,05, <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX, <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR.

#### 4.7.6 Citocina anti-inflamatória

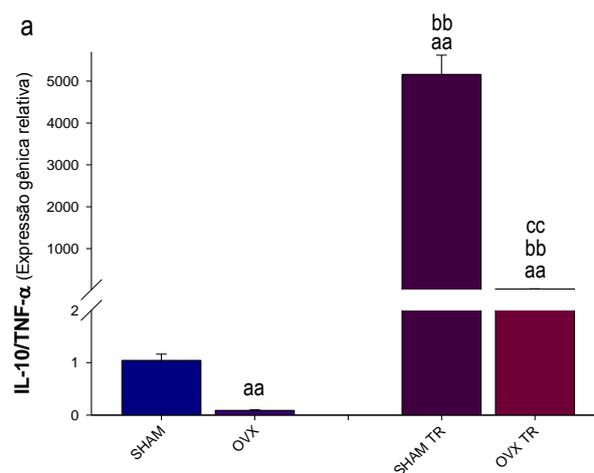
A expressão do gene considerado o mais potente anti-inflamatório IL-10 era menor no grupo OVX comparado a todos os outros grupos. O grupo SHAM-TR era o que mais expressava IL-10 em relação a todos os outros. O grupo OVX-TR expressava mais IL-10 do que os grupos SHAM e OVX (fig. 27).



**Figura 27.** Comparação da expressão gênica de IL-10 entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX e <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR.

#### 4.7.7 Relação IL-10/TNF- $\alpha$

A razão IL-10/TNF- $\alpha$  que, quando baixa, indica status inflamatório e doenças associadas à morbidade, era menor no grupo OVX comparado a todos os outros grupos. O grupo SHAM-TR tinha a maior razão IL-10/TNF- $\alpha$ , comparado a todos os outros. Mas o grupo OVX-TR tinha a razão IL-10/TNF- $\alpha$  maior do que os grupos SHAM e OVX.



**Figura 28.** Comparação das relações IL-10/ TNF- $\alpha$  entre os grupos SHAM, OVX, SHAM-TR e OVX-TR no tecido adiposo mesentérico (n=6 por grupo). SHAM = sham sedentária, OVX = ovariectomizada sedentária, SHAM-TR = sham treinamento resistido e OVX-TR = ovariectomizadas treinamento resistido. Os dados são média  $\pm$  EPM. <sup>aa</sup>p <0,001 vs SHAM, <sup>bb</sup>p <0,001 vs OVX e <sup>cc</sup>p <0,001 vs SHAM-TR.

## 5 DISCUSSÃO

Não há dúvidas de que a TRH é um método efetivo para reduzir os sintomas da pós-menopausa, porém os riscos de efeitos colaterais, principalmente o de desenvolver alguns tipos de câncer, provocou um grande declínio na prescrição e uso desta terapia (Cummings et al., 2009; Narod, 2011). Esse declínio levanta a necessidade de encontrar alternativas não farmacológicas para o tratamento dos sintomas da pós-menopausa (Daley; Stokes-Lampard; Macarthur, 2009; Leite et al., 2010).

A obesidade na pós-menopausa é caracterizada pelo aumento de massa gorda e redução de massa magra, uma condição denominada obesidade sarcopênica, o que representa um grande fator de risco para a mulher (Oliveira et al., 2011). Reconhecendo a condição de obesidade sarcopênica na pós menopausa tanto em mulheres (Oliveira et al., 2011) quanto em roedores (Vieira Potter et al., 2012) e considerando os maiores benefícios do exercício resistido sobre a massa muscular esquelética, sem entrar aqui nas questões de osteoporose, consideramos importante o modelo de exercício resistido. Por isso adotamos um modelo de exercício resistido para investigar o metabolismo lipídico e a inflamação crônica, na falta dos hormônios ovarianos.

O modelo de exercício resistido em escada já demonstrou ser eficaz em aumentar a massa do músculo esquelético (Prestes et al., 2011) assim como em reduzir tanto os depósitos de gordura quanto o acúmulo de gordura ectópica (Leite et al., 2009), além de reverter os efeitos deletérios da ovariectomia sobre o osso (Shigemoto et al., 2012) de ratas ovariectomizadas.

Este modelo de exercício se preocupa com os princípios do treinamento (Tubino, 1984). Promove a manutenção do número de séries (4-9) e a continuidade do exercício (3 vezes por semana, durante 10 semanas). Além disso, utiliza de sobrecarga individual e crescente, que é reajustada a cada treino de acordo com as possibilidades individuais provenientes das adaptações moleculares e fisiológicas que ocorrem a cada sessão de treino, preservando dessa forma a individualidade biológica. Além disso, o descanso de 2 minutos entre as séries proporciona tempo suficiente para a recuperação metabólica entre as séries (Smith, 2004). Esses cuidados possibilitam atingir os melhores resultados positivos. Talvez tenham sido estes cuidados ao prescrever o exercício que maximizem os resultados positivos. Os mesmos cuidados devem ser observados ao trabalhar com humanos. O protocolo

de treinamento promoveu um aumento no desempenho, avaliado pela habilidade de carregar cargas progressivamente mais pesadas (Fig. 15). Ambos os grupos treinados, SHAM-TR e OVX-TR, evoluíram a carga de carregamento de maneira semelhante.

Já está bem documentado (Saengsirisuwan et al., 2009; Stubbins et al., 2012b; Vieira Potter et al., 2012) que a falta dos hormônios ovarianos resulta em obesidade. Estudos realizados com machos e fêmeas demonstraram que o estrogênio protege contra a obesidade. Roedores machos alimentados com dieta hiperlipídica exibem maior propensão ao aumento de gordura e massa corporal do que fêmeas. No entanto, a remoção dos ovários elimina a proteção das fêmeas, fazendo que com elas mimetizem a suscetibilidade dos machos em aumentar a gordura e massa corporal. A suplementação com estrogênio reestabelece essa proteção (Hong et al., 2009; Stubbins et al., 2012b). Adicionalmente, a deleção do receptor de estrogênio em camundongos tanto machos quanto fêmeas, aumenta a adiposidade em ambos, sem aumento da ingestão alimentar (Heine et al., 2000).

Consistente com trabalhos anteriores, tanto a massa corporal (Corriveau et al., 2008; Saengsirisuwan et al., 2009) quanto à ingestão (Cao et al., 2013; Zengin et al., 2013) aumentaram no grupo OVX. No entanto, o treinamento resistido adotado foi capaz de prevenir tanto o aumento da ingestão alimentar quanto, parcialmente, da massa corporal. Em mulheres pós-menopausais, o exercício resistido também reduziu o diâmetro de adipócitos subcutâneos, visceral e gluteal (Revisado por Thompson et al., 2012).

O pequeno, se comparado ao aumento que teve o grupo OVX, porém significativo, aumento de massa corporal do grupo OVX-TR comparado ao grupo SHAM, provavelmente é resultado da demora (*delay*) em iniciar o treinamento resistido após a ovariectomia (3 semanas), pois neste período a diferença entre a massa corporal dos grupos OVX e SHAM foi grande (tabela 2). Ao contrário, no período de treinamento resistido, o aumento da massa corporal das ratas OVX-TR foi semelhante a das ratas SHAM. Portanto, estes dados, juntamente com resultados de trabalhos anteriores (Pighon et al., 2010; Shigemoto et al., 2012), apontam para a importância do início imediato após a perda da atividade ovariana para prevenir a obesidade, tanto em roedores quanto em mulheres pós-menopausais.

Nossos resultados também confirmam o impacto de baixos níveis de estrogênio tanto sobre o aumento da área de adipócitos quanto sobre o redirecionamento dos depósitos de TA subcutâneos para depósitos viscerais, pois embora a área dos três depósitos de TA tenha

aumentado nos animais OVX em comparação ao grupo SHAM, o aumento foi maior nos adipócitos dos TA viscerais (45% no depósito mesentérico e 48% no parametrial) do que no depósito subcutâneo (15%) (Fig. 17 a, b e c), evento já demonstrado previamente também em camundongos (Rogers et al., 2009; Vieira Potter et al., 2012) e seres humanos (Lovejoy et al., 2008; Davis et al., 2012; Tchernof; Despres, 2013).

Não existe dúvida de que a quantidade de TA abdominal possui forte correlação, e que talvez seja a direcionadora dos riscos para a saúde associados com o sobrepeso ou a obesidade. A obesidade visceral é parte de um fenótipo complexo que inclui disfunção do armazenamento de TA e acúmulo ectópico de TG em vários locais, incluindo o fígado (Tchernof; Despres, 2013). Portanto a menor capacidade de expansão do TA subcutâneo e o aumento dos TA viscerais pode ser a causa da lipodistrofia (Tchernof; Despres, 2013) observada em ratas OVX de um trabalho semelhante a este (Leite et al., 2009).

A obesidade visceral também está associada à RI (Spritzer; Oppermann, 2013; Tchernof; Despres, 2013). Apesar das ratas OVX possuírem adipócitos maiores, as ratas OVX não apresentaram glicose de jejum elevada. Isso talvez porque a RI apareça apenas bem depois da ovariectomia - em camundongos aproximadamente 26 semanas após a cirurgia - demora consequente, pelo menos em parte, do tempo necessário para instaurar e modular processo inflamatório no TA visceral, necessário para desencadear a RI (Vieira Potter et al., 2012). Nos grupos treinados, a glicemia dos grupos SHAM-TR e OVX-TR era semelhante a dos seus respectivos grupos sedentários, mas era menor no grupo SHAM-TR do que no grupo OVX-TR (tabela 2). Como existe uma relação positiva entre tamanho dos adipócitos viscerais e RI (Majka et al., 2010), a menor glicemia do grupo SHAM-TR pode ter sido decorrente do menor tamanho dos adipócitos viscerais deste grupo comparado ao grupo OVX-TR.

Os resultados de massa corporal e tamanho dos adipócitos são alicerçados pelo conceito de eficiência alimentar. Quando ocorre um aumento na eficiência alimentar, há um maior aumento na massa corporal, mesmo com o consumo semelhante de alimento. O grupo OVX apresentou a maior eficiência alimentar entre os grupos (Fig. 16), o que parece ser a causa do maior aumento tanto de massa corporal (tabela 2) quanto da área dos adipócitos deste grupo (Fig. 17), uma vez que camundongos, mesmo sem aumentarem a ingestão alimentar após a ovariectomia, se tornam obesos em comparação aos animais não ovariectomizados. Portanto, a obesidade desses camundongos OVX é atribuída à maior eficiência alimentar (Rogers et al., 2009; Vieira Potter et al., 2012; Camporez et al., 2013).

O aumento da eficiência alimentar em roedores OVX comparados aos SHAM é consequência do menor gasto energético corporal (mensurado pelo consumo de oxigênio), que por sua vez é resultado não só da redução da atividade física espontânea nas horas escuras (período acordado de roedores), mas também por mecanismos independentes ainda desconhecidos, nas horas claras (período de sono de roedores) (Rogers et al., 2009; Vieira Potter et al., 2012; Camporez et al., 2013). Estes dados são consistentes com os dados de mulheres pós-menopausais, que também apresentam redução do gasto energético diário total e durante o sono (Lovejoy et al., 2008).

Nós encontramos que o treinamento resistido previne o aumento da eficiência alimentar nas ratas OVX (fig. 16). A eficiência alimentar é, pelo menos parcialmente, relacionada com o gasto energético que, por sua vez, é positivamente relacionado com a quantidade de massa magra (Strasser; Arvandi; Siebert, 2012), principal determinante do gasto energético (Thrush et al., 2013). O exercício de resistência na escada demonstrou ser eficaz para aumentar a massa muscular esquelética em ratos OVX (Prestes et al., 2011). Assim, o aumento da massa muscular poderia explicar a menor da eficiência alimentar do grupo OVX-TR comparado ao grupo OVX. No entanto, as causas precisam ser melhores investigadas. A suplementação com estrogênio produz o mesmo benefício (redução da eficiência alimentar) em animais OVX (Saengsirisuwan et al., 2009; Pighon et al., 2011), indicando que treinamento resistido tem um importante efeito semelhante ao estrogênio na prevenção da obesidade em animais OVX.

O TA é um importante órgão metabólico que pode estocar e liberar energia em resposta às variações de demanda energética (Bouwman et al., 2013). Estudos sobre o metabolismo do TA sugerem que o tamanho dos adipócitos é um fator determinante das diferenças regionais no metabolismo lipídico (Tchernof; Despres, 2013). Para esclarecer possíveis mecanismos envolvidos na ação metabólica do treinamento físico sobre o TAV mesentérico de ratas OVX, analisamos a expressão de genes-chave que regulam o metabolismo lipídico.

Na obesidade ocorre aumento da lipólise do TA (Galic; Oakhill; Steinberg, 2010; Czech et al., 2013), pois adipócitos hipertrofiados, com grandes estoques de TG, possuem altas taxas lipolíticas (Strasser; Arvandi; Siebert, 2012). Estudo com populações de adipócitos separados de acordo com seu tamanho mostraram que os adipócitos grandes possuem maiores taxas lipolíticas, tanto basal quanto estimulada (Tchernof; Despres, 2013).

O aumento tanto na expressão gênica de HSL (Fig. 21) quanto na fosforilação dessa proteína (Stubbins et al., 2012b), uma enzima fundamental na lipólise, em condições de ausência dos hormônios ovarianos, sugere o envolvimento dessa enzima na alta atividade lipolítica do TAV observada tanto em roedores ovariectomizados quanto em mulheres pós-menopausais, ambos com grandes adipócitos (Stubbins et al., 2012b), o que resulta em elevados níveis séricos de TG encontrados tanto em ratas (Leite et al., 2009) quanto em camundongos (Stubbins et al., 2012b) OVX, o que promove lipotoxicidade (acúmulo ectópico de lipídeos) (Stein; Imai, 2012).

A HSL é um mediador crítico da lipólise induzida pelo exercício. Uma sessão de treino agudo aumenta a HSL (Ogasawara et al., 2010). Ao contrário, nosso protocolo de treinamento crônico evitou o aumento induzido pela ovariectomia na expressão gênica de HSL (Fig. 21). Este mesmo efeito foi observado após a suplementação com estrogênio (D'eon et al., 2005; Yonezawa et al., 2012). Em ambos os casos, o efeito provavelmente é devido a grande redução do tamanho dos adipócitos, observados tanto no grupo OVX-TR quanto no grupo OVX+estrogênio comparados ao grupo OVX.

Como a redução da HSL tende a limitar a liberação de AG dos adipócitos para o plasma (Du et al., 2011; Iwata et al., 2012), a redução na expressão de HSL pode ter um importante papel tanto a redução da lipotoxicidade quanto no melhor perfil lipídico previamente reportado em ratas OVX que realizaram o treinamento resistido (Leite et al., 2009). A redução na liberação de AG do TA no repouso é uma adaptação ao treinamento que ocorre pra evitar aumento de AG livres sistêmicos (Thompson et al., 2012). Este benefício do treinamento também foi demonstrado ocorrer em mulheres entre 30 e 60 anos, que apresentaram redução na expressão gênica de HSL, assim como melhora do perfil lipídico no soro, após 12 semanas de treinamento aeróbio (Cho et al., 2011).

O PPAR- $\gamma$ , um fator de transcrição chave na adipogênese, é alvo para diversas drogas de sensibilização à insulina (Vieira et al., 2009). Esta função é atribuída ao PPAR- $\gamma$  porque ele aumenta o número de pequenos e novos adipócitos e por consequência, aumenta a capacidade de armazenamento de TG no TAB, o que pode impedir tanto a lipotoxicidade quanto a produção de citocinas pelos adipócitos hipertrofiados (Medina-Gomez; Gray; Vidal-Puig, 2007). No entanto, as drogas insulino-sensibilizantes ligantes de PPAR- $\gamma$  usadas para tratar o diabetes, como a tiazolidinedionas, agem estimulando a adipogênese principalmente do TAS (Tchernof; Despres, 2013). Estimular PPAR- $\gamma$  no TAV jamais seria interessante, já

que além de estimular a adipogênese, induz a lipogênese, o que provoca a expansão do TA (White; Stephens, 2010; Park; Tanaka; Yokozawa, 2013). Portanto, a estimulação do PPAR- $\gamma$  deve ser cautelosa e tecido-dependente, tendo-se em mente as diferenças fisiopatológicas entre TAV e TAS.

A ovariectomia provocou um aumento expressivo na expressão de PPAR- $\gamma$  (429%) (Fig. 18). No entanto, esse aumento não evitou o aumento da área das células adiposas (Fig. 17 a, b e c). A explicação não parece ser tão complexa, uma vez que a ativação de PPAR- $\gamma$  também ativa a expressão do gene lipogênico SREBP-1c (Czech et al., 2013). De fato, as ratas do grupo OVX apresentaram alta expressão SREBP-1c e dos genes *downstream* ACC e SCD-1, todos envolvidos na lipogênese, mesmo após uma noite de jejum (Fig. 19).

Estudos em roedores demonstraram que quando eles são submetidos ao jejum, o TAV reduz a expressão de PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c e ACC e a realimentação reestabelece a expressão normal desses genes (Morgan et al., 2008; Palou et al., 2010). Já roedores obesos por dieta hiperlipídica, após permanecerem à noite em jejum, apresentaram uma persistente expressão alta dos fatores lipogênicos PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c e ACC quando comparados com os roedores alimentados com dieta normal (Morgan et al., 2008). Camundongos ob/ob (deficientes em leptina) também apresentaram uma persistente lipogênese *de novo* no TAV durante o jejum (Turner et al., 2007). De forma semelhante, humanos diabéticos tipo II apresentam aumento da lipólise basal e na expressão de PPAR- $\gamma$  e outros fatores lipogênicos no TAV mesentérico (Yang et al., 2008). Estes dados mostram que a desregulação do metabolismo lipídico no TAV pode ter uma função crítica nas patologias associadas ao acúmulo de TA visceral, como síndrome metabólica, RI, diabetes mellitus tipo II e também na falta dos hormônios ovarianos.

Da mesma forma que a suplementação com estrogênio reduz a expressão de SREBP-1c, ACC e SCD-1 em ratas OVX (D'eon et al., 2005), o treinamento resistido impediu o aumento promovido pela ovariectomia na expressão de SREBP-1c e SCD-1, assim como de PPAR- $\gamma$ . Considerando a função lipogênica de PPAR- $\gamma$ , podemos observar que tanto a alta expressão desses genes lipogênicos (PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c, ACC e SCD-1) nas ratas OVX quanto a menor expressão nas ratas OVX-TR são condizentes com os resultados de massa corporal e área de adipócitos. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a avaliar estes efeitos do treinamento resistido em ratas OVX.

Apesar de conter relativamente baixa massa mitocondrial em relação à sua dimensão global, o adipócito do TAB pode tanto para oxidar AG e carboidratos através do ciclo do ácido carboxílico (TCA) e da cadeia respiratória, quanto armazenar estes combustíveis sob a forma de triglicerídeos (TG), até que as necessidades energéticas do corpo enviem sinais para a sua liberação (Kusminski; Scherer, 2012).

No TAB, uma maior disponibilidade de glicose resulta em maior formação de Malonil-CoA através da carboxilação da acetil-CoA, pela ação da enzima ACC (Sampath e Ntambi 2006). A Malonil-CoA inibe a CPT-1, que é a enzima responsável por promover a entrada dos AG na mitocôndria para serem oxidados (Zang, Wang et al. 2005), para evitar ciclos fúteis de ácidos graxos recém-sintetizados dentro da mitocôndria (Bouwman, Wang et al. 2013). Podemos especular que a menor expressão de CPT-1 nas ratas OVX seja resultado do balanço energético positivo (evidenciado pelo aumento de massa corporal dessas ratas) o que gera grande quantidade de malonil-CoA (alta expressão de ACC), que inibi a CPT-1 (Fig. 20).

Por outro lado, quando existe pouca disponibilidade de glicose, o aumento dos TG intracelulares pode ser utilizado para a  $\beta$ -oxidação mitocondrial, também nos adipócitos, o que aumenta a utilização de AG pelos adipócitos (Bouwman et al., 2013). Portanto, o déficit energético proporcionado pelo treinamento resistido (evidenciado pela redução da massa corporal), somado a menor formação de Malonil-CoA (menor expressão de ACC) justificam o aumento de expressão de CPT-1 nas ratas OVX-TR.

Estes dados sugerem que, após o treinamento resistido, a  $\beta$ -oxidação de AG no TAV mesentérico das ratas OVX aumentou, indicando que estas ratas podem tanto estarem catabolizando os TG que estavam estocados, ou apenas realizando o ciclo fútil, que pode ocorrer no TAB para aumentar gasto energético em situações de redução de massa corporal (Bouwman et al., 2013; Flachs et al., 2013). O aumento da  $\beta$ -oxidação no TAB pode indicar a presença de células adiposas bege (Spiegelman, 2013).

As alterações encontradas na expressão dos genes relacionados ao metabolismo lipídico são consistentes com o fenótipo das ratas após a ovariectomia e/ou treinamento resistido.

Diferentemente das respostas sobre o metabolismo lipídico, o resultado da retirada do hormônio estrogênio sobre a resposta inflamatória do TAV é relativamente bem conhecida (Rogers et al., 2009; Stubbins et al., 2012b; Vieira Potter et al., 2012). No entanto,

os resultados do treinamento resistido em relação ao status inflamatório do TAV ainda não estão bem esclarecidos. Por isso, com o objetivo de contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos do treinamento resistido sobre a resposta inflamatória do TAV na ausência desse hormônio, assim como sua relação com o metabolismo lipídico, quantificamos a expressão gênica de vários marcadores inflamatórios no TA mesentérico.

Os dados até aqui demonstraram que concomitantemente com acúmulo excessivo de gordura nas ratas OVX está instaurada a desregulação do metabolismo lipídico no TAV mesentérico. O acúmulo excessivo de gordura pode resultar em um maior direcionamento de gordura para o fígado (Palou et al., 2010), como foi demonstrado por Moraes et al. (2012). Além disso, adipócitos hipertrofiados, principalmente os viscerais, produzem citocinas (Medina-Gomez; Gray; Vidal-Puig, 2007) que aumentam a infiltração de células imunológicas pró-inflamatórias no TA, gerando um baixo nível de inflamação crônica (Sell; Habich; Eckel, 2012) tanto local quanto sistêmica (Hagita et al., 2011; Hellmann et al., 2011).

Atualmente é bem aceito que a inflamação crônica inicia-se pela expansão dos compartimentos de TA (Vandenbroucke et al., 2002). Contudo, simplesmente reverter o aumento de massa parece não ser suficiente para reverter o status inflamatório inicialmente desencadeado com o aumento de massa corporal. Recentemente foi demonstrado por Vieira et al. (2012) que na ausência de estrogênio, a redução de massa corporal e de TA não é suficiente para suspender o status inflamatório responsável por desencadear resistência à insulina em camundongos OVX (Vieira Potter et al., 2012).

Além disso, mulheres pós-menopausais obesas que emagreceram após receberem dieta hipocalórica reduziram a área total e abdominal proporcionalmente a redução obtida no grupo que, adicionalmente a dieta, realizou exercício aeróbio. No entanto, somente o grupo que realizou a dieta juntamente com exercício conseguiu melhorar o status inflamatório crônico (You et al., 2004). Os dados indicam que somente a redução de massa corporal não é suficiente para eliminar o quadro de inflamação crônica na falta do estrogênio.

Considerando que o exercício possui um efeito profilático sobre as patogêneses desencadeadas pela inflamação crônica (Walsh et al., 2011) analisamos a expressão de diversos genes relacionados à inflamação para verificar se com e/ou adicionalmente a regulação do perfil metabólico proporcionado pelo treinamento nas ratas OVX, também

ocorre a regulação do status inflamatório, sem a necessidade de uma intervenção calórica. Pelo nosso conhecimento, essas respostas não haviam sido verificadas anteriormente.

Na ausência do estrogênio, a inflamação crônica do TAV, assim como a infiltração de células T, predispõe resistência à ação da insulina sistêmica (Rogers et al., 2009; Stubbins et al., 2012b; Vieira Potter et al., 2012). Já se sabe que essa inflamação é revertida em roedores OVX que realizam a suplementação com estrogênio (D'eon et al., 2005; Stubbins et al., 2012b; Yonezawa et al., 2012). O treinamento aeróbio também já demonstrou ser efetivo em reduzir a inflamação crônica tanto de ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, (Kawanishi et al., 2010) como em ratos caquéticos (Lira et al., 2012).

O exercício aeróbio demonstrou inibir a inflamação do TAV tanto por suprimir a infiltração de macrófagos, quanto através de uma troca de fenótipo de macrófagos M1 para M2, em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Kawanishi et al., 2010). No entanto, pelo nosso conhecimento ainda não foi verificado se o treinamento resistido é capaz de modular a inflamação do TAV na ausência do estrogênio.

Os dados deste estudo demonstram que 12 semanas sem os hormônios ovarianos, concomitantemente com o aumento da adiposidade, está presente um processo inflamatório no TAV mesentérico, demonstrado pelo aumento do principal quimioatraente de monócitos MCP-1 (Fig. 22b) (Lumeng; Bodzin; Saltiel, 2007), acúmulo de macrófagos (F4/80 e CD11b – Figs. 23 a e b), aumento de células Th1 ativadas (IFN- $\gamma$  – Fig. 24), além do aumento de mediadores pós-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 – Figs. 25 a, b e c) no TAV mesentérico

A expressão desses genes pró-inflamatórios estão relacionados com a RI. A super expressão de MCP-1 no TA resulta em resistência a insulina (Kamei et al., 2006; Kanda et al., 2006). Por outro lado, a deleção do TNF- $\alpha$  resulta em rápida normalização da RI e de marcadores de inflamação, tanto locais quanto sistêmicos (Uysal et al., 1997). Já o aumento de expressão de TNF- $\alpha$  promove inibição da captação de glicose estimulada pela insulina (Lumeng; Bodzin; Saltiel, 2007) e macrófagos organizados em volta dos adipócitos (*crow like structures*) (Rogers et al., 2009; Vieira Potter et al., 2012), o que denota a morte por necrose destas células (Cinti et al., 2005).

O gene IFN- $\gamma$  é expresso por células Th1 ativadas e o seu produto ativa macrófagos pró-inflamatórios M1 (Thompson et al., 2012; Vieira Potter et al., 2012). A

ativação de macrófagos M1 induz a liberação de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e é essencial para a promoção de inflamação (Sell; Habich; Eckel, 2012).

Os macrófagos M2 ativados alternativamente são divididos em três subgrupos, devido a diferenças no seu método de ativação. Estes diferentes subgrupos estão envolvidos na cicatrização de feridas ou na imunorregulação. Os macrófagos M2a produzem poliaminas, um componente da matriz extracelular. Sua principal função parece ser a cicatrização. Estes macrófagos secretam arginase e também IL-10 em pequena quantidade (Harford et al., 2011).

A ovariectomia aumentou a expressão de arginase-1 (Fig. 26). Estes resultados coincidem com os de Vieira et al. (2012) porém diferem com os de Rogers et al. (2009), que mostrou redução na expressão de Arg-1 nos camundongos OVX. Curiosamente, nos roedores do estudo de Vieira et al. (2012), de mesma idade e tempo sem estrogênio, onde a Arg-1 estava presente não havia RI, mas quando ocorreu redução na sua expressão, o quadro de RI se instaurou. A deleção de Arg-1 não altera o número de macrófagos M2, mas aumenta a inflamação no TAV (Campbell et al., 2013).

A ativação de PPAR- $\gamma$ , via administração de rosiglitazone, uma droga antidiabética, induz a ativação de macrófagos M2a (Lefevre et al., 2010). Portanto, a expressão de PPAR- $\gamma$  nas ratas OVX provavelmente está sustentando a alta expressão de Arg-1. Estes dados parecem indicar um papel protetor da Arg-1 contra a RI em um ambiente inflamado.

A ovariectomia reduziu a expressão de IL-10 (Fig. 27). A produção em grande quantidade de IL-10 ocorre por macrófagos M2b, que através dessa citocina anti-inflamatória bloqueiam a inflamação. A IL-10 induz a terceira classe de macrófagos M2, os M2c, que estão envolvidos no remodelamento tecidual (Harford et al., 2011). A super expressão de IL-10 melhora a sensibilidade à insulina (Fujisaka et al., 2009), por proteger os adipócitos contra os efeitos deletérios do TNF- $\alpha$  (Lumeng; Bodzin; Saltiel, 2007).

Por isso a razão IL-10/TNF- $\alpha$  é adotada como indicador de uma condição inflamatória e doenças associadas à mortalidade (Kaur et al., 2006; Leonidou et al., 2007; Lira et al., 2009; Donatto et al., 2013). O TNF- $\alpha$  é uma das principais citocinas relacionadas a RI (Kowalski et al., 2011). Portanto, considera-se que o aumento de TNF- $\alpha$  pode ser tolerado, desde que também ocorra um aumento na IL-10. A ovariectomia reduziu a razão IL-10/TNF- $\alpha$  (Fig. 28).

Sabe-se que o exercício possui um efeito profilático sobre a patogênese desencadeada pela inflamação crônica. Seu efeito parece ser em parte, resultado da redução da gordura visceral promovida pelo exercício regular e/ou uma indução de citocinas anti-inflamatórias após cada sessão de exercício (Walsh et al., 2011). Os resultados deste trabalho demonstraram um potente efeito anti-inflamatório que 12 semanas de treinamento resistido exercem sobre o TAV mesentérico das ratas OVX. O treinamento impediu completamente o aumento sobre o acúmulo (F4/80 e CD11b) de macrófagos M1 no TAV mesentérico. Além disso, entre os grupos ovariectomizadas, o treinado reduziu células Th1 ativadas ( $<IFN-\gamma$ ), o que certamente contribuiu para impedir o aumento induzido pela ovariectomia da indução dos mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) nestes grupos ovariectomizados treinados.

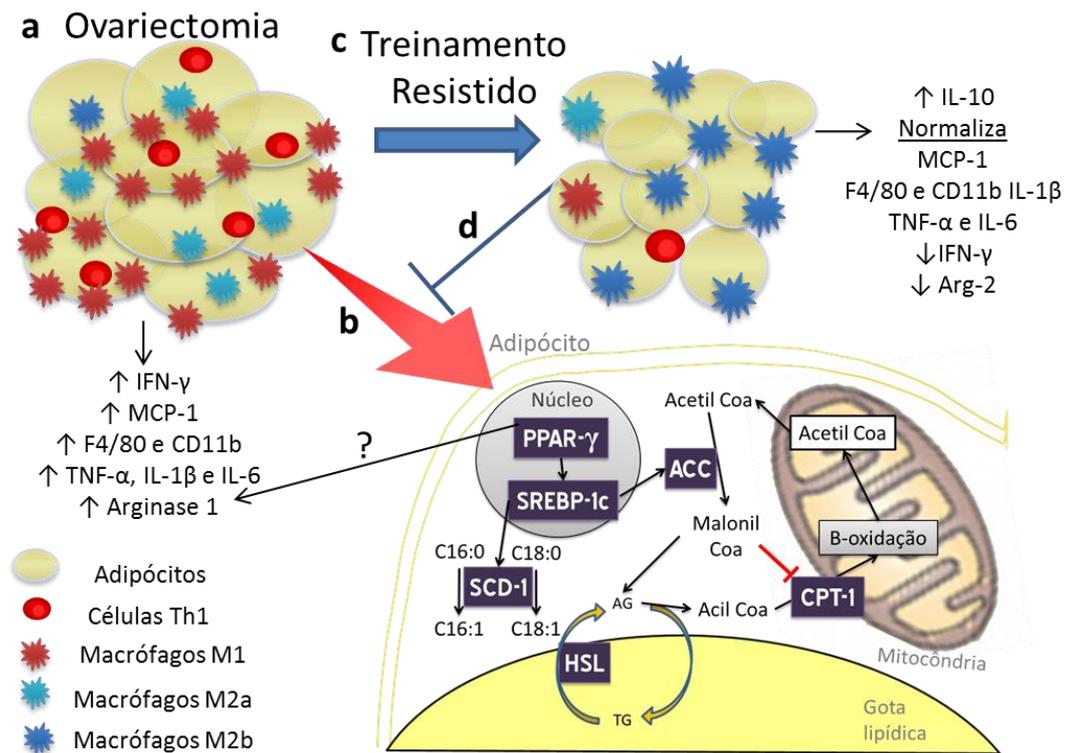
Além de reduzir genes relacionados com a inflamação crônica, certamente o benefício mais expressivo do treinamento foi o grande aumento observado na expressão de IL-10, o que também culminou no grande aumento da razão IL-10/TNF- $\alpha$ . Contudo, o TR reduziu também a expressão de arg-1 nas ratas OVX.

A arg-1 possui funções diferentes na presença ou não de iNOS, a qual é produzido por macrófagos M1. Estas duas enzimas competem pelo mesmo substrato, a arginina. A arginase converte a arginina em ornitina e uréia, metabólitos que promovem reparo tecidual. Por outro lado, a iNOS converte a arginina em citrulina e óxido nítrico (NO), metabólitos que podem aumentar a lesão do tecido (Lumeng; Bodzin; Saltiel, 2007). Por isso a arginase-1 provavelmente não possui um papel importante em um meio não inflamado, o que pode justificar sua redução nas ratas OVX treinadas.

Dados com humanos que relacionam os benefícios proporcionados pelo exercício sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias são escassos e controversos, sendo que alguns estudos demonstraram redução e outros, nenhuma mudança. Essas divergências podem ser, segundo os autores da revisão (Thompson et al., 2012), por várias possibilidades como: variações sazonais, análise exclusiva sobre RNAm e o tempo da coleta das amostras. Podemos acrescentar que o fato das amostras serem coletadas do TAS. Ainda, os estudos que não apresentarem alterações foram realizados com pessoas saudáveis, o que pode refletir ausência de inflamação nestas pessoas, mesmo nas não treinadas. Estudo realizado com homens e mulheres obesas encontrou redução da condição inflamatória (Thompson et al., 2012).

Em resumo, os resultados deste trabalho ilustrados na figura 29, demonstram que na ausência dos hormônios ovarianos ocorre a hipertrofia da área dos adipócitos viscerais e subcutâneo e aumento de adiposidade, depositada preferencialmente em locais viscerais. Além da hipertrofia dos adipócitos, ocorre desregulação do metabolismo lipídico mesentérico e o meio apresenta-se inflamado. O treinamento resistido provou ser capaz de evitar tanto a hipertrofia dos adipócitos quanto a desregulação do metabolismo lipídico e instauração de processo inflamatório, com adicional benefício de elevar a expressão do gene anti-inflamatório IL-10, o que demonstra uma condição extremamente favorável proporcionada pelo treinamento resistido na ausência dos hormônios ovarianos. As ratas não ovariectomizadas também tiveram o benefício de induzir a expressão de IL-10 com o treinamento, favorecendo ainda mais o meio em direção a um ambiente protegido da inflamação.

Algumas limitações deste trabalho podem ser endereçadas ao uso da técnica de expressão gênica. Apesar de ser um método relativamente bem aceito, talvez algumas das alterações observadas a nível gênico não estejam ou ativas ou em amplitude suficiente para exercer sua função fisiológica. No entanto, a precisão e exatidão deste método permanecem inquestionáveis. Adicionalmente, seria interessante futuramente acessar as alterações por um período mais longo, pois como demonstrado recentemente por Viera et al. (2012), as mudanças são tempo dependente.



**Figura 29.** Função protetora do treinamento resistido sobre o tecido adiposo visceral mesentérico de ratas ovariectomizadas. (a) Nas ratas OVX, a área dos adipócitos aumenta, ocorre a infiltração e ativação de macrófagos M1 de células T helper 1 e (b) a expressão dos genes lipogênicos permanece alta, mesmo no jejum. O aumento na expressão de ACC indica formação de Malonil Coa em grande quantidade, o que inibi a CPT-1. O aumento na expressão de PPAR-γ provavelmente está estimulando a expressão de arginase 1 nestas ratas OVX, o que parece ser um mecanismo protetor que retarda o surgimento da RI em roedores OVX. (c) O treinamento resistido normaliza todos estes parâmetros. Reduz a inflamação e adicionalmente aumenta a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10. (d) Inibi a elevada expressão dos genes lipogênicos no jejum. A redução de ACC resulta em menor formação de Malonil Coa, que para de inibir a CPT-1 e aumenta nas ratas OVX treinadas, indicando maior B-oxidação mitocondrial.

Coletivamente, os resultados deste trabalho refletem um potente efeito profilático do treinamento resistido na falta dos hormônios ovarianos, tanto fisiológicos - massa corporal, ingestão e eficiência alimentar e área dos adipócitos, quanto moleculares - normalização do metabolismo lipídico e da inflamação crônica do TAV. Além disso, não devemos ignorar o fato que o exercício regular possui inúmeros outros benefícios não observados com o TRH, como manutenção da massa muscular e óssea, melhora da função cardíaca, entre outros. Todos estes benefícios certamente resultarão em uma melhor qualidade de vida na pós-menopausa. Portanto, podemos sugerir que este pode ser um vantajoso tratamento de baixo custo no período pós-menopausal, se adequadamente prescrito.

## 6 REFERÊNCIAS

- BAE, K. H.; W. K. KIM ; S. C. LEE. Involvement of protein tyrosine phosphatases in adipogenesis: new anti-obesity targets? **BMB Rep**, v.45, n.12, p.700-706. 2012.
- BALTGALVIS, K. A. et al. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. **PLoS One**, v.5, n.4, p.e10164. 2010.
- BEMBEN, D. A. et al. Musculoskeletal responses to high- and low-intensity resistance training in early postmenopausal women. **Med Sci Sports Exerc**, v.32, n.11, p.1949-1957. 2000.
- BERKEMEYER, S. Acid-base balance and weight gain: are there crucial links via protein and organic acids in understanding obesity? **Med Hypotheses**, v.73, n.3, p.347-356. 2009.
- BORER, K. T. Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women : interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. **Sports Med**, v.35, n.9, p.779-830. 2005.
- BOUWMAN, F. G. et al. Increased beta-oxidation with improved glucose uptake capacity in adipose tissue from obese after weight loss and maintenance. **Obesity (Silver Spring)**. 2013.
- BRYZGALOVA, G. et al. Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.295, n.4, p.E904-912. 2008.
- CAMPBELL, L. et al. Local Arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. **J Invest Dermatol**. 2013.
- CAMPOREZ, J. P. et al. Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. **Endocrinology**, v.154, n.3, p.1021-1028. 2013.
- CAO, Y. K. et al. Daidzein improves insulin resistance in ovariectomized rats. **Climacteric**, v.16, n.1, p.111-116. 2013.
- CARR, D. B. et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. **Diabetes**, v.53, n.8, p.2087-2094. 2004.
- CAWTHORN, W. P.; E. L. SCHELLER ; O. A. MACDOUGALD. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. **J Lipid Res**, v.53, n.2, p.227-246. 2012.

- CEDERNAES, J. et al. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase 1 index is increased and linoleic acid is decreased in obesity-prone rats fed a high-fat diet. **Lipids Health Dis**, v.12, p.2. 2013.
- CHO, J. K. et al. Randomized controlled trial of training intensity in adiposity. **Int J Sports Med**, v.32, n.6, p.468-475. 2011.
- CHOI, S. E. et al. Stimulation of lipogenesis as well as fatty acid oxidation protects against palmitate-induced INS-1 beta-cell death. **Endocrinology**, v.152, n.3, p.816-827. 2011.
- CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res**, v.46, n.11, p.2347-2355. 2005.
- COOPER, J. A. et al. Maximal Sustained Levels of Energy Expenditure in Humans during Exercise. **Med Sci Sports Exerc**. 2011.
- CORRIVEAU, P. et al. Resistance training prevents liver fat accumulation in ovariectomized rats. **Maturitas**, v.59, n.3, p.259-267. 2008.
- CUMMINGS, S. R. et al. Prevention of breast cancer in postmenopausal women: approaches to estimating and reducing risk. **J Natl Cancer Inst**, v.101, n.6, p.384-398. 2009.
- CZECH, M. P. et al. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. **Diabetologia**, v.56, n.5, p.949-964. 2013.
- 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. **J Biol Chem**, v.280, n.43, p.35983-35991. 2005.
- DALEY, A. et al. Exercise for vasomotor menopausal symptoms. **Cochrane Database Syst Rev**, n.4, p.CD006108. 2007.
- DALEY, A. J.; H. J. STOKES-LAMPARD ; C. MACARTHUR. Exercise to reduce vasomotor and other menopausal symptoms: a review. **Maturitas**, v.63, n.3, p.176-180. 2009.
- DAVIS, S. R. et al. Understanding weight gain at menopause. **Climacteric**, v.15, n.5, p.419-429. 2012.
- DIPIETRO, L. et al. Exercise and improved insulin sensitivity in older women: evidence of the enduring benefits of higher intensity training. **J Appl Physiol**, v.100, n.1, p.142-149. 2006.
- 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. **Eur J Appl Physiol**, v.112, n.4, p.1437-1444. 2012.
- DONATTO, F. F. et al. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. **Cytokine**, v.61, n.2, p.426-432. 2013.

- DONNELLY, J. E. et al. American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **Med Sci Sports Exerc**, v.41, n.2, p.459-471. 2009.
- DU, Z. Y. et al. Depot-dependent effects of adipose tissue explants on co-cultured hepatocytes. **PLoS One**, v.6, n.6, p.e20917. 2011.
- ELBASSUONI, E.; M. RAGY ; N. AZIZ. Protective effect of GHRP-6 and estrogen supplementation against some cardiometabolic risk factors in ovariectomized rats. **Endocr Regul**, v.46, n.2, p.73-81. 2012.
- ESCHBACH, C. Exercise Recommendations for Menopause-Aged Women. **AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE**, v.Fall, 2009. 2009.
- FLACHS, P. et al. Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: A key to lean phenotype. **Biochim Biophys Acta**. 2013.
- FORYST-LUDWIG, A. ; U. KINTSCHER. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 2010.
- FUJISAKA, S. et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. **Diabetes**, v.58, n.11, p.2574-2582. 2009.
- GALIC, S.; J. S. OAKHILL ; G. R. STEINBERG. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol**, v.316, n.2, p.129-139. 2010.
- GILSANZ, V. et al. Reciprocal relations of subcutaneous and visceral fat to bone structure and strength. **J Clin Endocrinol Metab**, v.94, n.9, p.3387-3393. 2009.
- HAGITA, S. et al. Adipose inflammation initiates recruitment of leukocytes to mouse femoral artery: role of adipo-vascular axis in chronic inflammation. **PLoS One**, v.6, n.5, p.e19871. 2011.
- HAMZA, M. S. et al. De-novo identification of PPARgamma/RXR binding sites and direct targets during adipogenesis. **PLoS One**, v.4, n.3, p.e4907. 2009.
- HARFORD, K. A. et al. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. **Proc Nutr Soc**, v.70, n.4, p.408-417. 2011.
- HARVEY, R. A. ; D. R. FERRIER. **Bioquímica ilustrada**. Porto Alegre: Artmed. 2012. 520 pags.
- HEINE, P. A. et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.23, p.12729-12734. 2000.
- HELLMANN, J. et al. Resolvin D1 decreases adipose tissue macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice. **FASEB J**. 2011.

- HOLM, L. et al. Protein-containing nutrient supplementation following strength training enhances the effect on muscle mass, strength, and bone formation in postmenopausal women. **J Appl Physiol**, v.105, n.1, p.274-281. 2008.
- HONG, J. et al. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. **Nutr J**, v.8, p.11. 2009.
- HORCAJADA, M. N. et al. Hesperidin inhibits ovariectomized-induced osteopenia and shows differential effects on bone mass and strength in young and adult intact rats. **J Appl Physiol**, v.104, n.3, p.648-654. 2008.
- HORNBERGER, T. A., JR. ; R. P. FARRAR. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, v.29, n.1, p.16-31. 2004.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v.444, n.7121, p.860-867. 2006.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em: 06 mai 2013.
- IGNACIO, D. L. et al. [Body mass regulation by estrogen and physical activity]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.53, n.3, p.310-317. 2009.
- ISKEN, F. et al. Deficiency of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor prevents ovariectomy-induced obesity in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.295, n.2, p.E350-355. 2008.
- IWATA, T. et al. The action of D-dopachrome tautomerase as an adipokine in adipocyte lipid metabolism. **PLoS One**, v.7, n.3, p.e33402. 2012.
- JAMES, A. M. et al. Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome. **Trends Endocrinol Metab**, v.23, n.9, p.429-434. 2012.
- JIANG, J. M.; S. M. SACCO ; W. E. WARD. Ovariectomy-induced hyperphagia does not modulate bone mineral density or bone strength in rats. **J Nutr**, v.138, n.11, p.2106-2110. 2008.
- JONES, M. E. et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.79, n.1-5, p.3-9. 2001.
- KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v.15, n.3, p.175-191. 1991.
- KAMEI, N. et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. **J Biol Chem**, v.281, n.36, p.26602-26614. 2006.
- KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest**, v.116, n.6, p.1494-1505. 2006.

- KAUR, K. et al. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v.41, n.6, p.1023-1030. 2006.
- KAWANISHI, N. et al. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exerc Immunol Rev**, v.16, p.105-118. 2010.
- KIM, T. H. et al. Modulation of the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by protein-protein interactions and post-translational modifications. **Yonsei Med J**, v.54, n.3, p.545-559. 2013.
- KO, S. S. ; V. C. JORDAN. Treatment of osteoporosis and reduction in risk of invasive breast cancer in postmenopausal women with raloxifene. **Expert Opin Pharmacother**, v.12, n.4, p.657-674. 2011.
- KORCZYNSKA, J. et al. Upregulation of lipogenic enzymes genes expression in white adipose tissue of rats with chronic renal failure is associated with higher level of sterol regulatory element binding protein-1. **Metabolism**, v.53, n.8, p.1060-1065. 2004.
- KOWALSKI, G. M. et al. Deficiency of haematopoietic-cell-derived IL-10 does not exacerbate high-fat-diet-induced inflammation or insulin resistance in mice. **Diabetologia**, v.54, n.4, p.888-899. 2011.
- KUS, V. et al. Unmasking differential effects of rosiglitazone and pioglitazone in the combination treatment with n-3 fatty acids in mice fed a high-fat diet. **PLoS One**, v.6, n.11, p.e27126. 2011.
- KUSMINSKI, C. M. ; P. E. SCHERER. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. **Trends Endocrinol Metab**, v.23, n.9, p.435-443. 2012.
- LAMBRINOUDAKI, I. et al. EMAS position statement: managing obese postmenopausal women. **Maturitas**, v.66, n.3, p.323-326.
- LEE, M. J.; Y. WU ; S. K. FRIED. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.13, n.4, p.371-376. 2010.
- LEFEVRE, L. et al. PPARgamma ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal Candida elimination. **PLoS One**, v.5, n.9, p.e12828. 2010.
- 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. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.34, n.6, p.1079-1086. 2009.
- LEITE, R. D. et al. Menopause: highlighting the effects of resistance training. **Int J Sports Med**, v.31, n.11, p.761-767. 2010.
- LEONIDOU, L. et al. Cytokine production and hospital mortality in patients with sepsis-induced stress hyperglycemia. **J Infect**, v.55, n.4, p.340-346. 2007.

- LIN, Y. T. et al. Inhibition of adipogenesis by RGD-dependent disintegrin. **Biochem Pharmacol**, v.70, n.10, p.1469-1478. 2005.
- LIRA, F. S. et al. Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. **Lipids Health Dis**, v.9, p.109. 2010.
- LIRA, F. S. et al. Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF-alpha ratio in rat adipose tissue. **Cytokine**, v.45, n.2, p.80-85. 2009.
- LIRA, F. S. et al. Exercise training decreases adipose tissue inflammation in cachectic rats. **Horm Metab Res**, v.44, n.2, p.91-98. 2012.
- LIU, X. et al. The role of AMPK/mTOR/S6K1 signaling axis in mediating the physiological process of exercise-induced insulin sensitization in skeletal muscle of C57BL/6 mice. **Biochim Biophys Acta**, v.1822, n.11, p.1716-1726. 2012.
- LIVAK, K. J. ; T. D. SCHMITTGEN. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408. 2001.
- LOVEJOY, J. C. et al. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. **Int J Obes (Lond)**, v.32, n.6, p.949-958. 2008.
- LUMENG, C. N.; J. L. BODZIN ; A. R. SALTIEL. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v.117, n.1, p.175-184. 2007.
- LUNDHOLM, L. et al. Key lipogenic gene expression can be decreased by estrogen in human adipose tissue. **Fertil Steril**, v.90, n.1, p.44-48. 2008.
- MAJKA, S. M. et al. De novo generation of white adipocytes from the myeloid lineage via mesenchymal intermediates is age, adipose depot, and gender specific. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.107, n.33, p.14781-14786. 2010.
- MARCONDES, F. K.; F. J. BIANCHI ; A. P. TANNO. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, v.62, n.4A, p.609-614. 2002.
- MATTOS, M. G. ; M. G. NEIRA. **Educação física na adolescência:construindo o conhecimento na escola**. São paulo: Phorte editora. 2000.
- MAUVAIS-JARVIS, F.; D. J. CLEGG ; A. L. HEVENER. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. **Endocr Rev**. 2013.
- MAYES, J. S. ; G. H. WATSON. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. **Obes Rev**, v.5, n.4, p.197-216. 2004.
- MCARDLE, W. D.; F. I. KATCH ; V. L. KATCH. **Fisiologia do Exercício: Nutrição, Energia e Desempenho Humano**: Guanabara Koogan. 2011.
- MEDINA-GOMEZ, G.; S. GRAY ; A. VIDAL-PUIG. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgamma coactivator-1 (PGC1). **Public Health Nutr**, v.10, n.10A, p.1132-1137. 2007.

- MORGAN, K. et al. Altered expression of transcription factors and genes regulating lipogenesis in liver and adipose tissue of mice with high fat diet-induced obesity and nonalcoholic fatty liver disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.20, n.9, p.843-854. 2008.
- NAKAMURA, F. Y.; A. MOREIRA ; M. S. AOKI. MONITORAMENTO DA CARGA DE TREINAMENTO: A PERCEPÇÃO SUBJETIVA DO ESPORFÇO DA SESSÃO É UM MÉTODO CONFIÁVEL? **Revista da Educação Física/UEM**, v.21, n.1, p.1-11. 2010.
- NAKAYAMA, H. et al. Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. **Metabolism**, v.56, n.4, p.470-475. 2007.
- NAROD, S. A. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, v.8, n.11, p.669-676. 2011.
- NAVAB, M.; N. GHARAVI ; A. D. WATSON. Inflammation and metabolic disorders. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.11, n.4, p.459-464. 2008.
- NEILSON, H. K. et al. Physical activity and postmenopausal breast cancer: proposed biologic mechanisms and areas for future research. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.18, n.1, p.11-27. 2009.
- ODEGAARD, J. I. ; A. CHAWLA. Alternative macrophage activation and metabolism. **Annu Rev Pathol**, v.6, p.275-297. 2011.
- OGASAWARA, J. et al. Hormone-sensitive lipase is critical mediators of acute exercise-induced regulation of lipolysis in rat adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v.400, n.1, p.134-139. 2010.
- OLIVEIRA, R. J. et al. Identification of sarcopenic obesity in postmenopausal women: a cutoff proposal. **Braz J Med Biol Res**, v.44, n.11, p.1171-1176. 2011.
- ORSATTI, F. L. et al. Plasma hormones, muscle mass and strength in resistance-trained postmenopausal women. **Maturitas**, v.59, n.4, p.394-404. 2008.
- PALLOTTINI, V. et al. Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms. **Infect Disord Drug Targets**, v.8, n.1, p.52-60. 2008.
- PALOU, M. et al. Regional differences in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue in response to short- and medium-term fasting and refeeding. **J Nutr Biochem**, v.21, n.1, p.23-33. 2010.
- PARK, C. H.; T. TANAKA ; T. YOKOZAWA. Evaluation of 7-O-galloyl-D-sedoheptulose, isolated from Corni Fructus, in the adipose tissue of type 2 diabetic db/db mice. **Fitoterapia**. 2013.
- PENG, I. C. et al. Glucagon regulates ACC activity in adipocytes through the CAMKKbeta/AMPK pathway. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.302, n.12, p.E1560-1568. 2012.

- PEREIRA, G. B. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in rat calcaneal tendon. **Connect Tissue Res**, v.51, n.6, p.459-466. 2010.
- PIGHON, A. et al. Does exercise training prior to ovariectomy protect against liver and adipocyte fat accumulation in rats? **Climacteric**, v.13, n.3, p.238-248. 2010.
- PIGHON, A. et al. Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver. **Metabolism**, v.60, n.5, p.629-639. 2011.
- POEHLMAN, E. T. ; A. TCHERNOF. Traversing the menopause: changes in energy expenditure and body composition. **Coron Artery Dis**, v.9, n.12, p.799-803. 1998.
- POLLANEN, E. et al. Muscular transcriptome in postmenopausal women with or without hormone replacement. **Rejuvenation Res**, v.10, n.4, p.485-500. 2007.
- PRESTES, J. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.34, n.4, p.700-706. 2009.
- PRESTES, J. et al. Resistance Training and Glycogen Content in Ovariectomized Rats. **Int J Sports Med**. 2011.
- PRITCHARD, K. I. The role of hormone replacement therapy in women with a previous diagnosis of breast cancer and a review of possible alternatives. **Ann Oncol**, v.12, n.3, p.301-310. 2001.
- RENNO, A. C. et al. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. **Exp Gerontol**, v.42, n.6, p.517-522. 2007.
- RIANT, E. et al. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. **Endocrinology**, v.150, n.5, p.2109-2117. 2009.
- RICHTER, C. P. "Dark-active" rat transformed into "light-active" rat by destruction of 24-hr clock: function of 24-hr clock and synchronizers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.75, n.12, p.6276-6280. 1978.
- 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.2161-2168. 2009.
- ROSA, J. C. et al. Exhaustive exercise increases inflammatory response via Toll like receptor-4 and NF-kappaBp65 pathway in rat adipose tissue. **J Cell Physiol**, v.226, n.6, p.1604-1607. 2011.
- RYAN, A. S. et al. Resistive training maintains bone mineral density in postmenopausal women. **Calcif Tissue Int**, v.62, n.4, p.295-299. 1998.
- SAENGSIRISUWAN, V. et al. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. **Metabolism**, v.58, n.1, p.38-47. 2009.

- SAMPATH, H. et al. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. **J Biol Chem**, v.282, n.4, p.2483-2493. 2007.
- SEIDLOVA-WUTTKE, D. et al. Effects of estrogen receptor alpha- and beta-selective substances in the metaphysis of the tibia and on serum parameters of bone and fat tissue metabolism of ovariectomized rats. **Bone**, v.43, n.5, p.849-855. 2008.
- SELL, H.; C. HABICH ; J. ECKEL. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. **Nat Rev Endocrinol**, v.8, n.12, p.709-716. 2012.
- SHAUL, M. E. et al. Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. **Diabetes**, v.59, n.5, p.1171-1181. 2010.
- SHIGUEMOTO, G. E. et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scand J Med Sci Sports**, v.22, n.5, p.607-617. 2012.
- SMITH, L. L. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? **J Strength Cond Res**, v.18, n.1, p.185-193. 2004.
- SMORLESI, A. et al. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. **Obes Rev**, v.13 Suppl 2, p.83-96. 2012.
- SONGLIN, P. et al. Epimedium-derived flavonoids promote osteoblastogenesis and suppress adipogenesis in bone marrow stromal cells while exerting an anabolic effect on osteoporotic bone. **Bone**, v.45, n.3, p.534-544. 2009.
- SOUZA, S. B. et al. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. **Hypertension**, v.50, n.4, p.786-791. 2007.
- SPANGENBURG, E. E.; L. M. WOHLERS ; A. P. VALENCIA. Metabolic dysfunction under reduced estrogen levels: looking to exercise for prevention. **Exerc Sport Sci Rev**, v.40, n.4, p.195-203. 2012.
- SPIEGELMAN, B. M. Banting lecture 2012: regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. **Diabetes**, v.62, n.6, p.1774-1782. 2013.
- SPRITZER, P. M. ; K. OPPERMAN. Weight gain and abdominal obesity at menopause. **Climacteric**, v.16, n.2, p.292. 2013.
- STEIN, L. R. ; S. IMAI. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. **Trends Endocrinol Metab**, v.23, n.9, p.420-428. 2012.
- STRASSER, B.; M. ARVANDI ; U. SIEBERT. Resistance training, visceral obesity and inflammatory response: a review of the evidence. **Obes Rev**. 2012.
- STUBBINS, R. E. et al. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. **Eur J Nutr**, v.51, n.7, p.861-870. 2012a.

- STUBBINS, R. E. et al. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. **Diabetes Obes Metab**, v.14, n.1, p.58-66. 2012b.
- TCHERNOF, A. ; J. P. DESPRES. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. **Physiol Rev**, v.93, n.1, p.359-404. 2013.
- THOMPSON, D. et al. Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. **Physiol Rev**, v.92, n.1, p.157-191. 2012.
- THRUSH, A. B. et al. Implications of Mitochondrial Uncoupling in Skeletal Muscle in the Development and Treatment of Obesity. **FEBS J**. 2013.
- TRAN, T. T. ; C. R. KAHN. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. **Nat Rev Endocrinol**, v.6, n.4, p.195-213. 2010.
- TSAI, W. J. et al. Estrogen effects on skeletal muscle insulin-like growth factor 1 and myostatin in ovariectomized rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.232, n.10, p.1314-1325. 2007.
- TUBINO, M. J. G. **Metodologia científica do treinamento desportivo**. São Paulo: Ibrasa. 1984.
- TURNER, S. M. et al. Dissociation between adipose tissue fluxes and lipogenic gene expression in ob/ob mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.292, n.4, p.E1101-1109. 2007.
- UYSAL, K. T. et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. **Nature**, v.389, n.6651, p.610-614. 1997.
- VANDENBROUCKE, I. et al. Quantification of NF1 transcripts reveals novel highly expressed splice variants. **FEBS Lett**, v.522, n.1-3, p.71-76. 2002.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v.3, n.7, p.RESEARCH0034. 2002.
- VIEIRA POTTER, V. J. et al. Adipose tissue inflammation and reduced insulin sensitivity in ovariectomized mice occurs in the absence of increased adiposity. **Endocrinology**, v.153, n.9, p.4266-4277. 2012.
- VIEIRA, V. J. et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.296, n.5, p.E1164-1171. 2009.
- WALSH, N. P. et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exerc Immunol Rev**, v.17, p.6-63. 2011.
- WARBURTON, D. E.; C. W. NICOL ; S. S. BREDIN. Health benefits of physical activity: the evidence. **Cmaj**, v.174, n.6, p.801-809. 2006a.

WARBURTON, D. E.; C. W. NICOL ; S. S. BREDIN. Prescribing exercise as preventive therapy. **Cmaj**, v.174, n.7, p.961-974. 2006b.

WHITE, U. A. ; J. M. STEPHENS. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. **Mol Cell Endocrinol**, v.318, n.1-2, p.10-14. 2010.

YANG, Y. K. et al. Human mesenteric adipose tissue plays unique role versus subcutaneous and omental fat in obesity related diabetes. **Cell Physiol Biochem**, v.22, n.5-6, p.531-538. 2008.

YONEZAWA, R. et al. Central versus peripheral impact of estradiol on the impaired glucose metabolism in ovariectomized mice on a high-fat diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.303, n.4, p.E445-456. 2012.

YOSHIOKA, M. et al. Gender difference of androgen actions on skeletal muscle transcriptome. **J Mol Endocrinol**, v.39, n.2, p.119-133. 2007.

YOU, T. et al. Effects of exercise training on chronic inflammation in obesity : current evidence and potential mechanisms. **Sports Med**, v.43, n.4, p.243-256. 2013.

YOU, T. et al. Effects of hypocaloric diet and exercise training on inflammation and adipocyte lipolysis in obese postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, n.4, p.1739-1746. 2004.

ZENGIN, A. et al. Neuropeptide Y mediates the short-term hypometabolic effect of estrogen deficiency in mice. **Int J Obes (Lond)**, v.37, n.3, p.390-398. 2013.

ZHANG, S. et al. Exercise Improved Rat Metabolism by Raising PPAR-alpha. **Int J Sports Med**. 2006.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE A – TENTATIVAS DE WESTERN BLOTTING

Foram feitas incansáveis tentativas de quantificar níveis proteicos de TNF- $\alpha$  utilizando a técnica de western blotting. O primeiro obstáculo foi remover toda a gordura da amostra. Caso contrário, a amostra não corria direito no gel de SDS.

Após conseguir boas corridas no gel de SDS começaram as tentativas de Western Blotting. No entanto o grande problema foi a altura das bandas.

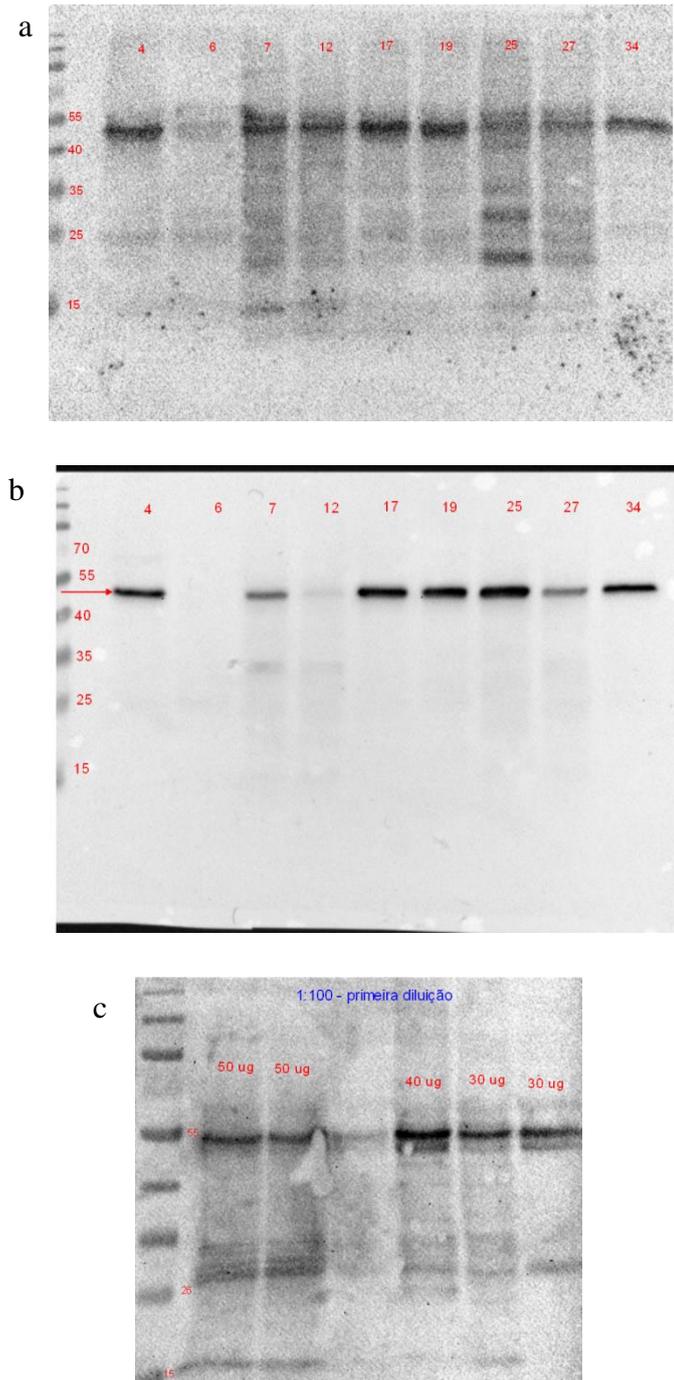
O TNF-a solúvel na membrana tem 26 kDa de massa molecular. Quando é secretado, é clivado e fica com 17 KDa. Em sua forma ativa é um trímero de 52 KDa.

O fabricante do anticorpo monoclonal AB1793 garantia que a banda aparece próxima de 17 KDa, inclusive no tecido adiposo. Porém, entramos em contato com diversos pesquisadores pelo mundo. Tentamos todas as sugestões, no entanto, não conseguimos esta banda no tecido adiposo, problema também relatado por uma pesquisadora que respondeu aos meus e-mails. Em outros tecidos ela conseguia. Um professor da Unicamp (Wagner José Fávoro, obrigada pelas orientações) que trabalha com o anticorpo desta proteína, me disse que a banda adequada para trabalhar é a de 26 kDa e que a de 17kDa eles nunca haviam conseguido. E a de 52 não mostrava resultados previstos.

A banda de 26 kDa a gente conseguia somente quando aumentávamos muito a concentração do anticorpo ou no primeiro uso após a diluição de 1:100, o que gerava muito background, como pode ser visto na figura 30.

Tentamos remover esse background aumentando a concentração de NaCl e/ou de Tween na solução de lavagem. O tween sozinho não produzia resultado e o NaCl removia o background, mas as bandas de 26 kDa também. Mudar a concentração do bloqueio ou o tempo de incubação não alterava o resultado.

A empresa, que acompanhou o caso desde o início, nunca conseguiu garantir que a banda que estava aparecendo era a do TNF-a e por fim, mesmo após 6 meses da compra, a, desfez por acreditar que o anticorpo não funcionaria para minhas amostras.



**Figura 30.** (a) e (b) são géis com as mesmas amostras, corrido e bloqueados da mesma forma. Porém (a) foi incubado com uma diluição nova 1:100 do anticorpo e (b) foi o segundo uso do anticorpo na mesma diluição. (c) Teste de concentração de proteína. Observe que quanto maior a concentração, mais bandas perto de 26 KDa e menor a intensidade próximo a 55 KDa..

## **ANEXO**

**ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

---

**Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 008/2010**

Protocolo CEEA nº 001/2010

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 40ª. Reunião ocorrida em 16/03/2010, **APROVOU** o trabalho intitulado “Efeitos do treinamento de força sobre a expressão gênica e protéica de larga escala em músculos de ratas ovariectomizadas”, elaborado por Uliana Sbeguen Stotzer, Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo e Sérgio Eduardo de Andrade Perez..

São Carlos, 22 de março de 2010.

Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal