

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

MATEUS MORAES DOMINGOS

**EFEITOS DA OVARIECTOMIA, DO TREINAMENTO RESISTIDO E DA
TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE MARCADORES DA BIOGÊNESE MITOCONDRIAL EM
CÉREBRO DE RATAS**

**SÃO CARLOS – SP
2015**

**EFEITOS DA OVARIECTOMIA, DO TREINAMENTO RESISTIDO E DA
TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE MARCADORES DA BIOGÊNESE MITOCONDRIAL EM
CÉREBRO DE RATAS**

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

**EFEITOS DA OVARECTOMIA, DO TREINAMENTO RESISTIDO E DA
TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE MARCADORES DA BIOGÊNESE MITOCONDRIAL EM
CÉREBRO DE RATAS**

Mateus Moraes Domingos

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas de Associação Ampla entre a Universidade Federal de São Carlos e a Universidade Estadual Paulista – Araraquara, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas. Área de concentração: Fisiologia do Exercício. Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez.

**SÃO CARLOS
2015**

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

D671eo Domingos, Mateus Moraes.
Efeitos da ovariectomia, do treinamento resistido e da terapia de reposição hormonal sobre a expressão gênica de marcadores da biogênese mitocondrial em cérebro de ratas / Mateus Moraes Domingos. -- São Carlos : UFSCar, 2015. 87 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

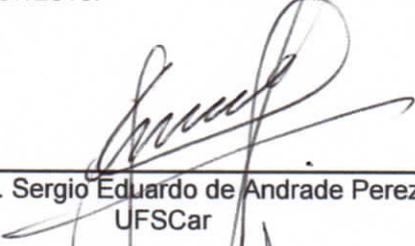
1. Fisiologia. 2. Ovariectomia. 3. Treinamento resistido. 4. Terapia de reposição hormonal. 5. Cérebro. 6. Biogênese mitocondrial. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

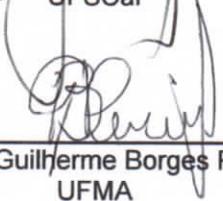


Folha de Aprovação

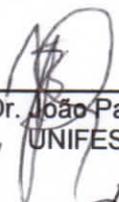
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Mateus Moraes Domingos, realizada em 15/07/2015:



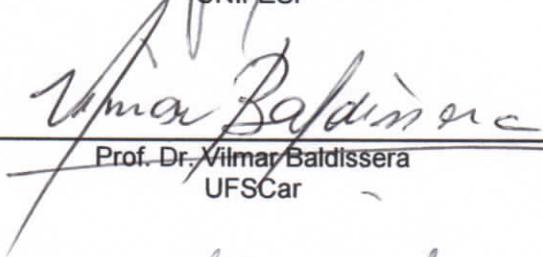
Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez
UFSCar



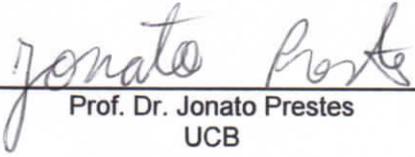
Prof. Dr. Guilherme Borges Pereira
UFMA



Prof. Dr. João Paulo Botero
UNIFESP



Prof. Dr. Vilmar Baldissera
UFSCar



Prof. Dr. Jonato Prestes
UCB

Dedico esta Tese a todas as pessoas que compreendem a importância e a beleza da busca da compreensão de fatos e fenômenos.

Aos meus queridos pais, Donizetti Domingos e Maria de Fátima Domingos, e irmão, Daniel Moraes Domingos, que em um mundo repleto de lógica, mostraram-me o que é mais abstrato e mais verdadeiro em minha vida.

À minha namorada e esposa Suzi, mulher maravilhosa e companheira que sempre esteve ao meu lado e sempre estará até o dia em que Deus quiser. Sem você eu não teria conseguido.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo presente da vida, e por ter me dado saúde, sabedoria, perseverança e por ter guiado meus passos até aqui.

Aos meus pais e irmão,

nos quais sempre me espelhei, Maria de Fátima, Donizetti e Daniel, e também pelo incentivo incansável da busca por objetivos intelectuais e honestos.

À minha namorada e esposa Suzi,

pelo incentivo, companheirismo e pela compreensão de todos os momentos que tive que me ausentar para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Sérgio Eduardo de Andrade Perez,

agradeço pela amizade, orientação e incentivo intelectual. Sua grande experiência científica e de vida foi especialmente valiosa na minha jornada acadêmica.

Ao professor Vilmar Baldissera,

toda minha gratidão e admiração. Agradeço pela amizade, pelos ensinamentos, colaboração e apoio, que sem dúvida foi determinante para a realização deste trabalho.

Ao professor Gilberto Eiji Shiguemoto,

Agradeço pela amizade, pelos ensinamentos, pela colaboração para realização do presente trabalho, e sem dúvida, pelos prazerosos momentos de descontração no “Espetinhos Tomodaty”, que saudade!

À professora Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo,

Por ter aberto as portas do laboratório de bioquímica e biologia molecular, e pelos seus ensinamentos e colaboração com este trabalho.

Aos meus queridos amigos do laboratório de fisiologia do exercício, pela convivência, pelos ensinamentos, e os quais, de alguma maneira contribuíram para a concretização deste trabalho, uma vez que pesquisa não se faz sozinho.

Aos técnicos do laboratório de fisiologia do exercício; Cacau, também conhecido como Carlos, hoje desfrutando de sua aposentadoria, e Tati atual técnica do laboratório pelos seus ensinamentos e dedicação para a realização deste trabalho, sem esquecer os momentos agradáveis da hora do café, onde juntos ficamos por várias vezes.

As meninas do laboratório de bioquímica e biologia molecular, principalmente pela paciência, companheirismo e pelos ensinamentos.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo a mim fornecida e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa.

MUITÍSSIMO OBRIGADO A TODOS!!!

SEREI ETERNAMENTE AGRADECIDO...

“Estudante, eis um título que apenas abandonamos no túmulo”.

(JEAN GUITTON)

“As raízes do estudo são amargas, mas seus frutos são doces”.

(ARISTÓTELES)

“Você não pode ensinar nada a um homem; você pode apenas ajudá-lo a encontrar
a resposta dentro dele mesmo”.

(GALILEU GALILEI)

“Eu tentei 99 vezes e falhei. Mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista
de seus objetivos, mesmo que eles pareçam impossíveis. A próxima tentativa pode
ser a vitoriosa”.

(ALBERT EINSTEIN)

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(GEORGE BERNAR SHAW)

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

(ARTHUR SCHOPENHAUER)

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

(ALBERT EINSTEIN)

RESUMO

A diminuição dos níveis dos hormônios ovarianos está associado a um declínio na bioenergética cerebral, o que poderia estar associado a uma diminuição da biogênese mitocondrial (BM). O treinamento de endurance (TE) foi demonstrado aumentar a expressão gênica dos marcadores da BM em diferentes regiões do cérebro. No entanto, os eventos moleculares da BM ainda não foram investigados em outros tipos de treinamento, como, o treinamento resistido (TR) ou em outros tipos de modelo experimental, como a ovariectomia (Ovx) e a terapia de reposição hormonal (TRH). Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da Ovx, do TR e da TRH sobre a expressão gênica dos marcadores-chaves da biogênese mitocondrial, o coativador 1 α do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α), o fator respiratório nuclear 1 (NRF-1) e o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) em diferentes regiões do cérebro, córtex (CX), hipocampo (HC) e hipotálamo (HT) de ratas. Trinta e seis ratas adultas Sprague-Dawley foram distribuídas em seis grupos experimentais (n = 6 por grupo): (I) sedentário sham-operação (Sed-Sham); (II) Ovx-Sed; (III) Sham-TR; (IV) Ovx-TR; (V) Ovx-Sed-TRH e (VI) Ovx-TR-TRH. Os animais dos grupos Ovx foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de remoção bilateral dos ovários, dos grupos TRH foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de implantação subcutânea de cápsulas silásticas preenchidas com uma solução de 180 μ g de 17 β -estradiol/ml de óleo de girassol e os animais dos grupos TR foram submetidos a doze semanas de treinamento resistido progressivo em escada, sendo as sessões de treinos realizadas uma vez a cada 3 dias. A expressão gênica foi analisada por PCR-RT e determinada pelo método do $\Delta\Delta$ Ct. O grupo Ovx-Sed apresentou uma menor expressão gênica dos

marcadores chaves da BM no HC quando comparado ao grupo Sham-Sed. A expressão do PGC-1 α foi 28% menor, do NRF-1 29% menor e do TFAM 20% menor. Estas menores expressões gênicas no HC foram restauradas nas ratas do grupo Ovx-TR e parcialmente restauradas nas ratas do grupo Ovx-Sed-TRH. Adicionalmente, as ratas do grupo Sham-TR apresentaram maior expressão gênica nas três áreas investigadas (CX, HC e HT), PGC-1 α ~33% maior, NRF-1 ~31% maior e TFAM ~44% maior. Estes resultados sugerem que o declínio na concentração circulante dos hormônios ovarianos diminui a BM no cérebro, em nossos resultados observados no HC, e que o TR pode aumentar a BM no cérebro, o que pode ter importantes implicações no que diz respeito a várias doenças do sistema nervoso central e demência relacionada com a idade que são frequentemente caracterizadas por disfunção mitocondrial. Sendo assim, a estimulação da BM cerebral estimulada pelo exercício pode ser uma importante estratégia de neuroproteção.

Palavras-chaves: ovariectomia; treinamento resistido; terapia de reposição hormonal; biogênese mitocondrial; cérebro.

ABSTRACT

Decreased levels of estrogen are associated with a decline in brain bioenergetics, which could be associated with a decrease in mitochondrial biogenesis (MB). Endurance training (ET) has been shown to increase markers of MB within the brain. However, the molecular events associated with this process were only investigated for ET but not for resistance training (RT) and hormone replacement therapy (HRT). In the study, we attempted to investigate the effects of ovariectomy (Ovx), RT and HRT on markers of MB (mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 (PGC-1 α), nuclear respiratory factor-1 (NRF-1), and mitochondrial transcription factor A (TFAM)) in specific brain regions, cortex (CX), hippocampus (HC), and hypothalamus (HT) in rats. Sprague-Dawley adult female rats were grouped into six groups: sham-operated sedentary (Sham-Sed); Ovx-Sed; Sham-RT; Ovx-RT; Ovx-Sed-HRT and Ovx-RT-HRT. The animals in HRT groups received subcutaneously implanted silastic capsules with a solution of 180 μ g 17 β -estradiol/ml sunflower oil. A 12-week RT period, during which the animals climbed a 1.1-m vertical ladder with weights attached to their tails, was used. The sessions were performed once every 3 days, with 4-9 climbs. Gene expression was analyzed by RT-PCR by the $\Delta\Delta$ Ct method. The Ovx decreased the gene expression of molecules related to MB, PGC-1 α (28%), NRF-1 (29%) and TFAM (20%) in the HC. These Ovx-induced lower gene expressions were totally restored in this structure by RT. RT increased the markers of MB, PGC-1 α (~33%), NRF-1 (~31%) and TFAM (~44%) in CX, HC and HT. These findings suggest that OVX decreases brain MB, in our data observed in HC, and RT increases brain MB, which may have important implications with respect to various central nervous system diseases and age-related

dementia that are often characterized by mitochondrial dysfunction. Stimulation or enhancement of mitochondrial biogenesis may prove a novel neuroprotective strategy in the future.

Keywords: ovariectomy; resistance training; hormone replacement therapy; mitochondrial biogenesis; brain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da regulação da biogênese mitocondrial....	24
Figura 2 – Regulação dos sistemas bioenergéticos pelo estrogênio.....	26
Figura 3 – Distribuição das ratas e desenho experimental inicial do estudo.....	31
Figura 4 – Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia.....	33
Figura 5 – Escada para treinamento resistido.....	35
Figura 6 – Organização da carga de carregamento por sessão de treino.....	37
Figura 7 – Recursos materiais utilizados para administração do 17 β -estradiol.....	38
Figura 8 – Desenho experimental.....	41
Figura 9 – Exemplo de um gel de agarose.....	44
Figura 10 – Exemplo de curvas MELT originais representativas dos ciclos do PCR-RT.....	47
Figura 11 – Exemplos de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT.....	48
Figura 12 – Carga máxima de carregamento (g) dos grupos Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-TRH nas semanas 1, 6 e 12.....	53
Figura 13 – Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no córtex.....	54
Figura 14 – Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no hipocampo.....	56
Figura 15 – Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no hipotálamo.....	58
Figura 16 - Representação esquemática dos possíveis efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre a função mitocondrial cerebral.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos primers usados para PCR-RT.....	46
Tabela 2 – Efeitos da ovariectomia, do treinamento resistido e da terapia de reposição hormonal sobre parâmetros antropométricos.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK: proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

ATP: adenosina trifosfato

BM: biogênese mitocondrial

CaMK: proteína quinase dependente de cálcio calmodulina

CX: córtex

ER α : receptor de estrógeno alfa

ER β : receptor de estrógeno beta

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HC: hipocampo

HT: hipotálamo

MEF-2: *myocyte enhancer fator-2*

NRF-1: fator respiratório nuclear 1

Ovx: ovariectomia

PGC-1 α : coativador 1 α do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

SIRT 1: *Silent Information Regulator*

TE: treinamento de endurance

TFAM: fator de transcrição mitocondrial A

TI: treinamento intervalado

TIM: Translocases de membrana interna

TOM: translocases de membrana externa

TR: treinamento resistido

TRH: terapia de reposição hormonal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2 HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	28
2.1 Hipóteses.....	28
2.2 Objetivos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais e condições experimentais.....	29
3.2 Grupos experimentais.....	30
3.2.1 Grupos de animais sedentários.....	31
3.2.2 Grupos de animais ovariectomizados	31
3.2.3 Grupos de animais treinamento resistido.....	32
3.2.4 Grupos de animais terapia de reposição hormonal.....	32
3.3 Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia e da sham operação.....	32
3.4 Treinamento resistido (TR).....	34
3.5 Terapia de reposição hormonal (TRH).....	37
3.6 Controle da ingestão alimentar e da massa corporal.....	39
3.7 Eutanásia e coleta dos tecidos.....	39
3.8 Desenho experimental.....	40
3.9 Quantificação da expressão gênica do PGC-1 α , NRF-1, TFAM e GAPDH.....	41
3.9.1 Procedimentos gerais.....	41
3.9.2 Extração do RNA total.....	42
3.9.3 Quantificação do RNA total.....	44

3.9.4 Determinação da integridade do RNA.....	44
3.9.5 Transcrição reversa.....	45
3.9.6 Reação em cadeia da polimerase – tempo real (PCR-RT).....	46
3.10 Análise estatística.....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1 Efeitos da ovariectomia, do treinamento resistido e da terapia de reposição hormonal sobre parâmetros antropométricos.....	50
4.2 Carga máxima de carregamento nas semanas 1, 6 e 12 de treinamento resistido.....	52
4.3 Expressão dos fatores da biogênese mitocondrial.....	53
4.3.1 Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no córtex.....	54
4.3.2 Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no hipocampo.....	55
4.3.3 Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no hipotálamo.....	57
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÃO.....	69
Referências bibliográficas.....	70
Anexo I.....	87

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A vida tem início no momento da concepção, envolvendo a diferenciação e a maturação do organismo e suas células. No entanto, é iniciado um processo lento e progressivo de perda funcional que resultará na morte do indivíduo, sendo esse processo conhecido como envelhecimento. O envelhecimento é, portanto, universal, progressivo e intrínseco de todos os seres vivos (Lane et al., 1987). Com a idade, ocorrem alterações estruturais e fisiológicas em todos os sistemas orgânicos (Collins; Exton-Smith, 1986).

O envelhecimento proporciona algumas alterações sistêmicas no indivíduo, entre elas, a menopausa nas mulheres, sendo caracterizada pela redução e/ou cessação da produção dos hormônios ovarianos (Riggs et al., 1992; Zofkova; Kancheva, 1996) que proporciona uma condição de permanente cessação da menstruação (Saengsirisuwan et al., 2009). O início dos fenômenos característicos da menopausa gera um grande impacto negativo em processos fisiológicos de remodelamento tecidual e metabólico que podem conduzir a maior incidência de osteoporose (Lane et al., 2000), riscos cardiovasculares, mudança no perfil lipídico, aumento da pressão arterial (Taechakraichana et al., 2000), alteração do metabolismo tecidual (Sciore et al., 1998; Fred et al., 2006) e alterações no metabolismo lipídico e distribuição de gordura corporal (Kannel; Wilson, 1995). Há também estudos correlacionando o envelhecimento com o declínio da função mitocondrial e da capacidade de produção de adenosina trifosfato (ATP) pela fosforilação oxidativa no cérebro de mamíferos (Navarro et al., 2008; Marton et al., 2010).

A terapia de reposição hormonal (TRH) tem sido estudada como intervenção farmacológica para o tratamento desses efeitos deletérios da menopausa, porém, há trabalhos correlacionando essa intervenção com o aumento na incidência de alguns tipos de cânceres (mama e útero), visto que, as dosagens hormonais utilizadas ainda precisam ser mais estudadas quanto a seus efeitos (Stefanick et al., 2006; Olson; Bandera; Orlow, 2007; Zhang et al., 2007).

Estudos sugerem ainda que a melhor atitude para as mulheres na menopausa é modificar seu estilo de vida por meio do emagrecimento, da prática de atividade física regular e de hábitos alimentares saudáveis, uma vez que, normalmente mulheres menopausadas desenvolvem obesidade por terem seu metabolismo basal diminuído, aliado ao fato de manterem a ingesta alimentar inalterada ou às vezes até aumentada (Mattar et al., 2008). Neste sentido, o treinamento resistido (TR) como intervenção não-farmacológica é recomendado para o tratamento de várias doenças associadas à menopausa, como sarcopenia, osteopenia, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, entre outras, dada a capacidade do exercício em aumentar o gasto calórico bem como promover aumento da taxa metabólica e remodelamento tecidual (Leite et al., 2010).

No intuito de compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos nos efeitos deletérios associados ao período pós-menopausa e estabelecer estratégias para prevenir e reverter essas alterações, esta condição pode ser mimetizada em animais de laboratório, por exemplo em ratas, por meio da remoção cirúrgica dos ovários – ovariectomia bilateral (Leite et al., 2009; Prestes et al., 2009; Pighon et al., 2011; Shiguemoto et al., 2012; Domingos et al., 2012). Essa técnica permite estudar em diferentes tecidos os efeitos da diminuição drástica dos níveis sistêmicos dos hormônios ovarianos combinado a outras formas de intervenção, como por exemplo,

com o TR. Modelos experimentais desta natureza possibilitam estudos mais invasivos, como por exemplo, estudo da expressão gênica de sinalizadores celulares em diversos tecidos, como, músculos esqueléticos, coração, fígado, tecido adiposo, estruturas cerebrais entre outros (Leite et al., 2009; Prestes et al., 2009; Shiguemoto et al., 2012; Domingos et al., 2012).

Na literatura os efeitos do TR sobre o sistema muscular são bem documentados (Hornberger, Farrar, 2004; Baar et al., 2002; Akimoto et al., 2005; Leite et al., 2009; Wang et al., 2011). Entretanto, a influência dos hormônios ovarianos e do treinamento resistido sobre o sistema nervoso central, especificamente o cérebro, necessita de mais esclarecimentos, principalmente quando se aborda a nível molecular.

O cérebro humano e o cérebro do rato são grandes quando comparado com o tamanho dos seus respectivos corpos. Tanto o cérebro de humanos quanto o cérebro de ratos representa aproximadamente 2% da massa corporal total, no entanto, consomem aproximadamente 20% de toda energia dispendida diariamente, o que impõe uma enorme demanda na bioenergética celular, especialmente no sistema de fosforilação oxidativa de ressíntese de ATP (Brinton 2008 e 2009).

Neste sentido, o hipocampo uma estrutura do sistema nervoso central importante para aprendizagem e memória, vem sendo intensamente estudada por ser uma das únicas estruturas cerebrais onde há síntese de novos neurônios (neurogênese). Estudos mostraram que a neurogênese hipocampal é modulada por muitos fatores que incluem envelhecimento, estresse, enriquecimento ambiental, exercício físico e aprendizado (Fabel; Kempermann, 2008; Praag, 2008). Estudos demonstraram que o exercício físico é um indutor robusto do aumento da neurogênese hipocampal em animais jovens, adultos e idosos (Fabel; Kempermann,

2008; Kannagara et al., 2010; Kohman et al., 2012), o que enseja a biogênese mitocondrial como fator primordial para o suprimento da demanda energética. Outra estrutura cerebral que sofre influência do estado bioenergético celular e apresenta uma grande demanda energética é o hipotálamo, por ser uma região encefálica importante na homeostase corporal, isto é, no ajustamento do organismo às variações externas (Watts, 2015). É o hipotálamo que controla a homeostase energética, a temperatura corporal, o apetite, o equilíbrio hídrico hidroeletrólítico, além de ser o principal centro da expressão emocional e do comportamento sexual (Watts, 2015). O hipotálamo faz também a integração entre os sistemas nervoso e endócrino, atuando na ativação e regulação de diversas glândulas produtoras de hormônios (Watts, 2015). Coletivamente, todas estas funções são fundamentais para a sobrevivência do organismo em situações de estresse (Watts, 2015).

Recentemente Niwa et al. (2015), demonstraram que o exercício físico voluntário tem uma correlação positiva com a neurogênese hipotalâmica, levando à recuperação das funções homeostáticas no cérebro adulto após acidente vascular cerebral. De acordo com Li et al. (2013) o treinamento físico pode estimular a proliferação de células progenitoras neuronais no hipotálamo e a sua diferenciação em neurônios, o que também enseja a biogênese mitocondrial nesta estrutura cerebral.

Assim, coletivamente as diferentes estruturas cerebrais são singularmente dependentes de uma função mitocondrial eficiente, ficando em risco de declínio bioenergético caso as funções mitocondriais sejam prejudicadas ou a densidade mitocondrial diminuída. Neste sentido, vários fatores moduladores, como: adrenalina, noradrenalina, triiodotironina e tiroxina, entre outros, já foram demonstrados ser importantes para a homeostase energética intracelular, por

influenciar a expressão gênica e a atividade enzimática dos sistemas de ressíntese de ATP (Brinton, 2009). Adicionalmente, os estudos de Brinton (2008 e 2009) e o estudo de Yao e Brinton (2009), demonstraram que o estrógeno desencadeia importantes efeitos moduladores benéficos sobre o sistema bioenergético cerebral, por modular o transporte de glicose através da membrana neuronal, a glicólise, o ciclo do ácido tricarboxílico, a fosforilação oxidativa e consequentemente a ressíntese oxidativa de ATP.

Yao et al. (2012), demonstraram que a depleção dos hormônios ovarianos induzido pela ovariectomia resultou em um declínio na função bioenergética mitocondrial cerebral. Sendo o declínio na capacidade bioenergética mitocondrial podendo ser devido a diminuições no número e no tamanho das mitocôndrias, diminuição da densidade mitocondrial por célula, bem como, por mudanças nos componentes intramitocondriais, como, diminuição na densidade das enzimas envolvidas nos processos de fosforilação oxidativa, bem como de suas capacidades catalíticas. No entanto, os mesmos autores demonstraram que ratas ovariectomizadas, porém, que receberam TRH iniciado imediatamente após a ovariectomia, este evento deletério de menor capacidade bioenergética mitocondrial cerebral foi impedido, o que demonstra o potente papel modulador que o estrógeno exerce sobre a capacidade oxidativa cerebral. De acordo com Finsterer (2006), o sistema nervoso central é o segundo órgão mais frequentemente afetado por disfunções mitocondriais.

Já é bem estabelecido na literatura que o treinamento físico aeróbio leva a um aumento na capacidade oxidativa muscular, o que resulta em melhor desempenho aeróbio e maior resistência à fadiga (Steiner et al., 2011). Estas adaptações funcionais são explicadas pelo menos em parte, pelo aumento na

densidade mitocondrial muscular (Holloszy, 1967). Entretanto, melhoras na capacidade oxidativa, ou seja, das funções mitocondriais, também são fatores importantes dos benefícios do exercício físico regular para a manutenção da saúde, incluindo a prevenção de doenças crônicas, tais como, as cardiovasculares e as metabólicas (Ren et al., 2011; Duncan, 2011). No entanto, investigações que tenham incidido sobre as respostas adaptativas mitocondriais ao treinamento físico no cérebro são limitadas. Para nosso conhecimento, foram levantados três estudos (Steiner et al., 2011; Zhang et al., 2012 e Casuso et al., 2014) que tiveram dentre seus objetivos principais o de verificar os efeitos do exercício físico sobre a expressão dos marcadores da biogênese mitocondrial no cérebro de ratos.

Vários distúrbios psicológicos e doenças neurodegenerativas, tais como, a doença de Parkinson e o mal de Alzheimer possuem sua gênese associada a uma disfunção mitocondrial cerebral, sendo assim, estratégias que possam aumentar a biogênese mitocondrial em regiões específicas do cérebro se tornam importantes, como o aumento induzido pelo exercício físico conforme demonstrado no estudo de Steiner et al., (2011) que após oito semanas de treinamento aeróbico em esteira os animais do grupo submetido ao treinamento apresentaram aproximadamente três vezes mais DNA mitocondrial no cérebro do que os animais do grupo controle. Além disso, o aumento induzido pelo exercício físico na biogênese mitocondrial pode contribuir para diminuição da fadiga central durante o exercício, melhorar o desempenho do exercício e retardar o início da instalação de doenças neurodegenerativas com gênese na disfunção mitocondrial.

O controle celular sobre as mudanças adaptativas na quantidade de mitocôndrias requer a capacidade de detectar a necessidade de produção adicional de energia mitocondrial, seguida pelo desencadeamento de vias de sinalização que

resultarão em um aumento da expressão de genes para a formação de novas mitocôndrias na célula (Clementi; Nisoli, 2005).

O processo de biogênese mitocondrial refere-se não apenas à formação de novas mitocôndrias, mas também ao processo de aumento da organela e da expressão de enzimas relacionadas à sua função. É um processo complexo, uma vez que a mitocôndria é derivada de genomas nucleares e mitocondriais (Hood, 2009). Diferentes estímulos, como a ativação simpática, o exercício físico, a queda da temperatura corporal, as espécies reativas de oxigênio, dentre outros, podem ativar a biogênese mitocondrial (Nisoli et al., 2003; Nisoli et al., 2008; Hood, 2009; Kowaltowski et al., 2009).

Como apresentado na figura 1, a biogênese mitocondrial ocorre por meio da ativação do coativador 1α do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma, o PGC- 1α , sendo o mesmo, considerado o “regulador mestre” da biogênese mitocondrial e da expressão de proteínas mitocondriais (Puigserver; Spiegelman, 2003; Rodgers et al., 2005; Gerhart-Hines et al., 2007; Rohas et al., 2007). O PGC- 1α é uma proteína reguladora de uma variedade de processos metabólicos, incluindo a formação de novas mitocôndrias nos músculos esqueléticos, no coração e no cérebro, bem como no controle da β - oxidação mitocondrial (Lin et al., 2005; Silveira et al., 2006; Steiner et al., 2011), e também controla a resposta celular ao estresse oxidativo (St-Pierre et al., 2006).

Na biogênese mitocondrial, o PGC- 1α interage com fatores respiratórios nucleares (NRF-1 e NRF-2), os quais são conhecidos reguladores do processo de transcrição e replicação mitocondrial. Posteriormente, o NRF-1 ativa o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), que é um potente estimulador da duplicação do DNA mitocondrial (Viña et al., 2009). Sendo assim, o NRF-1 é considerado um fator

de transcrição intermediário na cascata de sinalização da biogênese mitocondrial, o qual é responsável pela estimulação e síntese do TFAM que é o efetor final da ativação e duplicação do DNA mitocondrial.

Choi et al. (2001) demonstraram que os níveis de TFAM são proporcionais ao do DNA mitocondrial, ou seja, quando ocorre redução ou aumento na expressão de TFAM, proporcionalmente irá ocorrer redução ou aumento da replicação do DNA mitocondrial. Portanto, o aumento na expressão do TFAM preveniria desordens relacionadas à redução da expressão proteica desse fator, além de resultar em aumento na biogênese mitocondrial (Medeiros, 2008). Deste modo, todo vez que a biogênese mitocondrial for necessária, o PGC-1 α será ativado o que levará a ativação do NRF-1 que resultará na síntese e ativação do TFAM, resultando no aumento da duplicação do DNA mitocondrial o que conduz para um aumento no número de mitocôndrias celulares (Viña et al., 2009).

A biogênese mitocondrial também é dependente do aumento na transcrição do *Silent Information Regulator T1* (SIRT 1), o SIRT 1 interage fisicamente com enzimas desacetilases e ativa o PGC-1 α . No entanto, todas as proteínas que regulam a transcrição e replicação do DNA mitocondrial são codificadoras nucleares e requerem entrada na mitocôndria. Provavelmente a mais importante dessas proteínas a serem transportadas é o TFAM. A entrada das proteínas para a mitocôndria é um processo complexo que envolve transportadores de proteínas que ficam em compartimentos submitocondriais, principalmente as Translocases de Membrana Externa, ou complexo TOM, e as Translocases de Membrana Interna ou complexo TIM. Na matriz mitocondrial, o TFAM leva a um aumento no número de cópias do DNA presente na célula e à replicação da mitocôndria (Hood, 2009; Viña et al., 2009).

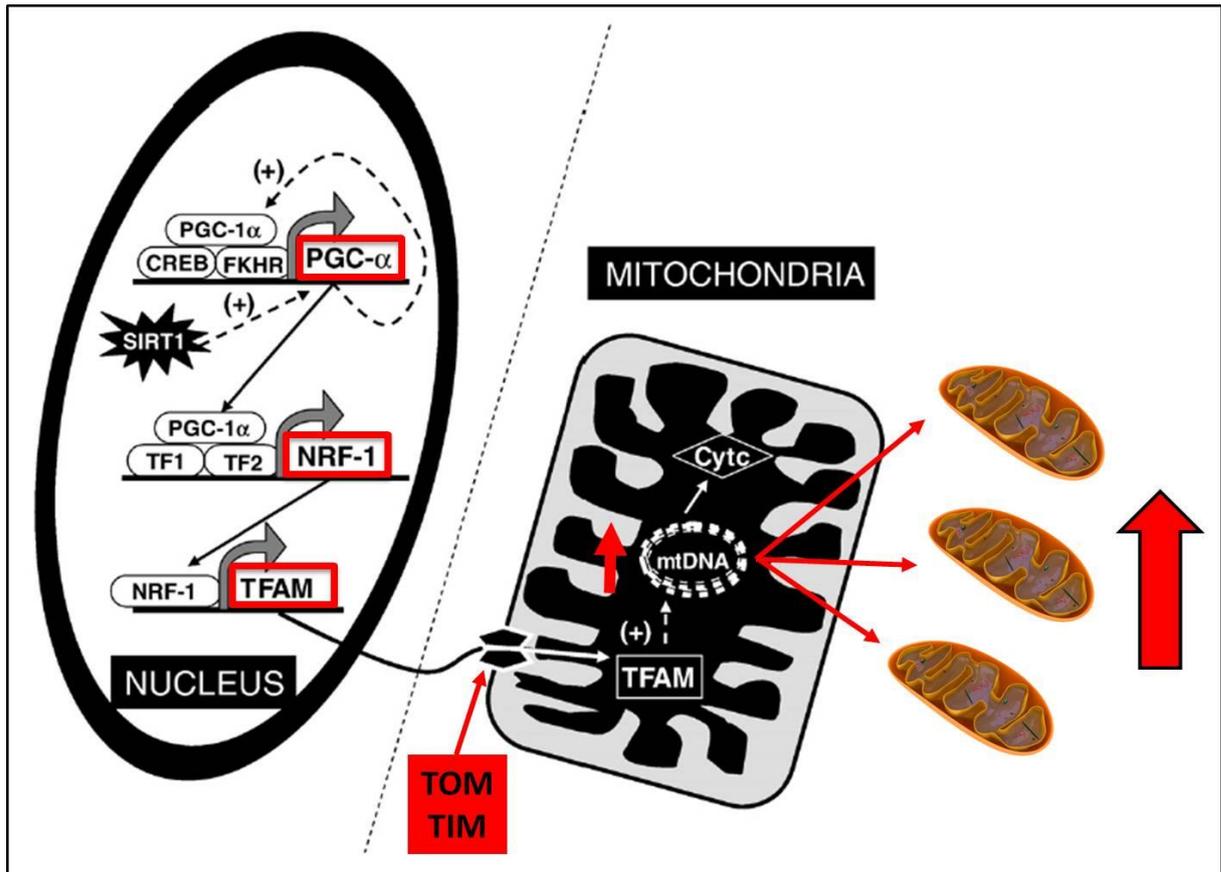


Figura 01. Representação esquemática da regulação da biogênese mitocondrial. SIRT1: *Silent Information Regulator T1*; PGC-1 α : coativador 1 α do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma; NRF-1: fator respiratório nuclear 1; TFAM: fator de transcrição mitocondrial A; TOM: translocases de membrana externa; TIM: translocases de membrana interna; mtDNA: ácido desoxirribonucleico mitocondrial. (Fonte: Viña et al., 2009, adaptado pelo autor).

Tanto o exercício agudo quanto o crônico demonstrou ativar o PGC-1 α no músculo esquelético, o qual foi associado ao aumento nas proteínas mitocondriais e melhorias no desempenho do exercício (Terada et al., 2002; Terada; Tabata, 2004; Wright et al., 2007; Calvo et al., 2008). Wang et al. (2011) demonstraram em humanos que o treinamento concorrente, a combinação do treinamento de endurance mais o TR, conduz um aumento duas vezes maior na expressão

muscular do RNAm do marcador da biogênese mitocondrial PGC-1 α em comparação ao treinamento de endurance de modo único. Contrária a hipótese inicial suscitada por Wang et al. (2011), os resultados demonstraram que o exercício resistido realizado após o exercício de endurance, potencializa as respostas adaptativas de sinalização para a biogênese mitocondrial quando comparado com o treinamento de endurance de modo único.

Gibala et al. (2009) trabalhando com músculo esquelético demonstraram que uma sessão aguda de treinamento intervalado (TI) de alta intensidade e baixo volume (4 blocos de 30 segundos de exercício máximo realizado no cicloergômetro separados por 4 minutos de recuperação) aumenta a expressão do RNAm do PGC-1 α 3 horas após a sessão aguda de TI, demonstrando assim, que uma dose surpreendentemente pequena (2 minutos de trabalho total) de exercício intervalado intenso é suficiente para aumentar o RNAm do PGC-1 α durante a recuperação. Logo, o TI compartilha caminhos de sinalização que são normalmente ativados pelo treinamento tradicional de *endurance*, o que justifica a rápida regulação ascendente da capacidade oxidativa de pessoas engajadas no TI (fenótipo oxidativo) (Gibala, 2009).

Tendo em vista os resultados supracitados referentes ao TI e sua semelhança com o treinamento resistido, é encorajador especular que o exercício resistido também possa alterar positivamente a expressão de marcadores da biogênese mitocondrial em diferentes tecidos, inclusive no cérebro, e que esta resposta ocorra também em modelo experimental de ovariectomia. No entanto, até o presente momento nenhum estudo examinou os efeitos do TR, da ovariectomia, da TRH e de suas associações sobre a expressão de marcadores da biogênese mitocondrial no cérebro.

Por este motivo, experimentos que possam aumentar o conhecimento a respeito da interação, ovariectomia, TR e TRH sobre a expressão gênica de moléculas marcadoras da biogênese mitocondrial no cérebro se tornam bastantes atrativas, uma vez que, foi demonstrado em trabalho recente de Rettberg et al. (2014), que o estrogênio é considerado um regulador “mestre” dos sistemas bioenergéticos cerebrais por modular diversas reações enzimáticas e sistemas bioenergéticos como demonstrado na figura 2.

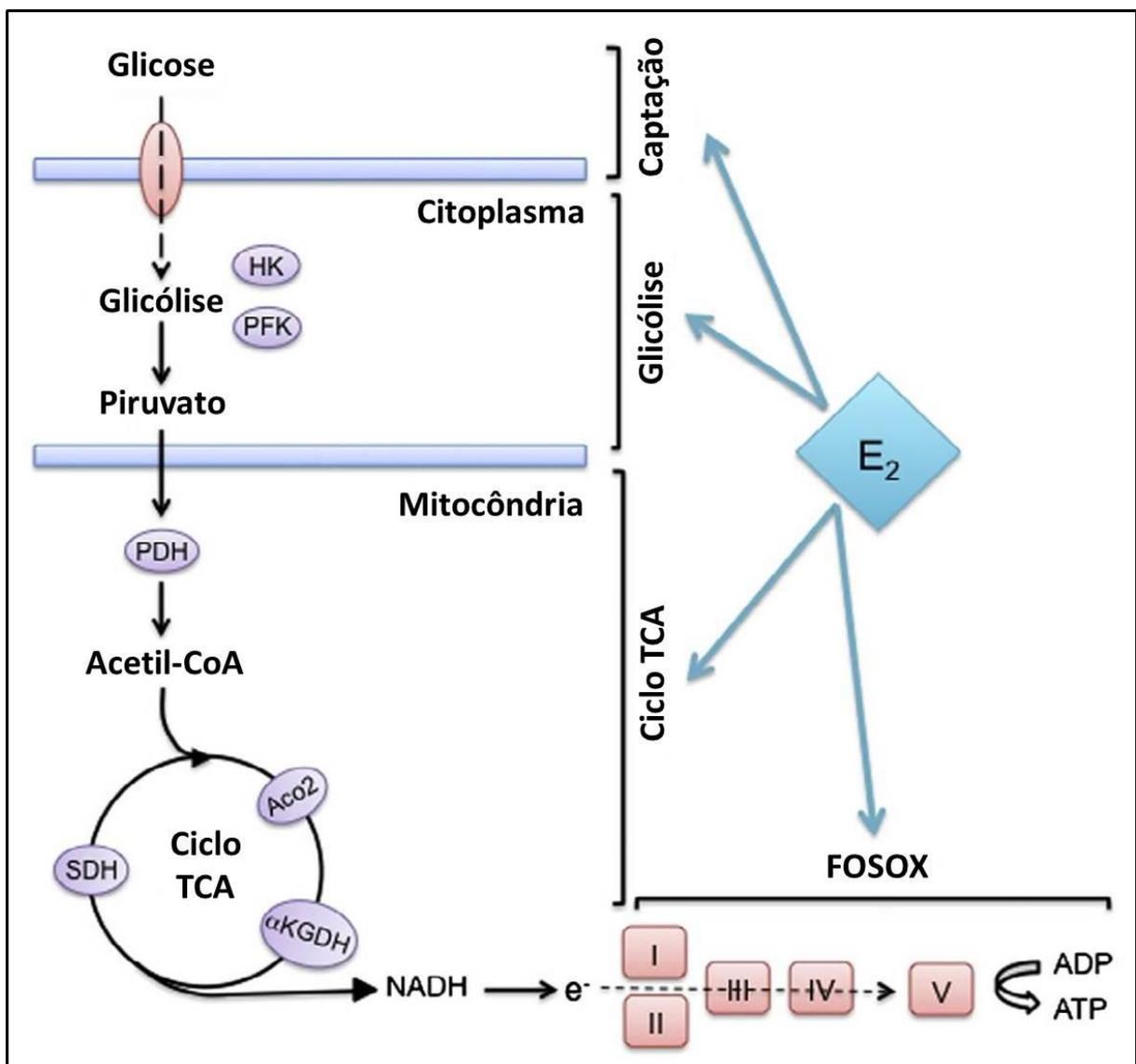


Figura 2. Regulação dos sistemas bioenergéticos pelo estrogênio. Estrogênio regula muitas das enzimas chaves envolvidas na bioenergética mitocondrial, incluindo

transportadores de glicose, hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), piruvato desidrogenase (PDH), aconitase (Aco2), alfa-cetoglutarato desidrogenase (α KGDH), succinato desidrogenase (SDH) e os complexos I, III e IV da cadeia transportadora de elétrons. Ciclo TCA: ciclo do ácido tricarboxílico; FOSOX: fosforilação oxidativa. (Fonte: Rettberg et al., 2014, tradução nossa).

Adicionalmente, foi demonstrado que o estrógeno aumenta a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 nos neurônios, uma proteína de sobrevivência neuronal. A maior expressão de Bcl-2 pode potencializar a capacidade máxima de captação de cálcio pelas mitocôndrias. A aumentada captação mitocondrial de cálcio induzido pelo estrógeno via Bcl-2 pode proteger os neurônios contra os agravos decorrentes de um excesso de cálcio no citoplasma e prevenir possíveis neurodegenerações (Yao; Brinton, 2012). No entanto, para um sistema neuronal eficiente, é de primordial importância a integridade funcional das mitocôndrias e uma densidade mitocondrial compatível com as demandas metabólicas celulares.

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 Hipóteses

Nossa hipótese inicial foi que tanto o TR quanto a OVX podem alterar a expressão gênica das moléculas marcadoras da biogênese mitocondrial nas diferentes regiões cerebrais investigadas (córtex, hipocampo e hipotálamo), sendo que a OVX leva a uma menor expressão e o TR conduz a uma maior expressão dos marcadores da biogênese mitocondrial, e que a TRH previne a menor expressão dos marcadores da biogênese mitocondrial nas regiões cerebrais investigadas.

2.2 Objetivos

Investigar os efeitos da OVX, do TR e da TRH sobre a expressão gênica de marcadores da biogênese mitocondrial (PGC-1 α , NRF-1 e TFAM) em regiões específicas do cérebro (CX, HC e HT).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizadas 36 ratas Sprague-Dawley, adultas, obtidas do biotério da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araraquara, com massa corporal de chegada ao biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) de 220 ± 12 g (média \pm desvio padrão da média). Durante todo o período experimental as ratas foram mantidas em gaiolas coletivas (três ratas por gaiola) no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, sob condições constantes de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação em ciclo invertido, sendo que, das 20h00min às 08h00min claro e das 08h00min às 20h00min escuro. Todas as ratas foram alimentadas com ração comercial para roedores com controle diário da quantidade de ração consumida por gaiola. Para controle alimentar foi ofertado diariamente em média por gaiola 140 g, sendo que, no dia seguinte a sobra de ração era pesada e calculado a ingestão de ração por gaiola, da seguinte maneira: $\text{Ingestão(g)} = \text{Oferta(g)} - \text{sobra(g)}$. Posteriormente foi calculado a ingestão por animal, pela razão ingestão por gaiola pelo número de animais. Todas as ratas tiveram livre acesso a água.

Todas as ratas após chegada ao biotério do laboratório de fisiologia do exercício - UFSCar permaneceram por três semanas em condição de aclimatação ao biotério e ao ciclo invertido. Após este período, as ratas foram distribuídas em seis grupos experimentais.

Todos os procedimentos de pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (número protocolo 005/2013) e conduzidos de acordo com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América (National Research Council's, 1996).

3.2 Grupos Experimentais

Após o período de três semanas de aclimação ao biotério e ao ciclo invertido as ratas foram randomicamente distribuídas em seis grupos experimentais (seis animais por grupo) onde permaneceram até o final do experimento. Abaixo está apresentado os nomes dos grupos com suas respectivas abreviações utilizadas neste trabalho.

- (I) Sham operado sedentário (Sham-Sed);
- (II) Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed);
- (III) Sham operado treinamento resistido (Sham-TR);
- (IV) Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-TR);
- (V) Ovariectomizado sedentário terapia de reposição hormonal (Ovx-Sed-TRH);
- (VI) Ovariectomizado treinamento resistido terapia de reposição hormonal (Ovx-TR-TRH).

Na figura 3 está representado o esquema de distribuição das ratas e o desenho experimental inicial do estudo.

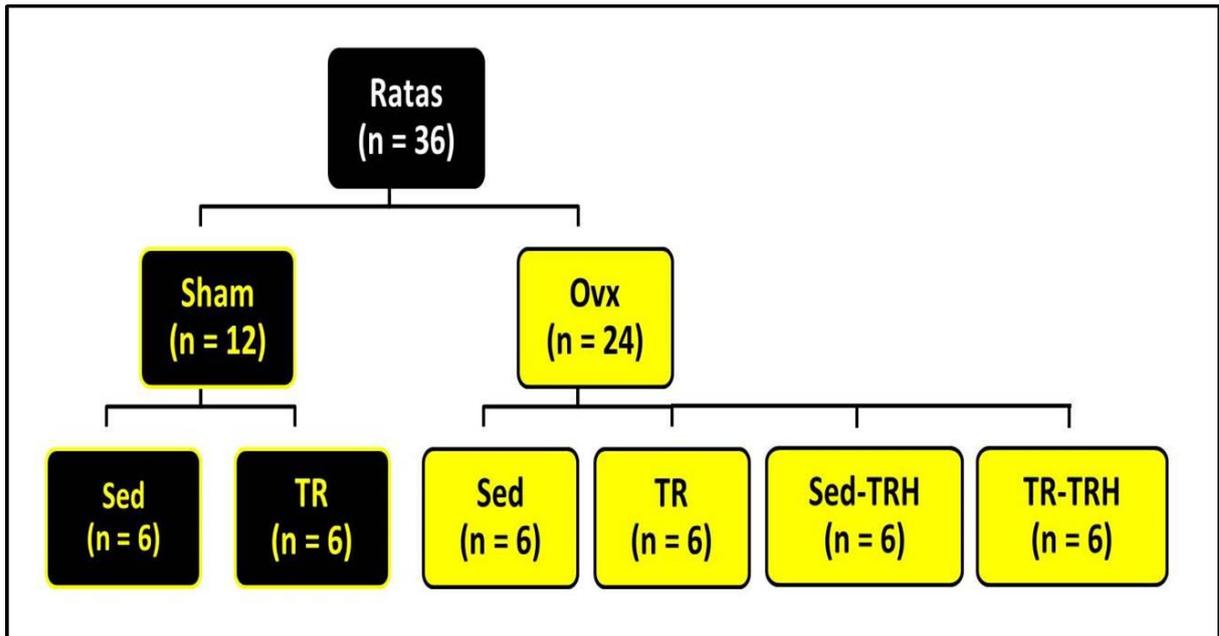


Figura 3. Distribuição das ratas e desenho experimental inicial do estudo.

3.2.1 Grupos de animais sedentários

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

3.2.2 Grupos de animais ovariectomizados

Os animais dos grupos ovariectomizados (Ovx), Ovx-Sed, Ovx-TR, Ovx-Sed-TRH e Ovx-TR-TRH foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de remoção bilateral dos ovários (ovariectomia) como descrito no item 3.3.

3.2.3 Grupos de animais treinamento resistido

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

3.2.4 Grupos de animais terapia de reposição hormonal

Os animais dos grupos terapia de reposição hormonal (TRH) Ovx-Sed-TRH e Ovx-TR-TRH foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de implantação subcutânea de cápsulas silásticas preenchidas com uma solução de 180 µg de 17 β-estradiol/ml de óleo de girassol, como descrito no item 3.5.

3.3 Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia e da sham operação

A ovariectomia e a sham operação foi realizada quando os animais atingiram aproximadamente 250g de massa corporal de acordo com a técnica descrita por Kalu (1991).

Inicialmente as ratas foram anestesiadas com uma mistura de Ketamina (61,5 mg/kg de massa corporal) e Xilazina (7,6 mg/kg de massa corporal) por meio de injeção na cavidade peritoneal, via de administração parenteral por meio de injeção intraperitoneal, visando atingir um grau razoável de relaxamento muscular para facilitar a cirurgia e, principalmente, produzir analgesia suficiente a fim de que os animais não sofressem durante os procedimentos cirúrgicos e o tão logo retornasse a sua normalidade fisiológica.

Para dar início aos procedimentos cirúrgicos da Ovx e da sham operação os reflexos das ratas foram testados para verificação da eficácia do procedimento de anestesia após as ratas terem recebido a injeção intraperitoneal da mistura de Ketamina e Xilazina. Durante todo o transcorrer dos procedimentos cirúrgicos da Ovx e da sham operação as ratas foram mantidas sobre o efeito anestésico proporcionado pela Ketamina-Xilazina. Primeiramente, foi realizada uma pequena incisão bilateral de 1,0-1,5 cm através da pele e da camada muscular, entre a última costela e a coxa, em paralelo com a linha corporal do animal (Figura 4A). A cavidade peritoneal foi aberta e feita uma ligadura abaixo da fimbria (Figura 4B e 4C). Os ovários foram removidos e a incisão feita na pele e músculos suturados (Figura 4D). A figura 4 foi extraída da dissertação de Pereira (2010) e adaptada para este trabalho.

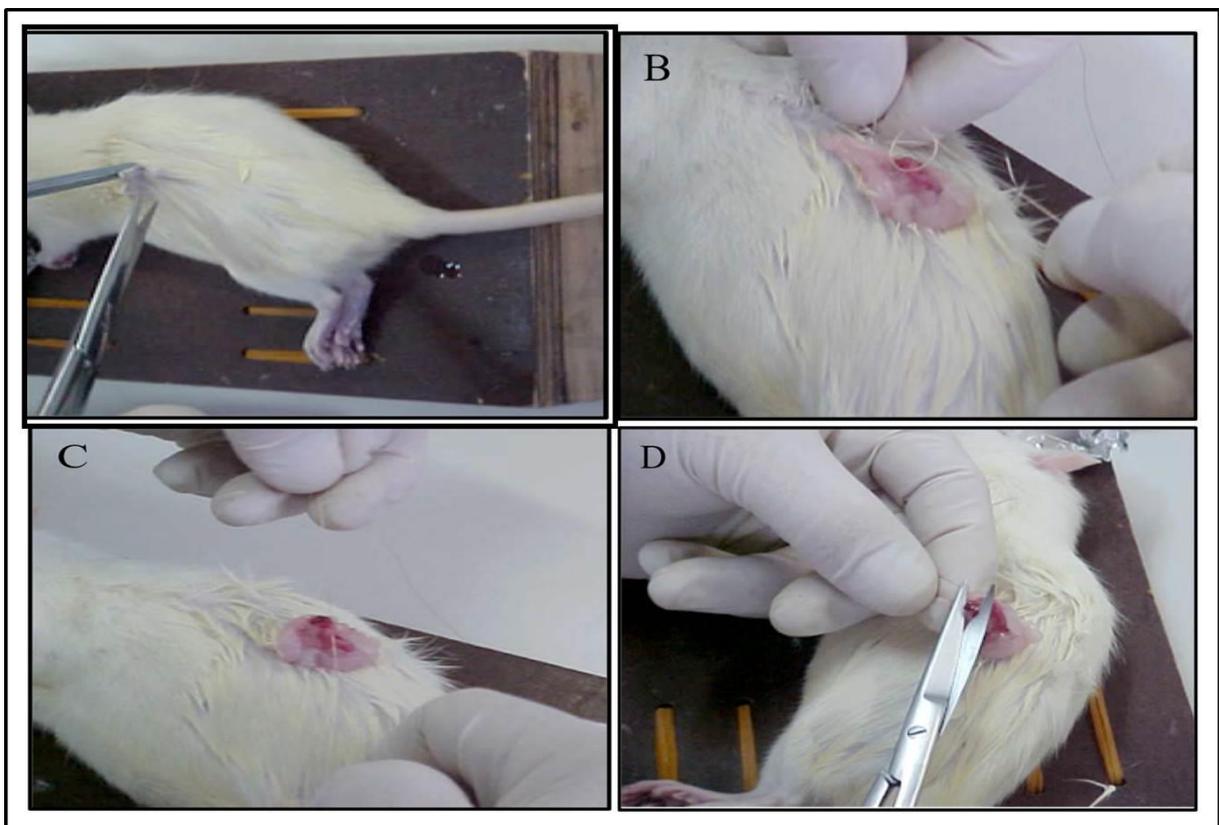


Figura 4. Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia. A) Incisão bilateral; B e C) Ligadura abaixo da fimbria e D) Remoção do ovário (Pereira, 2010).

Pelas próximas 72 horas após a Ovx e a sham operação as ratas foram mantidas em caixas individuais, posteriormente a este período as ratas foram novamente agrupadas nas caixas coletivas referentes aos seus grupos, onde permaneceram até o fim do experimento. Foi respeitado um período de sete dias de recuperação pós-cirurgia para dar início aos procedimentos do protocolo de treinamento resistido nos grupos Ovx-TR e Ovx-TR-TRH.

A sham operação foi realizada por meio dos mesmos procedimentos da ovariectomia, exceto que não foi realizada a ligadura abaixo da fimbria e nem os ovários foram removidos, e sim apenas expostos e devolvidos ao local de origem. Vale ressaltar que todos os animais sham operados e ovariectomizados tiveram o mesmo tempo de exposição aos procedimentos cirúrgicos (88 dias) até a data da eutanásia.

3.4 Treinamento resistido (TR)

O protocolo de treinamento resistido em escada de Prestes et al., (2009) foi utilizado e adaptado para as necessidades e execução desta pesquisa.

Inicialmente, as ratas foram adaptadas ao protocolo de treinamento resistido que exigia que os animais escalassem uma escada vertical (110 x 18 cm, 2 cm de espaçamento entre os degraus da grade, inclinação de 80⁰) com pesos atados as suas caudas (figura 5A). O aparato de carga foi atado à porção proximal da cauda com uma fita auto-adesiva (Figura 5B). Com o aparato fixado a cauda as ratas eram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada. Caso necessário um estímulo com pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento. No topo da escada as ratas alcançavam uma gaiola (20 x 20 x

20 cm) onde descansavam durante 120 segundos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem estímulo de pinça na cauda. Foram realizadas duas sessões de adaptação (familiarização) com intervalo de 48 horas entre as sessões.

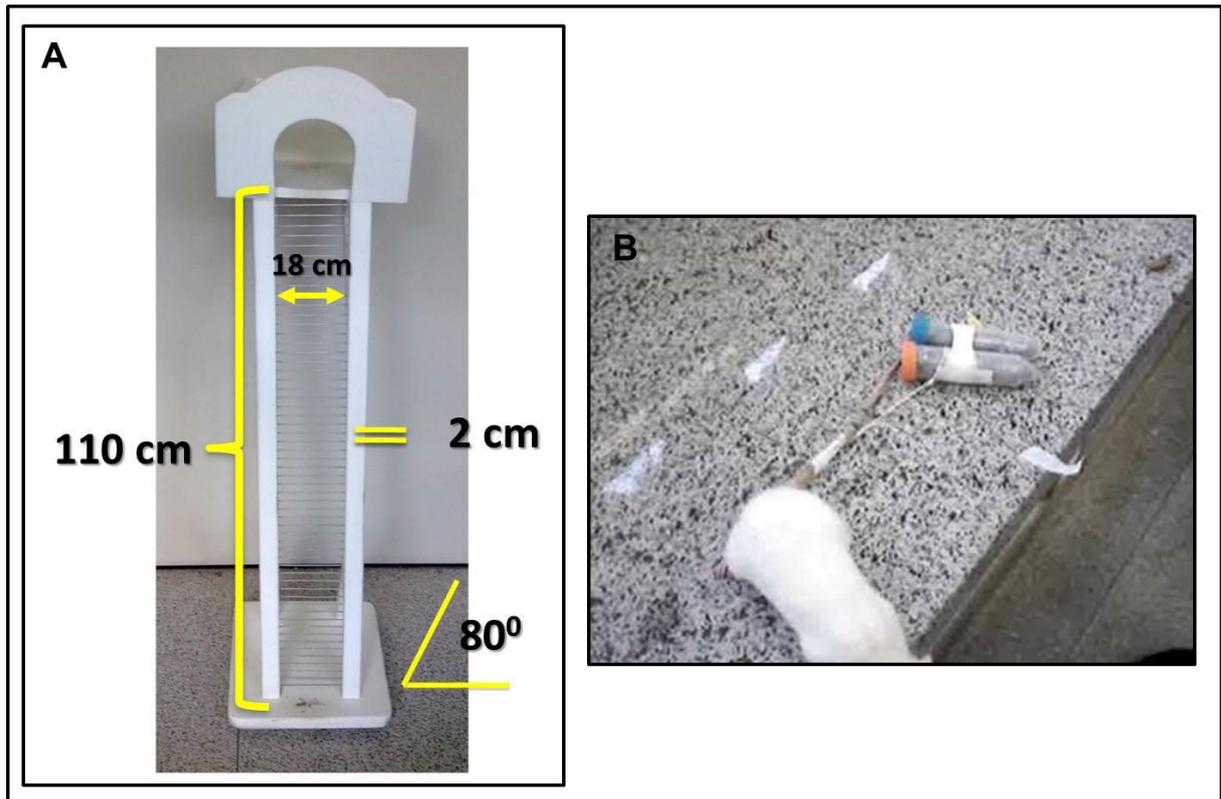


Figura 5. A) Escada para treinamento resistido e B) Localização do aparato de carga na cauda do animal (Pereira, 2010).

Três dias após a última sessão de familiarização foi realizada a primeira sessão de treinamento que consistiu de 4 a 8 escaladas com cargas progressivamente mais pesadas. A escalada inicial consistiu em carregar uma carga correspondente a 75% da massa corporal do animal atado em sua cauda. Após completar o carregamento desta carga inicial com sucesso, um peso adicional de 30 g era adicionado ao aparato e uma nova escalada era realizada. Este procedimento de acréscimo de 30 g foi sucessivamente repetido em um número máximo de oito

escaladas, até que se alcançasse uma sobrecarga que não permitia que a rata escalasse toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguia progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento (carga máxima) da rata para aquela sessão de treinamento, carga a qual, foi utilizada para a determinação da carga de carregamento utilizada para a próxima sessão de treinamento.

As sessões de treinamento seguintes, até o final do período de treinamento, consistiram inicialmente de quatro escaladas, com 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subsequentes em um número máximo de cinco escaladas eram adicionados 30g em cada nova escalada realizada com sucesso, até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada. O intervalo de recuperação entre as escaladas foi fixo de 2 minutos.

O treinamento das ratas dos grupos treinamento resistido (Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-TRH) ocorreu durante um período de doze semanas, sendo as sessões de treino realizadas uma vez a cada 3 dias, ou seja, entre as sessões havia um intervalo de 72 horas. O início das sessões de treino sempre ocorreu às 14 horas.

A organização da carga de carregamento por sessão de treino, os dias de treino semanalmente e os pesos utilizados nos aparatos como sobrecarga de treino estão demonstrados na figura 6.

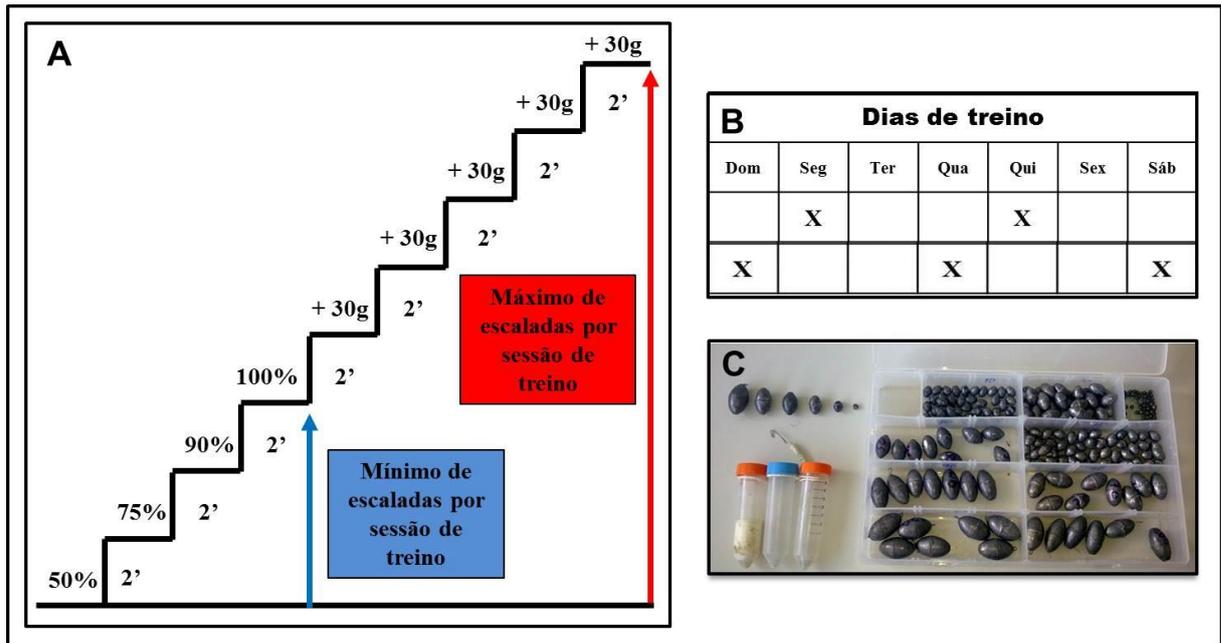


Figura 6. A) organização da carga de carregamento por sessão de treino. B) dias de treino. C) Pesos utilizados nos aparatos de treino.

3.5 Terapia de reposição hormonal (TRH)

Os animais dos grupos terapia de reposição hormonal (TRH) Ovx-Sed-TRH e Ovx-TR-TRH foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de implantação subcutânea de cápsulas silásticas preenchidas com uma solução de 180 µg de 17 β-estradiol/ml de óleo de girassol com a finalidade de reposição hormonal, de acordo com as técnicas descritas por Strom et al. (2008).

As cápsulas silásticas são segmentos de 30 milímetros de tubo silástico (diâmetro interno/externo 1,575/3,175 milímetros) preenchidos com uma solução de 180 µg de 17 β-estradiol dissolvido em 01 ml de óleo de girassol. Para confecção das cápsulas silásticas utilizadas na presente pesquisa, inicialmente o tubo silástico de 30 milímetros foi cortado em pedaços de 15 milímetros preenchidos com a

solução de 17β -estradiol e selado nas extremidades com cola de silicone, o que resultou em uma coluna de óleo- 17β -estradiol.

Na figura 7 estão apresentados os três recursos materiais convencionalmente utilizados para a finalidade de terapia de reposição hormonal.

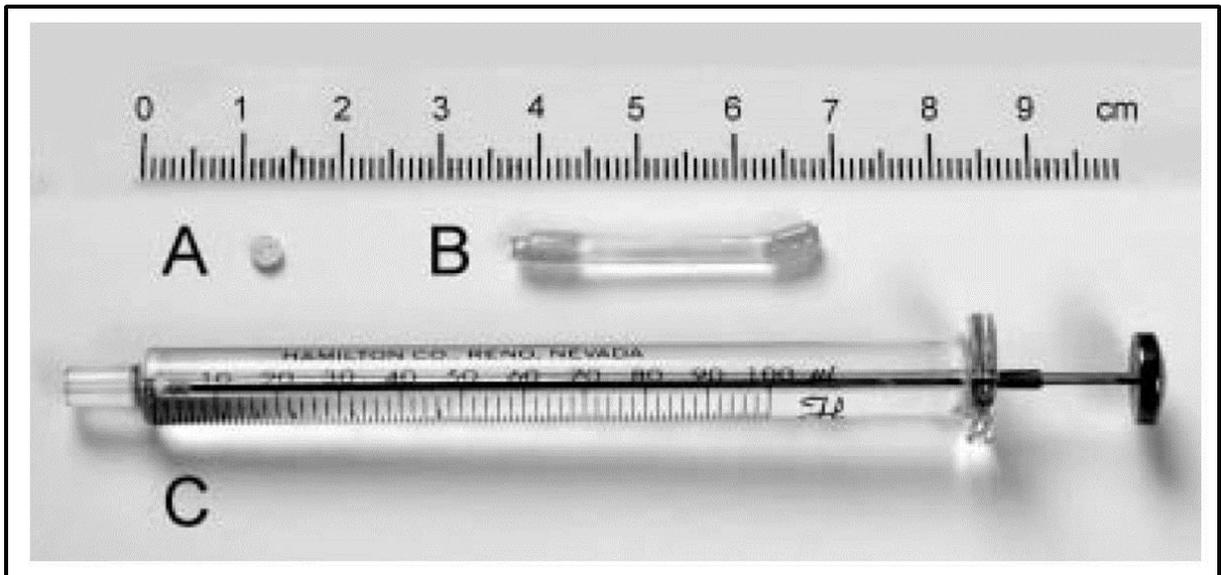


Figura 7. Recursos materiais utilizados para administração do 17β -estradiol. A) Pellet de liberação lenta. B) Cápsula silástica. C) Seringa para injeções diárias. Fonte: (STROM et al., 2008).

Após a confecção das cápsulas silásticas e um dia antes da implantação, as mesmas foram armazenadas durante a noite (*overnight*) em um frasco contendo a mesma solução de 17β -estradiol utilizada para o preenchimento das cápsulas. Antes da implantação as cápsulas foram cuidadosamente lavadas. No dia da implantação, inicialmente as ratas foram anestesiadas com uma mistura de Ketamina (61,5 mg/kg de massa corporal) e Xilazina (7,6 mg/kg de massa corporal) por meio de injeção intraperitoneal. Com a rata anestesiada foi feita uma incisão de 0,5 cm no dorso da rata para implantação subcutânea da cápsula. Após implantação

da cápsula silástica a incisão foi suturada e a rata colocada em caixa individual até completo retorno da anestesia.

No trigésimo sexto dia após implantação da cápsula silástica uma nova cápsula (segundo implante) foi implantada seguindo os mesmos procedimentos descritos acima.

Segundo Strom et al (2008), esta técnica de administração de 17β -estradiol produz níveis séricos fisiológicos de estradiol significativamente diferente a dos animais ovariectomizados, ainda de acordo com os mesmos autores, as cápsulas silásticas são superiores aos pellets de liberação lenta e as injeções diárias para a produção confiável de concentrações a longo prazo de 17β -estradiol dentro da faixa fisiológica.

3.6 Controle da ingestão alimentar e da massa corporal

A ingestão alimentar (gramas de ração consumida por gaiola) foi monitorada diariamente sempre no mesmo horário do dia, entre 13h00min e 13h30min e a massa corporal verificada três vezes na semana, todas as segundas, quartas e sextas-feiras sempre no mesmo horário entre 13h00min e 14h00min. Ambos os procedimentos foram realizados durante todo o período experimental.

3.7 Eutásia e coleta dos tecidos

Os animais dos grupos treinamento resistido foram eutanasiados por decapitação 48h após a última sessão de treinamento para minimizar quaisquer efeitos de interferência decorrentes da última sessão de treino sobre as análises

realizadas. Os animais dos grupos sedentários também foram eutanasiados por decapitação respeitando a mesma duração do experimento para todos os grupos.

Imediatamente após a decapitação o cérebro foi removido e as áreas de interesse dissecadas. As áreas cerebrais dissecadas incluíram: córtex lobo frontal (CX), hipocampo (HC) e hipotálamo (HT), após a dissecação das áreas, as mesmas foram armazenadas em tubos de criogenia, imediatamente congelados no nitrogênio líquido e armazenados no freezer a -80°C até o momento das análises. As três áreas cerebrais (CX, HC e HT) foram processadas para determinação e quantificação da expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm).

Vários outros órgãos e tecidos foram removidos e armazenados, a saber: fígado, útero, os depósitos de gordura mesentérica, parametrial e retroperitoneal, três músculos esqueléticos do membro posterior direito (sóleo, plantar e gastrocnêmio) foram rapidamente removidos e pesados. Fêmur direito foi removido e seu peso úmido determinado após um período curto de ebulição em uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% para remoção do tecido circundante.

3.8 Desenho experimental

A figura 8 apresenta um resumo do desenho experimental da pesquisa deste a chegada dos animais ao biotério do laboratório de fisiologia do exercício da UFSCar até o momento da eutanásia.

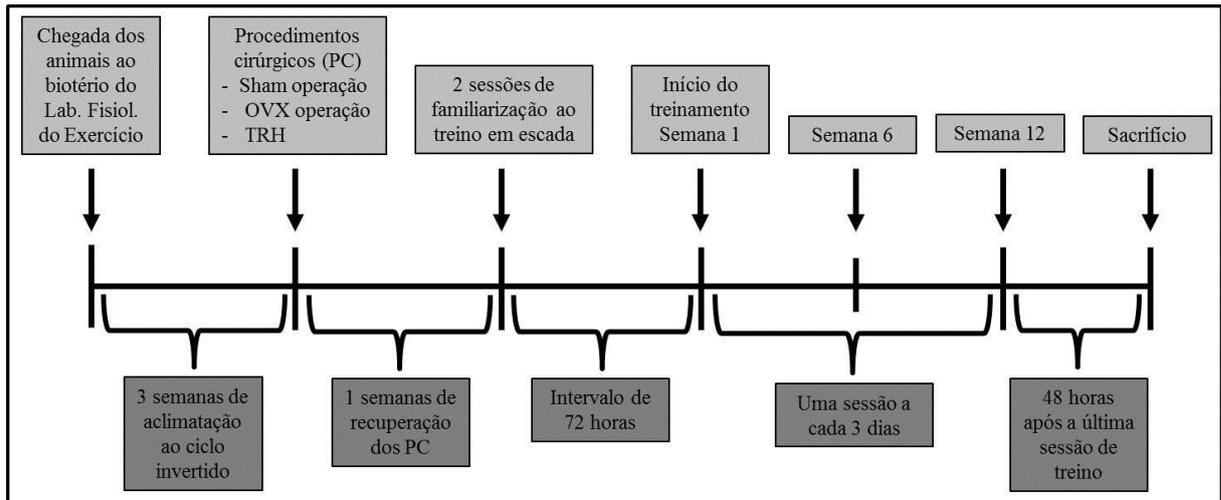


Figura 8. Desenho experimental

3.9 Quantificação da expressão gênica do PGC1- α , NRF-1, TFAM e GAPDH

A quantificação da expressão gênica do Coativador 1 α do Receptor Gama Ativado pelo Proliferador de Peroxissoma (PGC1- α), do Fator Respiratório Nuclear 1 (NRF-1), do Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM ou mtTFA) e do GAPDH foi realizada pela quantificação do seu RNAm por Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real (PCR-RT). Esta análise foi realizada no laboratório de Fisiologia do Exercício em conjunto com o laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar.

3.9.1 Procedimentos gerais

Para reduzir a presença de ácidos ribonucleases (RNases), foram adotados os seguintes cuidados em todos os procedimentos: utilização de material esterilizado descartável; autoclavagem da vidraria, microtubos e ponteiros utilizadas;

manipulação de amostras e materiais com luvas; utilização de água tratada com dietil-pirocarbonato (água DEPC, autoclavada).

3.9.2 Extração do RNA total

Para análise da expressão gênica das proteínas PGC1- α , NRF-1, TFAM, e GAPDH o RNA total das áreas cerebrais de interesse; córtex lobo frontal (CX), hipocampo (HC) e hipotálamo (HT) foram extraídos com o reagente Tri *Reagent*[®] (Sigma-Aldrich, USA) de acordo com as especificações do fabricante.

No dia da extração, a área total dissecada era homogeneizada em 1 ml de Tri *Reagent*[®] seguindo os seguintes procedimentos:

- (I) Inicialmente o microtubo com o tecido era retirado do nitrogênio líquido e o tecido triturado com pistilo cônico em polipropileno autoclavável (Bellart[®]);
- (II) Após a trituração inicial era adicionado 100 μ l do reagente Tri *Reagent*[®] para término manual da trituração do fragmento de tecido;
- (III) Após a trituração com 100 μ l de Tri *Reagent*[®] era acrescentado 900 μ l do reagente Tri *Reagent*[®] e homogeneizado manualmente por 15 segundos.

Após a homogeneização as amostras permaneciam por 10 minutos encubadas em gelo. Logo em seguida, era adicionado 200 μ l de clorofórmio e as amostras homogeneizadas manualmente por 15 segundos. Logo após, as amostras eram novamente encubadas em gelo por 10 minutos, e em seguida, centrifugadas em centrifuga refrigerada (*Eppendorf*[®] 5804R) por 15 minutos a 12.500 rpm a 4°C.

Seguido a centrifugação o sobrenadante (fase aquosa) aproximadamente 450 µl era transferido para um novo microtubo esterilizado (Eppendorf®).

Após a transferência do sobrenadante para um novo microtubo era adicionado 460 µl de isopropanol e 40 µl de acrilamida (5mg/ml) e as amostras homogeneizadas manualmente por 15 segundos, e após, as amostras eram encubadas em gelo por 10 minutos. A seguir, as amostras eram centrifugadas por 10 minutos a 12.500 rpm a 4° C para formação do pellet. Em seguida, o sobrenadante era descartado com cuidado por inversão manual e adicionado no microtubo 950 µl de etanol 75% (diluído com água tratada com Dietil Pirocarbonato - água DEPC 0,1%) e em seguida colocado no vortex (Eppendorf®) por 10 segundos para homogeneizar o pellet. Após nova centrifugação, por 5 minutos a 10.000 rpm a 4° C, novamente o sobrenadante era descartado com cuidado por inversão manual, e caso necessário o restante de etanol 75% era aspirado com auxílio de uma pipeta. Posteriormente ao descarte do sobrenadante, o microtubo contendo o pellet era colocado para secagem por 10 minutos em temperatura ambiente. Após secagem, o pellet foi ressuscitado com 30 a 60 µL de água DEPC desativada, o microtubo colocado no vortex por 10 segundos, e em seguida, as amostras colocadas em banho Maria a 55⁰C por 10 minutos.

Após o procedimento de banho Maria as amostras eram colocadas no vortex por 15 segundos, em seguida, transferidas para a centrifuga refrigerada para realização do Spin e finalmente as amostras eram armazenadas no freezer a -80⁰ C até o momento das análises.

Para avaliação da concentração e pureza do RNA total, foram realizados ensaios espectrofotométricos sob comprimento de onda de 260 e 280 nm. A razão $A_{260/280}$ é proporcional à concentração de RNA total na amostra.

3.9.3 Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA total em ng/ μ l e a determinação do grau de pureza das amostras foram realizadas por meio da determinação das absorvâncias nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm, sendo as leituras realizadas no NanoDrop 2000c Espectrofotômetro (Thermo Scientific®). Para realização das leituras espectrofotométricas foi pipetado sempre 1 μ l do estoque de RNA total das amostras no pedestal do NanoDrop e realizada a leitura.

O grau de pureza do RNA foi determinado pela razão $A_{260/280}$, considerando-se adequados os valores entre 1,8 e 2,0.

3.9.4 Determinação da integridade do RNA total

A integridade do RNA total foi confirmada pela visualização em luz ultravioleta do padrão de eletroforese das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (figura 9).

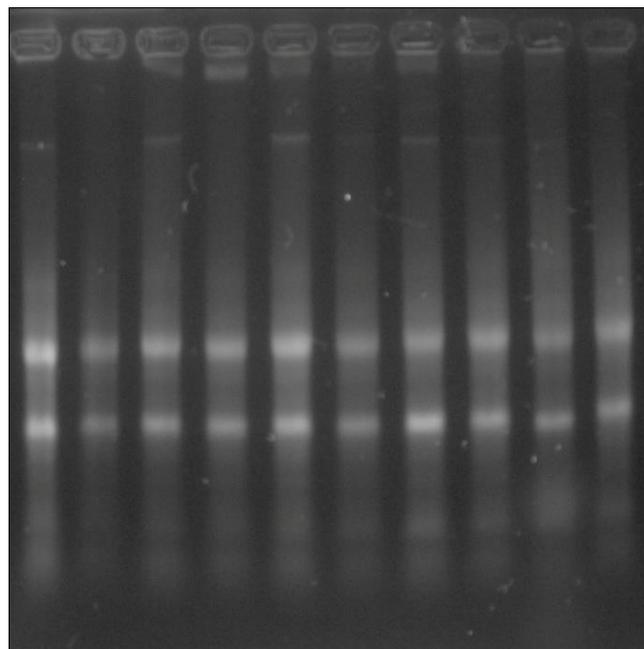


Figura 9. Exemplo de um gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio indicando a integridade do RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 28S e 18S.

3.9.5 Transcrição reversa

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

Após o tratamento com DNase, o RNA mensageiro (RNAm) foi transcrito de forma reversa em DNA complementar (cDNA) utilizando o kit de síntese de cDNA da Bio-Rad, USA. Para síntese do cDNA foi pipetado em microtubo os seguintes reagentes:

- (I) Volume de RNA proporcional para uma quantidade de 1µg de RNA;
- (II) 5 µl do mix Bio-Rad para síntese de cDNA, sendo que 1 µl iScript reverse transcriptase;
- (III) Água ultra limpa livre de nucleases em volume proporcional para volume final de 20 µl.

Em seguida, as amostras foram estocadas a -80° C até o momento das análises.

3.9.6 Reação em cadeia da polimerase – tempo real (PCR-RT)

Foram utilizados os seguintes reagentes para cada amostra de cDNA (40 ng/μl), em duplicata.

- 7,125 μl de água livre de nucleases
- 0,5 μl primer forward
- 0,5 μl primer reverse
- 0,625 μl de cDNA
- 6,25 μL EVA[®] Green (Sigma-Aldrich, USA)
- Volume final 15 μl

As amostras foram processadas no Termociclador de placa de 96 poços *CFX384 TouchTM* (BIO-RAD) e os ciclos consistiram de 95⁰C por 10 minutos, seguidos de 42 ciclos de amplificação a 95⁰C por 15 segundos; temperatura de anelamento (T_m) variando conforme a especificidade do gene analisado de 59,6 a 68⁰C por 30 segundos e 72⁰C por 30 segundos. A curva Melt foi produzida ao final dos 42 ciclos de amplificação iniciando a 70⁰C e finalizando a 90⁰C com incrementos de 0,5⁰C a cada 30 segundos. As T_m dos primers foram previamente padronizadas.

Os primers utilizados foram adquiridos da Invitrogen Life Technologies e suas seqüências estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos primers usados para PCR-RT

Genes	Sense forward (5'-3')	Antisense reverse (5'-3')	N. de acesso
PGC-1α	GGCCCGCTACAGTGAGTGTT	ATTGCTCCGCCCTTTCTT	NM_031347.1
NRF-1	GGGAAAGAAAGCTGCAAGCC	TGGTCCGTAATGCTTGGGTC	NM_0011007 08.1
TFAM	CAAGACTGTGCGTGCATCTG	TTCACAAACCCGCACGAAAC	NM_031326.1
GAPDH	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCTG	GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA	NM_017008.3

PGC1-α = Coativador-1α do Receptor Gama Ativado pelo Proliferador de Peroxissoma; NRF-1 = Fator Respiratório Nuclear 1; TFAM = Fator de Transcrição Mitocondrial A; GAPDH = Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

O GAPDH foi utilizado como controle endógeno para cálculo da expressão relativa dos produtos do PCR-RT determinada pelo método do delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$).

Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas MELT como demonstrado na figura 10.

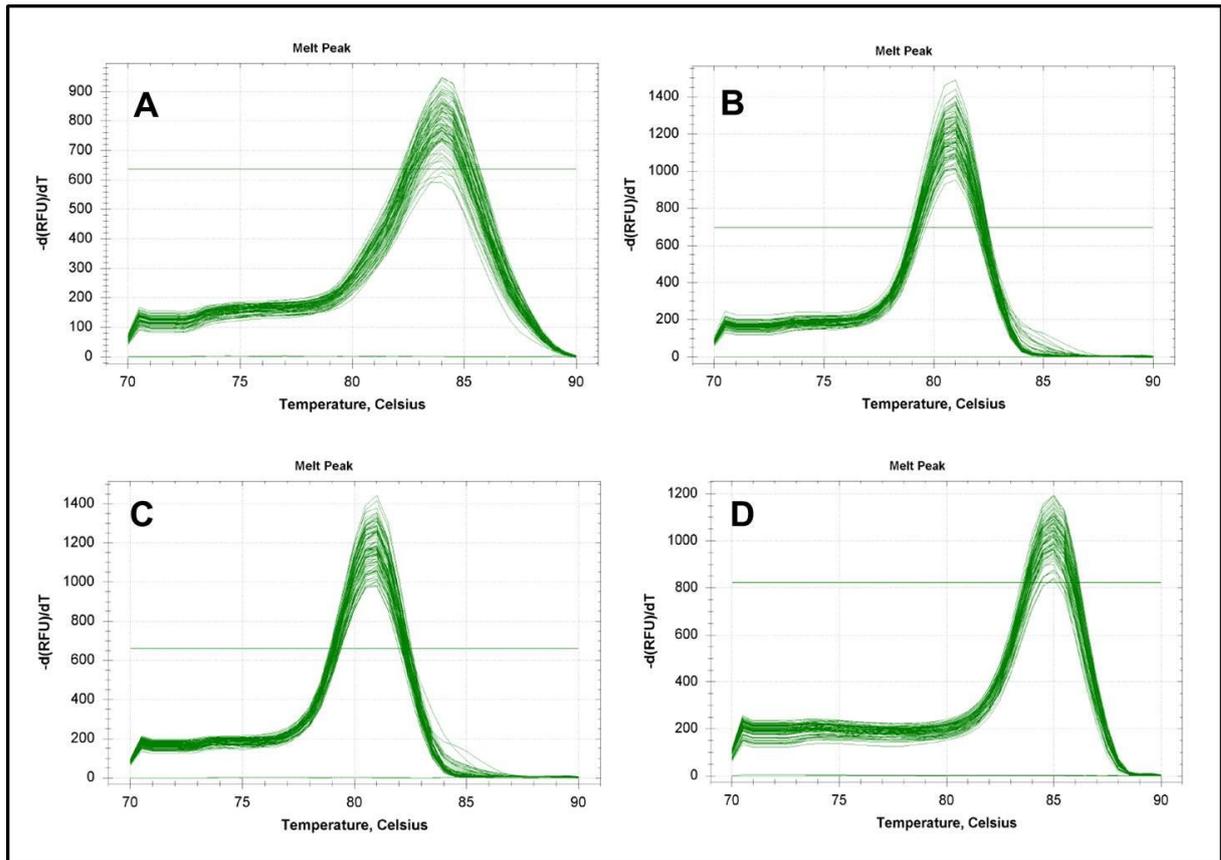


Figura 10. Exemplos de curvas MELT originais representativas dos ciclos do PCR-RT. A) PGC-1 α , B) NRF-1, C) TFAM e D) GAPDH.

Os valores de threshold cycle (Ct) e as curvas de MELT foram obtidos pelo *Software* CFX384. O Ct é o ponto onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com o menor número de ciclos durante a fase exponencial da amplificação (figura 11).

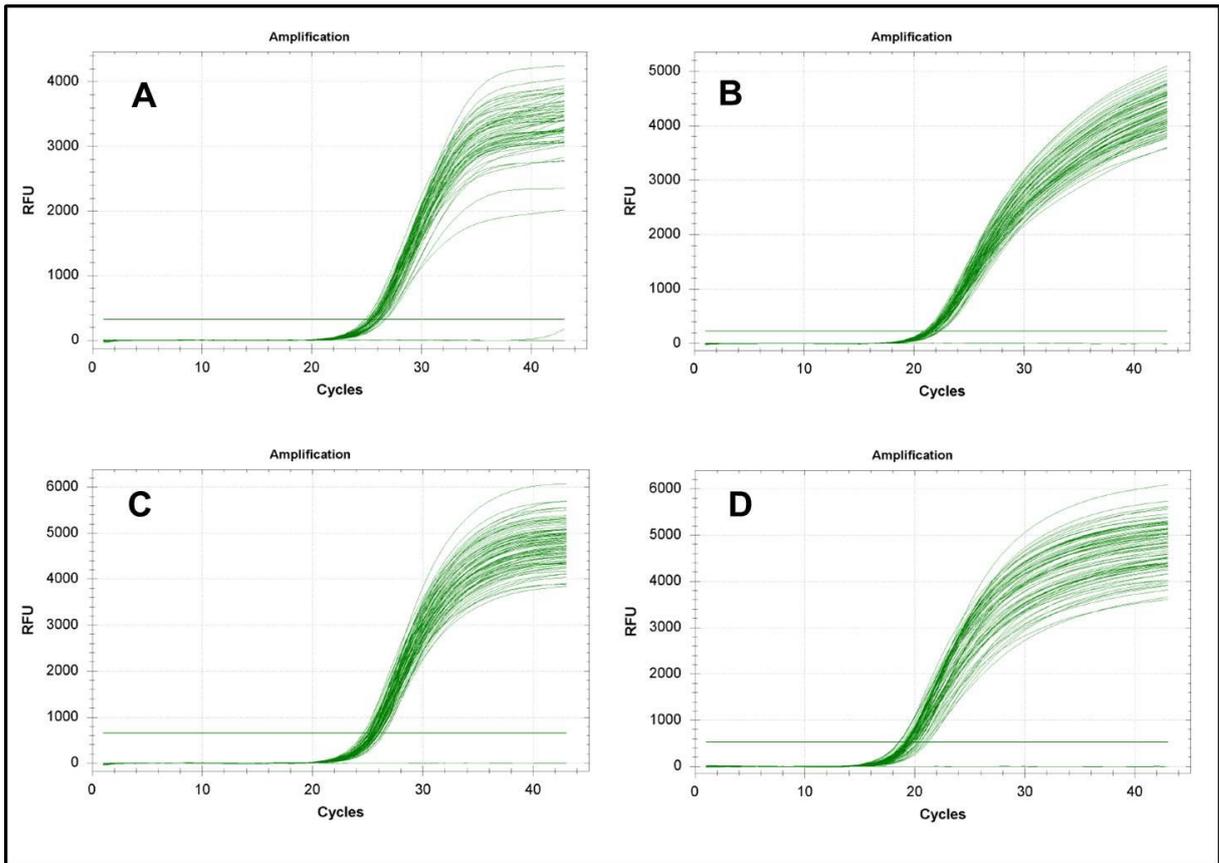


Figura 11. Exemplos de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT. A) PGC-1 α , B) NRF-1, C) TFAM e D) GAPDH.

O nível de expressão comparativa de cada condição foi calculado pelo método do delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Inicialmente foi calculado a média dos Ct de cada gene e posteriormente calculado:

- a) Delta Ct (ΔCt) = Ct do GAPDH – Ct do gene alvo;
- b) Cálculo da média S = Média do ΔCt ;
- c) $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{média S}$

Os $\Delta\Delta Ct$ dos grupos Sham-Sed, Sham-TR, Ovx-Sed, Ovx-TR, Ovx-Sed-TRH e Ovx-TR-TRH foram calculados em relação ao grupo Sham-Sed. O valor em unidades arbitrárias (UA) da expressão dos genes alvos foram calculados por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Com os valores em UA foram realizados os testes estatísticos.

3.10 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi iniciada com o teste de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov*). Todas as variáveis apresentaram distribuição normal, sendo utilizado o teste paramétrico de análise de múltiplas variâncias (MANOVA) levando em consideração três variáveis: ovariectomia x treinamento resistido x terapia de reposição hormonal. Foi utilizado também o teste paramétrico ANOVA One-way com teste post-hoc de Fisher's para determinação das diferenças significativas entre os grupos experimentais. Todas as informações foram processadas no pacote estatístico OringinPro 8[®] adotando-se um nível de significância de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos da ovariectomia, do treinamento resistido e da terapia de reposição hormonal sobre parâmetros antropométricos

Os resultados referentes aos parâmetros antropométricos apresentados na tabela 2 demonstram que as ratas do grupo Ovx-Sed apresentaram massa corporal 23% maior, ingestão alimentar diária 11% maior e peso do depósito de gordura retroperitoneal 52% maior que as ratas do grupo Sham-Sed ($p < 0,05$) e, peso da soma dos três músculos esqueléticos (sóleo, plantar e gastrocnêmio) relativo ao peso corporal 9% menor quando comparado com o mesmo grupo ($p < 0,05$). Adicionalmente, a ovariectomia resultou em menor peso do fêmur (-11%, $p < 0,05$) e peso do útero (-83%, $p < 0,05$) indicando os efeitos fisiológicos da ausência dos hormônios ovarianos proporcionados pela ovariectomia bilateral. No entanto, as ratas do grupo Ovx-Sed-TRH apresentaram peso corporal 12% menor e peso do fêmur e do útero 13% e 481% maiores respectivamente, que as ratas do grupo Ovx-Sed ($p < 0,05$), o que indica os efeitos fisiológicos da TRH. Embora o peso corporal tenha sido maior do que das ratas do grupo Sham-Sed (+9%, $p < 0,05$). Além disso, as ratas do grupo Sham-TR apresentaram menor peso dos depósitos de gordura: parametrial (-23%, $p < 0,05$) e mesentérica (-43%, $p < 0,05$) e maior peso do fêmur (+12%, $p < 0,05$) quando comparado com o grupo Sham-Sed (Tabela 2).

As ratas do grupo Ovx-TR apresentaram peso corporal e peso do depósito de gordura retroperitoneal 6% e 35% menores respectivamente, quando comparado ao grupo Ovx-Sed (Tabela 2).

Quando se compara o grupo Ovx-TR-TRH com os grupos Ovx-Sed e Ovx-TR, o grupo Ovx-TR-TRH apresentou menor peso corporal do que os grupos Ovx-Sed e Ovx-TR (-15% e -9%, $p < 0,05$), respectivamente, e maior peso da soma dos três músculos esqueléticos (sóleo, plantar e gastrocnêmio) relativo ao peso corporal do que os grupos Ovx-Sed e Ovx-Sed-TRH (+8% e +13%, $p < 0,05$), respectivamente. O mesmo grupo (Ovx-TR-TRH) apresentou peso relativo do fêmur 17% e 8% maior do que os grupos Ovx-Sed e Ovx-TR ($p < 0,05$), respectivamente, o que demonstra que a associação da terapia de reposição hormonal com o treinamento resistido é mais eficaz do que o treinamento resistido como única intervenção para a manutenção da massa óssea. No entanto, não foi observada nenhuma diferença significativa na comparação entre os grupos Ovx-TR-TRH e Ovx-Sed-TRH. Todos os resultados supracitados encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2. Efeitos da ovariectomia, do treinamento resistido e da terapia de reposição hormonal sobre parâmetros antropométricos

	Sham-Sed	Sham-TR	Ovx-Sed	Ovx-TR	Ovx-Sed-TRH	Ovx-TR-TRH
Massa corporal (g)	301,85 ± 6,56	320,42 ± 4,77	372,10 ± 11,08*	350,40 ± 10,44#δ	328,94 ± 7,57*#§	317,66 ± 8,12#§
Ingestão alimentar (g/d)	21,05 ± 0,50	22,78 ± 0,58	23,39 ± 0,92*	23,25 ± 0,64*	22,28 ± 0,84	22,58 ± 0,75
Gordura parametrial (g)	6,52 ± 0,74	5,05 ± 0,26*	6,93 ± 0,38	6,43 ± 0,42	8,13 ± 0,60δ	6,97 ± 0,69δ
Gordura mesentérica (g)	3,68 ± 0,28	2,10 ± 0,12*	3,14 ± 0,27δ	3,38 ± 0,30δ	3,51 ± 0,28δ	3,35 ± 0,35δ
Gordura retroperitoneal (g)	2,97 ± 0,37	2,25 ± 0,15	4,54 ± 0,26*δ	2,96 ± 0,55#	4,35 ± 0,49*δ§	3,39 ± 0,33δ
Músculos da pata (g/100 g MC)	0,69 ± 0,02	0,67 ± 0,01	0,63 ± 0,01*	0,65 ± 0,02	0,60 ± 0,02*δ§	0,68 ± 0,02#&
Peso do útero (g)	0,67 ± 0,07	0,63 ± 0,05	0,11 ± 0,00*δ	0,09 ± 0,0*δ	0,64 ± 0,05#§	0,62 ± 0,03#§
Peso do fêmur (g/100 g MC)	0,26 ± 0,005	0,29 ± 0,004*	0,23 ± 0,006*δ	0,25 ± 0,010	0,26 ± 0,007#	0,27 ± 0,004#§

Valores são médias ± erro padrão da média; n = 6 ratas por grupo. d = dia; MC = massa corporal.

*, diferente significativamente de Sham-Sed ($p \leq 0,05$).

δ, diferente significativamente de Sham-TR ($p \leq 0,05$).

#, diferente significativamente de Ovx-Sed ($p \leq 0,05$).

§, diferente significativamente de Ovx-TR ($p \leq 0,05$).

&, diferente significativamente de Ovx-Sed-TRH ($p \leq 0,05$).

4.2 Carga máxima de carregamento nas semanas 1, 6 e 12 de treinamento resistido

Para a carga máxima de carregamento durante as 12 semanas de treinamento, não houve nenhuma interação entre grupo e tempo, indicando que os grupos Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-TRH aumentaram a capacidade máxima de carregamento de maneira similar durante o período de treinamento (Figura 12). As cargas máximas de carregamento aumentaram significativamente após a semana 6 e semana 12 quando comparado com a semana 1, e após a semana 12 comparado com a semana 6. As ratas dos grupos Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-TRH apresentaram carga máxima de carregamento 54%, 50% e 40%, respectivamente, maior na semana 6 (Sham-TR = $724,83 \pm 44,81$ g; Ovx-TR = $756,50 \pm 30,33$ g e Ovx-TR-TRH = $768,00 \pm 43,45$ g) do que na semana 1 (Sham-TR = $469,83 \pm 29,40$ g; Ovx-TR = $503,16 \pm 26,46$ g e $548,00 \pm 16,30$ g), e 27%, 23% e 23% maior na semana 12 (Sham-TR = $918,16 \pm 38,11$ g; Ovx-TR = $929,83 \pm 42,66$ g e $941,33 \pm 50,79$ g) do que na semana 6, respectivamente para os grupos Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-TRH (Figura 12). Deste modo, não houve nenhuma diferença nas cargas máximas de carregamento entre os grupos treinados cronicamente durante o período de 12 semanas.

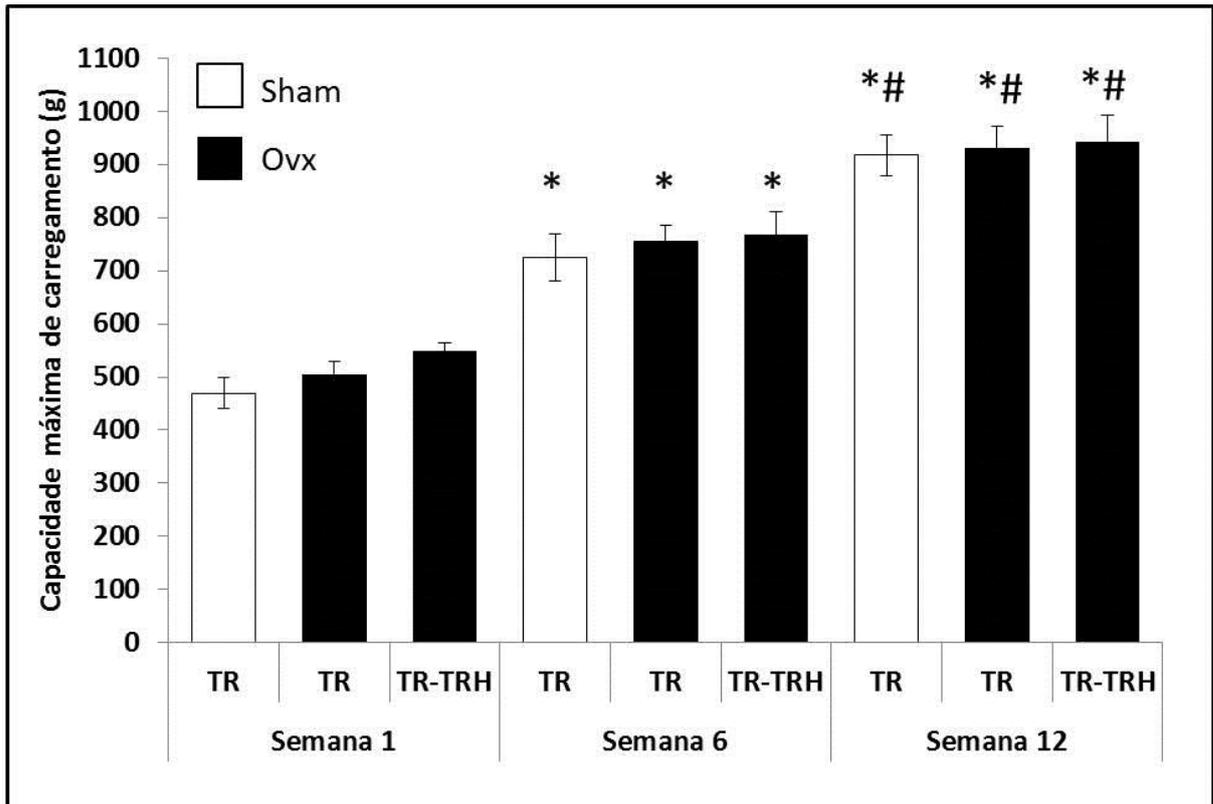


Figura 12. Carga máxima de carregamento (g) dos grupos Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-TRH nas semanas 1, 6 e 12. Os valores são médias \pm erro padrão da média (n = 6 por grupo). *, significativamente diferente de semana 1; #, significativamente diferente de semana 6 ($p < 0,05$).

4.3 Expressão dos fatores da biogênese mitocondrial

Foram examinados os níveis de expressão do RNAm de três fatores de transcrição considerados essenciais para o controle da formação de novas mitocôndrias, o PGC-1 α , o NRF-1 e TFAM em três diferentes áreas cerebrais, córtex lobo frontal, hipocampo e hipotálamo.

4.3.1 Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no córtex lobo frontal

Análise por PCR-RT demonstrou que 12 semanas de TR resultou em aumento significativo da expressão gênica do PGC-1 α , aumento de 26% ($p < 0,05$) (figura 13A), do NRF-1, aumento de 24% ($p < 0,05$) (figura 13B) e do TFAM, aumento de 41% ($p < 0,05$) (figura 13C), quando comparado com as ratas do grupo Sham-Sed. Estes resultados demonstram, em parte, os potenciais benéficos do treinamento resistido como uma estratégia alternativa para aumentar a capacidade oxidativa do córtex cerebral. Além disso, as ratas do grupo Ovx-TR-TRH mostraram maior expressão do NRF-1 (31%, 32% e 27%; $p < 0,05$) quando comparado com as ratas dos grupos Sham-Sed, Ovx-Sed e Ovx-TR, respectivamente.

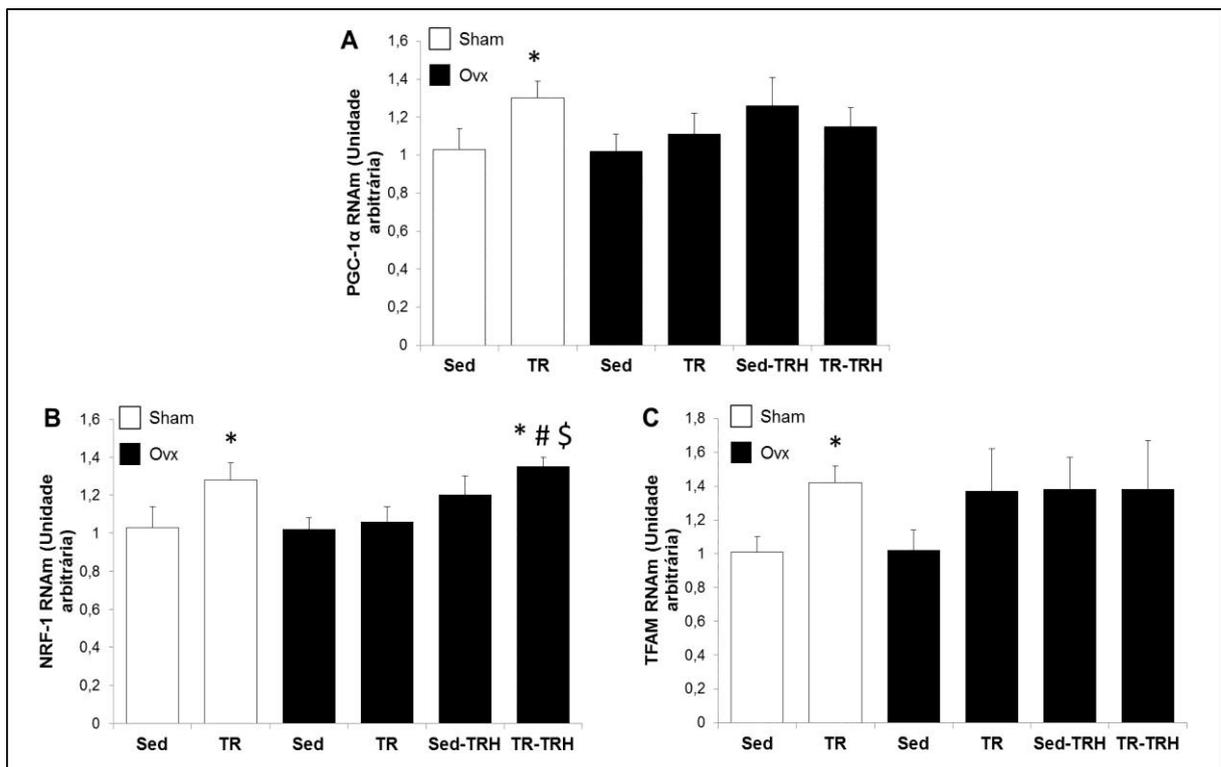


Figura 13. Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no córtex. (A) Coativador 1 α do Receptor Gama Ativado pelo Proliferador de Peroxissoma (PGC1- α); (B) Fator Respiratório Nuclear 1 (NRF-1); (C) Fator de Transcrição Mitocondrial A

(TFAM) nos grupos Sham sedentário (Sham-Sed), Sham treinamento resistido (Sham-TR), ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed), ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr), ovariectomizado sedentário terapia de reposição hormonal (Ovx-Sed-TRH) e ovariectomizado treinamento resistido terapia de reposição hormonal (Ovx-TR-TRH). Valores são médias \pm erro padrão da média, $p < 0,05$ ($n = 6$ por grupo). *, diferente significativamente de Sham-Sed; #, diferente significativamente de Ovx-Sed; \$, diferente significativamente de Ovx-TR.

4.3.2 Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no hipocampo

Os resultados referentes à expressão dos genes da biogênese mitocondrial no hipocampo apresentados na figura 14 demonstram que as ratas do grupo Sham-TR apresentaram expressão gênica do PGC-1 α 28% maior, do NRF-1 31% maior e do TFAM 29% maior do que as ratas do grupo Sham-Sed ($p < 0,05$). Além disso, as ratas do grupo Ovx-Sed demonstraram menor expressão dos genes da biogênese mitocondrial quando comparado com o grupo Sham-Sed. Esta menor expressão foi de 28%, 29% e 20% para os genes PGC-1 α , NRF-1 e TFAM, respectivamente. No entanto, as ratas do grupo Ovx-TR demonstraram expressão gênica do PGC-1 α 22% maior do que as ratas do grupo Ovx-Sed ($p < 0,05$), porém, 32% menor do que as ratas do grupo Sham-TR ($p < 0,05$). Para a expressão gênica do NRF-1, as ratas do grupo Ovx-TR apresentaram expressão 31% maior do que as ratas do grupo Ovx-Sed ($p < 0,05$), e, 29% menor do que as ratas do grupo Sham-TR ($p < 0,05$). Já para a expressão gênica do TFAM, as ratas do grupo Ovx-TR demonstraram expressão 10% maior do que as ratas do grupo Ovx-Sed ($p < 0,05$), mas, 32% menor do que as ratas do grupo Sham-TR ($p < 0,05$). No entanto, não

houve diferenças significativas na expressão dos genes PGC-1 α , NRF-1 e TFAM quando os grupos Sham-Sed e Ovx-TR foram comparados, o que pode indicar um reestabelecimento na expressão desses genes em ratas ovariectomizadas quando submetidas ao treinamento resistido, aja visto, que todos os genes analisados tiveram uma menor expressão no grupo Ovx-Sed quando comparado com o grupo Sham-Sed, o que pode tornar o treinamento resistido uma estratégia alternativa para conter os efeitos da menor expressão dos genes da biogênese mitocondrial induzidos pela ovariectomia. Por fim, no hipocampo a expressão gênica do TFAM foi 30% maior no grupo Ovx-Sed-TRH do que no grupo Ovx-Sed sem diferença significativa para o grupo Sham-Sed, o que indica que a expressão do TFAM foi restaurada pela terapia de reposição hormonal.

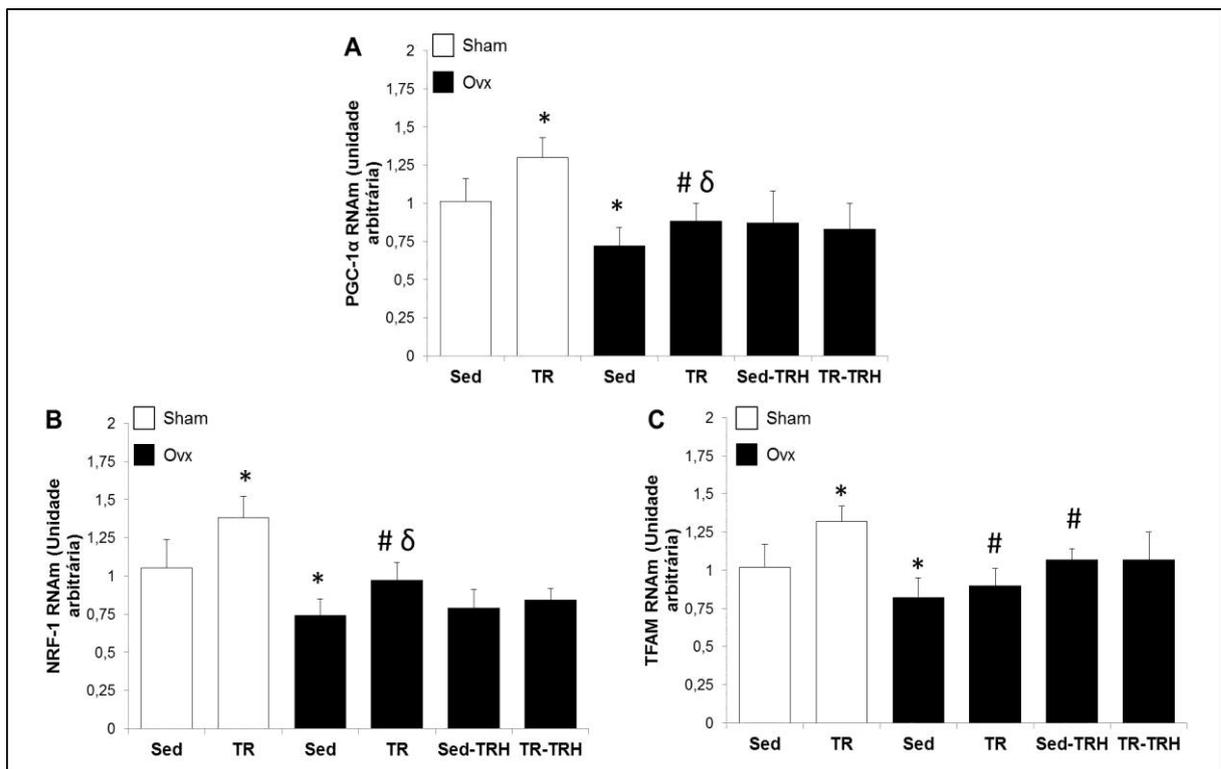


Figura 14. Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no hipocampo. (A) Coativador 1 α do Receptor Gama Ativado pelo Proliferador de Peroxissoma (PGC1- α); (B) Fator Respiratório Nuclear 1 (NRF-1); (C) Fator de Transcrição Mitocondrial A

(TFAM) nos grupos Sham sedentário (Sham-Sed), Sham treinamento resistido (Sham-TR), ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed), ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr), ovariectomizado sedentário terapia de reposição hormonal (Ovx-Sed-TRH) e ovariectomizado treinamento resistido terapia de reposição hormonal (Ovx-TR-TRH). Valores são médias \pm erro padrão da média, $p < 0,05$ ($n = 6$ por grupo). *, diferente significativamente de Sham-Sed; #, diferente significativamente de Ovx-Sed; \$, diferente significativamente de Ovx-TR.

4.3.3 Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no hipotálamo

A análise por PCR-RT demonstrou que após 12 semanas de treinamento resistido as ratas do grupo Sham-TR apresentaram expressão gênica do PGC-1 α 46% maior, do NRF-1 37% maior e do TFAM 64% maior do que as ratas do grupo Sham-Sed ($p < 0,05$). Adicionalmente, a expressão do PGC-1 α foi significativamente maior nos grupos Ovx-Sed e Ovx-TR quando comparados com o grupo Sham-Sed, a expressão do NRF-1 foi significativamente maior no grupo Ovx-Sed-TRH do que no grupo Sham-Sed e a expressão do TFAM foi significativamente maior nos grupos Ovx-Sed e Ovx-Sed-TRH quando comparados com o grupo Sham-Sed. Todos os resultados estão apresentados na figura 15.

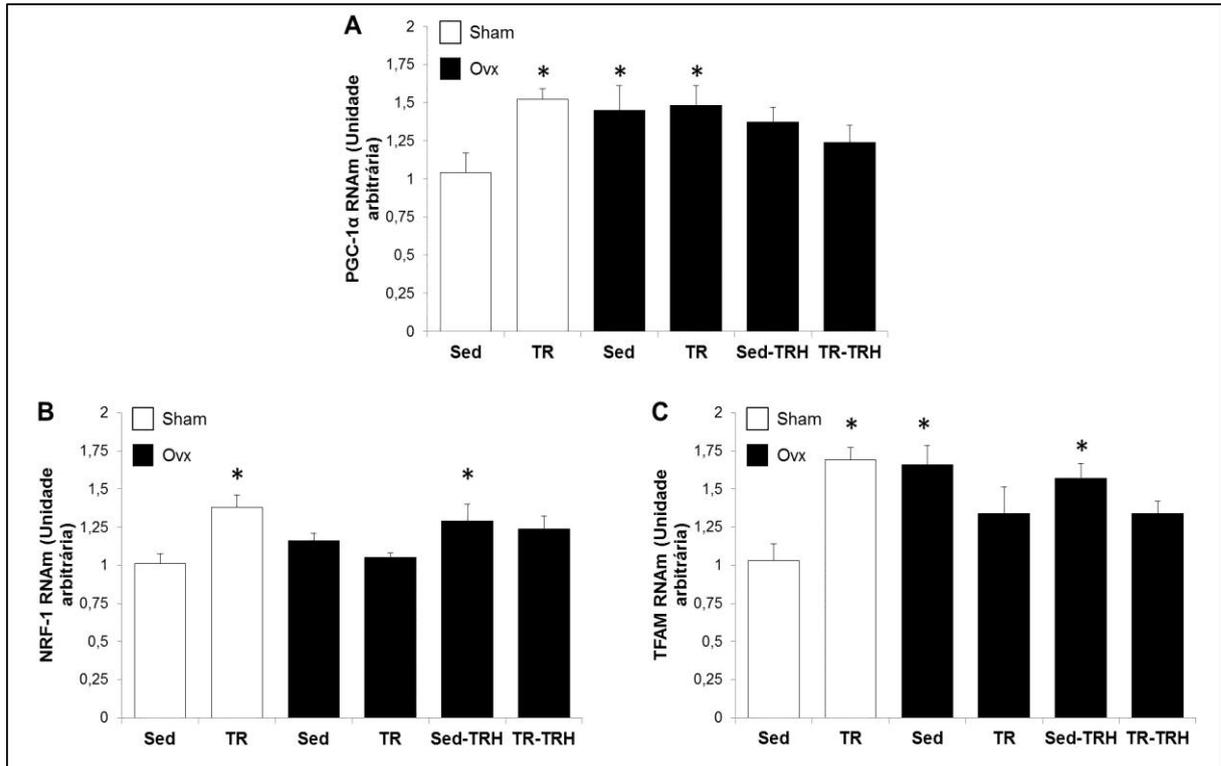


Figura 15. Expressão dos genes da biogênese mitocondrial no hipotálamo. (A) Coativador 1 α do Receptor Gama Ativado pelo Proliferador de Peroxissoma (PGC1- α); (B) Fator Respiratório Nuclear 1 (NRF-1); (C) Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM) nos grupos Sham sedentário (Sham-Sed), Sham treinamento resistido (Sham-TR), ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed), ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr), ovariectomizado sedentário terapia de reposição hormonal (Ovx-Sed-TRH) e ovariectomizado treinamento resistido terapia de reposição hormonal (Ovx-TR-TRH). Valores são médias \pm erro padrão da média, $p < 0,05$ ($n = 6$ por grupo). *, diferente significativamente de Sham-Sed.

5. DISCUSSÃO

Sabe-se que a biogênese mitocondrial ocorre por meio da ativação do PGC-1 α , que é uma proteína reguladora de uma variedade de processos metabólicos incluindo a formação de novas mitocôndrias nos músculos esqueléticos e no coração, e que fatores de transcrição e replicação mitocondrial como o TFAM tem fundamental importância nesse processo (Medeiros, 2008; Viña et al., 2009; Russel et al., 2013). Embora seja bem estabelecido que o treinamento físico aumente a biogênese mitocondrial e a capacidade oxidativa das mitocôndrias musculares, há poucas pesquisas deste tipo de resposta adaptativa no cérebro. Para nosso conhecimento este é o primeiro estudo a examinar mudanças na expressão gênica de moléculas relacionadas com a biogênese mitocondrial em regiões específicas do cérebro de ratas submetidas à ovariectomia, ao treinamento resistido e a terapia de reposição hormonal.

Um dos principais achados do presente estudo foi que as ratas do grupo Ovx-Sed apresentaram menor expressão gênica do PGC-1 α (-28%), do NRF-1 (-29%) e do TFAM (-20%) no hipocampo do que as ratas do grupo Sham-Sed. Além disso, esta menor expressão dos genes reguladores da biogênese mitocondrial foi completamente normalizada no grupo de ratas ovariectomizadas submetidas ao treinamento resistido, demonstrando desta maneira, que o treinamento resistido pode contrabalançar as alterações nos padrões de expressão gênica cerebral induzidos pela ovariectomia, restaurando os níveis de expressão gênica das moléculas chaves relacionadas à biogênese mitocondrial. Adicionalmente, a expressão do TFAM também foi restaurada nas ratas submetidas a ovariectomia e a terapia de reposição hormonal, o que de certa forma indica que tanto o treinamento

resistido quanto a ausência de estrógeno podem modular a expressão de proteínas chaves da biogênese mitocondrial no hipocampo de ratas. Adicionalmente, embora tenha ocorrido um aumento no hipocampo de 20% na expressão gênica do PGC-1 α no grupo de ratas Ovx-Sed-TRH na comparação com o grupo Ovx-Sed este aumento não foi significativamente diferente, possivelmente por causa do tamanho da amostra ou do tamanho do erro padrão da média do grupo Ovx-Sed-TRH. Apesar da diferença não ter sido significativa, acreditamos que este resultado possa ter significado clínico, indicando possíveis efeitos benéficos da terapia de reposição hormonal em reestabelecer a densidade mitocondrial em regiões específicas do cérebro.

Outra contribuição do presente estudo é o resultado original de que o treinamento resistido pode aumentar a expressão gênica dos fatores chaves da biogênese mitocondrial em diferentes regiões do cérebro. A expressão gênica do PGC-1 α foi 26% maior no córtex, 28% maior no hipocampo e 46% maior no hipotálamo das ratas do grupo Sham-TR do que das ratas do grupo Sham-Sed. Do mesmo modo, a expressão gênica do NRF-1 foi significativamente maior 24%, 31% e 37% no córtex, hipocampo e hipotálamo, respectivamente, e a expressão do TFAM também foi significativamente maior 40%, 29% e 64% nas mesmas regiões do cérebro, respectivamente, nas ratas do grupo Sham-TR quando comparado com o grupo de ratas Sham-Sed. Estas respostas moleculares sugerem fortemente que o treinamento resistido aumenta a capacidade oxidativa cerebral, e isto poderia ser um possível mecanismo pelo qual o treinamento aumenta a resistência à fadiga como demonstrado no estudo de Steiner et al (2011), que após oito semanas de treinamento de *endurance* houve um aumento de mais de 70% (pré = 74,1 minutos;

pós = 126,5 minutos) na duração do teste de corrida na esteira até a fadiga, sendo este aumento correlacionado com o aumento da densidade mitocondrial cerebral.

Estes resultados encontrados no presente estudo de diminuição da expressão gênica de marcadores chaves da biogênese mitocondrial no hipocampo de ratas ovariectomizadas e de aumento na expressão destes marcadores no córtex, no hipocampo e no hipotálamo das ratas submetidas ao treinamento resistido, podem estar associados à capacidade de neurogênese do hipocampo e do hipotálamo, o que enseja uma modulação na biogênese mitocondrial destas estruturas em função da maior ou menor demanda energética, visto que, estudos recentes demonstraram que o exercício físico é um indutor robusto do aumento da neurogênese hipocampal (Fabel; Kempermann, 2008; Kannagara et al., 2010; Kohman et al., 2012) e hipotalâmica (Li et al., 2013; Niwa et al., 2015).

Embora os mecanismos que estejam interligados à biogênese mitocondrial possam variar entre os tecidos, o PGC-1 α frequentemente funciona como um regulador chave deste processo, modulando mais de 20% dos genes que estão associados com a capacidade oxidativa tecidual (Corton et al., 2004). O PGC-1 α coativa metabolicamente inúmeros fatores de transcrição nucleares e não nucleares determinantes para a cascata de eventos que resultará na replicação do DNA mitocondrial e na formação de novas mitocôndrias (Houten; Auwerx, 2004; Fink; Kelly, 2006). O PGC-1 α é altamente expresso em tecidos com alta demanda metabólica e oxidativa, como o tecido adiposo marrom, músculo esquelético e cérebro, sendo que um de seus principais alvos é promover a coativação dos fatores de transcrição NRF-1 e NRF-2. Sua ativação coordena a expressão de genes que codificam proteínas mitocondriais (Scarpulla, 2002; Scarpulla, 2011). Parte desta coordenação inclui a expressão do TFAM o que aumenta os níveis e expressão de

DNA mitocondrial (Kang; Hamasaki, 2005; Scarpulla, 2006). Choi et al. (2001) demonstraram que os níveis de TFAM são proporcionais ao conteúdo de DNA mitocondrial, quando a expressão do TFAM é diminuída a replicação do DNA mitocondrial também diminui. Portanto, o aumento na expressão gênica do TFAM previne a redução da expressão proteica desse fator, além de resultar em aumento na biogênese mitocondrial (Medeiros, 2008).

Estudos anteriores de Cotman e Berchtold (2002), Nybo e Rasmussen (2003) e Cotman, Berchtold e Christie (2007) demonstraram que um estresse metabólico substancial ocorre no cérebro tanto em regiões motoras quanto não motoras durante o exercício físico, sendo este estresse metabólico semelhante ao que ocorre no músculo esquelético durante o exercício conhecido por estimular a biogênese mitocondrial muscular. Sendo assim, o exercício físico desde décadas já é conhecido como um potente indutor da biogênese mitocondrial no músculo esquelético (Holloszy; Booth, 1976), no entanto, há poucas evidências que demonstraram este tipo de adaptação decorrente do treinamento físico em regiões específicas do cérebro (Steiner et al., 2011).

A atividade contrátil muscular inicia uma série de eventos fisiológicos e bioquímicos que levam à biogênese mitocondrial. A biogênese é iniciada com um sinal, que tem sua magnitude relacionada com a intensidade e a duração do estímulo contrátil. É proposto que o exercício aeróbio (exercício de *endurance*) provoca um maior estímulo à biogênese da mitocôndria do que o exercício resistido (Steiner et al., 2011).

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) tem sido implicada neste processo, pois a mesma monitora a homeostase energética intracelular e é ativada quando a razão AMP/ATP aumenta (Hardie, 2011). Condições estressantes como

exercício, privação alimentar e disfunções mitocondriais aumentam a atividade desta molécula (Romanello et al., 2010). Neste sentido, a sobrecarga energética imposta pelo exercício aumenta a razão AMP/ATP o que ativa a AMPK que pode resultar na proliferação mitocondrial (Chabi et al., 2005). Drogas que ativam a AMPK também resultam em biogênese mitocondrial.

Steiner et al. (2011) sugerem que o exercício físico independente de sua natureza, resistido ou de *endurance*, estimula vias moleculares semelhantes no cérebro e no músculo, o que torna provável que estes fatores também estejam envolvidos na biogênese mitocondrial no cérebro.

Um aumento na biogênese mitocondrial induzido pelo exercício físico também pode ter implicações importantes em várias doenças neurológicas em que a disfunção mitocondrial é uma característica marcante, incluindo distúrbios psiquiátricos, doenças genéticas e neurodegenerativas (Finsterer, 2006; Lin and Beal, 2006; Rezin et al. 2009). O estudo de St-Pierre et al. (2006) com ratos nocautes para PGC-1 α demonstrou que os animais nocautes apresentaram maior sensibilidade à neurodegeneração do que os animais do grupo controle, o que demonstra um papel importante do PGC-1 α na etiologia das desordens neurodegenerativas associadas com a idade, tal como a doença de Alzheimer.

Estudos com ratos nocautes para PGC-1 α também demonstraram alterações histológicas e fisiológicas no sistema nervoso central e alterações comportamentais no grupo de ratos nocautes (Lin et al., 2004; Leone et al., 2005; St-Pierre et al. 2006). Além disso, estudos com ratos envelhecidos sugerem que o treinamento físico pode atenuar o declínio relativo à idade na função mitocondrial (Navarro et al., 2004; Navarro and Boveris, 2007; Boveris and Navarro, 2008; Marton et al. 2010). Estes resultados fornecem uma base biológica para o uso do exercício

como intervenção de prevenção e ou tratamento de doenças neurológicas que podem ser caracterizadas por uma disfunção mitocondrial.

A expressão do PGC-1 α é alta em tecidos com alta demanda oxidativa, como no músculo esquelético, especialmente nas fibras musculares de contração lenta, fibras oxidativas. Estudos com ratos demonstraram que tanto o exercício aeróbio agudo quanto o treinamento aeróbio crônico aumenta a expressão do PGC-1 α (Baar et al., 2002; Taylor et al., 2005; Terada et al., 2005). Estudos com humanos também demonstraram que a expressão do PGC-1 α é aumentada após exercício aeróbio agudo ou após treinamento aeróbio crônico (Pilegaard et al., 2003; Russell et al., 2003), e, indicaram que a expressão gênica do PGC-1 α após treinamento aeróbio é maior nas fibras musculares do tipo IIa do que nas demais fibras musculares (Russell et al., 2003).

Embora os eventos de sinalização *upstream* envolvidos na ativação da expressão do PGC-1 α subsequente ao exercício agudo ou ao treinamento não estejam bem definidos, vários caminhos têm sido implicados nesta cascata de sinalização que culminará no aumento da expressão do PGC-1 α . Caminhos dependentes e modulados pela proteína calcineurina A e pela proteína quinase dependente de cálcio calmodulina (CaMK) estão envolvidas na transcrição gênica do PGC-1 α por meio da ativação do *myocyte enhancer factor-2* (MEF-2) (Czubryt et al., 2003; Schaeffer et al., 2004). Recentemente, as vias da p38 MAPK e da AMPK, também tem sido implicadas na regulação da expressão do PGC-1 α no músculo esquelético após o exercício (Akimoto et al., 2005).

Por outro lado, estudos que demonstram o papel do PGC-1 α , do NRF-1 e do TFAM na biogênese mitocondrial no cérebro são limitados. O estudo de Wareski (2009) é um dos poucos trabalhos que investigaram o controle da biogênese

mitocondrial em diferentes regiões do cérebro, demonstrando que a expressão aumentada do PGC-1 α em células neuronais do córtex, do mesencéfalo e do cerebelo foi associada a um aumento na densidade mitocondrial. Do mesmo modo, evidências que demonstrem o papel do *Silent Information Regulator T1* (SIRT1) na biogênese mitocondrial no cérebro são limitadas. O SIRT1 também é um importante fator determinante da biogênese mitocondrial nos tecidos, pois o mesmo interage fisicamente, promove a desacetilação e ativação do PGC-1 α . Wareski et al. (2009) demonstraram que a superexpressão do SIRT1 levou a um aumento na densidade mitocondrial mediado pela ativação do PGC-1 α em neurônios do córtex cerebral.

Com base na literatura levantada e nos resultados do presente estudo, sugerimos que as mesmas vias moleculares envolvidas na modulação da biogênese mitocondrial do músculo esquelético possam ser moduladas no cérebro pela ovariectomia, pelo treinamento resistido e pela terapia de reposição hormonal. No entanto, estas especulações estão limitadas as regiões específicas do cérebro investigadas no presente estudo (córtex, hipocampo e hipotálamo).

Segundo Brinton (2008 e 2009) o estrógeno demonstrou ser um importante regulador do balanço energético cerebral, por modular o transporte de glicose através da membrana celular neuronal, a glicólise, o ciclo do ácido tricarboxílico, a fosforilação oxidativa e conseqüentemente a produção de adenosina trifosfato (ATP), sendo que na ausência de estrógeno tais processos poderiam ser desalinhados, o que poderia resultar numa demanda maior do que a oferta. O estrógeno exerce seus efeitos biológicos por meio da interação com os receptores para estrógeno do tipo α (ER α) e do tipo β (ER β), os quais são amplamente distribuídos pelo cérebro, apresentando uma alta densidade em algumas estruturas cerebrais, como: córtex, hipotálamo, hipocampo e amígdala (Mitterling et al., 2010;

Brinton, 2009). Adicionalmente, Rettberg et al. (2014), afirmaram que durante a menopausa ocorre um declínio nos níveis de estrógeno circulante o qual é coincidente com um declínio na capacidade de ressíntese oxidativa de ATP, o que muda o fenótipo tecidual cerebral para um fenótipo metabolicamente comprometido.

Yao et al. (2012), demonstraram que a depleção dos hormônios ovarianos por meio da ovariectomia diminuiu significativamente a capacidade de ressíntese de ATP cerebral (bioenergética cerebral) e induziu uma disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. No entanto, ratas ovariectomizadas tratadas com 17β -estradiol demonstraram reversão no quadro de disfunção mitocondrial, reestabelecimento da bioenergética cerebral e diminuição do estresse oxidativo. Entretanto, como já mencionado a existência da associação da disfunção mitocondrial com doenças neurodegenerativas. Yao e Brinton (2012), em ensaios clínicos, apontam que neurônios de mulheres tratadas com estrógeno antes da exposição ao insulto neurodegenerativo evita a morte neuronal. Em contraste, exposição ao estrógeno seguinte ao insulto neurodegenerativo pode resultar em apoptose neurológica exacerbada, possivelmente, decorrente de uma diminuição na densidade mitocondrial cerebral o que ocasiona uma perturbação no fluxo homeostático do cálcio entre os compartimentos celulares.

No entanto, o presente estudo é o primeiro a demonstrar que a ovariectomia resultou na diminuição da expressão dos fatores chaves da biogênese mitocondrial (PGC-1 α , NRF-1 e TFAM) no hipocampo, diminuição que foi totalmente restaurada pelo treinamento resistido e parcialmente pela terapia de reposição hormonal, e, que a expressão de todos os fatores chaves da biogênese mitocondrial foram aumentadas nas ratas do grupo Sham-TR. Resultados semelhantes a estes foram encontrados no estudo de Steiner et al. (2011) que demonstraram aumentos

de duas vezes na expressão do RNAm do SIRT1, de três vezes do PGC-1 α , de aproximadamente duas vezes na expressão da enzima citrato sintase (CS) e aumento de aproximadamente três vezes no conteúdo de DNA mitocondrial em regiões específicas do cérebro (tronco cerebral, cerebelo, mesencéfalo, córtex lóbulo frontal, hipocampo e hipotálamo) de ratos submetidos a oito semanas de treinamento em esteira rolante. Adicionalmente, Steiner et al. (2011) também demonstraram que o aumento na expressão do RNAm do SIRT1, do PGC-1 α e da CS nas estruturas cerebrais investigadas foi proporcional ao aumento na expressão dos mesmos marcadores no músculo sóleo dos animais submetidos ao treinamento, e que o aumento no conteúdo de DNA mitocondrial nas estruturas cerebrais investigadas, principalmente no córtex lóbulo frontal, também foi semelhante ao aumento encontrado no músculo sóleo, o que reforça a hipótese de que o estresse fisiológico proporcionado pelo exercício físico afeta de forma semelhante o músculo esquelético e diferentes estruturas cerebrais, pelo menos, no que diz respeito a expressão dos marcadores da biogênese mitocondrial.

No entanto, o presente estudo mostra resultados originais de que as mudanças induzidas pela ovariectomia na expressão de genes envolvidos com a biogênese mitocondrial no hipocampo podem ser restauradas por meio do treinamento resistido e parcialmente pela terapia de reposição hormonal e que o treinamento resistido pode aumentar a expressão destes genes no córtex, no hipocampo e no hipotálamo, o que faz suscitar novas abordagens em relação ao treinamento resistido, e, em seu emprego como estratégia alternativa de prevenção de doenças neurodegenerativas que possuem sua gênese associada com a diminuição na densidade mitocondrial cerebral.

A figura 16 resume o exposto acima.

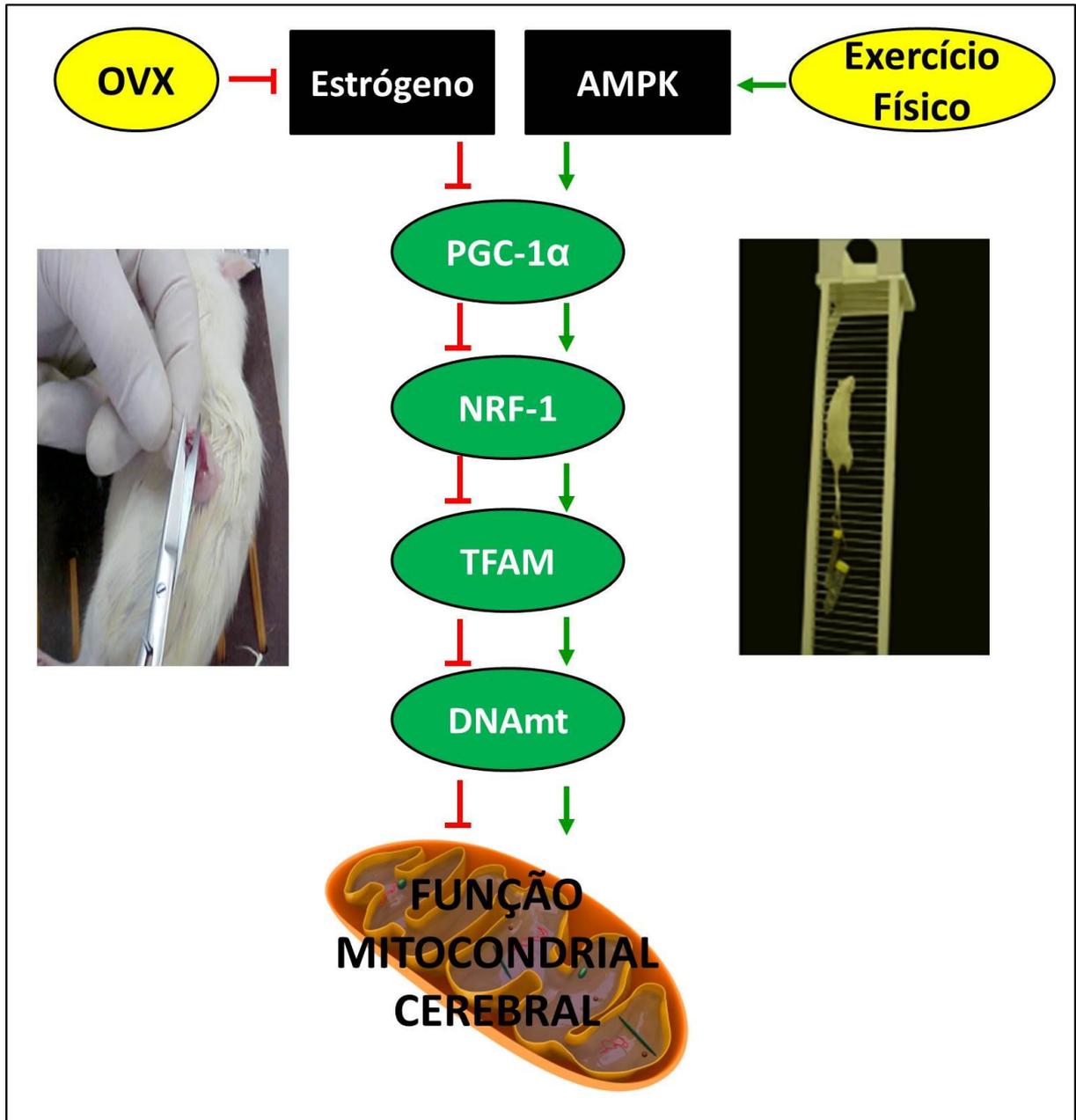


Figura 16. Representação esquemática dos possíveis efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre a função mitocondrial cerebral.

6. CONCLUSÃO

A deficiência dos hormônios ovarianos proporcionado pela Ovx altera a expressão de genes que favorecem o desenvolvimento de um fenótipo de disfunção mitocondrial cerebral, observado em nosso estudo principalmente no hipocampo. Estas alterações podem ser restauradas parcialmente pelo treinamento resistido e pela terapia de reposição hormonal, sendo que os animais do grupo sham treinamento resistido apresentou maior expressão de todos os genes analisados quando comparado com o grupo sham sedentário, o que faz suscitar novas abordagens de recomendação em relação ao treinamento resistido, e, em seu emprego como estratégia alternativa de prevenção de doenças neurodegenerativas que possuem sua gênese associada com a diminuição na densidade mitocondrial cerebral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIMOTO, T.; POHNERT, S. C.; LI, P.; ZHANG, M.; GUMBS, C.; ROSENBERG, P. B.; WILLIAMS, R. S.; YAN, Z. Exercise stimulates PGC-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. **J Biol Chem** 280(20):19587–19593, 2005. doi: 10.1074/jbc.M408862200

BAAR, K.; WENDE, A. R.; JONES, T. E.; MARISON, M.; NOLTE, L. A.; CHEN, M.; KELLY, D. P.; HOLLOSZY, J. O. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. **FASEB J** 16:1879–1886, 2002. doi: 10.1096/fj.02-0367com

BOVERIS, A.; NAVARRO, A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. **Free Radic Biol Med** 44:224–229, 2008. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.015

BRINTON, R. D. Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function. **Trends Pharmacol Sci** 30:212-222, 2009. doi: 10.1016/j.tips.2008.12.006.

BRINTON, R. D. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. **Trends Neurosci** 31:529-537, 2008. doi: 10.1016/j.tins.2008.07.003

CALVO, J. A.; DANIELS, T. G.; WANG, X.; PAUL, A.; LIN, J.; SPIEGELMAN, B. M.; STEVENSON, S. C.; RANGWALA, S. M. Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. **J Appl Physiol** 104:1304–1312, 2008. doi: 10.1152/jappphysiol.01231.2007

CASUSO, R. A.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, E. J.; HITA-CONTRERAS, F.; CAMILETTI-MOIRON, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, R.; CAÑUELO, A.; MARTÍNEZ-AMAT, A. The combination of oral quercetin supplementation and exercise prevents brain mitochondrial biogenesis. **Genes Nutr** 9:420, 2014.

CHABI, B.; ADHIHETTY, P. J.; LJUBICIC, V.; HOOD, D. A. How is mitochondrial biogenesis affected in mitochondrial disease? **Med Sci Sports Exerc** 37:2102–2110, 2005. doi:

CHOI, Y. S.; KIM, S.; PAK, Y. K. Mitochondrial transcription factor A (mtTFA) and diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice** v. 54, n. 2, p. 3-9, 2001.

CLEMENTI, E. NISOLI, E. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**v.142, n.2, p.102-110, 2005.

COOLINS, K. J.; EXTON-SMITH, A. N. Effects of ageing on human homeostasis. In: *The biology of human ageing* Cambridge University Press. p. 261-275, 1986.

CORTON, J. C.; APTE, U.; ANDERSON, S. P.; LIMAYE, P.; YOON, L.; LATENDRESSE, J.; DUNN, C.; EVERITT, J. I.; VOSS, K. A.; SWANSON, C.; KIMBROUGH, C.; WONG, J. S.; GILL, S. S.; CHANDRARATNA, R. A.; KWAK, M. K.; KENSLER, T. W.; STULNIG, T. M.; STEFFENSEN, K. R.; GUSTAFSSON, J. A.; MEHENDALE, H. M. Mimetics of caloric restriction include agonists of lipid-activated nuclear receptors. **J Biol Chem** 279:46204–46212, 2004. doi: 10.1074/jbc.M406739200

CZUBRYT, M. P.; MCANALLY, J.; FISHMAN, G. I.; OLSON, E. N. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. **Proc Natl Acad Sci USA** 100:1711–1716, 2003. doi: 10.1073/pnas.0337639100

DOMINGOS, M. M.; RODRIGUES, M. F.; STOTZER, U. S.; BERTUCCI, D. R.; SOUZA, M. V.; MARINE, D. A.; GATTO, C. D.; DE ARAUJO, H. S.; DE ANDRADE PEREZ, S. E. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. **Eur J Appl Physiol.** 112:1437-1444, 2012.

DUNCAN, J. G. Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. **Biochim Biophys Acta** 1813:1351–1359, 2011. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.014

FABEL, K.; KEMPERMANN, G. Physical activity and the regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. **Neuromol Med.** 10:59-66, 2008.

FINK, B. N.; KELLY, D. P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. **J Clin Invest** 116:615–622, 2006. doi: 10.1172/JCI27794

FINSTERER, J. Central nervous system manifestations of mitochondrial disorders. **Acta Neurol Scand** 114: 217–238, 2006. doi: 10.1111/j.1600-0404.2006.00671.x

FRED, A.; WENTORF, SUDOH K.; MOSES, C.; ELIZABETH A. The Effects of Estrogen on Material and Mechanical Properties of the Intra- and Extra-articular Knee Structures. **Am. J. Sports Med.** vol. 34, p. 1948-1957, 2006.

GERHART-HINES, Z.; RODGERS, J. T.; BARE, O.; KIM, C.; KIM, S. H.; MOSTOSLAVSKY, R.; ALT, F. W.; WU, Z. D.; PUIGSERVER, P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 alpha. **EMBO J** 26:1913–1923, 2007. doi: 10.1038/sj.emboj.7601633

GIBALA, M. J.; MCGEE, S. L.; GARNHAM, A. P.; HOWLETT, K. F.; SNOW, R. J.; HARGREAVES, M. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1 α in human skeletal muscle. **J Appl Physiol.** 106: 929-934, 2009.

HARDIE, D. G. Energy sensing by the AMP-activated protein kinase and its effects on muscle metabolism. **Proceedings Nutritional Society.** v. 70, p. 92-99, 2011.

HOOD, D. A. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab.** v.34, n.3, p.465-472, 2009.

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle: effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. **J Biol Chem** 242:2278-2282, 1967. doi:

HOLLOSZY, J. O.; BOOTH, F. W. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. **Annu Rev Physiol** 38:273–291, 1976. doi: 10.1146/annurev.ph.38.030176.001421

HORNBERGER JR, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. **Can J Appl Physiol** 29:16-31, 2004. doi:

HOUTEN, S. M.; AUWERX, J. PGC-1alpha: Turbocharging mitochondria. **Cell** 119:5–7, 2004. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.016

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner** 15(3):175-91, 1991.

KANG, D.; HAMASAKI, N. Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: overview of its multiple roles. **Ann NY Acad Sci** 1042:101–108, 2005. doi: 10.1196/annals.1338.010

KANNANGARA, T. S.; LUCERO, M. J.; GIL-MOHAPEL, J.; DRAPALA, R. J.; SIMPSON, J. M.; CHRISTIE, B. R.; PRAAG, H. V. Running reduces stress and

enhances cell genesis in aged mice. **Neurobiol Aging Neurobiolaging.** 32(12):2279-86, 2010.

KANNEL, W.B.; WILSON, P.W. Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage. **Arch Intern Med.** vol. 61, p. 155-157, 1995.

KOHMAN, R. A.; DEYOUNG, E. K.; BHATTACHARYA, T. K.; PETERSON, L. N.; RHODES, J. S. Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. **Brain Behav Immun.** 26(5):803-10, 2012.

KOWALTOWSKI, J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med.** v. 47, n. 4, p. 333-343, 2009.

LANE, N.E.; BLOCH, D.A.; WOOD, P.D.; FRIES, J.F. Aging, long distance running, and the development of muscle skeletal disability. **Am. J. Med.** vol. 82, p. 772-780, 1987.

LEITE, R.D.; PRESTES, J.; BERNARDES, C.F.; SHIGUEMOTO, G.E.; PEREIRA, G.B.; DUARTE, J.O.; DOMINGOS, M.M.; BALDISSERA, V.; DE ANDRADE PEREZ, S.E. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. **Appl Physiol Nutr Metab,** v. 34, n. 6, p. 1079-1086, 2009.

LEITE, R.D.; PRESTES, J.; PEREIRA, G.B.; SHIGUEMOTO, G.E.; DE ANDRADE PEREZ, S.E. Menopause: highlighting the effects of resistance training. **Int J Sports Med.** v. 31, n. 11, p. 761-7, 2010.

LEONE, T. C.; LEHMAN, J. J.; FINCK, B. N.; SCHAEFFER, P. J.; WENDE, A. R.; BOUDINA, S.; COURTOIS, M.; WOZNIAK, D. F.; SAMBANDAM, N.; BERNALMIZRACHI, C.; CHEN, Z. J.; HOLLOSZY, J. O.; MEDEIROS, D. M.; SCHMIDT, R. E.; SAFFITZ, J. E.; ABEL, E. D.; SEMENKOVICH, C. F.; KELLY, D. P.; PGC-1 alpha deficiency causes multisystem energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control, and hepatic steatosis. **PLoS Biol** 3:672–687, 2005. doi: 10.1371/journal.pbio.0030101

LI, G.; MATSUZUKI, K.; WANG, Y.; ZHAO, N.; YANG, M.; SHIDO, O. Voluntary exercise promotes proliferation and differentiation of adult rat hypothalamus progenitor cells. **Nan Fanq Yi Ke Da Xue Xue Bao.** 33(8):1099-106, 2013.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature** 443:787–795, 2006. doi: 10.1038/nature05292

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metab.** v.1, n.6, p.361-370, 2005.

LIN, J. D.; WU, P. H.; TARR, P. T.; LINDENBERG, K. S.; ST-PIERRE, J.; ZHANG, C. Y.; MOOTHA, V. K.; JAGER, S.; VIANNA, C. R.; REZNICK, R. M.; CUI, L. B.; MANIERI, M.; DONOVAN, M. X.; WU, Z. D.; COOPER, M. P.; FAN, M. C.; ROHAS,

L. M.; ZAVACKI, A. M.; CINTI, S.; SHULMAN, G. I.; LOWELL, B. B.; KRAINC, D.; SPIEGELMAN, B. M. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 alpha null mice. **Cell** 119:121–135, 2004. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.013

LIN, J, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibers. **Nature** 418(6899):797–801, 2002. doi: 10.1038/nature00904

MARTON, O.; KOLTAI, E.; NYAKAS, C.; BAKONYI, T.; ZENTENO-SAVIN, T.; KUMAGAI, S.; GOTO, S.; RADA, Z. Aging and exercise affect the level of protein acetylation and SIRT1 activity in cerebellum of male rats. **Biogerontology** 11:679–686, 2010. doi: 10.1007/s10522-010-9279-2

MATTAR, C.N.; HARHARAH, L.; SU, L.L.; AGARWAL, A.A.; WONG, P.C.; CHOOHLANI, M. Menopause, hormone therapy and cardiovascular and cerebrovascular disease. **Ann Acad Med Singapore**. v. 37, n. 1, p. 54-62, 2008.

MEDEIROS, D. M. Assessing mitochondria biogenesis. **Methods**. v. 46, n. 4, p. 288-294, 2008.

MITTERLING, K. L.; SPENCER, J. L.; DZIEDZIC, N.; SHENOY, S.; MCCARTHY, K.; WATERS, E. M.; MCEWEN, B. S.; MILNER, T. A. Cellular and subcellular localization of estrogen and progesterin receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus. **The Journal of Comparative Neurology** 518, 2729–2743, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals. **National Academy Press, Washington, D.C.**, 140p, 1996.

NAVARRO, A.; LOPEZ-CEPERO, J.M.; BANDEZ, M.J.; SANCHEZ-PINO, M.J.; GOMEZ, C.; CADENAS, E.; BOVERIS, A. Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 294, n. 2, p. R501-9, 2008.

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. Brain mitochondrial dysfunction in aging: conditions that improve survival, neurological performance and mitochondrial function. **Front Biosci** 12:1154–1163, 2007.

NAVARRO, A.; GOMEZ, C.; LOPEZ-CEPERO, J. M.; BOVERIS, A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 286:R505–R511, 2004. doi: 10.1152/ajpregu.00208.2003

NISOLI, E.; COZZI, V.; CARRUBA, M.O. Amino acids and mitochondrial biogenesis. **Am J Cardiol**. v. 101, n.11A, p. 22E-25E, 2008.

NISOLI, E. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. **Science**. v.7, n.299, p.896-899, 2003.

NIWA, A.; NISHIBORI, M.; HAMASAKI, S.; KOBORI, T.; LIU, K.; WAKE, H.; MORI, S.; YOSHINO, T.; TAKAHASHI, H. Voluntary exercise induces neurogenesis in the

hypothalamus and ependymal lining of the third ventricle. **Brain Struct Funct.** [Epub ahead of print], 2015.

OLSON, S.H.; BANDERA, E.V.; ORLOW, I. Variants in estrogen biosynthesis genes, sex steroid hormone levels, and endometrial cancer: a HuGE review. **Am J Epidemiol**, v. 165, n. 3, p. 235-45, 2007.

PIGHON, A.; GUTKOWSKA, J.; JANKOWSKI, M.; RABASA-LHORET, R.; LAVOIE, J.M. Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver. **Metabolism**. v. 60, n. 5, p. 629-39, 2011.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. **J Physiol** 546:851–858, 2003. doi: 10.1113/jphysiol.2002.034850

PRAAG, V. H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. **Neuromol Med.** 10:128-140, 2008.

PRESTES, J.; DE CASSIA MARQUETI, R.; SHIGUEMOTO, G.E.; LEITE, R.D.; PEREIRA, G.B.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; BALDISSERA, V.; DE ANDRADE PEREZ, S.E. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab.** v. 34, n. 4, p. 700-6, 2009.

PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M.; Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. **Endocr Rev** 24:78–90, 2003. doi: 10.1210/er.2002-0012

REN, J.; PULAKAT, L.; WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J. R. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. **J Mol Med** 88:993–1001, 2011. doi: 10.1007/s00109-010-0663-9

RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Front Neuroendocrinol** 35:8-30, 2014. doi: 10.1016/j.yfrne.2013.08.001

REZIN, G. T.; AMBONI, G.; ZUGNO, A. I.; QUEVEDO, J.; STRECK, E. L. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. **Neurochem Res** 34:1021–1029, 2009. doi: 10.1007/s11064-008-9865-8

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. The prevention and treatment of osteoporosis. **New Engl. J. Med.** vol. 327, n.9, p.620-627, 1992.

RODGERS, J. T.; LERIN, C.; HAAS, W.; GYGI, S. P.; SPIEGELMAN, B. M.; PUIGSERVER, P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. **Nature** 434:113–118, 2005. doi: 10.1038/nature03354

ROHAS, L. M.; ST-PIERRE, J.; ULDRY, M.; JAGER, S.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated

by PGC-1alpha. **Proc Natl Acad Sci USA** 104:7933–7938, 2007. doi: 10.1073/pnas.0702683104

ROMANELLO, V.; GUADAGNIN, E.; GOMES, L.; RODER, I.; SANDRI, C.; PETERSEN, Y.; MILAN, G.; MASIERO, E.; DEL PICCOLO, P.; FORETZ, M.; SCORRANO, L.; RUDOLF, R.; SANDRI, M. Mitochondrial fission and remodeling contributes to muscle atrophy. **EMBO Journal**. v. 29, p. 1774-1784, 2010.

RUSSELL, A. P.; FOLETTA, V. C.; SNOW, R. J.; WADLEY, G. D. Skeletal muscle mitochondria: a major player in exercise, health and disease. **Biochim Biophys Acta** 2013.

RUSSELL, A. P.; FEILCHENFELDT, J.; SCHREIBER, S.; PRAZ, M.; CRETENAND, A.; GOBELET, C.; MEIER, C. A.; BELL, D. R.; KRALLI, A.; GIACOBINO, J. P.; DÉRIAZ, O. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 and peroxisome proliferator activated receptor- α in skeletal muscle. **Diabetes** 52:2874–2881, 2003. doi: 10.2337/diabetes.52.12.2874

SAENGSIRISUWAN, V. et al. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. **Metabolism**. vol. 58, n.1, p.38-47, 2009.

SCARPULLA, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. **Biochim Biophys Acta** 1813(7):1269-1278, 2011. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.09.019

SCARPULLA, R. C. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 97:673–683. doi: 10.1002/jcb.20743

SCARPULLA, R. C. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. **Gene** 286:81–89, 2002. doi: 10.1016/S0378-1119(01)00809-5

SCHAEFFER, P. J.; WENDE, A. R.; MAQEE, C. J.; NEILSON, J. R.; LEONE, T. C.; CHEN, F.; KELLY, D. P. Calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase activate distinct metabolic gene regulatory programs in cardiac muscle. **J Biol Chem** 279:39593–39603, 2004. doi: 10.1074/jbc.M403649200

SCIORE, P.; FRANK, C.B.; HART, D.A. Identification of sex hormone receptors in human and rabbit ligaments of the knee by reverse transcription-polymerase chain reaction: evidence that receptors are present in tissue from both male and female subjects. **J Orthop es.** vol. 16, p. 604-610, 1998.

SHIGUEMOTO, G.E.; PRESTES, J.; LEITE, R.D.; PEREIRA, G.B.; PONTES, C.L.; D'AVILA, F.V.; BOTERO, J.P.; BALDISSERA, V.; NONAKA, K.O.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; DE ANDRADE PEREZ, S.E. Effects of resistance training on matrix

metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scand J Med Sci Sports**. 22(5):607-617, 2012.

SILVEIRA, L. R.; Pilegaard, H.; Kusuhara, K.; Curi, R.; Hellsten, Y. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta**. v. 1763, n.9, p.969-976, 2006.

STEFANICK, M.L.; ANDERSON, G.L.; MARGOLIS, K.L.; HENDRIX, S.L.; RODABOUGH, R.J.; PASKETT, E.D.; LANE, D.S.; HUBBELL, F.A.; ASSAF, A.R.; SARTO, G.E.; SCHENKEN, R.S.; YASMEEN, S.; LESSIN, L.; CHLEBOWSKI, R.T. Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. **JAMA**. v. 295, n. 14, p. 1647-57, 2006.

STEINER, J. L.; MURPHY, E. A.; MCCLELLAN, J. L.; CARMICHAEL, M. D.; DAVIS, J. M. Exercise Training increases mitochondrial biogenesis in the brain. **J Appl Physiol** 111:1066-1071, 2011. doi: 10.1152/jappphysiol.00343.2011

ST-PIERRE, J.; DRORI, S.; ULDRY, M.; SILVAGGI, J. M.; RHEE, J.; JAGER, S.; HANDSCHIN, C.; ZHENG, K. N.; LIN, J. D.; YANG, W. L.; SIMON, D. K.; BACHOO, R.; SPIEGELMAN, B. M. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell** 127:397–408, 2006. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.024

STROM, J. O.; THEODORSSON, E.; THEODORSSON, A. Order of magnitude differences between methods for maintaining physiological 17β -oestradiol concentrations in ovariectomized rats. **Scand J Clin Lab Invest** 68(8):814-822, 2008. doi: 10.1080/00365510802409703

TAECHAKRAICHANA, N.; LIMPAPHAYOM, K.; NINLAGORN, T. A randomized trial of oral contraceptive and hormone replacement therapy on bone mineral density and coronary heart disease risk factors in post menopausal women. **Obstet Gynecol.** vol. 95, p. 87-94, 2000.

TAYLOR, E. B.; LAMB, J. D.; HURST, R. W.; CHESSER, D. G.; ELLINQSON, W. J.; GREENWOOD, L. J.; PORTER, B. B.; HERWAY, S. T.; WINDER, W. W. Endurance training increases skeletal muscle LKB1 and PGC-1 α protein abundance: effects of time and intensity. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 289:E960–E968, 2005. doi: 10.1152/ajpendo.00237.2005

TERADA, S.; GOTO, M.; KATO, M.; KAWANAKA, K.; SHIMOKAWA, T.; TABATA, I. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. **Biochem Biophys Res Commun** 296:350–354, 2002. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00881-1

TERADA, S.; TABATA, I. Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1 alpha protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. **Am J**

Physiol Endocrinol Metab 286:E208–E216, 2004. doi: 10.1152/ajpendo.00051.2003

TERADA, S.; KAWANAKA, K.; GOTO, M.; SHIMOKAWA, T.; TABATA, I. Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1 α protein expression in rat skeletal muscle. **Acta Physiol. Scand.** 184:59–65, 2005. doi: 10.1111/j.1365-201X.2005.01423.x

VIÑA, J.; GOMEZ-CABRERA, M. C.; BORRAS, C.; FROIO, T.; SANCHIS-GOMAR, F.; MARTINEZ-BELLO, V. E.; PALLARDO, F. V. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 61, n. 14, p. 1369-1374, 2009. doi: 10.1016/j.addr.2009.06.006

WANG, L.; MASCHER, H.; PSILANDER, N.; BLOMSTRAND, E.; SAHLIN, K. Resistance exercise enhances the molecular signaling of mitochondrial biogenesis induced by endurance exercise in human skeletal muscle. **J Appl Physiol.** 111: 1335-1344, 2011.

WARESKI, P.; VAARMANN, A.; CHOUBEY, V.; SAFIULINA, D.; LIIV, J.; KUUM, M.; KAASIK, A. PGC-1 alpha and PGC-1 beta regulate mitochondrial density in neurons. **J Biol Chem** 284:21379–21385, 2009. doi: 10.1074/jbc.M109.018911

WATTS, A. G. The structure of the neuroendocrine hypothalamus: the neuroanatomical legacy of Geoffrey Harris. **J Endocrinol.** [Epub ahead of print], 2015.

WRIGHT, D. C.; HAN, D. H.; GARCIA-ROVES, P. M.; GEIGER, P. C.; JONES, T. E.; HOLLOSZY, J. O. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1 alpha expression. **J Biol Chem** 282:194–199, 2007. doi: 10.1074/jbc.M606116200

YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen regulation of mitochondrial bioenergetics: implications for prevention of alzheimer's disease. **Adv Pharmacol** 64:327-371, 2012. doi: 10.1016/B978-0-12-394816-8.00010-6

YAO, J.; IRWIN, R.; CHEN, S.; HAMILTON, R.; CADENAS, E.; BRINTON, R. D. Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial beta-amyloid. **Neurobiology of Aging** 33:1507-1521, 2012. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.001

ZHANG, S.M.; MANSON, J.E.; REXRODE, K.M.; COOK, N.R.; BURING, J.E.; LEE, I.M. Use of oral conjugated estrogen alone and risk of breast cancer. **Am J Epidemiol.** v. 165, n. 5, p. 524-529, 2007.

ZHANG, Q.; WU, Y.; ZHANG, P.; SHA, H.; JIA, J.; HU, Y.; ZHU, J. Exercise induces mitochondrial biogenesis after brain ischemia in rats. **Neuroscience** 205:10-17, 2012.

ZOFKOVA, I.; KANCHEVA, R.L. Effect of estrogen status on bone regulating hormones. **Bone.** vol.19, n.3, p.227-232, 1996.

ANEXO I

Trabalho apresentado no congresso internacional “*Integrative Physiology of Exercise, September, 2014*”.



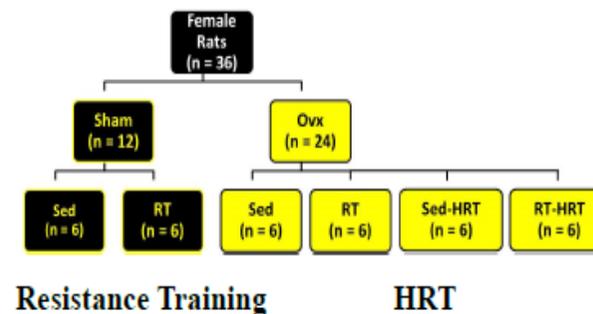
RESISTANCE TRAINING INCREASE GENE EXPRESSION OF BIOMARKERS TO MITOCHONDRIAL BIOGENESIS IN BRAIN OF OVARECTOMIZED RATS

Mateus M. Domingos, Marina R. Barbosa, Maria F.C. Rodrigues, Fabiano C. Ferreira, Markus V.C. Souza, Luciane M. Tomáz, Gustavo H.R. Canevazzi, Natália S. Silva, Cristiani G. Lagoeiro, Fernanda Danieli, Gilberto E. Shiguetomoto, Sérgio E.A. Perez.
Department of Physiological Sciences, Federal University of São Carlos.

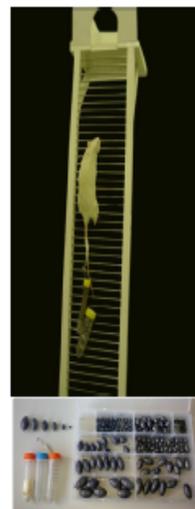


Purpose: to investigate the effects of ovariectomy (Ovx), resistance training (RT) and hormone replacement therapy (HRT) on markers of MB (mRNA expression of PGC-1 α , NRF-1, and TFAM) in specific brain regions, cortex (CX), hippocampus (HC), and hypothalamus (HT) in rats. **Methods:** sprague-Dawley adult female rats were grouped into six groups (n = 6 per group): (I) sham-operated sedentary (Sham-Sed); (II) Ovx-Sed; (III) Sham-RT; (IV) Ovx-RT; (V) Ovx-Sed-HRT and (VI) Ovx-RT-HRT. The animals in HRT groups received subcutaneously implanted silastic capsules with a solution of 180 μ g 17 β -estradiol/mL sunflower oil. A 12-week RT period, during which the animals climbed a 1.1-m vertical ladder with weights attached to their tails, was used. The sessions were performed once every 3 days, with 4-9 climbs and 8-12 dynamic movements per climb. Gene expression was analyzed by RT-PCR by the $\Delta\Delta$ Ct method.

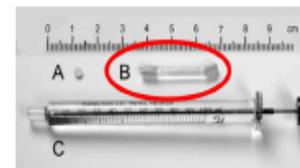
Material and Methods



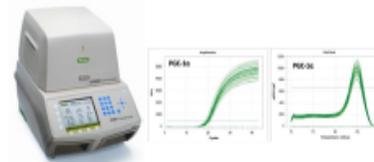
Resistance Training



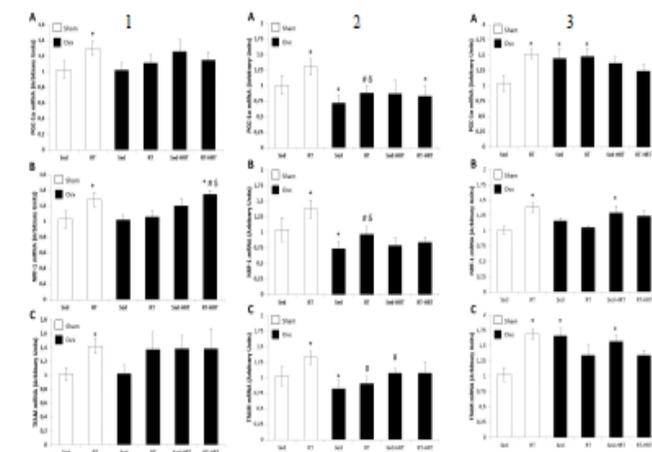
HRT



Gene Expression (RT-PCR)



Results



Expression of genes associated with mitochondrial biogenesis measured in the cortex (1), hippocampus (2) and hypothalamus (3). mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator (PGC-1 α) (A), nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) (B), and transcription factor A, mitochondrial (TFAM) mRNA abundance (C) in Sham-Sed, Sham-RT, Ovx-Sed, Ovx-RT, Ovx-Sed-HRT and Ovx-RT-HRT groups. Values are presented by means \pm SEM; $p \leq 0.05$ (n = 6 each group). *, statistically significant difference compared with Sham-Sed; δ , compared with Sham-RT; #, compared with Ovx-Sed; $\$$, compared with Ovx-RT.

Conclusion

These findings suggest that OVX decreases brain MB, in our data observed in HC, and RT increases brain MB, which may have important implications with respect to various central nervous system diseases and age-related dementia that are often characterized by mitochondrial dysfunction.

