

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas
UFSCar/UNESP

**EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO DE NATAÇÃO NO CONTEÚDO DE
GLUT4 E FAT CD36 E METABOLISMO ENERGÉTICO DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Discente: Taciane Maria Melges Pejon

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck

São Carlos – SP

Fevereiro 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas
UFSCar/UNESP

Taciane Maria Melges Pejon

**EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO DE NATAÇÃO NO CONTEÚDO DE
GLUT4 E FAT CD36 E METABOLISMO ENERGÉTICO DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck

São Carlos – SP

Fevereiro 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Taciane Maria Melges Pejon, realizada em 02/03/2020:

Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck
UFSCar

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto
UNICAMP

Prof. Dr. Gilberto Elji Shiguemoto
UFSCar

Este trabalho recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Processo: #134042/2018-2

AGRADECIMENTO

Meu primeiro agradecimento eu devo a Deus, por sempre amparar, guiar e abençoar as decisões na minha vida. Sempre acreditei que tudo tem um propósito e um momento exato para acontecer e quanto à decisão de realizar um mestrado não foi diferente. O mestrado não foi o caminho mais fácil que escolhi seguir, mas sem dúvidas foi o que mais poderia ter contribuído positivamente para meu crescimento na vida pessoal e principalmente profissional.

Agradeço imensamente aos meus pais (Carlos e Sílvia), irmão (Tadeu) e demais familiares por todo apoio e torcida de sempre. Diante de algumas dificuldades enfrentadas nesse percurso e diversas alterações de humor, sempre foi confortante contar com vocês para que eu pudesse continuar seguindo meu caminho. Agradeço cada palavra e gesto de carinho que me fazem ser hoje quem sou, buscando sempre melhorar para poder retribuir tudo que fizeram e fazem por mim. Faço um agradecimento especial ao meu pai, ele que convivo diariamente e está sempre em prontidão para me tentar fazer enxergar as coisas de um modo que sem o olhar de pai não seria possível.

Ao professor e orientador Wladimir Rafael Beck ofereço os meus mais sinceros agradecimentos, ele que desde o primeiro momento se mostrou receptivo em me receber em seu laboratório. É gratificante fazer parte da história inicial do laboratório e presenciar todo o progresso que está ocorrendo. Todas essas mudanças positivas com certeza são resultados da constante dedicação empenhada por você. Obrigada pela paciência, aprendizado, apoio e amizade diariamente concedidos. Diante de todo crescimento observado em mim até hoje, percebo que é fundamental ter como base um exemplo de profissional e pessoa como você tem sido.

Agradeço aos amigos que o laboratório me proporcionou, Vinícius Faria e Nick Alexandre. Fico feliz por diariamente criarmos um ambiente de aprendizado e também de companheirismo. Hoje percebo o quanto é essencial ter perto de si pessoas que busquem crescer e que torçam por suas vitórias e vocês são exemplos disso. Não poderia deixar de agradecer ao Victor que me acolheu e me ajudou desde os primeiros dias no laboratório. Obrigada pela paciência inicial e pelos ensinamentos com diversas técnicas. Gostaria de fazer um agradecimento especial ao meu amigo Eliton Vasconcelos por ter feito parte desse caminho que decidi seguir. Graças a sua ajuda

pude fazer o contato inicial no Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. Deixo aqui meu obrigada a todos colegas de laboratórios vizinhos que contribuíram de alguma forma para o meu percurso até aqui.

Para que esse estudo fosse possível contei com a ajuda de diversos professores que foram essenciais nesse processo. Agradeço imensamente a Profa. Dra. Anabelle Cornachione por não hesitar em nos ajudar em um momento sequer. Obrigada pela ajuda com as técnicas, com a compreensão de resultados e empréstimos de materiais. Assim como por disponibilizar seus alunos (Paulo e Tatiana) para me ajudarem. Agradeço também ao Prof. Dr. Thiago Russo e às professoras doutoras Heloísa De Araújo e Marisa Fernandes por me disponibilizarem seus laboratórios para que eu realizasse as análises.

Devo meu agradecimento ao Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (responsáveis: Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto e Profa. Dra. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto) por terem permitido a instalação e uso do equipamento de gravimetria e dos tanques direcionados ao treinamento de natação em nosso laboratório. Assim como pela disposição do Pedro Scariot em gentilmente comparecer ao nosso laboratório para o ensinamento de novas técnicas.

Para finalizar meus agradecimentos, deixo meu carinho e gratidão a todos meus amigos mais próximos. Agradeço pela paciência comigo por ter estado ausente em muitos momentos e por sempre me apoiar nesse caminho. Obrigada pelos momentos e pelas conversas tão importantes que me fazem perceber o quanto sou rodeada de pessoas especiais.

Enfim, o meu sincero obrigada a todos vocês que desde algo simples até o mais complexo contribuíram para minha chegada até aqui.

RESUMO

O fim da secreção ovariana de estrógenos é associado a desequilíbrio de substratos energéticos, elevando o risco de doenças metabólicas. O treinamento físico (TF) corresponde a tratamento não farmacológico nesse contexto, por ser potente regulador metabólico através da oxidação e armazenamento de substratos transportados por GLUT4 e FAT CD36. Entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos do TF sobre o conteúdo desses transportadores na ovariectomia (OVX). Portanto, o objetivo foi analisar a repercussão metabólica da OVX e TF no músculo esquelético (ME) a partir do conteúdo de GLUT4 e FAT CD 36, sob a hipótese de que o TF impeça os efeitos metabólicos indesejados causados pela OVX, por não permitir queda no conteúdo dessas proteínas. Foram avaliadas 38 ratas *Wistar* divididas em 4 grupos: controle (GC), ovariectomizado (GO), exercitado (GE) e ovariectomizado/exercitado (GOE). Aos 90 dias de idade GO e GOE tiveram seus ovários extraídos por meio da técnica de OVX bilateral. Aos 102 dias de idade GE e GOE foram submetidos ao teste de carga crítica, que consistiu em 4 esforços máximos de natação com tempos entre 2 e 10 minutos, para determinação da intensidade de carga crítica individual (iCC - % da massa corporal - %MC). GE e GOE nadaram com 80% de iCC, 30 minutos diários/5 dias na semana, durante 12 semanas, com reajuste semanal conforme a MC. A atividade física espontânea (AFE) de todos grupos foi medida quinzenalmente por análise gravimétrica. Após 12 semanas de TF, os animais foram eutanasiados. O sangue foi coletado para análise glicêmica; o tecido adiposo marrom (TAM) para registro da massa; ME sóleo direito foi direcionado para quantificação de FAT CD36 e GLUT4 por imunofluorescência; ME glúteo máximo (GM) e gastrocnêmio direitos para análise de triacilglicerol muscular (TG); ME sóleo, gastrocnêmio e GM esquerdos para mensuração de glicogênio. Os dados foram apresentados em média±desvio padrão, submetidos ao teste de análise de variância ANOVA fatorial e *post hoc* de *Newman-Keuls* para nível de significância de 5%. OVX promoveu redução de MC (F=216,22; p<0,01), sem efeito significativo causado pelo TF (F=0,40; p=0,78). OVX reduziu AFE (F=6,67; p<0,05), enquanto o TF aumentou (F=19,75; p<0,01). OVX reduziu conteúdo de FAT CD36 (F=56,01; p<0,01) e o TF aumentou (F=43,98; p<0,01). OVX reduziu conteúdo de GLUT4 (F=23,43; p<0,01) e o TF aumentou (F=39,28; p<0,01). OVX reduziu a massa do TAM relativizada pela MC (F=11,51; p<0,01) e o TF aumentou (F=35,63; p<0,01). Quanto ao glicogênio muscular, OVX não provocou alterações no sóleo, GM e gastrocnêmio (F=1,31; p=0,26; F=1,67; p=0,20 e F=3,91; p=0,05, respectivamente), enquanto o TF promoveu aumento no sóleo (F=5,66; p<0,01), sem repercussão no GM e gastrocnêmio (F=3,04; p=0,09; F=3,18; p=0,08). Quanto ao TG, OVX reduziu significativamente no GM (F=5,27; p<0,05), mas não promoveu alteração no gastrocnêmio (F=1,68; p=0,20). TF não alterou significativamente no GM (F=1,71; p=0,20) e gastrocnêmio (F=2,88; p=0,10). OVX aumentou a glicemia (F=9,57; p<0,01) e TF reduziu (F=27,66; p<0,01). De maneira geral, OVX causou prejuízos em parâmetros metabólicos, enquanto TF promoveu melhoria nesses parâmetros, apresentando resultados similares e eventualmente otimizados em relação ao controle.

Palavras chave: Hipoestrogenismo. Balanço Energético. Tecido Adiposo Marrom. Metabolismo Intermediário. Exercício Físico.

ABSTRACT

The end of ovarian secretion of estrogens is associated with imbalance of energy substrates, raising the risk of metabolic diseases. Physical training (PT) corresponds to non-pharmacological treatment in this context, because it is potent metabolic regulator through oxidation and storage of substrates transported by GLUT4 and FAT CD36. However, few is known about the effects of PT on the content of these carriers on ovariectomy (OVX). Therefore, the objective was to analyze the metabolic repercussion of OVX and PT in the from the GLUT4 and FAT CD36 content, under the hypothesis that The PT prevents the unwanted metabolic effects caused by OVX, by not allowing a drop in the content of these proteins. We evaluated 38 *Wistar* rats divided into 4 groups: control (CG), ovariectomized (GO), exercised (GE) and ovariectomized/exercised (GOE). At 90 days of age GO and GOE had their ovaries extracted through the bilateral OVX technique. At 102 days of GE and GOE were submitted to critical load test, which consisted of 4 maximum swimming efforts with times between 2 and 10 minutes, to determine the intensity of individual critical load (iCC - % of body mass - % BM). GE and GOE swam with 80% iCC, 30 minutes daily/5 days a week, for 12 weeks, with weekly adjustment according to BM. Spontaneous physical activity (SPA) of all groups was measured every two weeks by gravimetric analysis. After 12 weeks of PT, the animals were euthanized. Blood was collected for glycemic analysis; brown adipose tissue (BAT) for mass recording; skeletal muscle (SM) right soleus was directed to quantify FAT CD36 and GLUT4 by immunofluorescence; SM gluteus maximus (GM) and gastrocnemius rights for muscular triacilglycerol analysis (TG); SM soleus, gastrocnemius and GM left for glycogen measurement. The data were presented in mean±standard deviation, submitted to the ANOVA factorial and post hoc variance analysis test of Newman-Keuls for significance level of 5%. OVX promoted BM reduction ($F=216.22$; $p<0.01$), without significant effect caused by the PT ($F=0.40$; $p=0.78$). OVX reduced SPA ($F=6.67$; $p<0.05$), while PT increased ($F=19.75$; $p<0.01$). OVX reduced FAT CD36 ($F=56.01$; $p<0.01$) and PT increased ($F=43.98$; $p<0.01$). OVX reduced GLUT4 content ($F=23.43$; $p<0.01$) and PT increased ($F=39.28$; $p<0.01$). OVX reduced the mass of BAT relativized by BM ($F=11.51$; $p<0.01$) and PT increased ($F=35.63$; $p<0.01$). As for muscle glycogen, OVX did not prove changes in the soleus, GM and gastrocnemius ($F=1.31$; $p=0.26$; $F=1.67$; $p=0.20$ and $F=3.91$; $p=0.05$, respectively), while PT promoted an increase in the soleus ($F=5.66$; $p<0.01$), without repercussion on the GM and gastrocnemius ($F=3.04$; $p=0.09$; $F=3.18$; $p=0.08$). Regarding TG, OVX significantly reduced in GM ($F=5.27$; $p<0.05$), but did not promote alteration in gastrocnemius ($F=1.68$; $p=0.20$). PT did not change significantly in GM ($F=1.71$; $p=0.20$) and gastrocnemius ($F=2.88$; $p=0.10$). OVX increased blood glucose ($F=9.57$; $p<0.01$) and PT decreased ($F=27.66$; $p<0.01$). In general, OVX caused damage in metabolic parameters, while PT promoted improvement in these parameters, presenting similar results and eventually optimized in relation to control.

Keywords: Hypoestrogenism. Energetic Balance. Brown Adipose Tissue. Intermediary Metabolism. Physical Exercise.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Figura ilustrativa adaptada de AIRES et al., (2012) representando os passos para biossíntese dos estrógenos, apresentando via delta-4 e via delta-5 e as respectivas enzimas.....25
- Figura 2.** Figura ilustrativa adaptada de Ventura-Clapier et al. (2019). Demonstração do efeito genômico dos estrógenos atingindo o tecido muscular e se ligando aos seus receptores citoplasmáticos ou nucleares de isoforma α e β . O complexo quando localizado no núcleo induz a transcrição de novas proteínas, como por exemplo PGC-1 α relacionada na biogênese mitocondrial. Os estrógenos também podem exercer efeito não genômico se ligando ao receptor de estrógenos acoplado à proteína G ativando outras vias como AMPK, PI3K. GPER: receptor de estrógenos acoplado à proteína G; ER α : receptor de estrógenos alfa; ER β : receptor de estrógenos beta; E2: estradiol (estrógenos).....27
- Figura 3A.** Sequência cronológica dos eventos ocorridos ao longo do experimento: ovariectomia bilateral, adaptação ao meio líquido, treinamento físico e eutanásia. OVX: ovariectomia; TCC: teste de carga crítica; TF: treinamento físico.....45
- Figura 3B.** Sequência cronológica da realização dos 3 testes de carga crítica e treinamento físico ao longo de 12 semanas após o período de adaptação ao meio líquido. TF: treinamento físico; ICC: intensidade de carga crítica.....45
- Figura 4.** Ilustração do procedimento cirúrgico para remoção bilateral dos ovários. A) local da incisão lateral; B) ovário avistado após incisão; C) ovário exposto da cavidade peritoneal e envolto por tecido adiposo; D) ovário atado pelo fio de nylon para posterior extração.....46
- Figura 5.** Figura representativa do protocolo de adaptação progressiva ao meio líquido que perdurou 6 dias.....47

Figura 6A. Gráfico ilustrativo do teste de carga crítica. Nesse exemplo a iCC é correspondente à 8,65 %MC e CTA à 910,3 s.g. %MC: percentual da massa corporal; g: gramas; s: segundos.....	48
Figura 6B. Cargas de chumbo utilizadas para imposição de intensidade de exercício físico na natação.....	49
Figura 6C. Tanques de natação e aquecedores.....	49
Figura 6D. Animal executando treinamento.....	49
Figura 7A. A figura ilustra o aparato de gravimetria. A gaiola de alojamento dos animais está posicionada sobre a plataforma de ferro para mensuração da atividade física espontânea diária.....	51
Figura 7B. Equipamentos utilizados para captar, amplificar e processar os sinais analógicos do aparato de gravimetria.....	51
Figura 8A. Criótomo Leica utilizado para os cortes histológicos do músculo esquelético sóleo – Laboratório de imuno-histoquímica – Responsável: Prof. Dr. Thiago Russo, UFSCar (São Carlos/SP).....	53
Figura 8B. Sóleo posicionado para corte transversal.....	53
Figura 8C. Lâmina posicionada no suporte do ImageXpress para ser analisada.....	54
Figura 8D. Imagem ilustrativa das lâminas sendo fotografadas pelo software no ImageXpress - Laboratório de Bioquímica e biologia molecular – Responsável: Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, UFSCar (São Carlos/SP).....	55

Figura 9. SpectraMax® i3 (Marca Molecular Devices) - Equipamento utilizado para ler as absorbâncias dos valores séricos à partir de espectrofotometria – Laboratório de Bioquímica e biologia molecular – Responsável: Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, UFSCar (São Carlos/SP).....57

Figura 10. A imagem à esquerda ilustra o conteúdo de FAT CD36 (coloração vermelha) em músculo esquelético sóleo por imunofluorescência. O gráfico representa a média e desvio padrão do conteúdo de FAT CD36 mensurado por densidade óptica. * $p < 0,05$ em relação ao GC; ** $p < 0,05$ em relação ao GE e *** $p < 0,05$ em relação ao GO.....59

Figura 11. A imagem à esquerda ilustra o conteúdo de GLUT4 (coloração verde) em músculo esquelético sóleo por imunofluorescência. O gráfico representa a média e desvio padrão do conteúdo de GLUT4 mensurado por densidade óptica. * $p < 0,05$ em relação ao GC; ** $p < 0,05$ em relação ao GE e *** $p < 0,05$ em relação ao GO.....60

Figura 12. Imagem demonstrativa do conteúdo de FAT CD36 (CY5 – coloração vermelha), GLUT4 (FIT C - coloração verde) e núcleo (DAPI – coloração azul) em músculo sóleo de ratas.....61

Figura 13. Dados obtidos a partir do registro da massa do tecido adiposo marrom. *valores de $p < 0,05$ em relação ao GC, **valores de $p < 0,05$ em relação ao GO e ***valores de $p < 0,05$ em relação ao GE. mg: miligramas; g: gramas.....62

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Dados obtidos do glicogênio dos músculos sóleo, glúteo máximo e gastrocnêmio, triacilglicerol muscular do glúteo máximo e gastrocnêmio e valores de glicemia. Valores expressos em média e desvio padrão. ¹p<0,05 em relação ao GC; ²p<0,05 em relação ao GE, ³p<0,05 em relação ao GO. GL: glicogênio; Glúteo m.: glúteo máximo; Gastroc.: gastrocnêmio; TG: triacilglicerol muscular; mg: miligramas; g: gramas; dL: decilitros.....63

LISTA DE ABREVIATURAS E ABREVIACOES

Acetil-CoA: acetilcoenzima A

AFE: atividade física espontânea

AG: cidos graxos

PAS 160: fosfo-substrato de AKT de 160 kD

AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

AMPK: proteína quinase ativada por AMP

ATP: trifosfato de adenosina

C: carga

CaMK: proteína quinase dependente de cálcio

CEUA: Comissão de tica no uso de animais

cm: centímetros

CTA: capacidade de trabalho anaeróbia

DNA: cido desoxirribonucleico

ER- α : receptor de estrógeno α

ER- β : receptor de estrógeno β

EX-R: receptor de estrógeno X

FAT CD36: transportador de ácido graxo CD36

FSH: Hormônio folículo estimulante

GC: grupo controle

g: gramas

GE: grupo exercitado

GOE: grupo exercitado ovariectomizado

GO: grupo ovariectomizado

GL: glicogênio

GLIC: glicose

Glúteo m.: glúteo máximo

GLUT4: transportador de glicose tipo 4

GPER: receptor de estrógenos acoplado à proteína G

Hz: hertz

iCC: intensidade de carga crítica

IR: receptor de insulina

IRS: substrato do receptor de insulina

Kg: quilogramas

KOH: hidróxido de potássio

LH: hormônio luteinizante

ME: músculo esquelético

MEF2A: fator de crescimento do miócito 2A

mg: miligrama

mL: mililitros

min: minutos

mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos

mV: milivolts

Na₂SO₄: sulfato de sódio

nm: nanômetro

PGC-1 α : proliferador de peroxissoma 1 alfa

PI3K: fosfoinositídeo 3-quinase

PKB: proteína quinase B

p38MAPK: p38 map-quinase

PPAR α : receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa

PPARs: receptores ativados por proliferador de peroxissoma

PPAR β : receptor ativado por proliferador de peroxissoma beta

RE: receptores de estrógenos

RNA_m. RNA mensageiro

RPM: rotações por minuto

s: segundos

T. tempo

TAB: tecido adiposo branco

TAM: tecido adiposo marrom

TCC: teste de carga crítica

TF: efeito estatístico do treinamento físico

TG: triacilglicerol muscular

OVX: efeito estatístico da ovariectomia

R². coeficiente de determinação

μ L: microlitros

%MC: percentual da massa corporal

°C: graus celsius

LISTA DE SIGLAS

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

APS - American Physiological Society

AVMA - American Veterinary Medical Association

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Pág. 18
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral	Pág. 21
2.2 Objetivos específicos	Pág. 21
3. HIPÓTESES	Pág. 22
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
4.1 Sistema reprodutor feminino	Pág. 23
4.2 Estrógenos	Pág. 24
4.3 Estrógenos e metabolismo energético	Pág. 29
4.4 Estrógenos e balanço energético	Pág. 31
4.5 Estrógenos e tecido adiposo marrom	Pág. 33
4.6 Músculo esquelético	Pág. 34
4.7 Estrógenos e proteínas do metabolismo intermediário	Pág. 35
4.8 Exercício físico	Pág. 39
4.9 Exercício físico e proteínas do metabolismo intermediário	Pág. 41
5. METODOLOGIA	
5.1 Animais e condições ambientais	Pág. 44
5.2 Desenho experimental	Pág. 44
5.3 Técnica cirúrgica (ovariectomia bilateral)	Pág. 46
5.4 Protocolo de treinamento físico (natação)	Pág. 47
5.5 Gravimetria	Pág. 50
5.6 Eutanásia e coletas dos materiais	Pág. 52
5.7 Preparação das lâminas (marcação GLUT4 e FAT CD36)	Pág. 52
5.8 Quantificação das proteínas GLUT4 e FAT CD36 no sóleo	Pág. 55
5.9 Glicogênio	Pág. 55
5.10 Triacilglicerol muscular	Pág. 56
5.11 Análise sérica	Pág. 56
5.12 Análises e procedimentos estatísticos	Pág. 57
6. RESULTADOS	
6.1 Massa corporal	Pág. 58
6.2 Atividade física espontânea	Pág. 58
6.3 Conteúdo de FAT CD36	Pág. 58
6.4 Conteúdo de GLUT4	Pág. 59
6.5 Tecido adiposo marrom	Pág. 61
6.6 Glicogênio, triacilglicerol muscular e glicemia	Pág. 62
7. DISCUSSÃO	Pág. 64
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	Pág. 70
9. REFERÊNCIAS	Pág. 71
10. ANEXOS	
10.1 Certificado CEUA	Pág. 79
10.2 Tabela nutricional (ração para roedores)	Pág. 80

1 INTRODUÇÃO

Estrogênios são os principais hormônios feminilizantes classificados em três tipos: 17β -estradiol, estrona e *estriol*. São secretados de forma significativa pelos ovários e em menor quantidade pelas glândulas adrenais, sendo o estradiol o mais importante (Cruz et al., 2018; Guyton e Hall, 2011). Caracterizam-se por serem quase insolúveis em água, portanto, são ligados as glicoproteínas plasmáticas transportadoras como globulina e albumina (Melmed et al., 2016). Com exceção ao período de gravidez, a maior secreção desses hormônios ocorre na puberdade em resposta aos hormônios gonadotrópicos hipofisários, quando há secreção aumentada em cerca de 20 vezes, promovendo diversas alterações fisiológicas e físicas (Guyton e Hall, 2011).

Embora sejam classicamente mais reconhecidos pela sua ação hormonal reprodutiva no controle do ciclo menstrual, nas espécies mamíferas os estrógenos induzem alterações celulares em inúmeros tecidos em decorrência da ampla distribuição de seus receptores (Arnal et al., 2017). O papel dos estrógenos se estende na regulação do metabolismo ósseo (Cui et al., 2013; Nakamura, 2007), na modulação do balanço energético, na estimulação da termogênese pelo tecido adiposo marrom (TAM) (González-Garcia et al., 2017), no metabolismo e depósito de proteínas, carboidratos (Guyton e Hall, 2011) e gorduras (Frank et al., 2017; Kim et al., 2014; Pallottini et al., 2008), dentre outros. Contudo, a secreção de estrógenos ovarianos é totalmente cessada por volta dos 45 anos, sendo denominada de menopausa o fim da funcionalidade reprodutiva dos ovários (Faulds et al., 2012; Guyton e Hall, 2011).

Mesmo com consequências particulares para cada mulher, algumas complicações fisiológicas são comumente relatadas, tais como o distúrbio metabólico gerado à partir do desequilíbrio na utilização e consumo de substratos energéticos (Faulds et al., 2012) promovendo dislipidemias (Botogoski et al., 2009; Kim et al., 2016), a redução da atividade diária contribuindo para o ganho de massa corporal, redistribuição subcutânea de gordura (González-Garcia et al., 2017; Ignácio et al., 2009), menor taxa de termogênese (González-Garcia et al., 2017) e resistência à ação da insulina (Kawakami et al., 2019). Fatores esses que facilitam o surgimento de obesidade, diabetes mellitus (Inada et al., 2016; Mauvais-Jarvis et al., 2013) e

comprometimento cardiovascular (Botogoski et al., 2009; Meirelles, 2013; Yamamoto et al., 2017).

O músculo esquelético (ME) é um importante tecido na regulação metabólica e possui alta quantidade de receptores de estrógenos alfa ($ER\alpha$) e receptores de estrógenos beta ($ER\beta$), o entendimento aprofundado de suas alterações em contexto de ausência de estrógenos pode esclarecer alguns questionamentos de cunho metabólico. ME corresponde a aproximadamente 40% da massa total corporal, conferindo a ele um importante papel na homeostase energética a partir da oxidação de lipídios (Huang et al., 2017) e de glicose para produção de energia (Mandrup et al., 2017). Para que sejam disponibilizados os substratos para o interior da célula muscular, a oferta é dependente da translocação de seus específicos transportadores, no qual *Fatty acid transporter 36* (FAT CD36) é responsável pelo fornecimento e oxidação de ácidos graxos (AG) (Glatz et al., 2018; Kim et al., 2016) e *glucose transporter 4* (GLUT4) por disponibilizar glicose (Koh et al., 2019; Mandrup et al., 2017). Um dos principais estímulos fisiológicos responsáveis pela translocação dessas proteínas é mediante ação da insulina, sendo conhecido o papel dos estrógenos em aumentar a fosforilação intracelular da cascata de sinalização da via dependente de insulina (Mandrup et al., 2017). Dito isso, é de se esperar que a ausência de estrógenos afete a sinalização da via da insulina promovendo menor atividade de GLUT4. Contudo, ainda não podemos afirmar que tal circunstância seja severa o suficiente para alterar o conteúdo de GLUT4 diante dos estudos com resultados contraditórios verificados na literatura (Saengsirisuwan et al., 2009; MacDonald et al., 2015; Chen et al., 2017).

Quanto ao FAT CD36, a compreensão é ainda mais questionada devido ao número escasso de investigações sobre essa interação com a ausência de estrógenos ovarianos. Alterações no conteúdo dessa proteína reflete não apenas na captação de AG, mas na capacidade oxidativa da célula (Kim et al., 2016), sendo demonstrada a relação da redução da oxidação lipídica em animais que tiveram receptor de estrógenos alfa nocauteado (Ribas et al., 2010), porém, não foi avaliado o conteúdo do FAT CD36 nesse contexto. Portanto, novos estudos que explorem sobre o conteúdo dos transportadores GLUT4 e FAT CD36 após período prolongado de ausência de estrógenos podem ser cruciais para o esclarecimento do desequilíbrio

metabólico de glicose e lipídios comumente aparente em situação de disfuncionalidade ovariana.

Por outro lado, o processo contrátil durante o exercício físico é capaz de estimular inúmeras modificações moleculares no ME, estando envolvido em ampla rede de vias de sinalização que desempenham suas funções em resposta ao estímulos gerados (Abreu et al., 2017; Kim et al., 2014). O exercício físico tem alto poder sobre o metabolismo energético dos carboidratos por estimular translocação de GLUT4 resultando em captação de glicose via contração muscular e via insulina dependente melhorando a sensibilidade (Mandrup et al., 2017). Tal circunstância confere a ele o único fator capaz de ativar ambas as vias potencializando a atividade de GLUT4 (Pereira e Souza Junior, 2004). A prática regular eleva a demanda energética induzindo aumento da síntese de GLUT4 (Holloszy et al., 2011; Koh et al., 2019), sendo uma resposta fundamental para o processo de reposição do glicogênio muscular após o treinamento físico (Holloszy et al., 2011; Mandrup et al., 2017).

O metabolismo lipídico também é fortemente influenciado pelo exercício físico por induzir a captação de AG concomitantemente ao aumento da translocação de FAT CD36 no sarcolema para atender a demanda energética (Bosma, 2014). Assim como ocorre com o GLUT4, a translocação de FAT CD36 é ativada diante de dois estímulos importantes, pela contração muscular e via dependente de insulina (Glatz et al., 2016; Kim et al., 2016). O maior consumo de AG pelo ME para produção de energia ocorre predominantemente em treinamento físico de caráter aeróbio (Holloszy et al., 2011; Pereira e Souza Junior, 2004), sendo imprescindível a ativação de FAT CD36 tanto para captação como para auxiliar no processo de oxidação do substrato (Kim et al., 2016).

Todavia, apesar de conhecido o papel positivo do exercício físico quanto à regulação glicolítica (Koh et al., 2019) e lipídica plasmática (Wang e Xu, 2017), a literatura não possui respostas firmemente consolidadas sobre o efeito do treinamento físico no conteúdo de GLUT4 e FAT CD36 em contexto adverso diante da ausência de estrógenos ovarianos, tornando necessárias maiores investigações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a repercussão metabólica da ovariectomia bilateral e do treinamento físico aeróbio de natação em músculo esquelético oxidativo

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os efeitos da ovariectomia bilateral e do treinamento físico aeróbio de natação sobre o conteúdo de GLUT4 e FAT CD36 em músculo esquelético sóleo;

- Determinar os efeitos da ovariectomia bilateral e do treinamento físico aeróbio de natação sobre glicogênio dos músculos esqueléticos glúteo máximo e gastrocnêmio;

- Determinar os efeitos da ovariectomia bilateral e do treinamento físico aeróbio de natação sobre triacilglicerol dos músculos esqueléticos sóleo, glúteo máximo e gastrocnêmio;

- Determinar os efeitos da ovariectomia bilateral e do treinamento físico aeróbio de natação sobre a massa do tecido adiposo marrom.

3 HIPÓTESES

3.1 Efeito negativo da ovariectomia sobre parâmetros metabólicos como redução dos transportadores GLUT4 e FAT CD36 e seus respectivos substratos musculares, glicogênio e triacilglicerol, além de redução da massa de tecido adiposo marrom;

3.2 Efeito positivo do treinamento físico de natação em elevar conteúdo de GLUT4 e FAT CD36 e seus respectivos substratos musculares, bem como aumento da massa de tecido adiposo marrom;

3.3 O treinamento físico de natação proposto impedirá os efeitos metabólicos indesejados causados pela OVX por não permitir queda do conteúdo de GLUT4 e FAT CD36.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Sistema reprodutor feminino

O sistema reprodutor da mulher envolve as gônadas e o trato genital, os quais possuem características estruturais e funcionais diferenciadas ao longo de cada fase da vida, desde fetal até a senectude. Os hormônios esteroides são os principais mediadores para delimitar as fases, sendo que o pico de secreção desses hormônios sexuais ocorre na fase mais prolongada da mulher, designada de reprodutiva. A fase reprodutiva abrange desde a menarca até a menopausa e é marcada por oscilações hormonais que estão sob controle do ciclo menstrual. O ciclo menstrual envolve dois ciclos importantes, o ovariano e o uterino, que ocorrem simultaneamente com duração de aproximadamente 28 dias. Os ciclos desempenham ações específicas distintas com objetivo em comum de preparar o corpo da mulher para reprodução. O ovariano atua no desenvolvimento e maturação folicular, enquanto que o uterino na preparação do endométrio para uma possível nidação (Aires et al., 2012; Guyton e Hall, 2011).

Tudo se inicia na vida fetal, no qual 6 a 7 milhões de células germinativas começam a crescer, porém, inúmeras delas sofrem atresia, restando aproximadamente 1 milhão de células até o nascimento. Os oócitos ficam quiescentes até o momento da puberdade, momento demarcado pelo acontecimento da primeira menstruação. A partir da menarca sob ação do hormônio folículo estimulante (FSH), mensalmente um folículo retoma seu desenvolvimento para se tornar maduro. Nesse momento quantidades progressivas de estrógenos são sintetizadas e secretadas na circulação a medida que o corpo contendo células da granulosa e teçais evolui. Este óvulo atinge seu tamanho máximo e sob a ação de hormônio luteinizante (LH) é expelido em um processo chamado ovulação. As células teçais e da granulosa se diferenciam em células luteínicas e começam a secretar principalmente progesterona, mas também estrógenos. Não havendo fecundação esse corpo lúteo começa a involuir e conseqüentemente as concentrações hormonais sofrem declínio até que o endométrio não possui mais aporte hormonal suficiente para se sustentar e na seqüência descama, ocorrendo a menstruação. Esse momento é classificado como o início de um novo ciclo. Todos esses eventos se repetem mensalmente com o intuito de finalizar o desenvolvimento do folículo para na seqüência liberá-lo (Aires et al., 2012; Guyton e Hall, 2011).

Contudo, um número pré-estabelecido de folículos ficam disponíveis ao longo da vida, aproximadamente 400, enquanto os demais sofreram atresia. É comumente esperado que a mulher esgote seus folículos entre os 40-45 anos, fase denominada de menopausa e acompanhada de significativo declínio hormonal, sendo o principal os estrógenos (Aires et al., 2012; Guyton e Hall, 2011). Essa disfuncionalidade ocorrida pelos ovários resulta em queda brusca da disponibilidade de estrógenos na circulação e considerando sua ampla ação sistêmica, essa abstinência hormonal resulta em diversas complicações, exploradas em tópicos posteriores.

4. 2 Estrógenos

Os ovários desempenham papel importante no desenvolvimento gametogênico e são responsáveis por secretar hormônios esteroidais sexuais extremamente importantes: estrógenos (17β -estradiol, estrona e *estriol*), progestágenos (progesterona) e andrógenos (testosterona). O precursor da biossíntese desses esteroides é o colesterol adquirido da dieta e o formado no fígado a partir de acetilcoenzima A. O transporte do colesterol ocorre pela proteína reguladora aguda da esteroidogênese (*proteína StAR*) para o interior da mitocôndria. A enzima P_{450} (ou *side-chain-cleavage*) converte o colesterol em pregnenolona clivando a cadeia lateral do colesterol, sendo necessária ação do hormônio luteinizante nesse processo. Essas etapas ocorrem nas células da teca interna na fase folicular, nas células granulares na fase folicular tardia e nas células luteínicas, enquanto que as próximas etapas ocorrem no citoplasma. A pregnenolona pode partir pela via delta-4 (predomina nas células luteínicas) e ser convertida em progesterona, 17-hidroxiprogesterona e androstenediona, enquanto que pela via delta-5 (predomina nas células da teca interna) será transformada em 17α -hidroxipregnenolona, desidroepiandrosterona e então em androstenediona. A androstenediona por sua vez é secretada para a circulação sistêmica onde será transformada em testosterona e estrona em tecidos periféricos, enquanto é convertida em testosterona dentro do ovário. Por ação da enzima aromatase, a androstenediona e a testosterona são convertidas em estrona e estradiol, respectivamente. Estrona tem a capacidade de ser transformada em estradiol e o contrário também pode ocorrer. Com isso, estradiol e estrona podem ser convertidos em estriol no fígado (ver figura 1) (Aires et al., 2012; Guyton e Hall, 2011; Jameson, 2017).

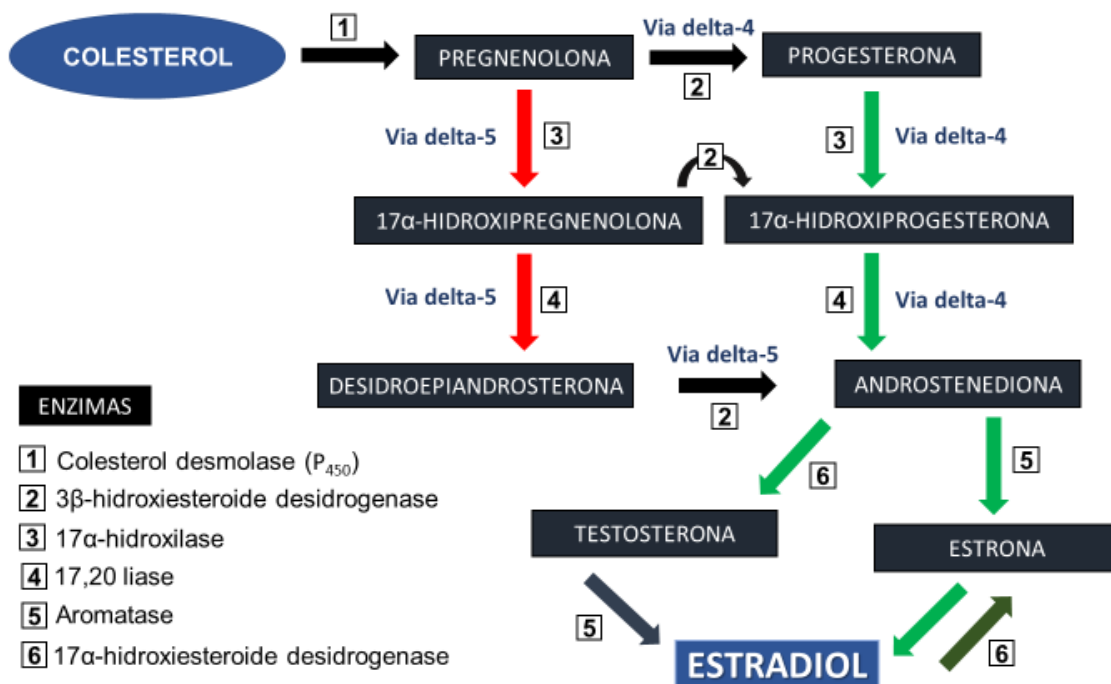


Figura 1. Figura ilustrativa adaptada de AIRES et al., (2012) representando os passos para biossíntese dos estrógenos, apresentando via delta-4 e via delta-5 e as respectivas enzimas.

Os estrógenos possuem 4 tipos de receptores: receptor de estrógeno α (ER- α), receptor de estrógeno β (ER- β), receptor acoplado à proteína G (GPER) e o menos conhecido nomeado EX-R, sendo todos geneticamente distintos e distribuídos em diferentes tipos celulares (Cui et al., 2013; Faulds et al., 2012; Lião et al., 2015; Sharma et al., 2018; Siqueira et al., 2011). As ações das células alvos são determinadas pela ligação dos hormônios com seus respectivos receptores de alta especificidade e proteínas receptoras que podem estar localizadas na membrana celular, no citoplasma ou no núcleo. A expressão dos receptores irá determinar como as células responderão, bem como as vias efetoras intracelulares ativadas pelo sinal hormonal (Melmed et al., 2016; Siqueira et al., 2011).

Em um modelo clássico da ação genômica estrogênica, o hormônio liga ao seu receptor do citoplasma da célula alvo, esse por sua vez dimeriza e transloca para o núcleo interagindo assim com sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Arnal et al., 2017). Diversos estudos iniciais relataram que os seus receptores nucleares clássicos agem como fatores de transcrição ativados por ligantes e que os receptores de estrógenos (RE) possuem múltiplas isoformas que exibem padrões e funções de expressão tecidual distintas. A ação ocorre dentro de horas, podendo ativar ou reprimir

o gene do alvo. O RE ativado dissocia-se do seu ligante e liga-se como um dímero ou diretamente a um elemento de resposta do estrógeno no gene alvo ou indiretamente na proteína ativadora ou proteína específica. Após a ligação, esses dímeros de RE interagem com co-fatores (podendo ser coativadores ou cosupressores) para regular a expressão gênica (Arnal et al., 2017; Mauvais-Jarvis et al., 2013) (ver figura 2).

Em algumas circunstâncias os estrógenos agem por efeito não genômico para desempenhar respostas mais imediatas, em segundos ou minutos. Os estrógenos ligam-se aos seus receptores de membrana plasmática, os receptores de estrógenos acoplado à proteína G (GPER) (Faulds et al., 2012; Ventura-Clapier et al., 2019), gerando resposta rápida por liberar Ca^{2+} no meio intracelular, permitindo a ativação de diversas vias como cálcio-calmodulina-dependente, AMPK (Faulds et al., 2012), beta catenina, calcineurina, fosfoinosítido 3-quinase (PI3K), proteína quinase B (PKB), alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), p38MAPK e outras (Ventura-Clapier et al., 2019) (ver figura 2).

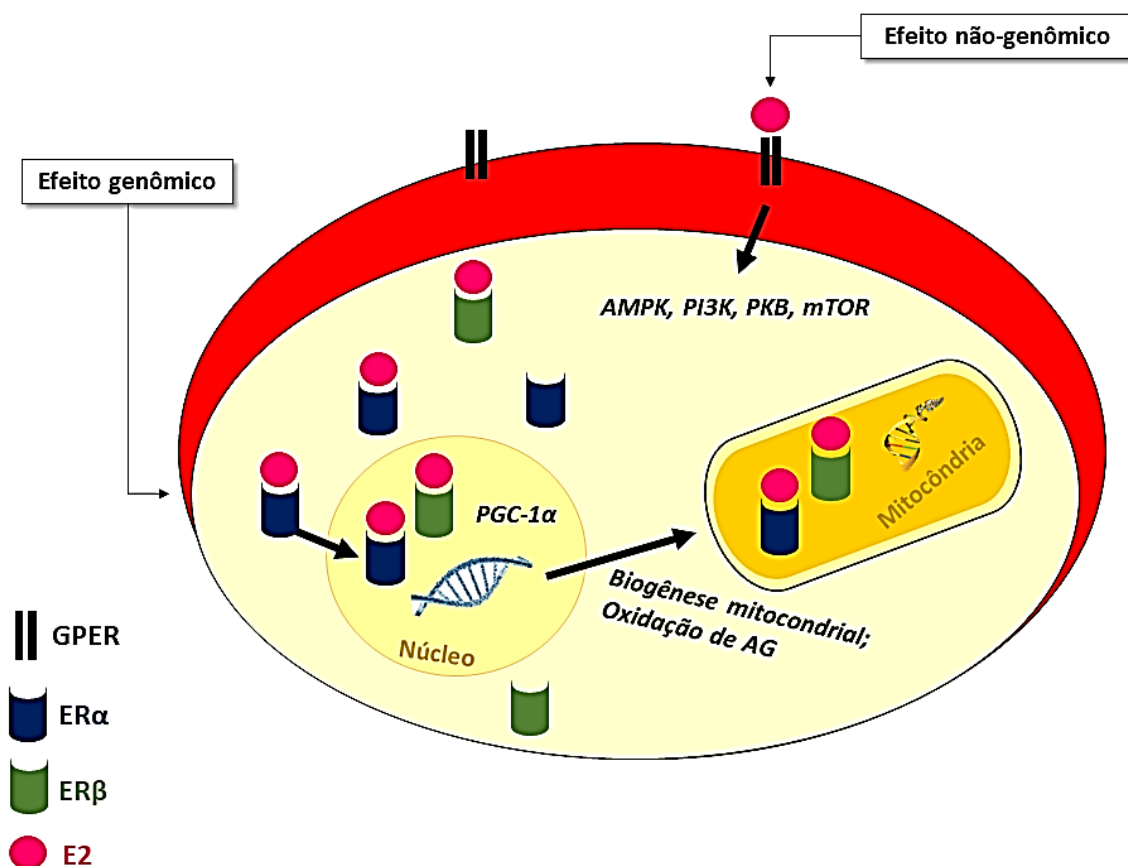


Figura 2. Figura ilustrativa adaptada de Ventura-Clapier et al. (2019). Demonstração do efeito genômico dos estrógenos chegando ao tecido muscular e se ligando aos seus receptores citoplasmáticos ou nucleares de isoforma α e β . O complexo quando localizado no núcleo induz a transcrição de novas proteínas, como por exemplo PGC-1 α relacionada na biogênese mitocondrial. Os estrógenos também podem exercer efeito não genômico se ligando ao receptor de estrógenos acoplado à proteína G ativando outras vias como AMPK, PI3K. GPER: receptor de estrógenos acoplado à proteína G; ER α : receptor de estrógenos alfa; ER β : receptor de estrógenos beta; E2: estradiol (estrógenos).

Diferentes tecidos expressam receptores estrogênicos, mas seu principal papel é classicamente conhecido em órgãos reprodutores, atuando dentro do útero na formação do endométrio, nas tubas uterinas realizando a proliferação glandular e no revestimento epitelial para aumento do número de células e cílios e nas glândulas mamárias favorecendo crescimento dos ductos e deposição de gordura. Mas há anos estuda-se a ação dos estrógenos nos mais diversos tecidos. No tecido ósseo, dentre outras participações, contribui para maturação dos osteoblastos no período de crescimento e inibição da síntese de interleucina 6, responsável por elevar atividade osteoclástica. Já no sistema cardiovascular os receptores de estrógenos são expressos em células endoteliais aumentando óxido nítrico e causando vasodilatação,

além de atuar no metabolismo lipídico reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares. As células-alvo dos estrógenos são inúmeras, o que torna preocupante as consequências do hipoestrogenismo resultante do fim da funcionalidade dos ovários (Aires et al., 2012; Guyton e Hall, 2011; Melmed et al., 2016).

A menopausa é o período biológico marcado pelo fim do ciclo menstrual da mulher, ocorrendo à partir dos 45 anos, o qual é previamente demarcado pelo climatério, momento em que os ovários começam a reduzir sua funcionalidade. A queda da secreção de estrógenos é um acontecimento biológico, portanto acomete todas as mulheres. Apesar de estrógenos serem secretados pelos córtices adrenais, a quantidade é irrelevante quando comparada aos ovários, não sendo suficiente para continuar exercendo suas funções nos tecidos ósseo, muscular, adiposo e outros (Aires et al., 2012; Guyton e Hall, 2011). Um modelo utilizado responsável por mimetizar a menopausa é a técnica cirúrgica de remoção dos ovários denominada ovariectomia (Kawakami et al., 2019), o qual possibilita o avanço de diversos estudos nesse cenário.

No que se diz a respeito ao tecido ósseo, o déficit de estrógenos é o fator chave por elevar a atividade osteoclástica, fazendo com que cálcio e fósforo sejam reabsorvidos e liberados na corrente sanguínea, diminuindo a densidade mineral e aumentando o risco de fraturas. Esses efeitos, quando agravados, conduzem à doença chamada osteoporose (Guyton e Hall, 2011) e hoje muitos estudos são voltados para identificação de mecanismos que busquem proteger ou tratar essa patologia por meio da inibição das células osteoclásticas e permitindo maior ação osteoblástica, responsável por absorver os minerais do sangue para o osso fortalecendo sua estrutura (Gambacciani e Levancini, 2014).

Doenças cardiovasculares e diabetes também estão associadas à queda de estrógenos e um fator comum é o aumento de massa corporal, principalmente de gordura abdominal (Kim et al., 2009). Uma das razões para aumento da gordura é o aumento da ingestão alimentar, que pode estar relacionada com redução de receptores de leptina no hipotálamo. Leptina é o hormônio da saciedade, atua no controle da ingestão alimentar, aumento do gasto energético e regulação no metabolismo de gordura e glicose (Ignácio et al., 2009; Romero e Zanesco, 2006),

ficando evidente o papel desse hormônio na modulação do tecido adiposo. Outro ponto fundamentado no estudo de Hong et al. (2007) que pode favorecer o desenvolvimento de doenças como aterosclerose e diabetes são os níveis de adipocitocinas (fator de necrose tumoral alfa- α) elevados relativos com os níveis de estrógenos reduzidos e isso está relacionado ao aumento de citocinas inflamatórias. De modo geral, nota-se que parâmetros como anormalidade no metabolismo da glicose, hiperinsulinemia, dislipidemia são associados com grande volume de gordura no organismo (Kim et al., 2014) e um exerce influência sobre o outro, alertando que o desequilíbrio inicial serve para desencadear outras comorbidades que podem vir a comprometer ainda mais a saúde.

4. 3 Estrógenos e metabolismo energético

O metabolismo envolve a integração de reações químicas trabalhando para o funcionamento ideal do organismo, auxiliando na reprodução, desenvolvimento, manutenção de estruturas e respostas aos estímulos externos (Braeckman et al., 2009).

Para que esses processos topicamente citados anteriormente aconteçam é necessário que o organismo receba carboidratos, proteínas e lipídios para produção de energia através da oxidação, dentre outras funcionalidades. De forma simplificada, a oxidação ocorre pelo consumo do oxigênio e liberação de gás carbônico, podendo variar conforme os alimentos ingeridos (Suen et al., 1998). Assim como a ingestão tem importância na manutenção do equilíbrio metabólico energético, o gasto energético necessário para que o metabolismo basal consiga manter as funções metabólicas vitais também tem grande relevância (Botogoski et al., 2009; Suen et al., 1998).

Os carboidratos são substratos essenciais para o desempenho das atividades físicas, podendo ser obtido à partir da dieta. Possuem reserva endógena que fica disponível sob a forma de glicogênio muscular e hepático, podendo ser afetada dependendo da intensidade, duração e disponibilidade de substratos (Faulds et al., 2012; Hearn et al., 2018; Maughan et al., 2000; Pereira e Junior, 2004). É a principal fonte de energia durante o exercício físico intenso, enquanto que a glicose livre plasmática corresponde a uma pequena quantidade (Maughan et al., 2000; Pereira e Souza Junior, 2004). No catabolismo dos carboidratos, o metabólico formado é a

acetilcoenzima A (acetil-CoA), sendo este o principal fornecedor para o ciclo de Krebs realizado nas mitocôndrias. Esse processo de formação de acetil-CoA também pode ocorrer no catabolismo dos lipídios e das proteínas (Maughan et al., 2000).

Os lipídios apresentam propriedades estruturais iguais aos carboidratos, ou seja, contém em sua estrutura básica o carbono, hidrogênio e oxigênio. Para gerar trifosfato de adenosina (ATP), o processo de catabolismo lipídico sempre conta com a participação de oxigênio. Podem ser estocados em grandes quantidades no tecido adiposo auxiliando no isolamento térmico e na proteção dos órgãos. No músculo esquelético ficam armazenados no citoplasma em forma de triacilglicerol, perto das miofibrilas facilitando a rápida disponibilização. Essa reserva lipídica será usada como fonte de energia, principalmente na condição de repouso e durante exercício físico de domínio leve ou moderado. Ácidos graxos e triacilgliceróis são lipídios que podem ser oxidados para gerar energia durante processo de repouso ou exercício, até certo ponto poupando reservas de glicogênio (Maughan et Al., 2000; Pereira e Souza Junior, 2004; Figueira et Al., 2008).

Quanto às proteínas, cada espécie contém DNA com suas próprias informações genéticas, o que determina o tipo e quantidade de proteínas sintetizadas em cada célula. Sendo assim, as proteínas exercem papel crucial na formação estrutural de todos órgãos e tecidos, além de atuarem na comunicação celular e capacidade metabólica desses tecidos. Quanto a utilização de proteínas para obtenção de energia durante a prática de exercício físico, seu catabolismo é mais resistente quando comparado com os carboidratos e lipídios. No entanto, em práticas de exercício físico que resultem em esgotamento de glicogênio, o catabolismo proteico acaba contribuindo para o fornecimento de energia. Sendo que nesse momento podem ser ofertados dois tipos de aminoácidos, os cetogênicos e os glicogênicos (Maughan et al., 2000; Pereira e Souza Junior, 2004).

Quanto à influência no perfil metabólico dos carboidratos, é conhecida a relação dos estrógenos na regulação da homeostase da glicose por melhorar a sensibilidade da insulina (Barros et al., 2006). Após a ligação dos estrógenos ao seus receptores, principalmente do tipo α , ocorre aumento da fosforilação intracelular da cascata de sinalização da insulina, tendo como finalidade a captação de glicose pelo tecido, o que contribui para a homeostase circulante (Mandrup et al., 2017). Em contrapartida, a

privação de estrógenos ovarianos pode afetar a sinalização da cascata da insulina (Mandrup et al., 2017), além de aumentar o processo de gliconeogênese hepática. Todos esses eventos culminam em aumento da glicose sanguínea, favorecendo o surgimento de diabetes mellitus e outras doenças relacionadas (Olatunji et al., 2018), como hipertensão arterial sistêmica de etiologia endócrina (Faulds et al., 2012; Pérez-Cremades et al., 2018).

Quanto as gorduras, a presença de estrógenos reduz a lipogênese, ou seja, diminui a síntese de ácidos graxos e triacilglicerol refletindo em menor deposição do tecido adiposo branco (Mauvais-Jarvis et al., 2013). Em situação oposta, a ausência de estrógenos é associada ao surgimento de dislipidemia, sendo esta caracterizada por distúrbios do metabolismo lipídico aumentando os níveis de diferentes componentes lipídicos circulantes (Botogoski et al., 2009). Estudos comprovaram que a terapia com reposição de estradiol está associada com maior ação da insulina na supressão da lipólise, sugerindo que o aumento da lipólise e de subseqüente ácidos graxos livres lançados pelo tecido adiposo ocorrem em resposta à deficiência de estrógenos (Faulds et Al., 2012; Kim et Al., 2014; Pallottini et Al., 2008; Sharma et Al., 2018).

4. 4 Estrógenos e balanço energético

O balanço energético é definido como a relação entre o total de energia ingerida por meio da alimentação e o total de energia utilizada nos eventos celulares, no qual a dieta e o exercício são os principais moduladores. O balanço energético pode ser classificado em dois tipos: positivo e negativo. O positivo é caracterizado pelo aumento da massa corporal em decorrência de maior ingestão energética em relação ao gasto, enquanto que o negativo é representado pela redução da massa corporal como consequência de maior gasto energético em relação à ingestão alimentar (Francischi et al., 2001).

Dentre os fatores envolvidos no gasto energético, a atividade física espontânea (AFE) contribui para o gasto energético total diário, sendo composta por atividades como locomoção, permanecer em posição ereta, movimentos de inquietude, ou seja, qualquer ação excluindo o exercício físico (Teske et al., 2008). AFE está relacionada à taxa metabólica basal, termogênese pós-prandial e termogênese estimulada pela prática de exercício físico. Todavia, AFE parece ter interferência hormonal gerando

balanço energético positivo conforme a secreção de estrógenos sofre declínio. Tal circunstância é comumente associada ao comprometimento da saúde metabólica de mulheres na fase de menopausa ou de jovens que sofreram aguda restrição dos estrógenos por meio de cirurgias (Sherk et al., 2019). Desde a década de 1980 sabe-se que ratas ovariectomizadas apresentam balanço energético positivo crônico gerado por atividade física reduzida e maior ingestão alimentar diária, que favorece o aumento de massa corpórea, principalmente por acúmulo de gorduras. Ao administrar reposição com estradiol essas alterações foram revertidas (Ignácio et al., 2009).

Buscando compreender a relação dos estrógenos nesse contexto, primeiramente é importante salientar que o hipotálamo corresponde à uma área do sistema nervoso central que controla a ingestão alimentar, homeostase do corpo, gasto energético. As áreas envolvidas na regulação desses parâmetros são cerúleo, área tegmental ventral, núcleos de tuberomammillary, núcleo pedunculopontino, núcleo tegmental mais tardeodorsal, núcleo accumbens e núcleo estriado. Diversos neuropeptídeos e hormônios também participam do gasto energético, tais como neuromedina U, orexina, leptina, neuropeptídeo Y (Teske et al., 2008). A orexina vem sendo alvo dos estudos quanto sua relação na atividade física espontânea, sendo este neuropeptídeo sintetizado na região perifornical do hipotálamo que é altamente expressada com receptores de estrógenos (Federeci et al., 2016). Essa correlação serve de embasamento para o início do esclarecimento sobre a queda da atividade física ocorrer concomitantemente aos níveis de estrógenos circulantes, porém a compreensão total ainda não é elucidada.

Atualmente é possível mensurar dados diários em modelo animal por meio do aparato de gravimetria, o qual reside em registrar a alteração gravitacional gerada à partir de contrações musculares dos animais. É um método imperceptível ao animal, que registra sinais de alta frequência e longa duração, sendo extremamente sensível na captação de qualquer movimentação dos animais. Assim, podem ser verificadas eventuais mudanças quanto ao aumento ou redução de atividade diária, explicando possíveis resultados do balanço energético ocasionados pelas intervenções (Beck et al., 2016).

4. 5 Estrógenos e tecido adiposo marrom

Há três tipos de tecidos adiposos: tecido adiposo branco (TAB), tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo bege. O TAB é um órgão com função endócrina ativa envolvido na regulação do equilíbrio energético, da homeostase glicolítica e lipídica através de múltiplas vias de sinalização metabólica que se relacionam com fígado, músculo esquelético, dentre outros. Hormônios são extremamente influenciadores na regulação do tecido adiposo e especialmente os estrógenos desempenham papel importante nessa ação, visto que o tecido expressa receptores ER α e ER β , mediando assim sua função e distribuição (Fonseca-Alaniz et al., 2006; Kim et al., 2014). Estrógenos diminuem a lipogênese atuando como supressor da enzima lipase de lipoproteína, reduzindo assim a síntese de ácidos graxos e triacilglicerol que seriam armazenados no tecido adiposo (Kim et al., 2014).

Em razão desses achados, uma falha na homeostasia do tecido adiposo pode resultar em complicações metabólicas, comprometendo o fornecimento de energia sistêmica, prejudicando o consumo de glicose e outros substratos que podem afetar a ativação de mecanismos autonômicos envolvidos no sistema de homeostase corporal (Kim et al., 2014; Pallottini et al., 2008).

Por outro lado, o TAM é morfológicamente composto por pequenas gotículas lipídicas e relevantes quantidades de mitocôndrias. Em roedores está presente na região interescapular, enquanto que nos humanos fica localizado nas regiões cervicais profundas, supraclaviais e paravertebrais (Frank et al., 2017). A massa do TAM encontra-se inversamente proporcional ao tecido adiposo branco, sugerindo sua importância na regulação da gordura corporal (Fonseca-Alaniz et al., 2006).

Funcionalmente é mais conhecido pelo seu efeito termogênico e por atuar promovendo oxidação de diversos metabólitos, como glicose e lipídios (Frank et al., 2017), que são captados na circulação sanguínea para gerar energia na forma de calor devido ao número de mitocôndrias. A insulina se liga a seus receptores presentes no TAM induzindo captação de glicose e a atividade de enzimas atuantes na síntese de ácidos graxos. A deleção dos seus receptores está associada ao decréscimo do conteúdo de TAM, demonstrando o papel da insulina na modulação da termogênese realizada por TAM e no gasto energético (González-García et al., 2017). Fazendo relação com a investigação do presente estudo, na presença de estrógenos

a atividade de TAM é aumentada. Os estrógenos podem atuar por ação periférica agindo diretamente na TAM ou estimulação indireta pelo hipotálamo. No hipotálamo, os estrógenos melhoram a funcionalidade de TAM por atuar em áreas como núcleo arqueado, ventromedial, paraventricular, pré-óptico e lateral. Sua ação no hipotálamo é de inibir AMPK, tendo como consequência ativação do sistema nervoso simpático sobre a atividade do TAM. Essa teoria pôde ser sustentada a partir da administração de estradiol na área central, resultando resposta catabólica profunda. Ambos mecanismos, direto ou indireto, resultam em aumento de temperatura e do gasto energético, podendo reduzir a massa corporal pelo efeito da termogênese (González-Garcia et al., 2017). Portanto, são importantes estudos que relatem sobre alterações na massa do TAM em situação de ausência de estrógenos diante das funcionalidades energéticas impostas por esse tecido.

4. 6 Músculo esquelético

O músculo esquelético (ME) desempenha funções cruciais para a manutenção adequada do organismo, incluindo controle do movimento vinculado à respiração, deglutição e estabilidade de articulações e mantendo tensão entre os tendões e ossos. O ME também está envolvido com a produção de calor corporal, podendo corresponder até a 85% do calor gerado. No que se diz respeito ao metabolismo, são excelentes na capacidade de armazenar e utilizar glicose, influenciando na estabilização da concentração sanguínea desse substrato (Saladin, 2018), assim como no metabolismo das gorduras (Kim et al., 2016).

Quanto à estrutura do tecido muscular, ele é composto por numerosas fibras constituídas de subunidades sucessivamente menores que se prolongam por todo comprimento na maioria dos músculos e são revestidas por membrana celular denominada sarcolema. Cada fibra muscular contém milhares de miofibrilas compostas de filamentos de miosina e actina responsáveis pela contração muscular em resposta à estímulo neuronal e sucessiva liberação de cálcio. Existem dois tipos de fibras musculares, as do tipo I e do tipo II, sendo as do tipo II subdivididas em A e B. As fibras do tipo 1 (lentas) são menores, contém mioglobinas responsáveis pela coloração avermelhada do músculo, grande número de mitocôndrias para dar suporte aos altos níveis de metabolismo oxidativo, sistema de vasos sanguíneos e capilares mais extensos devido à exacerbada demanda de oxigênio. Enquanto que as fibras do

tipo II (rápidas) são recrutadas para grande força de contração, possuem altas quantidades de enzimas glicolíticas para fornecimento de energia, menor quantidade de mitocôndrias e coloração branca em virtude do déficit de mioglobina (Guyton e Hall, 2011).

Diversos hormônios participam e exercem funções sobre o metabolismo do ME, dentre eles os estrógenos. São expressados dois tipos de receptores de estrógenos no ME: alfa e beta (Gorres et al., 2011; Ikeda et al., 2019; Rogers et al., 2009). Ambos tem ligantes ativadores de fator de transcrição. A afinidade do estradiol pelos receptores é a mesma, apesar de ER α ter demonstrado maior atividade transcricional em resposta ao hormônio do que ER β na maioria das células. Os dois podem residir no mesmo tipo de célula interagindo e regulando a atividade transcricional à partir da expressão de RNA mensageiro (RNAm) em músculo esquelético humano (Wiik et al., 2008).

Assim como em demais tecidos, a ausência de estrógenos também afeta diretamente o ME. Uma das doenças mais conhecidas é a sarcopenia, caracterizada por redução no tamanho e em quantidade de fibras. Tal contexto é preocupante diante das consequências geradas pela perda progressiva de massa muscular e de força, comprometendo assim a capacidade física e qualidade de vida (Ahmad et al., 2019; Marzetti et al., 2017). Outra linha que vem ganhando força e que é o principal foco do presente estudo é sobre a relação da privação de estrógenos ovarianos com a atividade e conteúdo de proteínas transportadoras presentes no ME, tais como GLUT4 e FAT CD36. Alterações nessas proteínas comprometem a captação e oxidação de substratos como glicose e ácidos graxos, prejudicando o fornecimento de energia, além de aumentar o risco de diabetes, dislipidemia, dentre outras doenças crônicas metabólicas.

4. 7 Estrógenos e proteínas do metabolismo intermediário

O metabolismo intermediário envolve minuciosamente a área molecular, descrevendo reações envolvidas no armazenamento e geração energia metabólica utilizada na biossíntese de compostos de baixo peso molecular das suas respectivas vias (Braeckman et al., 2009).

Os AG são uma das mais importantes fontes de energia para o metabolismo celular (Kim et al., 2016), podendo ser oxidados ou estocados como triacilglicerol intramuscular, contribuindo na regulação de AG circulantes (Jackson et al., 2013). Um dos transportadores mais importantes no fornecimento de AG para o tecido muscular são os FAT CD36, sendo responsáveis por 70% do transporte, conferindo a eles um papel relevante na oferta desse substrato (Glatz et al., 2018). O transporte de AG ocorre em diversos tecidos que possuem capacidade de metabolizá-lo, principalmente músculo esquelético do tipo I devido as suas características energéticas (Kim et al., 2016; Vistisen et al., 2004). Os FAT CD36 permanecem localizadas no compartimento endossômico até receberem estímulo suficiente para serem translocadas até a membrana plasmática, mais especificamente para o sarcolema. A translocação é sensível a dois tipos de estímulos fisiológicos, dependente de insulina via PI3K ou por contração muscular gerada durante exercício físico via AMPK (Bonen et al., 2007; Glatz et al., 2018; Lombardi et al., 2012; Kim et al., 2016). Parte do AG disponibilizado é esterificado e armazenado em forma de triacilglicerol intramuscular, enquanto outras porções foram previamente ativadas à acil-CoA pelo processo extramitocondrial por ação da enzima acil-CoA sintase (Pereira e Souza Junior, 2004). A partir disso ocorre uma sequência de modificações até estarem disponíveis para a mitocôndria realizar beta-oxidação e produzir energia (Glatz et al., 2016; Pereira e Souza Junior, 2004).

Fazendo correlação com o presente estudo, os estrógenos possuem receptores ER α , sendo esta isoforma abundante no músculo esquelético, principalmente em fibras do tipo I. Sua ativação a partir da ligação do hormônio é conhecida por aumentar a oxidação de gorduras (Oosthuysen e Bosch, 2012), auxiliando na manutenção da homeostase lipídica (Jackson et al., 2013). Tal fenômeno ficou consistente ao extrair geneticamente ER α e obter redução da oxidação lipídica mitocondrial (Jackson et al., 2013), demonstrando o papel dos estrógenos na capacidade de utilização dos AG. Em células musculares, após ligação dos estrógenos aos seus receptores, a migração do complexo para o núcleo induz a transcrição de genes mitocondriais, dentre eles o proliferador de peroxissoma 1 alfa (PGC-1 α). A síntese de PGC-1 α promove biogênese mitocondrial e conseqüentemente elevação da utilização de ácidos graxos para produção de energia (Ventura-Clapier et al., 2019) (ver figura 2). Sendo o PGC-1 α um importante regulador da síntese de FAT CD36 (Cheng et al., 2018), é esperado que todo esse mecanismo iniciado pela ativação do receptor de estrógenos resulte

em aumento da atividade e conteúdo de FAT CD36 para atender a demanda energética de AG necessária.

Em circunstâncias contrárias de declínio da secreção de estrógenos ovarianos, é comumente relatado desequilíbrio no perfil lipídico, favorecendo quadro de dislipidemia (Kim et al., 2016), como dito anteriormente. Altas concentrações de AG circulantes são relacionadas com aumento de triacilglicerol em extratos de tecido muscular, porém, não é esclarecido se esse depósito ocorre intramuscular ou extramuscular (Jackson et al., 2012). Essas incertezas deixam questionamentos sobre os fatores responsáveis pelo desbalanço lipídico após privação de estrógenos ovarianos, podendo ser ocasionadas por alterações quanto ao conteúdo de FAT CD36, pelo comprometimento na oxidação lipídica mitocondrial ou até mesmo derivado da interação de ambos ou demais fenômenos.

Buscando afunilar o estudo a partir de um determinado parâmetro que poderá contribuir amplamente para o entendimento, decidimos investigar as consequências da ausência de estrógenos ovarianos sobre o conteúdo de FAT CD36. Considerando a afinidade dos estrógenos em estimular a fosforilação da via da insulina e essa por sua vez tem como uma de suas funções a translocação de FAT CD36, possivelmente, em contexto oposto de ausência de estrógenos, a menor ativação da via pode influenciar sobre o conteúdo de FAT CD36 em virtude de menor atividade. Esses eventos refletem sobre a entrada de AG no ME, o nível de AG circulante e sobre a oxidação lipídica.

Quanto ao metabolismo dos carboidratos, ME é responsável por captar aproximadamente 80% da glicose circulante (Mandrup et al., 2017), sendo GLUT4 a proteína transportadora responsável por possibilitar a entrada de glicose para o meio intracelular. Em condições basais, GLUT4 permanece em vesículas intracelulares até receber estímulo suficiente para translocar para os túbulos T e para a membrana plasmática (Inada et al., 2016). Essa translocação de GLUT4 é sensível as concentrações de insulina circulante, no qual após ligação da insulina ao seu receptor (IR), ocorre ativação de uma cascata de eventos intracelulares (IRS - PI3K - AKT) que tem como finalidade induzir a atividade do GLUT4 em captar a glicose. Outro mecanismo ativador da translocação de GLUT4 é independente de insulina, ou seja, por meio da contração muscular propiciada pelo exercício físico principalmente via

AMPK (Kawakami et al., 2019; Koh et al., 2019; Rogers et al., 2009) e via receptor ativado por proliferador de peroxissoma beta (PPAR β) (Koh et al., 2019). A participação do exercício físico será melhor explorada adiante.

Os estrógenos exercem influência sob o metabolismo dos carboidratos quanto a melhoria na sensibilidade à insulina (Gorres, et al., 2011; Inada et al., 2016; Mandrup et al., 2017; Turdi et al., 2015). Tal contexto pôde ser observado a partir de estudo em roedores que associaram as oscilações hormonais ao longo das diferentes fases do ciclo menstrual, identificando maior resistência na captação de glicose durante a fase lútea (Barros et al., 2006). Buscando compreender essa relação, ao promover a deleção de ER α no músculo esquelético, a resposta obtida foi resistência a ação da insulina e intolerância à glicose (Gorres et al., 2011; Ventura-Claiper et al. 2019). Em contrapartida, ao ativar ER α observou-se aumento da atividade de AKT – PAS-160 – AMPK com conseqüente translocação de GLUT4 promovendo captação de glicose, dando consistência ao papel dos estrógenos (Gorres et al., 2011; Turdi et al., 2015). Sendo assim, é possível inferir sobre a ação dos estrógenos no ME em estimular a fosforilação intracelular, ocasionando aumento da cascata de sinalização da insulina com conseqüente elevação da atividade de GLUT4 (Mandrup et al., 2017).

Porém, em cenário adverso de ausência de estrógenos o desequilíbrio no metabolismo dos carboidratos é comumente relatado. A literatura apresenta explicações vinculadas à resistência da ação da insulina (Chen et al., 2016; Stefanska et al., 2015) e até mesmo à redução da taxa de secreção de insulina pancreática (Stefanska et al., 2015). Quanto à relação do GLUT4 nesse cenário, são encontrados alguns estudos com resultados discrepantes (Chen et al., 2017; Hansen et al., 1996; MacDonald et al., 2015; Saengsirisuwan et al., 2009), mas que parecem demonstrar que cronicamente, a falta da ação dos estrógenos pode indiretamente ser um fator influenciador sobre a quantidade de GLUT4 presente no ME, o que reflete na atividade de captação de glicose.

É notável que não existe apenas um mecanismo ou fator que afeta o metabolismo dos carboidratos. Contudo, a redução do estoque energético de glicogênio no ME e o aumento da concentração sanguínea de glicose são suficientes para condicionar o surgimento de doenças metabólicas (Mandrup et al., 2017). Considerando que o GLUT4 é a peça chave para a entrada de glicose no tecido

muscular, por isso a proposta do presente estudo em investigar qual a influência prolongada do déficit de estrógenos sobre o seu conteúdo.

4. 8 Exercício físico

O exercício físico corresponde a um programa de treinamento sistematizado com a finalidade de manter ou melhorar o condicionamento a partir da ativação dos músculos esqueléticos, por meio da contração muscular gerando força e interrompendo a homeostase (Monteiro e Sobral Filho, 2004). De modo simplificado, a ativação dos eventos celulares ocorrem em 3 etapas: primeiramente há detecção de sinais advindos do exercício físico, no qual as proteínas sensoriais localizadas na membrana celular e dentro das células captam alterações nas concentrações de cálcio, AMP cíclico (AMPC), neurotransmissores, glicogênio e hormônios; posteriormente ocorre a transdução de sinal por vias e redes de proteínas que transmitem e avaliam a entrada detectada; enquanto a terceira etapa é o processo no qual as proteínas efetoras regulam a transcrição, tradução ou síntese proteica, degradação de proteínas e funções celulares. Todas essas etapas modulam a adaptação ao exercício, variando conforme a manipulação e prescrição das variáveis impostas (Foschini et al., 2007; Wackerhage, 2014).

A demanda energética ao exercício físico é suprida por meio de três vias bioquímicas: fosfogênica, glicolítica e oxidativa. O sistema fosfogênio participa de maneira importante em ações físicas fortes e rápidas, por meio da hidrólise de ATP e fosfocreatina obtidos do estoque intramuscular, o qual é bastante limitado. O sistema glicolítico obtém energia por meio da glicólise resultando em piruvato, parte dessa energia advém do glicogênio muscular, que possui reserva para suprir energia entre 20 segundos a 5 minutos (Cheng et al., 2017; Maughan et al., 2000). A via glicolítica é caracterizada pelo acúmulo de lactato como produto final e aumento da concentração de hidrogênio recorrente do exercício físico de alta intensidade (Cheng et al., 2017; Hearn et al., 2018; Maughan et al., 2000).

Já o sistema oxidativo, descrito na literatura também como sistema aeróbio, produz ATP em ambiente mitocondrial e com utilização de oxigênio. Apesar de ser o sistema com maior capacidade de produzir energia em termos de volume, não é o mais veloz. Para que mecanismos de fadiga comuns em exercício de alta intensidade sejam evitados ao realizar exercício de duração mais elevada, é necessária a

identificação de uma intensidade de esforço que permita a remoção dos metabólitos produzidos pela via glicolítica. Equivaleria, portanto, a maior intensidade onde há equilíbrio da produção e remoção de lactato sanguíneo, permitindo precisão na prescrição do tipo de intensidade que será aplicada (Zagatto et al., 2013). O ponto de intensidade definido como limiar anaeróbio lactacidêmico corresponde à intensidade de esforço que permite performance de longa duração, sem acúmulo de lactato sanguíneo, com pouca probabilidade de fadiga por acidose e utilização prioritária da via oxidativa para suprir a demanda energética (Faude et al., 2009; Kindermann et al., 1979). É possível impor intensidades de esforços no modelo animal a partir de adaptações do protocolos aplicados em humanos para determinar as intensidades correspondentes ao limiar anaeróbio lactacidêmico, como o teste de Carga Crítica (TCC), sendo um modelo adaptado da avaliação de Potência Crítica criado por Monod e Scherrer (1965). O protocolo de TCC é não-invasivo, o que possibilita menos estresse ao animal.

Um dos fundamentos para a determinação da intensidade de carga crítica (iCC) é através do terceiro modelo de regressão linear extraído do trabalho de Gobatto et al. (2013). O teste analisa esforços exaustivos que permitem a obtenção de uma regressão linear construída a partir de diferentes cargas em decorrência de seus respectivos tempos de exaustão. Para isso é necessário cumprimento de critérios objetivos de exaustão, como se vê em Beck e Gobatto (2013). Outro ponto forte e que torna esse modelo bastante confiável é a intensidade de esforço ser determinada individualmente, visto que cada animal possui sua respectiva densidade corporal. O exercício de natação há muito tempo vem sendo utilizado para pequenos animais (McArdle e Montoye, 1965), que são capazes de realizar tal atividade de forma contínua e sob absoluto controle da intensidade individual de esforço físico.

Dentre os diversos protocolos possíveis de exercício, o aeróbio de intensidade moderada é muito utilizado por influenciar na modulação metabólica, induzindo modificações lipoproteicas basais, estimulando o melhoramento de processos enzimáticos que metabolizam os lipídios, controlando assim os níveis ideais de colesterol no organismo e favorecendo a qualidade de vida (Botogoski et al., 2009).

4. 9 Exercício físico e proteínas do metabolismo intermediário

O ME depende de uma variedade de fatores para que sua função contrátil ocorra do modo adequado, tais como a atividade metabólica e a modulação sistêmica, sendo esses fatores relacionados com a disponibilidade de substratos, influência e sensibilidade dos receptores de insulina e atividade correspondente a captação de glicose e AG. As fibras musculares esqueléticas em repouso captam e utilizam glicose, mas essa captação aumenta conforme a demanda contrátil do músculo, podendo ser prontamente oxidada liberando energia, enquanto que o excesso é armazenado na forma de glicogênio (Severi et al., 2007). O exercício modula o metabolismo basal, aumentando o gasto energético por aproximadamente 6 a 24 horas após 30 minutos de treino moderado (Botogoski et al., 2009) e a nível molecular provoca aumento na expressão de genes que se prolongam por horas pós exercício (Civitarese et al., 2005). Sendo assim, muitos trabalhos associam o exercício físico como um forte influenciador do metabolismo, pois seu processo contrátil é capaz de estimular inúmeras modificações moleculares no músculo esquelético, além de estar envolvido em uma ampla rede de vias de sinalização e moléculas reguladoras que desempenham suas funções em resposta ao exercício resultando em diversos parâmetros metabólicos (Abreu et al., 2017).

Dentre os metabólitos consumidos pelo ME em condições basais, a utilização de AG como fonte de produção energética é potencializada durante a prática do exercício físico. Isso ficou claro ao avaliar que sessões de 30 minutos de treinamento físico são suficientes em elevar agudamente a demanda de ácidos graxos (Bonen et al., 2007). Exercício físico aeróbio promove aumento de Ca^{2+} intracelular, promovendo auto fosforilação da proteína quinase dependente de cálcio - calmodulina (CaMK), enquanto que o aumento de ADP e AMP (AMP:ATP) estimulam a fosforilação de AMPK. O resultado da fosforilação da CaMK (Wackerhage, 2014) e AMPK é o aumento do catabolismo de AG por promover transcrição de PGC-1 α (Glatz et al., 2016; Glatz et al., 2018; Wackerhage, 2014). A própria ativação do PGC-1 α (Koh et al., 2019) promove *upregulation* do FAT CD36 (Cheng et al., 2018) elevando a capacidade em oxidar ácidos graxos para geração de energia (Huss et al., 2004). A oxidação de AG ainda pode ser mais intensificada após interação do PGC-1 α com receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) (Huang et al., 2017). Dentre os tipos de PPARs existentes, o receptor ativado por PPAR β é altamente

expressado durante o treinamento físico aeróbio, exercendo função de aumentar a síntese de proteínas associadas na oxidação de AG, dentre elas FAT CD36 (Glatz et al., 2018). Após o fornecimento de AG para o tecido muscular, o próprio FAT CD36 estimula a síntese de novos transportadores (Glatz et al., 2018). Animais que tiveram nocaute no gene do CD36, resultaram em captação de AG prejudicada entre 40-75%, tendo como consequência alterações na capacidade oxidativa do ME (Glatz et al., 2016). Não existe uma única via de sinalização responsável por translocar FAT CD36, mas é visível seu papel crucial para o funcionamento adequado no fornecimento energético para o ME e o poder do exercício físico sobre a atividade dessa proteína.

Como anteriormente abordado, GLUT4 exerce papel crucial na entrada de glicose para o ME. Durante a contração muscular algumas das vias ativadas são AMPK (Koh, et al. 2019; Rogers et al., 2009), PPAR β (Koh et al., 2019) e PGC-1 α (Benton et al., 2009; Michael et al., 2001; Koh et al., 2019; Wende et al., 2007), tendo como uma de suas consequências a translocação de GLUT4 (Koh, et al. 2019; Rogers et al., 2009). A ativação desses fatores de transcrição estimulam o aumento da expressão de GLUT4 por ativar fator de crescimento do miócito 2A (MEF2A), um fator responsável por potencializar a transcrição de GLUT4 (Koh et al., 2019). Durante a contração muscular, o aumento da concentração citosólica de Ca⁺² e CaMK também parece estar relacionado ao aumento de GLUT4 por induzir a atividade de MEF2A (Ojuka et al., 2002). O processo contrátil também é capaz de modular o metabolismo dos carboidratos via dependente de insulina, melhorando sua sensibilidade no tecido muscular (Mandrup et al., 2017). Sendo assim, por meio de diversos mecanismos o exercício físico é considerado um forte estimulador das vias responsáveis pela translocação e síntese de GLUT4 (Koh et al., 2019). Além disso, altas concentrações de GLUT4 são proporcionais à capacidade de disponibilizar glicose para o tecido muscular, demonstrando o papel do exercício físico em elevar a taxa de síntese de glicogênio pelo fenômeno de supercompensação em resposta à adaptação energética imposta (Holloszy et al., 2011; Mandrup et al., 2017). Portanto, o processo contrátil exercido pelo exercício físico é capaz de estimular inúmeras vias de sinalizações que resultam em modificações moleculares no músculo esquelético acarretando benefícios sistêmicos (Abreu et al., 2017)

Contudo, a literatura ainda apresenta respostas diversificadas quanto ao papel do treinamento físico na melhoria do conteúdo de GLUT4 em animais

ovarietomizados (Chen et al., 2017; Hansen et al., 1996; MacDonald et al., 2015; Saengsirisuwan et al., 2009). Na tentativa de compreender melhor essa questão, o presente estudo optou por aplicar a natação de intensidade moderada para avaliar o quanto eficiente pode ser o treinamento físico aeróbio na síntese de GLUT4 e de FAT CD36 em ratas submetidas à ovariectomia. Se obtivermos sucesso nesses resultados, os benefícios são inúmeros quanto à redução do risco de doenças metabólicas relacionadas à intolerância à glicose e desbalanço lipídico.

5 METODOLOGIA

5.1 Animais e condições ambientais

O estudo avaliou 38 ratas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) distribuídas em 4 grupos: controle (GC: n=10), ovariectomizado (GO: n=10), exercitado (GE: n=9) e exercitado/ovariectomizado (GOE: n=9), dispostas em gaiolas (comprimento 40 cm, largura 40 cm e altura 20 cm) contendo no máximo 5 animais. Os animais foram provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ficaram alojados no biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico, localizado no departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar.

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos sob protocolo número 1556060417 (ver anexo 10.2). As ratas permaneceram no biotério obedecendo o ciclo de 10 horas claro e 14 horas escuro, temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar entre 45 e 55%, alimentação comercial própria para roedores (marca Presence – linha laboratorial – ver anexo 10.2) e água “*ad libitum*”. Os animais submetidos à natação executaram o treinamento em outra sala, cujas condições ambientais foram cuidadosamente definidas.

5.2 Desenho experimental

Aos 45 dias de idade os animais chegaram ao biotério, previamente preparado para o acolhimento visando atender as condições ambientais. Foi mensurada a massa corporal semanalmente para acompanhamento do início ao fim do experimento, enquanto que dados da atividade física espontânea foram mensurados quinzenalmente. Aos 90 dias de idade foi realizada a técnica cirúrgica de ovariectomia dos grupos GO e GOE. Aos 95 dias de idade iniciou-se a adaptação ao meio líquido para os grupos exercitados (GE e GOE). Realizada a adaptação ao meio líquido, ocorreu o 1º teste de carga crítica (TCC) aos 102 dias de idade. Ao determinar a intensidade de exercício físico correspondente à carga crítica de cada animal, iniciou-se o treinamento físico diário (ver figura 3A e 3B). Os registros de gravimetria ocorreram quinzenalmente à partir do 1º teste de carga crítica.

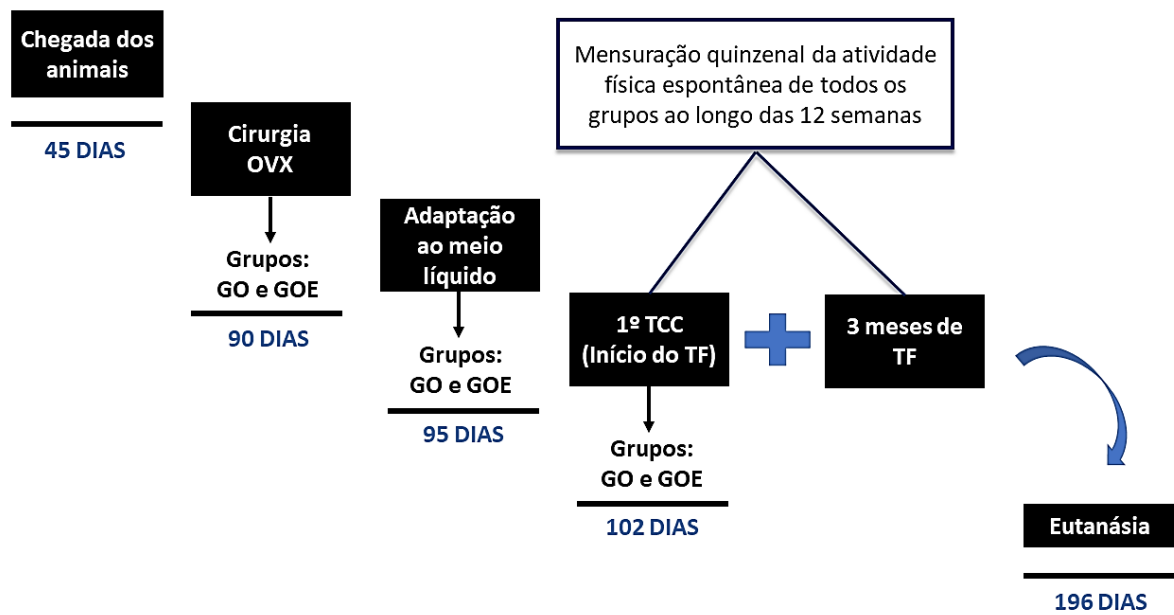


Figura 3A. Sequência cronológica dos eventos ocorridos ao longo do experimento: ovariectomia bilateral, adaptação ao meio líquido, treinamento físico, atividade física espontânea e eutanásia. OVX: ovariectomia; TCC: teste de carga crítica; TF: treinamento físico.

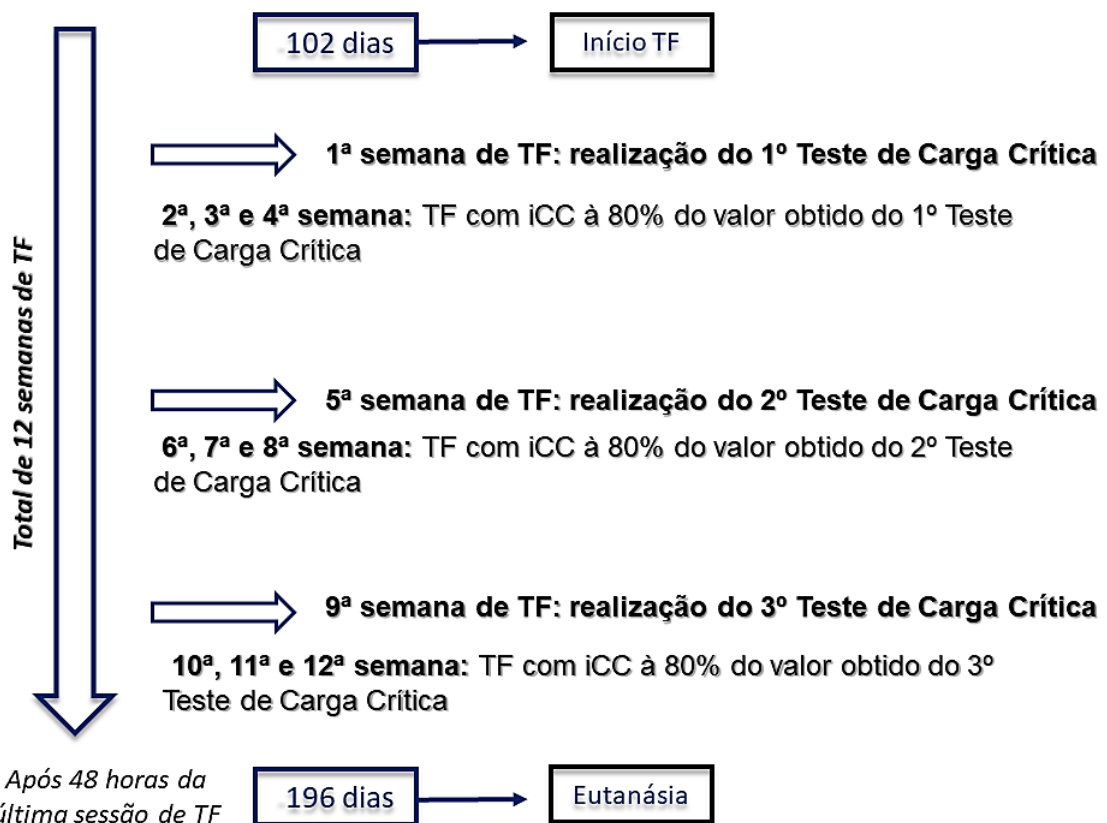
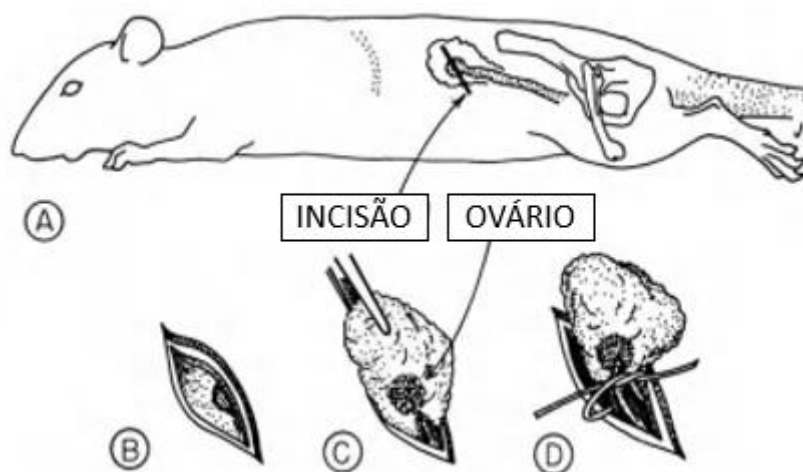


Figura 3B. Sequência cronológica da realização dos 3 testes de carga crítica e treinamento físico ao longo de 12 semanas após o período de adaptação ao meio líquido. TF: treinamento físico; iCC: intensidade de carga crítica.

5. 3 Técnica cirúrgica (ovariectomia bilateral)

O modelo animal tem sido estudado por mimetizar o quadro clínico de ausência de estrógenos ovarianos através da técnica cirúrgica denominada ovariectomia. No presente trabalho as ratas dos grupos (GO e GOE) foram ovariectomizadas aos 90 dias de idade, de acordo com Kalu (1991). A cirurgia foi precedida com anestesia composta por ketamina (10 mg.Kg^{-1}) e xilazina ($0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$) administrada via intraperitoneal.

Após a anestesia foi realizada uma incisão lateral de 1 a 1,5 cm entre a última costela e o joelho, cerca de 1 cm lateral aos músculos da coluna vertebral, com posterior incisão de 1 cm da camada muscular e cavidade peritoneal localizadas abaixo, em seguida o ovário foi exposto e atado com fio de nylon na região da ligadura inferior à fimbria possibilitando assim sua total extração. O restante do tecido foi retornado à cavidade peritoneal. A musculatura e a pele foram suturadas com fio de nylon (ver figura 4). O mesmo procedimento foi realizado no lado oposto (Zarrow, 1964). Todo o procedimento foi realizado em mesa cirúrgica mantida à 28°C . Os animais foram diariamente inspecionados durante período pós cirúrgico.



Fonte: figura adaptada de Zarrow (1964)

Figura 4. Ilustração do procedimento cirúrgico para remoção dos ovários. A) local da incisão lateral; B) ovário avistado após incisão; C) ovário exposto da cavidade peritoneal e envolto por tecido adiposo; D) ovário atado pelo fio de nylon para posterior extração.

5. 4 Protocolo de treinamento físico (natação)

A adaptação ao meio líquido foi ajustada a partir dos modelos propostos por Gobatto et al. (2013) e Lima et al. (2017). Aos 95 dias os animais (GE e GOE) foram submetidos a 6 dias de adaptação progressiva levando em consideração parâmetros como tempo de exposição (5 a 20 minutos), profundidade (10 a 80 cm) e carga (0 a 3% da massa corporal - %MC) (ver figura 5).

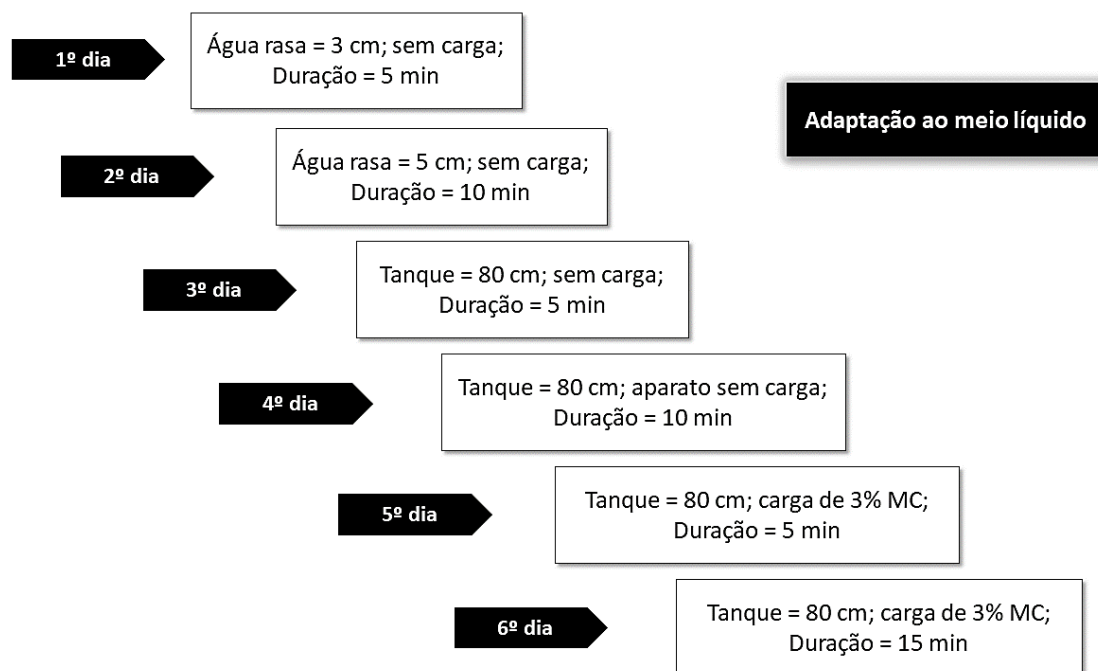


Figura 5. Figura representativa do protocolo de adaptação progressiva ao meio líquido que perdurou 6 dias. cm: centímetros; min: minutos; %MC: % da massa corporal.

Após a adaptação ao meio líquido, aos 102 dias os animais foram submetidos ao TCC, que consistiu em 4 esforços máximos com intensidades correspondente ao percentual da massa corporal do animal e tempos de exaustão entre 120 a 600 segundos. Foi considerado tempo de exaustão o momento em que o animal era incapaz de permanecer na superfície e mesmo após intensas tentativas persistia submerso por pelo menos 10-15 segundos, atingindo assim o ponto de falha (Beck e Gobatto, 2013).

Fundamentado à partir do terceiro modelo de regressão linear utilizado por Gobatto et al. (2013) para estimativa individual de carga crítica, os dados foram plotados no Excel e submetidos a análise por regressão linear após cada teste de carga crítica, de modo que os coeficientes lineares e angulares corresponderam à

capacidade de trabalho anaeróbia (CTA) e à intensidade de carga crítica (iCC) expressa em percentual da massa corporal (%MC), respectivamente. No gráfico o eixo Y representa os valores de tempo multiplicado pela carga (T . C) e o eixo X os valores de tempo. Dessa forma foi obtida a equação $Y=A \cdot x + B$ (ver figura 6A) (Gobatto et al., 2013). Para que o teste seja considerado válido, optou-se por aceitar o coeficiente de determinação (R^2) superior à 0,95.

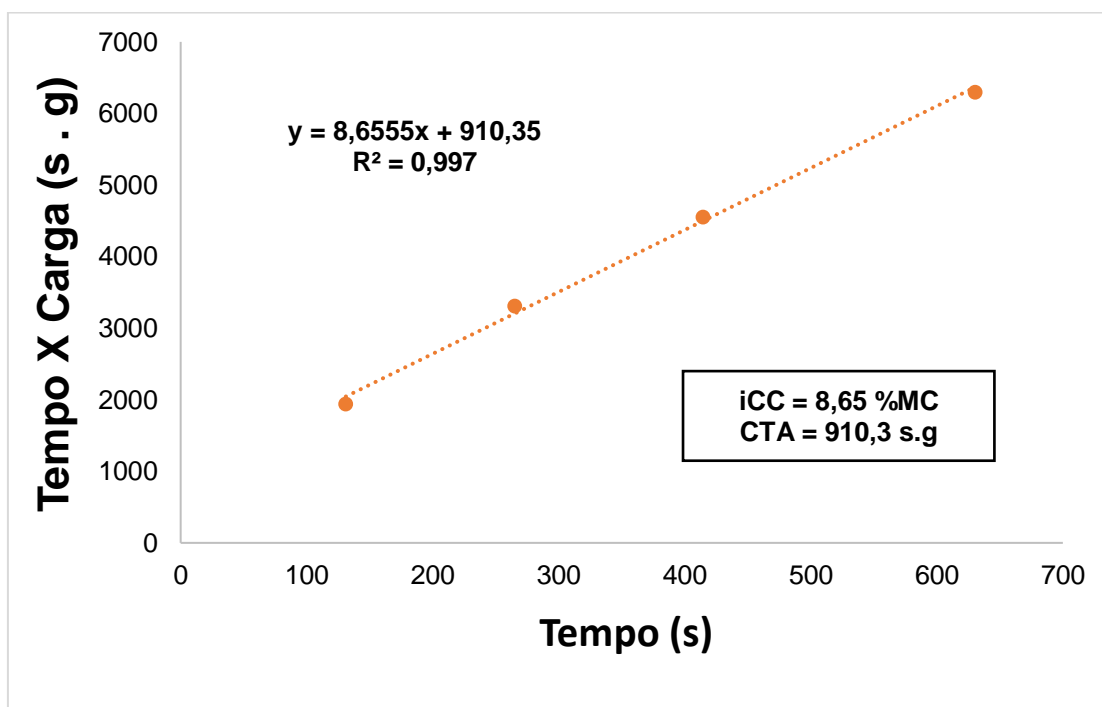


Figura 6A. Gráfico ilustrativo do teste de carga crítica. Nesse exemplo a iCC é correspondente à 8,65 %MC e CTA à 910,3 s.g. %MC: percentual da massa corporal; g: gramas; s: segundos.

O teste foi mensalmente realizado para acompanhamento do nível de capacidade aeróbia e anaeróbia e reajuste da carga de treinamento. Ambos os grupos realizaram natação 5 vezes na semana por 30 minutos diários contínuos com reajuste semanal da carga (ver figura 6B) conforme à massa corporal. O horário de início foi sistematicamente o mesmo em todos os testes e sessões de treinamento físico. Os animais nadaram com intensidade correspondente a 80% do valor de iCC (Ver figura 6A), sendo esse valor em média 5,92 para GE e 6,09 para GOE. O treinamento físico de natação ocorreu em tanques individuais (ver figura 6C e 6D) desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (Faculdade de Ciências Aplicadas – UNICAMP, Limeira/SP). A natação seguiu as orientações da American Physiological Society (Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols), com 80 cm de

profundidade, 30 cm de largura e temperatura da água mantida à $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ por meio de aquecedores (1000 watts) previamente colocados na água até atingir a temperatura ideal, sendo retirados do interior dos tanques no momento de nado dos animais.



Figura 6B. Cargas de chumbo utilizadas para imposição de intensidade de exercício físico na natação.

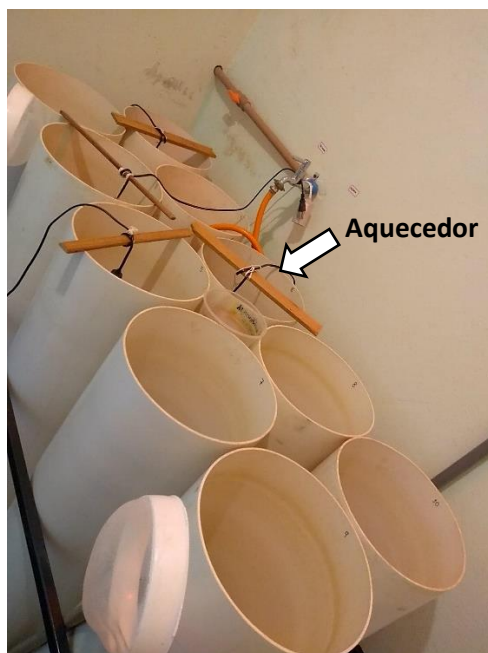


Figura 6C. Tanques de natação e aquecedores.



Figura 6D. Animal executando treinamento.

5. 5 Gravimetria

Todos os animais foram submetidos à análise de gravimetria a cada 15 dias durante as 12 semanas de experimento (ver figura 7A). A calibração do sistema foi realizada semanalmente antes de iniciar a primeira análise gravimétrica da atividade espontânea, com 9 cargas progressivas de 0,198 até 7,938 kg. Os sinais detectados em milivolts (mV) pelo sistema (ver figura 7B) foram relacionados com os pesos das cargas de calibração permitindo que os valores dos sinais fossem captados durante a movimentação dos animais na gaiola, a qual estava sobreposta em uma plataforma de ferro extremamente sensível à movimentação do animal. Esses sinais foram convertidos em unidade de massa (g) por meio da aplicação da equação de calibração originada da regressão linear estabelecidos entre os valores do sinal (mV) e peso (g). O aparato possui a capacidade de fazer a medição do início ao fim da mensuração gravimétrica captando deformações na célula de carga em mV. Este sinal é enviado para um amplificador (MKTC5-10, MK controle e instrumentação), processado por um módulo USB analógico-digital (USB-6001, National Instruments) e finalmente enviado ao computador para registro em ambiente LabView (Signal Express 2009) a 30 Hertz (Hz) durante o tempo necessário de análise (Beck et al., 2016). Para o presente experimento as caixas permaneceram aproximadamente 26 horas no aparato, garantindo assim a gravação de 24 horas necessárias para posterior análise, visto que nos primeiros e últimos minutos tem a influência de fatores externos devido à movimentação no biotério. Foi padronizada a análise de exatas 24 horas por gravação, com início sistemático às 18 horas somente aos finais de semana, visando reduzir ao máximo a influência de pesquisadores no biotério. Ao final do experimento os sinais captados foram tratados usando o MatLab® 7.0 (MathWorks™). O dado apresentado no resultado representa a somatória da atividade física diária. O aparato de gravimetria foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (Faculdade de Ciências Aplicadas – UNICAMP, Limeira/SP).



Figura 7A. A figura ilustra o aparato de gravimetria o qual a gaiola está posicionada sobre a plataforma de ferro para mensuração da atividade física espontânea diária.

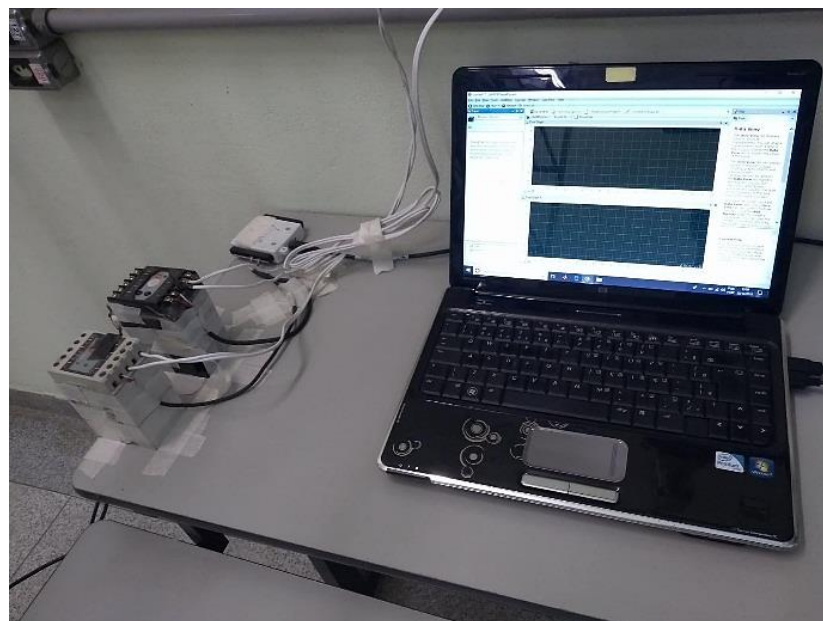


Figura 7B. Equipamentos utilizados para captar, amplificar e processar os sinais analógicos do aparato de gravimetria.

5. 6 Eutanásia e coletas dos materiais biológicos

A eutanásia foi conduzida por meio de decapitação, método este que pode ser usado de acordo com a American Veterinary Medical Association (AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals) para as características dessa pesquisa. Os animais submetidos ao treinamento físico de natação (GE e GOE) foram eutanasiados 48 horas após a última sessão de treinamento físico. Foi obtido de cada animal aproximadamente 3 mililitros (mL) de sangue que repousou por 15 minutos para posterior centrifugação durante 15 minutos a 3000 RPM na temperatura de 10°C. O soro obtido ficou armazenado a -20°C em alíquota de tubo plástico de 100 µL para posterior análise.

O músculo esquelético sóleo direito foi extraído para análise do conteúdo de GLUT4 e FAT CD36 por meio da técnica de imunofluorescência. O sóleo foi cuidadosamente extraído e seccionado em sua origem e inserção, imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido e armazenado em tubo de plástico no freezer -80°C até o momento da preparação da lâmina.

Frações de aproximadamente 150-250 miligramas (mg) de músculo esquelético sóleo esquerdo, gastrocnêmio e glúteo máximo direitos foram extraídas e armazenadas em tubos de ensaio contendo 1 mL de hidróxido de potássio (KOH 30%) para análise de glicogênio. Posteriormente cada amostra foi digerida sob agitação e conservada no freezer -20° C. Para análise de triacilglicerol muscular foram coletados 150-250 mg de tecido muscular gastrocnêmio e glúteo máximo esquerdos, os quais foram diretamente armazenados em tubos de plástico no freezer -20°C.

O tecido adiposo marrom inter-escapular foi extraído para registro da massa total (g).

5. 7 Preparação das lâminas (marcação GLUT4 e FAT CD36)

Para preparação do processamento histológico o músculo esquelético sóleo foi retirado do freezer -80°C e mantido no nitrogênio líquido até o momento da secção. O músculo foi transversalmente seccionado na espessura de 6µm, utilizando Criótomo Leica CM 1850 UV na temperatura de -26°C. Os cortes foram aderidos em lâminas de 24x32 mm e permaneceram armazenados a -20°C até a próxima etapa (ver figura 8A e 8B).



Figura 8A. Criótomo Leica utilizado para os cortes histológicos do músculo esquelético sóleo – Laboratório de imunohistoquímica – Responsável: Prof. Dr. Thiago Russo, UFSCar (São Carlos/SP).

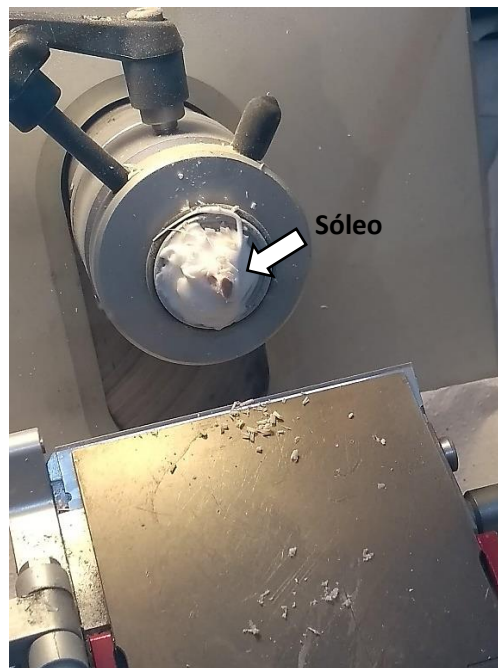


Figura 8B. Sóleo posicionado para corte transversal.

As lâminas foram previamente retiradas do freezer -20° . Na sequência, os cortes aderidos nas lâminas foram incubados por 45 minutos à 37°C utilizando anticorpo primário monoclonal GLUT4 (diluição 1:1600 - IF8 sc 535666) e anticorpo primário monoclonal FAT CD36 (diluição 1:400 - SM ϕ 7309), ambos foram previamente diluídos em PBS BSA 1%. Decorrido o tempo de incubação, as lâminas foram retiradas da estufa e os cortes passaram por 3 ciclos de 5 minutos em solução de PBS para lavagem. Todas as etapas a seguir foram executadas na ausência de luminosidade. Na sequência os cortes foram incubados por 35 minutos à 37°C utilizando anticorpo secundário Alexa 488 IgG¹ para GLUT4 (diluição 1:1000 - code 115-585-075) e Alexa 594 igM para FAT CD36 (diluição 1:1000 - code 115-545-205), ambos previamente diluídos em PBS BSA 1%. Assim como no primeiro momento, após as lâminas serem retiradas da estufa, os cortes receberam 3 ciclos de 5 minutos em solução de PBS. A última etapa consistiu em marcar o núcleo (DAPI) utilizando FluoroQuestTM Mounting Medium. Os anticorpos primários foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology, INC e os anticorpos secundários da Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC.

As lâminas permaneceram no freezer -20°C até estarem adequadas para serem fotografadas (mínimo de 12 horas de “descanso”). Após, cada lâmina foi conduzida para o equipamento ImageXpress Micro, sendo este um sistema automatizado de microscopia epifluorescente de alta resolução (ver figura 8C e 8D). No ImageXpress Micro as lâminas foram fotografadas na lente objetiva de 10x para assim obter imagens padronizadas para poder realizar a quantificação do conteúdo das proteínas desejadas. Utilizamos filtros e comprimentos de onda específicos para poder marcar GLUT4 (FITC - exposição 1200 nm), FAT CD36 (Cy5 – exposição 2500 nm) e os núcleos (DAPI - exposição 800 nm). Para essa etapa padronizamos a escala em 100 µm para todas imagens.



Figura 8C. Lâmina posicionada no suporte do ImageXpress para ser analisada.

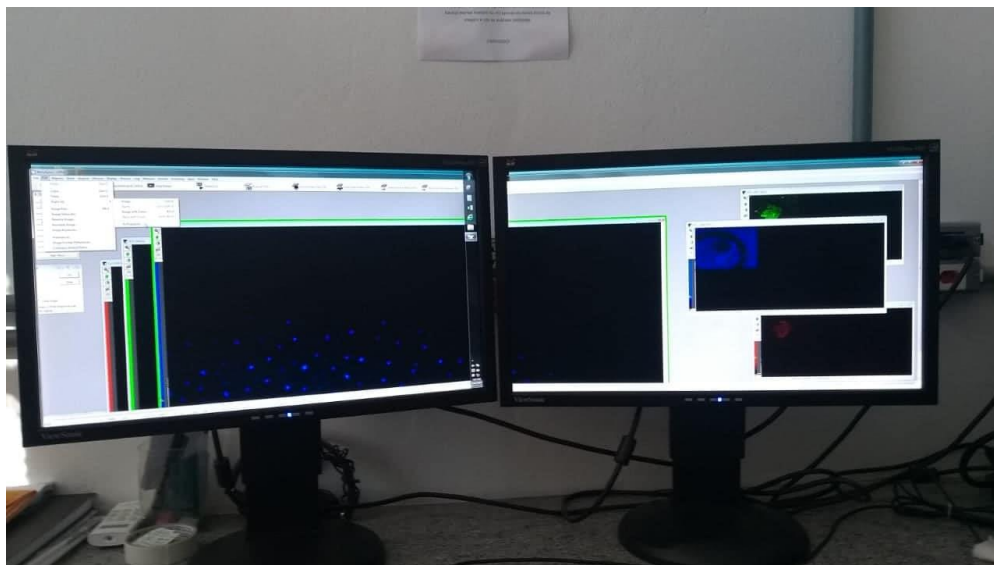


Figura 8D. Imagem ilustrativa das lâminas sendo fotografadas pelo software no ImageXpress - Laboratório de Bioquímica e biologia molecular – Responsável: Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, UFSCar (São Carlos/SP).

5. 8 Quantificação das proteínas GLUT4 e FAT CD36 no sóleo

Foi utilizado o software ImageJ para a quantificação das proteínas no músculo esquelético sóleo. Foi estabelecido um critério de padronização, no qual para cada amostra foi medida a densidade óptica de 5 campos distintos e aleatórios, tanto para FAT CD36 quanto para GLUT4. Os campos selecionados corresponderam à um quadrante de 220 (altura) x 220 (largura). A partir disso foi obtido o valor médio da densidade óptica das proteínas de cada amostra, sendo este o valor utilizado na estatística.

5. 9 Glicogênio

A determinação do glicogênio foi realizada conforme o protocolo de Dubois et al. (1956). Após serem retirados do freezer -20°C , os tubos de ensaio contendo as amostras foram distribuídos em estantes de aço inox e condicionados ao banho-maria à 85°C para complementar a digestão do tecido onde permaneceram por 4 minutos. Posteriormente foram conduzidos ao agitador e retornaram ao banho-maria. Foram acrescentados 0,1 mL de solução saturada de sulfato de sódio (Na_2SO_4) antes de submetidos novamente ao agitador. Após, foram adicionados 3 mL de álcool bidestilado (70%) para posterior retorno ao banho-maria por aproximadamente 1 minuto ou até borbulhar e centrifugação por 5 minutos à 2000 RPM. Feito isso o sobrenadante foi descartado e realizou-se os mesmos passos citados anteriormente

para limpeza do corpo de fundo (“pallet” que contém glicogênio e outras partículas precipitadas). Foi adicionado 1 mL de água destilada quente e na sequência retornou ao agitador. Posteriormente foram adicionados 3 mL de álcool bidestilado 70%, condicionado novamente ao banho-maria e à centrífuga. Após o último descarte do sobrenadante, foram adicionados ao pallet de glicogênio precipitado 5 mL de água destilada quente favorecendo assim a obtenção de uma solução homogênea quando agitada em vórtex.

A absorbância da amostra foi realizada a partir da colorimetria, sendo adicionados 10 uL de fenol + 800 uL de água destilada + 200 uL de volume de diluição final e 2 mL de ácido sulfúrico cuidadosamente. Para finalizar a preparação os tubos foram conduzidos em banho-maria por 5 minutos e agitados. A leitura da absorbância ocorreu em espectrofotômetro marca Hach (Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico) utilizando cubeta de quartzo e comprimento de onda de 490 nm. A técnica foi padronizada no Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (Faculdade de Ciências Aplicadas – UNICAMP, Limeira/SP) e o protocolo encontra-se detalhado no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico (UFSCar, São Carlos/SP).

5. 10 Triacilglicerol muscular

Previamente ao início do protocolo os tecidos foram retirados do freezer. Na sequência, foi adicionado 1 mL de Triton X-100 a 0,1% para cada 200 miligramas de tecido, posteriormente homogeneizados por completo e centrifugados por 10 minutos a 4000 RPM. Foi recolhido 10 µL do sobrenadante de cada amostra e pipetado em microplaca. Seguindo as especificações desse protocolo, cada amostra recebeu 200 µL de reagente advindo do kit comercial de triacilglicerol da empresa LaborLab. A leitura da absorbância foi realizada no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (Responsável: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes – UFSCar, São Carlos/SP) no equipamento SpectraMax M5 (marca Molecular Devices) com comprimento de onda de 505 nm, seguindo as normas do kit.

5. 11 Análise sérica

Para análise de glicose sérica foi utilizado kit comercial (empresa LaborLab) para mensuração da glicemia a partir de espectrofotometria (ver figura 9) seguindo

rigorosamente as recomendações do fabricante. Foram utilizadas apenas amostras sem ciclo anterior de descongelamento e evidências de hemólise.



Figura 9. SpectraMax® i3 (Marca Molecular Devices) - Equipamento utilizado para ler as absorbâncias dos valores séricos à partir de espectrofotometria – Laboratório de Bioquímica e biologia molecular – Responsável: Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, UFSCar (São Carlos/SP).

5. 12 Análises e procedimentos estatísticos

Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão. Foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk permitindo adoção da estatística paramétrica por meio do teste de análise de variância ANOVA fatorial para avaliar os efeitos (F) da ovariectomia (OVX) e treinamento físico (TF), utilizando o *post hoc* de Newman-Keuls quando necessário. Foi estabelecido um nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Massa corporal

Ao longo de 12 semanas OVX resultou em aumento significativo na massa corporal ($F=216,22$; $p<0,01$), enquanto que TF não promoveu diferença significativa ($F=0,40$; $p=0,78$). A média inicial e desvio padrão da massa corporal (gramas) dos animais não submetidos à ovariectomia foi $281,44\pm 20,17$, enquanto que dos animais submetidos ao TF correspondeu a $290,94\pm 30,27$. Contudo, ao final de 12 semanas os animais não ovariectomizados apresentaram média e desvio padrão de $308,26\pm 21,18$, enquanto que os submetidos à ovariectomia finalizaram com média e desvio padrão de $349,70\pm 30,25$ (aumento de 13%).

6.2 Atividade física espontânea

TF promoveu aumento da AFE ($F=19,75$; $p<0,01$), enquanto OVX reduziu ($F=6,67$; $p<0,05$). É possível afirmar que na 2ª semana houve aumento da AFE do GE quando comparado ao GC. Enquanto que na 4ª semana a AFE do GE estava aumentada com relação aos GC e GO.

6.3 Conteúdo de FAT CD36

OVX promoveu redução significativa do conteúdo de FAT CD36 ($F=56,01$; $p<0,01$), enquanto TF promoveu aumento significativo ($F=43,98$; $p<0,01$). A imagem da figura 1 ilustra FAT CD36 em músculo esquelético sóleo e o gráfico representa os valores do conteúdo em média e desvio padrão (ver figura 10).

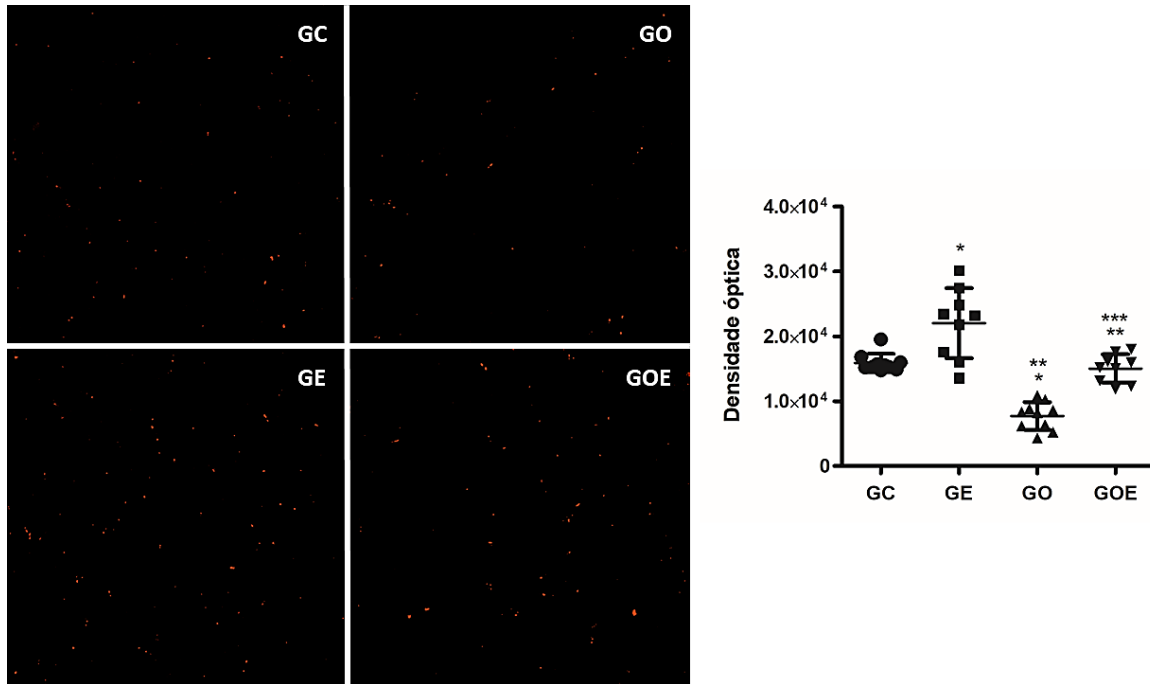


Figura 10. A imagem à esquerda ilustra o conteúdo de FAT CD36 (coloração vermelha) em músculo esquelético sóleo por imunofluorescência. O gráfico representa a média e desvio padrão do conteúdo de FAT CD36 mensurado por densidade óptica. * $p < 0,05$ em relação ao GC; ** $p < 0,05$ em relação ao GE e *** $p < 0,05$ em relação ao GO.

6. 4 Conteúdo de GLUT4

OVX promoveu redução significativa do conteúdo de GLUT4 ($F=23,43$; $p < 0,01$), enquanto TF promoveu aumento significativo ($F=39,28$; $p < 0,01$). A imagem da figura 1 ilustra GLUT4 em músculo esquelético sóleo e o gráfico representa os valores do conteúdo em média e desvio padrão (ver figura 11).

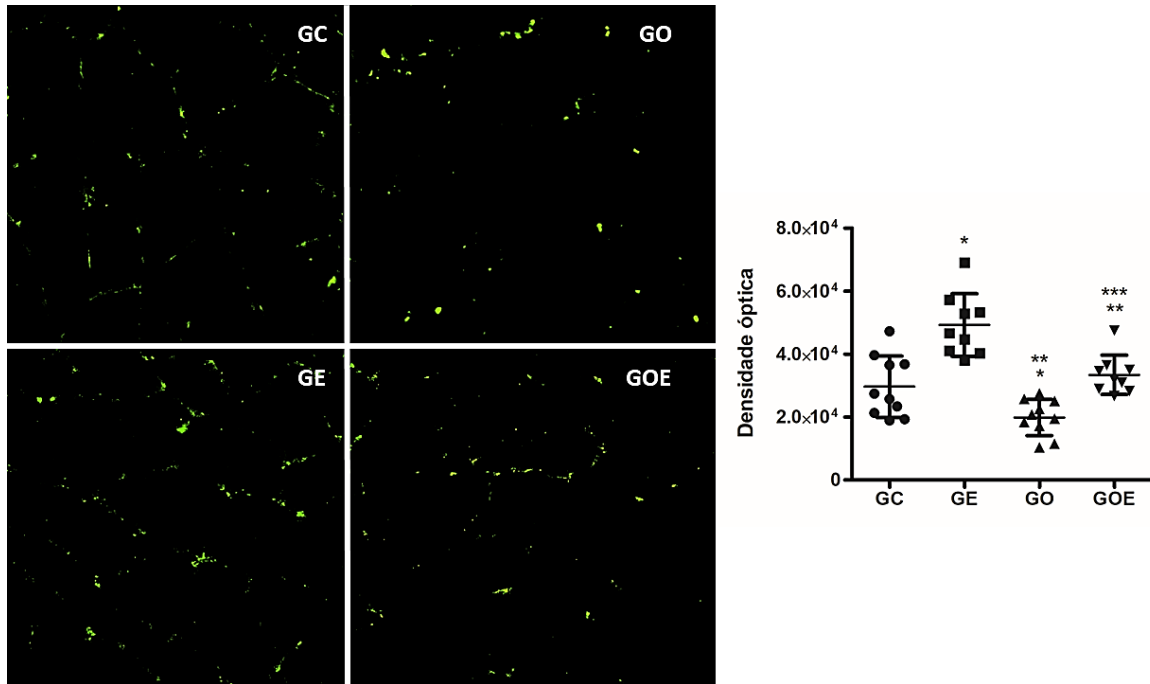


Figura 11. A imagem à esquerda ilustra o conteúdo de GLUT4 (coloração verde) em músculo esquelético sóleo por imunofluorescência. O gráfico representa a média e desvio padrão do conteúdo de GLUT4 mensurado por densidade óptica. * $p < 0,05$ em relação ao GC; ** $p < 0,05$ em relação ao GE e *** $p < 0,05$ em relação ao GO.

Overlay (NÚCLEO/FAT CD36/GLUT4)

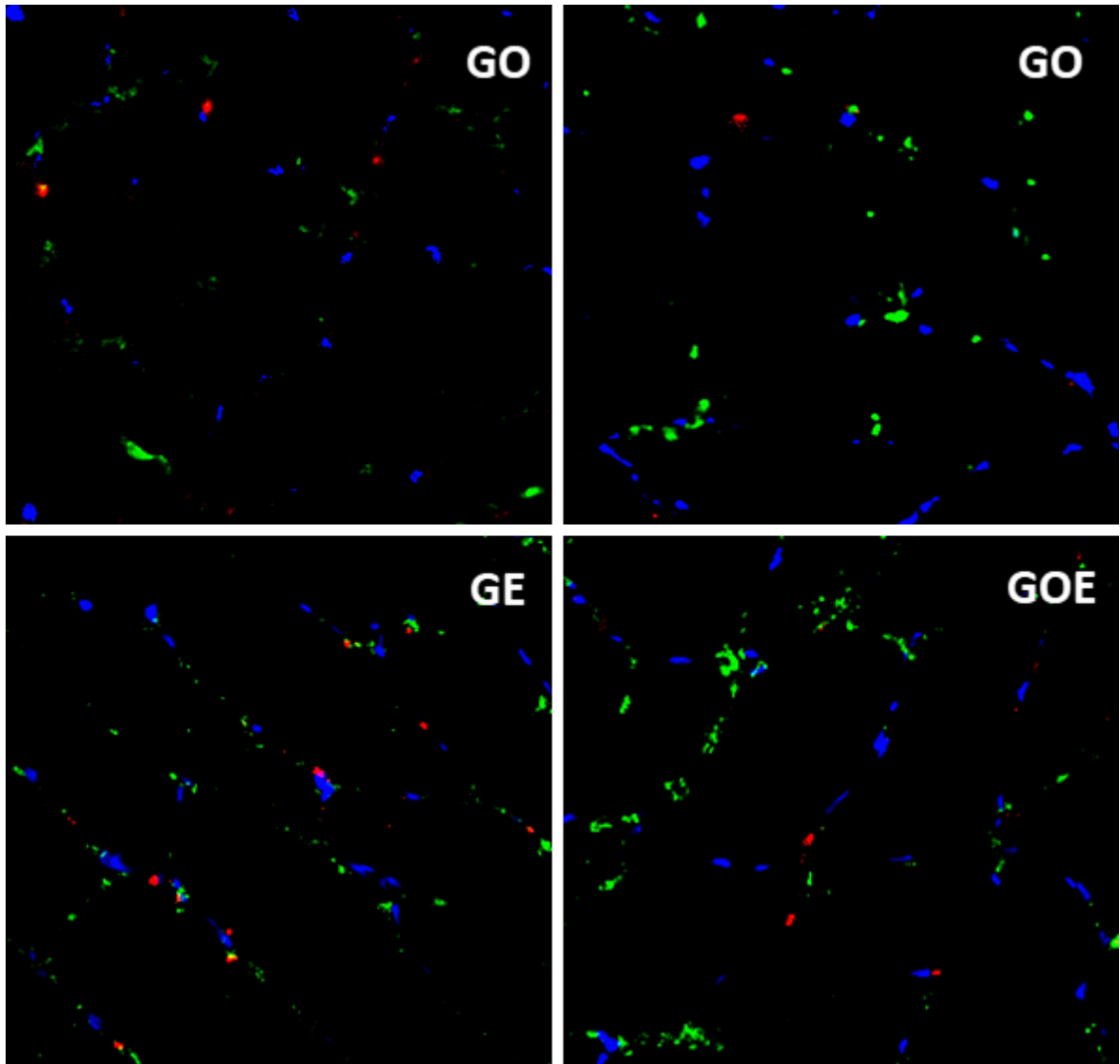


Figura 12. Imagem demonstrativa do conteúdo de FAT CD36 (CY5 – coloração vermelha), GLUT4 (FIT C - coloração verde) e núcleo (DAPI – coloração azul) em músculo sóleo de ratas.

6. 5 Tecido adiposo marrom

TF promoveu aumento significativo da massa absoluta e relativizada da gordura marrom ($F=24,45$; $p<0,01$ e $F=35,63$; $p<0,01$, respectivamente) enquanto que OVX causou redução significativa apenas na gordura marrom relativizada ($F=11,51$; $p<0,01$), sem alteração significativa na massa absoluta da gordura marrom ($F=1,30$; $p=0,26$) (ver figura 13).

Figura 13. Gordura marrom absoluta e relativizada pela massa corporal dos grupos GC, GO, GE, GEO. Valores de média, desvio padrão e post hoc.

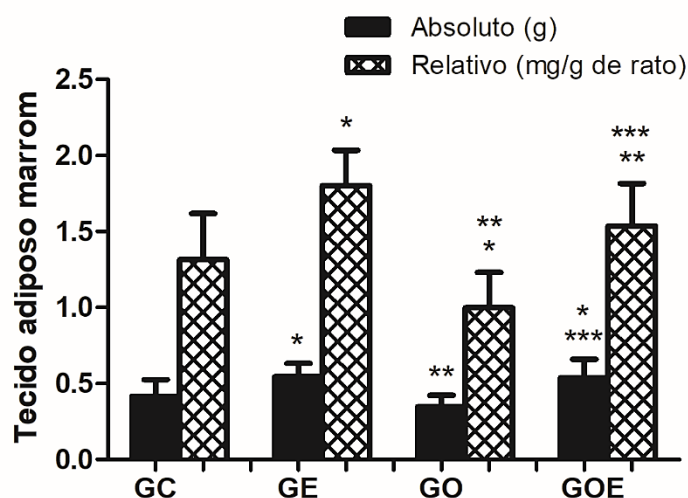


Figura 13. Dados obtidos a partir do registro da massa do tecido adiposo marrom. *valores de $p < 0,05$ em relação ao GC, **valores de $p < 0,05$ em relação ao GO e ***valores de $p < 0,05$ em relação ao GE. mg: miligramas; g: gramas.

6. 6 Glicogênio, triacilglicerol muscular e glicemia

TF promoveu aumento significativo do glicogênio no músculo esquelético sóleo ($F=5,66$; $p < 0,01$), enquanto que OVX não promoveu diferença significativa ($F=1,31$; $p=0,26$). TF e OVX não promoveram diferença significativa no glúteo ($F=3,04$; $p=0,09$ e $F=1,67$; $p=0,20$, respectivamente) e no gastrocnêmio ($F=3,18$; $p=0,08$ e $F=3,91$; $p=0,05$, respectivamente) (ver tabela 1).

TF não promoveu diferença significativa no valor de triacilglicerol muscular do glúteo máximo ($F=1,71$; $p=0,20$) e do gastrocnêmio ($F=2,88$; $p=0,10$). Enquanto que OVX diminuiu significativamente no glúteo máximo ($F=5,27$; $p < 0,05$) porém sem alteração significativa no gastrocnêmio ($F=1,68$; $p=0,20$) (ver tabela 1).

TF diminuiu significativamente a glicemia de repouso ($F=27,66$; $p < 0,01$), enquanto OVX aumentou significativamente ($F=9,57$; $p < 0,01$) (ver tabela 1).

Tabela 1. Glicogênio, triacilglicerol e glicemia dos grupos GC, GO, GE, GEO. Valores expressos em média e desvio padrão.

	GC	GE	GO	GEO
GL Sóleo (mg/100mg)	0,26±0,12	0,35±0,13	0,21±0,06	0,31±0,16
GL Glúteo m. (mg/100mg)	0,28±0,12	0,35±0,14	0,17±0,08	0,31±0,22
GL Gastroc. (mg/100mg)	0,27±0,11	0,32±0,10	0,12±0,08	0,26±0,24
TG Glúteo m. (mg/g)	1,87±0,23	2,02±0,58	1,35±0,47	1,69±0,56
TG Gastroc. (mg/g)	1,47±0,28	1,67±0,34	1,35±0,29	1,52±0,20
Glicemia (mg/dL)	128,49±12,63	110,66±7,22 ¹	137,68±6,94 ²	121,48±6,18 ²³

Tabela 1. Dados obtidos do glicogênio dos músculos sóleo, glúteo máximo e gastrocnêmio, triacilglicerol muscular do glúteo máximo e gastrocnêmio e valores de glicemia. Valores expressos em média e desvio padrão. ¹p<0,05 em relação ao GC; ²p<0,05 em relação ao GE, ³p<0,05 em relação ao GO. GL: glicogênio; Glúteo m.: glúteo máximo; Gastroc.: gastrocnêmio; TG: triacilglicerol muscular; mg: miligramas; g: gramas; dL: decilitros.

7 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi sobre o efeito positivo de 12 semanas de treinamento de natação com intensidade moderada no aumento do conteúdo de GLUT4 e FAT CD36 em músculo esquelético sóleo em ratas ovariectomizadas, impedindo o prejuízo metabólico ocasionado pela ausência de estrógenos ovarianos confirmando nossa hipótese.

No presente estudo, OVX promoveu redução do conteúdo de GLUT4 em músculo esquelético (ME) sóleo ($F=23,43$; $p<0,01$). Dando fundamentação a esse dado, quando comparado com GC, o GO obteve redução de 19,24%, 39,29% e 55,6% no valor de glicogênio em sóleo, glúteo e gastrocnêmio, respectivamente. Em condições fisiológicas os estrógenos estimulam a sensibilidade à insulina auxiliando na homeostase de glicose plasmática (Barros et al., 2006; Gorres, et al., 2011; Inada et al., 2016; Mandrup et al., 2017; Turdi et al., 2015). Segundo Gorres et al. (2011), a ativação por agonista de ER α resulta em captação de glicose por estimular as vias AKT – PAS 160 e AMPK. A ativação de AKT e AMPK condiciona à fosforilação do substrato de AKT (AS160) dando início à translocação de GLUT4 para a membrana plasmática com intuito de captar glicose (Mandrup et al., 2017; Turdi et al., 2015). Por outro lado, antagonista de receptor de estrógenos reduz ativação de AMPK, demonstrando que um dos fatores mediadores dessa proteína é via receptores de estrógenos (Rogers et al., 2009). Portanto, para o presente estudo acreditamos que a ausência de estrógenos ovarianos resultou em menor fosforilação da cascata de sinalização da insulina que possui a finalidade de translocar GLUT4, bem como estimular sua síntese (Dresseno et al., 2018; Mandrup et al., 2017). Corroborando ao nosso estudo, Saengsirisuwan et al. (2009) encontraram redução de GLUT4 após 12 semanas de OVX. Por outro lado, MacDonald et al. (2015), Hansen et al. (1996) e Chen et al. (2017) não encontraram redução significativa de GLUT4 em 4, 6 e 8 semanas após a ovariectomia, respectivamente. Esses achados nos induzem a pensar que a privação da ação dos estrógenos começa a ser prejudicial após determinado tempo, se agravando progressivamente.

Desequilíbrio no metabolismo lipídico é comumente associado com déficit de estrógenos (Kim et al., 2016). Verificamos que após 12 semanas, OVX promoveu redução do conteúdo de FAT CD36 em sóleo ($F=56,01$; $p<0,01$), sendo esta uma das razões pelo qual o grupo GO teve redução do triacilglicerol muscular (TG) em 27,8%

e 8,17% no glúteo máximo e gastrocnêmio, respectivamente, quando comparado ao GC, demonstrando o crucial papel dos transportadores no fornecimento de ácidos graxos (AG) para o ME (Glatz et al., 2018). Em níveis normais de estrógenos, a interação do complexo hormônio e receptor com o DNA nuclear induz a transcrição de genes mitocondriais, dentre eles o coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α) (Ventura-Clapier et al., 2019). Esse coativador é conhecido por promover a biogênese mitocondrial e a beta oxidação, principalmente em fibras musculares esqueléticas do tipo I (Chen et al., 2018; Huang et al., 2017), sendo necessária a translocação de FAT CD36 para possibilitar a entrada de AG para produção de energia (Chen et al., 2018). Em contexto oposto, animais ovariectomizados apresentaram expressão gênica do PGC-1 α reduzida (Barbosa et al., 2016; Cavalcanti-de-Albuquerque et al., 2014), tendo como consequência a redução na capacidade de oxidação lipídica no tecido muscular (Huang et al., 2017). Outro fator envolvido pode ser quanto ao receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR α). A literatura já aborda sobre animais ovariectomizados reduzirem PPAR α , responsável por regular o conteúdo de proteínas que transportam e oxidam AG (Oosthuyse e Bosch, 2012). Portanto, acreditamos que esses foram algumas das vias que influenciaram na redução do conteúdo de FAT CD36.

Um fator comumente associado a ausência dos estrógenos é quanto à redução da atividade física espontânea (AFE) (Sherk et al., 2019). Animais submetidos à OVX tiveram redução da AFE ao longo de 12 semanas (F=6,67; p<0,05), assim como evidenciado por Sherk et al. (2019) 11 semanas após OVX. Não são claramente elucidados os mecanismos centrais e humorais envolvidos nessa relação, mas é conhecido que a orexina, um neuropeptídeo relacionado a AFE, é sintetizado no hipotálamo em regiões que expressam quantidades abundantes de receptor de estrógenos (Federici et al., 2016). Acreditamos que a ausência de estrógenos ovarianos possa ter comprometido a ação do neuropeptídeo em incentivar AFE. A queda de AFE ocasiona menor gasto energético, além de perda de massa muscular por menor frequência de ativação mecânica (Tonkin et al., 2012), podendo ser um fator que interferiu para a redução do conteúdo de FAT CD36 e GLUT4 devido à redução de sinais mecânicos até as vias.

Os resultados sobre a massa do tecido adiposo marrom (TAM) a partir das intervenções contribuíram para consolidar com os demais. Estrógenos atuam por ação

periférica diretamente estimulando a TAM ou à nível central em áreas do hipotálamo. Ambos estímulos resultam em aumento do gasto energético pelo TAM (González-Garcia et al., 2017). Pudemos averiguar que em cenário contrário de restrição de estrógenos ovarianos, GO reduziu em 24% a massa do TAM relativizada pela massa corporal (MC) quando comparado ao GC. Este pode ter sido um dos fatores para que a MC final estivesse aumentada em 13% em relação aos animais que não passaram por ovariectomia, corroborando ao estudo de Ignácio et al. (2012) que demonstrou aumento de MC ao final de 8 semanas pós cirurgia. Redução de AFE também pode interferir no aumento de MC (Proietto et al., 2017) e risco à obesidade (Kotz et al., 2017), possibilitando quadro de síndrome metabólica (Engin, 2017).

Como mencionado anteriormente, a reposição hormonal pode ser eficaz em reverter as consequências da ausência de estrógenos, mas em contrapartida pode gerar efeitos colaterais indesejáveis (Kawakami et al., 2019; MacDonald et al., 2015). Sendo assim, optamos pelo treinamento físico de natação como estratégia de compensar os danos metabólicos provocados pela ovariectomia.

Partindo do conhecimento que o exercício aeróbio é um excelente modulador do perfil metabólico da glicose (Kawakami et al., 2019), verificamos que após 12 semanas de natação, TF aumentou o conteúdo de GLUT4 apesar da ovariectomia ($F=39,28$; $p<0,01$). Esses dados corroboram com os resultados obtidos quanto ao glicogênio, animais GOE tiveram aumento de 47%, 87% e 116% em relação ao GO nos ME sóleo, glúteo máximo e gastrocnêmio respectivamente, demonstrando o papel do exercício físico em elevar a síntese de glicogênio (Mandrup et al., 2017). Uma das explicações é que durante o exercício físico, a contração mecânica aumenta a concentração citosólica de Ca^{2+} calmodulina/CaMK (Ojuka et al., 2002; Funai et al., 2008), além de ativar reguladores importantes como AMPK (Funai et al., 2008), PPAR β e PGC-1 α , resultando em aumento da captação de glicose por elevar a síntese e atividade de GLUT4 (Koh et al., 2019). A sensibilidade periférica da insulina também é melhorada durante a contração muscular, além de induzir a síntese de glicogênio para dar suporte a energia requerida (Mandrup et al., 2017). Portanto, a exposição regular ao exercício físico eleva a concentração de GLUT4, sendo que a capacidade de resposta quanto à entrada de glicose no tecido é equivalente ao seu conteúdo (Holloszy et al., 2011). Todos esses eventos ocorrem para promover adaptações na melhoria da capacidade de realização daquele tipo de treinamento físico, deixando

claro que não existe um único caminho na regulação da atividade e do conteúdo de GLUT4.

Avaliando alguns trabalhos da literatura envolvendo treinamento físico em animais ovariectomizados, observamos que, constância, duração e intensidade de treinamento são determinantes para gerar respostas suficientes sobre a síntese de novos transportadores de glicose em situação adversa de falta de estrógenos. Saengsirisuwan et al. (2009) utilizou corrida durante 60 minutos, 5 dias na semana, com intensidade aumentando progressivamente a partir de 18 m/min até alcançar 27 m/min durante 12 semanas, resultando em aumento de 31% do GLUT4. Hansen et al. (1996) aplicou 6 horas de natação intervalada, 6 dias na semana por 5 semanas e encontrou aumento de GLUT4 em 40,4%. Chen et al. (2017) utilizou protocolo de corrida com duração de 60 minutos, 5 dias na semana, com intensidade aumentando progressivamente a partir de 12m/min até alcançar 16m/min durante 8 semanas e verificou aumento de GLUT4 apenas quando administrado glucosamina. Enquanto que, MacDonald et al. (2015) não encontrou alteração significativa quanto ao GLUT4 ao treinar os animais 60 minutos, 5 dias na semana, com intensidade entre 10-20 m/min durante 4 semanas. Parte dos achados indicam que o efeito do TF é predominante ao do OVX sobre a regulação do conteúdo de GLUT4. Contudo, nosso estudo apresenta diversas vantagens como ter utilizado protocolo individualizado, com intensidade moderada e tempo de duração facilmente suportado, tornando-o sem restrições à população em geral.

Quanto ao FAT CD 36, TF também promoveu aumento de seu conteúdo ($F=43,98$; $p<0,01$), fator crucial no fornecimento de substrato no ME para que a mitocôndria produza energia a partir de beta oxidação (Bonen et al., 2007; Glatz et al., 2016; Lombardi et al., 2012). Esse dado ficou consistente ao verificarmos que GOE teve aumento do triacilglicerol muscular (TG) em 25% no ME glúteo máximo e 12,5% em gastrocnêmio quando comparado ao GO. A contração muscular promove translocação de FAT CD36 via AMPK (Glatz et al., 2016; Glatz et al., 2018) e via CaMK responsável por ativar PGC-1 α (Wackerhage, 2014), fator importante na *upregulation* do FAT CD36 (Cheng et al., 2018). Ainda, a ativação de PGC-1 α interage com PPAR β culminando em aumento da capacidade oxidativa de AG (Huang et al., 2017). Considerando que aplicamos exercício aeróbio, podemos dizer que houve adaptação molecular em melhorar a oferta de AG para a célula muscular produzir energia

(Holloway et al., 2006; Inaka et al., 2019), resultando em recuperação do conteúdo de FAT CD36 e TG em animais submetidos à ovariectomia. Esse resultado nos permite concluir que as consequências da falta de estrógenos podem ser recompensadas pela ação do treinamento físico. Ainda é escasso na literatura estudos envolvendo efeito treinamento físico e ovariectomia sobre FAT CD36, limitando nossas comparações. Kim et al. (2016) submeteu animais ovariectomizados ao treinamento de corrida 5 vezes na semana durante 8 semanas. Sendo que no período entre a 1ª e 4ª semana foram sessões de 30 minutos/dia na intensidade de 15 m/min e da 5ª a 8ª semana sessões de 40 minutos/dia na intensidade de 18 m/min. Os autores verificaram diferença sutil quanto ao aumento da expressão de FAT CD36, porém não foi significativa.

Outro parâmetro influenciado pelo TF foi o aumento de AFE ($F=19,75$; $p<0,01$), um fator chave no balanço energético (Kotz et al., 2017). Quando consideramos a soma das 12 semanas de experimento, verificamos que GE tornou-se 38,8% mais ativo que GC, enquanto que GOE elevou em 10,1% a AFE em relação ao GO. A redução da AFE observada a partir da 8ª semana em todos os grupos corrobora com Sherk et al. (2019) relataram redução da AFE em grupos ovariectomizados, bem como dos exercitados ao final do experimento. Segundo Scariot et al (2016), essa similaridade da queda de AFE ocorre devido ao confinamento dos animais em gaiolas que impossibilitam a locomoção e a atividade de um espaço livre. Ou seja, o confinamento é um fator limitante porque pode induzir ao sedentarismo, principalmente em estudos a longo prazo.

Quando submetemos os animais ovariectomizados ao treinamento aeróbio de natação, verificamos aumento do TAM relativizado pela MC em 54,5% do GOE quando comparado ao GO. Elevação do gasto energético e produção de calor são respostas geradas pela prática de exercício físico, podendo promover alterações na massa do TAM (Lehnig e Standorf, 2018), sendo benéfico no consumo de AG e glicose circulante (Don et al., 2018). Este pode ter sido um dos fatores para que o treinamento aeróbio tenha reduzido a glicemia de GOE em 11,7% quando comparada ao GO.

A partir das similaridades verificadas nos parâmetros metabólicos de animais GC e GOE ($p>0,05$), pudemos demonstrar a efetividade do TF em preservar a homeostase metabólica apesar do efeito negativo da ovariectomia. Esses achados

nos permitem dizer que o TF é um excelente tratamento não farmacológico nesse contexto, possibilitando que animais OVX apresentem respostas metabólicas semelhantes aos animais com níveis fisiológicos de estrógenos, desde que treinados sob prescrição sistemática. Tal circunstância é extremamente favorável na prevenção de quadros de doenças metabólicas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados, podemos afirmar que a ausência de estrógenos ovarianos afeta a homeostase energética em uma rede de fatores que se relacionam, sendo amplamente conhecidos por favorecer o surgimento de doenças metabólicas. Ao longo de 12 semanas a ovariectomia promoveu redução do conteúdo de GLUT4 e FAT CD36, culminando em menor reserva energética muscular como demonstrado nos valores de glicogênio e triacilglicerol muscular. Verificamos redução da atividade física espontânea e da massa do tecido adiposo marrom, fatores que possivelmente contribuíram para aumento da massa corporal devido à redução do gasto energético diário. Contudo, ao inserimos a natação de intensidade moderada, o protocolo de 30 minutos/dia por 12 semanas foi eficiente em anular as consequências negativas provocadas pela ovariectomia, visto o efeito positivo da contração muscular em promover remodelamentos estruturais no metabolismo lipídico e glicolítico do ME. Todos esses resultados nos induzem a pensar que, a aplicação do TF quando executada metodicamente e atenta aos cuidados de ajustes de carga, fazem desse método um excelente substituto da reposição hormonal de estrógenos sob ponto de vista metabólico, sendo ainda mais vantajoso por não acarretar efeitos colaterais indesejados. Além disso, nosso protocolo de TF é absolutamente plausível de execução considerando seu domínio de intensidade de esforço, podendo ser indicado à praticamente toda população ocasionando benefícios na homeostase energética, bem como melhorando o funcionamento de todo o sistema fisiológico.

9 REFERÊNCIAS

- ABREU, P. et al. Adaptação do músculo esquelético ao exercício físico: considerações moleculares e energéticas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 23, n. 1, p. 60-65, 2017.
- AHMAD, N. et al. MicroRNA-672-5p identified during weaning reverses osteopenia and sarcopenia in ovariectomized mice. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 14, p. 536-549, 2019.
- AIRES, M. M. et al. **Fisiologia**. 4 Ed. Guanabara Koogan, 2012.
- American Veterinary Medical Association. **AVMA Guidelines on Euthanasia**. AVMA, Schaumber, Illinois, 2013.
- APS. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. **American Physiological Society**. 137, 2006.
- ARNAL, J. et al. Membrane and nuclear estrogen receptor alpha actions: from tissue specificity to medical implications. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 3, p. 1045-1087, 2017.
- BARBOSA, M. R. et al. Resistance training and ovariectomy: Antagonic effects in mitochondrial biogenesis markers in rat skeletal muscle. **International journal of sports medicine**, v. 37, n. 11, p. 841-848, 2016.
- BARBOSA, M. A. et al. Physical training improves thermogenesis and insulin pathway, and induces remodeling in white and brown adipose tissues. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 74, n. 3, p. 441-454, 2018.
- BARROS, R. P. et al. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ER β and ER α . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1605-1608, 2006.
- BECK, W.; GOBATTO, C. Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 100, n. 4, p. 427-434, 2013.
- BONEN, A. et al. Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 2, p. 245-249, 2004.
- BOSMA, M. Lipid homeostasis in exercise. **Drug discovery today**, v. 19, n. 7, p. 1019-1023, 2014.
- BOTOGOSKI, S. R. et al. Os Benefícios do exercício físico para mulheres após a menopausa. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 54, n. 1, p. 18-23, 2018.
- BRAECKMAN, B. et al. Intermediary metabolism. In: **WormBook**. Wormbook. org, 2009.
- CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE, J. P. A. et al. Role of estrogen on skeletal muscle mitochondrial function in ovariectomized rats: a time course study in different fiber types. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 7, p. 779-789, 2014.

- CHEN, C. H. et al. Exercise training ameliorates glucosamine-induced insulin resistance in ovariectomized rats. **Menopause**, v. 24, n. 6, p. 617-623, 2017.
- CHENG, C. F. et al. PGC-1 α as a pivotal factor in lipid and metabolic regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, p. 3447, 2018.
- CIVITARESE, A. E. et al. Glucose ingestion during exercise blunts exercise-induced gene expression of skeletal muscle fat oxidative genes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 6, p. E1023-E1029, 2005.
- CUI, J. et al. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. **Trends in molecular medicine**, v. 19, n. 3, p. 197-209, 2013.
- CRUZ, N. A. E. et al. Acute Administration of Tibolone Prevents Oxidative Stress in Ovariectomized Rats Fed High-Fat-and-Fructose Diet. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 127, n. 06, p. 396-404, 2018.
- DE CARVALHO, F. P. et al. Voluntary running decreases nonexercise activity in lean and diet-induced obese mice. **Physiology & behavior**, v. 165, p. 249-256, 2016.
- DRESSENO, L. P. et al. Impact of flaxseed and soy nuts as dietary supplements on lipid profile, insulin sensitivity, and GLUT4 expression in ovariectomized rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 43, n. 12, p. 1282-1287, 2018.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ENGİN, Atilla. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. In: **Obesity and Lipotoxicity**. Springer, Cham. p. 1-17, 2017.
- FAUDE, O. et al. Lactate threshold concepts. **Sports medicine**, v. 39, n. 6, p. 469-490, 2009.
- FAULDS, M. H. et al. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. **Journal of Endocrinology**, v. 212, n. 1, p. 3-12, 2012.
- FEDERICI, L. M. et al. Hypothalamic orexin's role in exacerbated cutaneous vasodilation responses to an anxiogenic stimulus in a surgical menopause model. **Psychoneuroendocrinology**, v. 65, p. 127-137, 2016.
- FIGUEIRA, T. R. et al. Efeito do treinamento aeróbico sobre o conteúdo muscular de triglicérides e glicogênio em ratos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 15, n. 2, p. 55-62, 2008.
- FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.
- FOSCHINI, D. et al. Relationship between physical exercise, muscle damage and delayed-onset muscle soreness. **Brazilian Journal of Kinanthropometry and Human Performance**, v. 9, n. 1, p. 101-106, 2007.
- FRANCISCHI, R. P. et al. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 15, n. 2, p. 117-140, 2017.

- FRANK, A. P. et al. Do estrogens enhance activation of brown and beige of adipose tissues?. **Physiology & behavior**, v. 187, p. 24-31, 2018.
- FUNAI, K.; CARTEE, G. D. Contraction-stimulated glucose transport in rat skeletal muscle is sustained despite reversal of increased PAS-phosphorylation of AS160 and TBC1D1. **Journal of applied physiology**, v. 105, n. 6, p. 1788-1795, 2008.
- GAMBACCIANI, M.; LEVANCINI, M. Hormone replacement therapy and the prevention of postmenopausal osteoporosis. **Przegląd menopauzalny= Menopause review**, v. 13, n. 4, p. 213, 2014.
- GLATZ, J. F. C. Et al. From fat to FAT (CD36/SR-B2): understanding the regulation of cellular fatty acid uptake. **Biochimie**, v. 136, p. 21-26, 2017.
- GLATZ, J. F. C. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. **Journal of lipid research**, v. 59, n. 7, p. 1084-1093, 2018.
- GOBATTO, C. A. et al. Critical load estimation in young swimming rats using hyperbolic and linear models. **Comparative Exercise Physiology**, v. 9, n. 2, p. 85-91, 2013.
- GONZÁLEZ-GARCÍA, I. et al. Estradiol Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis. In: **Sex and Gender Factors Affecting Metabolic Homeostasis, Diabetes and Obesity**. Springer, Cham, p. 315-335, 2017.
- GORRES, B. K. et al. In vivo stimulation of oestrogen receptor α increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake. **The Journal of physiology**, v. 589, n. 8, p. 2041-2054, 2011.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiología médica**. 12 ed. Elsevier, 2011.
- HANSEN, P. A. et al. Effects of ovariectomy and exercise training on muscle GLUT-4 content and glucose metabolism in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 80, n. 5, p. 1605-1611, 1996.
- HEARRIS, M. et al. Regulation of muscle glycogen metabolism during exercise: implications for endurance performance and training adaptations. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 298, 2018.
- HOLLOSZY, J. O. Regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 expression by exercise. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 2, p. 921-940, 2011.
- HOLLOWAY, G. P. et al. Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise. **The Journal of physiology**, v. 571, n. 1, p. 201-210, 2006.
- HONG, S. C. et al. Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women. **Menopause**, v. 14, n. 5, p. 835-840, 2007.
- HUANG, T. Y. et al. Overexpression of PGC-1 α increases peroxisomal activity and mitochondrial fatty acid oxidation in human primary myotubes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 312, n. 4, p. E253-E263, 2017.

- HUSS, J. M. et al. Estrogen-related receptor α directs peroxisome proliferator-activated receptor α signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 20, p. 9079-9091, 2004.
- IGNACIO, D. L. et al. Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 3, p. 310-7, 2009.
- IGNACIO, D. L. et al. Blunted response of pituitary type 1 and brown adipose tissue type 2 deiodinases to swimming training in ovariectomized rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n. 11, p. 797-803, 2012.
- INADA, A. et al. Effects of 17β -estradiol and androgen on glucose metabolism in skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 157, n. 12, p. 4691-4705, 2016.
- IKEDA, K. et al. Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 191, p. 105375, 2019.
- JACKSON, K. C. et al. Ectopic lipid deposition and the metabolic profile of skeletal muscle in ovariectomized mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 3, p. R206-R217, 2013.
- JAMESON, J. L. **Harrison's Endocrinology**. 4 Ed. Mc Graw Hill Education, 2017.
- JESSEN, N. et al. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 1, p. 330-337, 2005.
- KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and mineral**, v. 15, n. 3, p. 175-191, 1991.
- KAWAKAMI, M. et al. Endurance running exercise is an effective alternative to estradiol replacement for restoring hyperglycemia through TBC1D1/GLUT4 pathway in skeletal muscle of ovariectomized rats. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 69, n. 6, p. 1029-1040, 2019.
- KIM, J. H. et al. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. **Endocrine journal**, v. 61, n. 11, p. 1055-1067, 2014.
- KIM, J. K. et al. The effect of pueraria lobata/rehmannia glutinosa and exercise on fatty acid transporters expression in ovariectomized rats skeletal muscles. **Journal of exercise nutrition & biochemistry**, v. 20, n. 3, p. 32, 2016.
- KINDERMANN, W. et al. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 42, n. 1, p. 25-34, 1979.
- KOH, J. H. et al. AMPK and PPAR β positive feedback loop regulates endurance exercise training-mediated GLUT4 expression in skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 316, n. 5, p. E931-E939, 2019.
- KOTZ, C. M. et al. Spontaneous physical activity defends against obesity. **Current obesity reports**, v. 6, n. 4, p. 362-370, 2017.

- LEHNIG, A. C.; STANFORD, K. I. Exercise-induced adaptations to white and brown adipose tissue. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 1, p. jeb161570, 2018.
- LIAO, T. L. et al. Estrogen receptor- β in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis. **Annals of the New York Academy of sciences**, v. 1350, n. 1, p. 52-60, 2015.
- LIMA, A. A. de et al. Two water environment adaptation models enhance motor behavior and improve the success of the lactate minimum test in swimming rats. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 23, n. SPE, 2017.
- LOMBARDI, A. et al. Responses of skeletal muscle lipid metabolism in rat gastrocnemius to hypothyroidism and iodothyronine administration: a putative role for FAT/CD36. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 10, p. E1222-E1233, 2012.
- MCARDLE, W. D. et al. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. **Journal of Applied Physiology**, v. 21, n. 4, p. 1431-1434, 1966.
- MACDONALD, T. L. et al. Exercise training is an effective alternative to estrogen supplementation for improving glucose homeostasis in ovariectomized rats. **Physiological reports**, v. 3, n. 11, p. e12617, 2015.
- MANDRUP, C. M. et al. Effects of high-intensity training on cardiovascular risk factors in premenopausal and postmenopausal women. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 216, n. 4, p. 384. e1-384. e11, 2017.
- MARZETTI, E. et al. Sarcopenia: an overview. **Aging clinical and experimental research**, v. 29, n. 1, p. 11-17, 2017.
- MAUGHAN, R. et al. **Bioquímica do Exercício e Treinamento**. 1 ed. Manole, 2000.
- MAUVAIS-JARVIS, F. et al. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocrine reviews**, v. 34, n. 3, p. 309-338, 2013.
- MEIRELLES, R. M. R. et al. Menopausa e síndrome metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 58, n. 2, p. 91-6, 2014.
- MELMED S. et al. **Williams Textbook of Endocrinology**. 13 Ed. Elsevier, 2016.
- MONOD, H.; SCHERRER, J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics**, v. 8, n. 3, p. 329-338, 1965.
- MONTEIRO, M. F.. et al. Exercício físico e o controle da pressão arterial. **Rev. bras. med. esporte**, v. 10, n. 6, p. 513-519, 2004.
- SEVERI, MTM. et al. The estrogen effect on glycogen reserves of denervated skeletal muscles of female rats. **Publicação Oficial Da Associação Brasileira De Pesquisa E Pós-Graduação Em Fisioterapia**, p. 13, 2007.
- NAKAMURA, T. et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor α and induction of Fas ligand in osteoclasts. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 811-823, 2007.
- OJUKA, E. O. et al. Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca²⁺. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 282, n. 5, p. E1008-E1013, 2002.

OOSTHUYSE, T.; BOSCH, A. N. Oestrogen's regulation of fat metabolism during exercise and gender specific effects. **Current opinion in pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 363-371, 2012.

OLATUNJI, L. A. et al. Ameliorative effect of low-dose spironolactone on obesity and insulin resistance is through replenishment of estrogen in ovariectomized rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 97, n. 1, p. 65-74, 2019.

PALLOTTINI, V. et al. Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 8, n. 1, p. 52-60, 2008.

PARAVIDINO, V. B. et al. Effect of physical exercise on spontaneous physical activity energy expenditure and energy intake in overweight adults (the EFECT study): a study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 19, n. 1, p. 167, 2018.

PÉREZ-CREMADES, D. et al. Role of miRNA in the Regulatory Mechanisms of Estrogens in Cardiovascular Ageing. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

PROIETTO, J. et al. Obesity and weight management at menopause. **Australian family physician**, v. 46, n. 6, p. 368, 2017.

RIBAS, V. et al. Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ER α -deficient mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 2, p. E304-E319, 2010.

ROMERO, C. E. M. et al. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, n.1, p. 85-91, 2006.

ROGERS, N H. et al. Estradiol stimulates Akt, AMP-activated protein kinase (AMPK) and TBC1D1/4, but not glucose uptake in rat soleus. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 382, n. 4, p. 646-650, 2009.

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.

SALADIN, K. S. et al. **Anatomy & Physiology. The Unity of Form and Function**. 8 ed. Mc Graw Hill Education, 2018.

SCARIOT, P. P. M. Determinação da atividade espontânea de ratos por gravimetria e relações com a capacidade aeróbia e expressão gênica de MCTs 1 e 4: efeitos da idade e do treinamento físico. 2014. 129p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição e do Esporte Metabolismo) – Faculdade de Ciências Aplicadas, Limeira, 2014.

SHARMA, G. et al. Roles of G protein-coupled estrogen receptor GPER in metabolic regulation. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 176, p. 31-37, 2018.

SHERK, V. D. et al. Impact of Exercise and Activity on Weight Regain and Musculoskeletal Health PostOVX. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 2019, n.12, 2465-2473, 2019.

- SIQUEIRA, R. A influência do estrogênio na hipertensão arterial pulmonar: papel do estresse oxidativo. 2011.
- SOUZA JR, T. P.; PEREIRA, B. Metabolismo celular e exercício físico. Aspectos bioquímicos e nutricionais. Ed. Phorte, 2004.
- STEFANSKA, A. et al. Metabolic syndrome and menopause: pathophysiology, clinical and diagnostic significance. In: **Advances in clinical chemistry**. Elsevier, v. 72, p. 1-75, 2015.
- SUEN V. M. M. et al. Determinação do metabolismo energético no homem. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 31, p. 13-21, 1998.
- TESKE, J. A. et al. Neuropeptidergic mediators of spontaneous physical activity and non-exercise activity thermogenesis. **Neuroendocrinology**, v. 87, n. 2, p. 71-90, 2008.
- TONKIN, J. et al. SIRT1 signaling as potential modulator of skeletal muscle diseases. **Current opinion in pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 372-376, 2012.
- TUAZON, M. A. et al. Effects of ovariectomy and exercise training intensity on energy substrate and hepatic lipid metabolism, and spontaneous physical activity in mice. **Metabolism**, v. 83, p. 234-244, 2018.
- TURDI, S. et al. 17- β estradiol attenuates ovariectomy-induced changes in cardiomyocyte contractile function via activation of AMP-activated protein kinase. **Toxicology letters**, v. 232, n. 1, p. 253-262, 2015.
- VENTURA-CLAPIER, R. et al. Estrogens, estrogen receptors effects on cardiac and skeletal muscle mitochondria. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 557, 2019.
- VISTISEN, B. et al. Sarcolemmal FAT/CD36 in human skeletal muscle colocalizes with caveolin-3 and is more abundant in type 1 than in type 2 fibers. **Journal of lipid research**, v. 45, n. 4, p. 603-609, 2004.
- YAMAMOTO, H. H. et al. Síndrome metabólica na após a menopausa: prevalência da hipertensão arterial em mulheres com sobrepeso e obesidade/Metabolic syndrome after menopausal: prevalence of hypertension in overweight and obesity women. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 62, n. 1, p. 1-6, 2018.
- ZAGATTO, A. M. et al. Avaliação da capacidade aeróbia determinada por respostas sanguíneas e ventilatórias em quatro diferentes ergômetros. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v. 15, n. 3, p. 350-360, 2013.
- ZARROW M. X. et al. **Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques**. Academic press. New York and London, 1964.
- WACKERHAGE, H. **Molecular exercise physiology, an introduction**. 1 ed. London and New York, 2014.
- WANG, Y.; XU, D. Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 132, 2017.
- WENDE, A. R. et al. A role for the transcriptional coactivator PGC-1 α in muscle refueling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 50, p. 36642-36651, 2007.

WIJK, A. et al. Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. **Histochemistry and cell biology**, v. 131, n. 2, p. 181, 2009.

10 ANEXOS

10.1 Certificado CEUA

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "RESTRIÇÃO ALIMENTAR NO TRATAMENTO DO GANHO PONDERAL EM RATAS OVARIETOMIZADAS: REFLEXO SOBRE OS TECIDOS ÓSSEO E ADIPOSEO", protocolada sob o CEUA nº 1556060417, sob a responsabilidade de **Wladimir Rafael Beck** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 23/05/2017.

We certify that the proposal "FOOD RESTRICTION ON THE TREATMENT OF PONDERAL GAIN IN OVARIECTOMIZED RAT: EFFECTS ON BONE AND ADIPOSEOUS TISSUES", utilizing 60 Heterogenics rats (60 females), protocol number CEUA 1556060417, under the responsibility of **Wladimir Rafael Beck** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 05/23/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2017** a **12/2018**

Área: **Centro de Ciências Biológicas E da Saúde**

Origem: **Biotério Central da UFSCAR**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **40 a 45 dias**

N: **60**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **120 a 150 g**

Resumo: A menopausa corresponde ao fenômeno de cessação dos períodos menstruais, capaz de promover diversas alterações fisiológicas no organismo, principalmente devido à diminuição na produção de hormônios sexuais ovarianos. Dentre as consequências comuns, vê-se o ganho ponderal e déficit em parâmetros ósseos conduzindo a osteopenia e osteoporose. Sob a finalidade de evitar o ganho ponderal ou reduzir a massa corporal, a restrição alimentar tem sido empregada como estratégia não farmacológica. Para a investigação dessa intervenção, o modelo animal vem sendo largamente utilizado, mimetizando menopausa por meio da ovariectomia e possibilitando importantes aprofundamentos nos conhecimentos sobre o tema. Apesar de a literatura apresentar informações importantes a respeito das consequências da restrição alimentar ou da ovariectomia sobre o tecido ósseo e gorduroso, não se conhece adequadamente as consequências da associação desses efeitos, ou seja, da restrição alimentar em ratas ovariectomizadas sobre o tecido ósseo e adiposo. Dessa forma, o objetivo do presente estudo será investigar as consequências da restrição alimentar em ratas ovariectomizadas sobre os tecidos adiposos e ósseo. Quatro grupos de ratas Wistar albinas deverão ser compostos para o estudo dos efeitos da ovariectomia e restrição alimentar. Os animais serão submetidos a ovariectomia, ou simulação, aos 55 dias de idade. Aos 60 dias de idade será iniciada a dieta de restrição alimentar de 30%, por um período de 8 semanas. A partir do procedimento cirúrgico, serão conduzidas avaliações semanais da ingestão hídrica e alimentar por gaiola, além da massa corporal individual dos animais. Após a eutanásia, análises biométricas, biomecânicas e físicas do fêmur serão conduzidas, assim como registro das quantidades de tecido adiposo peritoneal, subcutâneo e marrom. Os resultados deverão ser tratados por meio de testes estatísticos sob nível de significância de 5%.

Local do experimento: **Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina / Departamento de Ciências Fisiológicas**

São Carlos, 23 de maio de 2017

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

10. 2 Tabela nutricional (ração roedores)

TABELA NUTRICIONAL

Umidade	13%
Proteína Bruta	23%
Extrato Etéreo	4,5%
Matéria Mineral	10%
Fibra Bruta	5%
Cálcio (Mín.)	12g/kg
Cálcio (Máx.)	13g/kg
Fósforo (Mín.)	8,5g/kg
Sódio (Mín.)	0,27%
Lisina (Mín.)	12,5g/kg
Metionina (Mín.)	25,5g/kg