

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

CECÍLIA TARDIVO MARIN

O TREINAMENTO RESISTIDO E A RESTRIÇÃO CALÓRICA
ALTERAM A EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DA
BIOGÊNESE E DINÂMICA MITOCONDRIAL DO MÚSCULO
QUADRÍCEPS DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

SÃO CARLOS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

CECÍLIA TARDIVO MARIN

O TREINAMENTO RESISTIDO E A RESTRIÇÃO CALÓRICA
ALTERAM A EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DA
BIOGÊNESE E DINÂMICA MITOCONDRIAL DO MÚSCULO
QUADRÍCEPS DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Fisioterapia da
Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de mestre.

Orientador: Gilberto Eiji Shiguemoto
Apoio Financeiro: CAPES

SÃO CARLOS

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M337t Marin, Cecília Tardivo
O treinamento resistido e a restrição calórica alteram a expressão gênica de marcadores da biogênese e dinâmica mitocondrial do músculo quadríceps de ratas ovariectomizadas / Cecília Tardivo Marin. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
54 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Ovariectomia. 2. Treinamento resistido. 3. Restrição calórica. 4. Biogênese e dinâmica mitocondrial. 5. Músculo quadríceps. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Cecília Tardivo Marin, realizada em 29/04/2016:

Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto
UFSCar

Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa
UFSCar

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione
USP

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
	2.1 Menopausa e Sarcopenia.....	12
	2.2 Biogênese Mitocondrial.....	14
	2.3 Dinâmica Mitocondrial.....	16
	2.3.1 Papel Bioenergético da Fusão Mitocondrial.....	18
	2.3.2 Papel Bioenergético da Fissão Mitocondrial.....	19
	2.4 Restrição Calórica e Sirtuínas.....	19
	2.5 Treinamento Resistido.....	21
3	OBJETIVOS.....	22
	3.1 Geral.....	22
	3.2 Específicos.....	22
4	METODOLOGIA.....	23
	4.1 Animais.....	23
	4.2 Grupos experimentais.....	23
	4.3 Procedimentos cirúrgicos.....	25
	4.4 Eutanásia dos animais.....	25
	4.5 Protocolo de Treinamento Resistido.....	26
	4.5.1 Escada vertical e aparato de carga.....	26
	4.5.2 Protocolo de familiarização.....	26
	4.5.3 Determinação da Carga Máxima de Carregamento.....	26
	4.5.4 Sessão de Treinamento Resistido.....	27
	4.6 Ração e Restrição Calórica.....	27
	4.7 Conversão e Obtenção do cDNA dos Genes PGC-1 α , MFN-1 e FIS-1.....	28
	4.7.1 Extração do RNA total.....	29
	4.7.2 Tratamento com DNase e transcrição reversa.....	29
	4.7.3 PCR em tempo real.....	29
	4.8 Expressão Proteica – Western Blotting.....	30
	4.8.1 Extração de Proteínas.....	30
	4.8.2 SDS-PAGE eletroforese.....	31

4.8.3	Transferência de proteínas do gel para a membrana.....	32
4.8.4	Imunodeteccção das proteínas com anticorpos.....	32
4.8.5	Revelação com quimioluminescência.....	32
4.9	Análise estatística.....	33
5	RESULTADOS.....	34
5.1	Evolução da massa corporal, massa do útero e quadríceps.....	34
5.2	Carga Máxima de Carregamento.....	35
5.3	Quantificação da expressão do RNAm dos genes relacionados à biogênese e dinâmica mitocondrial.....	36
5.4	Quantificação da expressão proteica da SIRT3.....	39
6	DISCUSSÃO.....	41
7	CONCLUSÃO.....	46
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Secreção de estrogênio durante toda a vida sexual da mulher (adaptado de HALL, 2011).....	11
Figura 2. Biogênese mitocondrial e expressão gênica com ativação da via PGC-1 α (PUIGSERVER, P. E SPIEGELMAN, B.M., 2003).....	15
Figura 3. Esquema ilustrando as proteínas responsáveis pela fusão e fissão mitocondrial (SEO <i>et al.</i> , 2010).....	17
Figura 4. Exemplo da adaptação da morfologia mitocondrial e sua atividade respiratória (adaptado de WESTERMANN, 2012).....	18
Figura 5. Organograma dos grupos experimentais.....	24
Figura 6. Curva de Melt obtida para a determinação da temperatura de anelamento do Gene GAPDH (62°C).....	30
Figura 7. Gel poliacrilamida corrido em eletroforese para escolha do volume/concentração proteica da amostra (Grupo Controle Sham Sed).....	31
Figura 8. Transferência úmida do gel para a membrana de nitrocelulose, corada com Ponceau-S.....	32
Figura 9. Expressão de RNAm do PGC-1 α no músculo quadríceps de ratas. Os valores a apresentados são em Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Grupo Ovariectomia: Ovariectomia Sedentário (OVX SED), Ovariectomia Treinado (OVX TR), Ovariectomia Restrição Calórica (OVX RC) e Ovariectomia Treinado com Restrição Calórica (OVX TR-RC). Grupo Intacto (Sham): Sham Sedentário (SHAM SED), Sham Treinado (SHAM TR), Sham Restrição Calórica (SHAM RC) e Sham Treinado com Restrição Calórica (SHAM TR-RC). Os símbolos * e # representam diferença estatística entre grupos pela ANOVA <i>one-way</i> seguida de <i>Post-Hoc Tukey's test</i> ($p < 0,05$). * SHAM SED, # OVX. O símbolo @ demonstra diferença estatística entre as intervenções OVX TR vs SHAM TR pelo <i>Test t Student</i> ($p < 0,01$).....	37
Figura 10. Expressão de RNAm da proteína MFN-1, no músculo quadríceps de ratas. Os valores a apresentados são em Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Grupo Ovariectomia: Ovariectomia Sedentário (OVX SED), Ovariectomia Treinado (OVX TR), Ovariectomia Restrição Calórica (OVX RC) e Ovariectomia Treinado com Restrição Calórica (OVX TR-RC). Grupo Intacto (Sham): Sham Sedentário (SHAM SED), Sham Treinado (SHAM TR), Sham Restrição Calórica (SHAM RC) e Sham Treinado com Restrição Calórica (SHAM TR-RC). Os símbolos * e # representam	

diferença estatística entre grupos pela ANOVA *one-way* seguida de *Post-Hoc Tukey's test* ($p < 0,05$). * SHAM SED, # OVX SED. O símbolo \$ demonstra diferença estatística entre as intervenções OVX TR-RC vs SHAM TR-RC pelo *Test t Student* ($p < 0,02$).....38

Figura 11. Expressão de RNAm da proteína FIS-1, no músculo quadríceps de ratas. Os valores apresentados são em Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). **Grupo Ovariectomia:** Ovariectomia Sedentário (OVX SED), Ovariectomia Treinado (OVX TR), Ovariectomia Restrição Calórica (OVX RC) e Ovariectomia Treinado com Restrição Calórica (OVX TR-RC). **Grupo Intacto (Sham):** Sham Sedentário (SHAM SED), Sham Treinado (SHAM TR), Sham Restrição Calórica (SHAM RC) e Sham Treinado com Restrição Calórica (SHAM TR-RC). Os símbolos * e # representam diferença estatística entre grupos pela ANOVA *one-way* seguida de *Post-Hoc Tukey's test* ($p < 0,05$). * SHAM SED; # OVX SED Não houve diferença estatística entre as intervenções.....39

Figura 12. Expressão Proteica da proteína SIRT 3, no músculo quadríceps de ratas. Os valores apresentados são em Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). **Grupo Ovariectomia:** Ovariectomia Sedentário (OVX SED), Ovariectomia Treinado (OVX TR), Ovariectomia Restrição Calórica (OVX RC) e Ovariectomia Treinado com Restrição Calórica (OVX TR-RC). **Grupo Intacto (Sham):** Sham Sedentário (SHAM SED), Sham Treinado (SHAM TR), Sham Restrição Calórica (SHAM RC) e Sham Treinado com Restrição Calórica (SHAM TR-RC). Os símbolos * e # representam diferença estatística entre grupos pela ANOVA *one-way* seguida de *Post-Hoc Tukey's test* ($p < 0,05$). * SHAM SED, # OVX SED. Os símbolos demonstram diferença estatística entre as intervenções pelo *Test t Student* ($p < 0,02$). @ OVX TR vs SHAM TR; % OVX RC vs SHAM RC; \$ OVX TR-RC vs SHAM TR-RC.....40

Figura 13. Membrana de nitrocelulose revelada pelo *Kit ECL* com os níveis de expressão proteica da proteína SIRT3.....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composições das rações utilizadas no experimento (AIN-93M controle e a modificada) (REEVES <i>et al.</i> , 1993).....	28
Tabela 2. Distribuição do valor calórico dos macronutrientes.....	28
Tabela 3. Sequência de primers utilizados.....	30
Tabela 4. Dados da massa corporal inicial e final, massa do útero, massa do quadríceps e consumo alimentar dos grupos experimentais (gramas).....	35
Tabela 5. Dados da Carga Máxima de Carregamento Absoluta dos grupos experimentais treinados (gramas).....	36

LISTA DE SIGLAS

ATP Adenosina Trifosfato
cAMP AMP cíclico
CREB Fator de Transcrição
eNOS Óxido nítrico endotelial
ER (alfa e gama)
EROs Espécies reativas de oxigênio
FHS Hormônio Folículo Estimulante
FIS-1 Proteína de fissão mitocondrial 1
GH Hormônio do Crescimento
GTPases Guanosina Fosfatases
IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1 Fator de crescimento insulínico tipo 1
LH Hormônio Luteinizante
MFN-1 e 2 Mitofusinas 1 e 2
MnSOD Superóxido Dismutase Mitocondrial
mTDNA DNA mitocondrial
mTFA Fator de transcrição mitocondrial
NAD Dinucleotídio de nicotinamida e adenina
NRF-1 e 2 Fator respiratório 1 e 2
PCR-RT Reação transcriptase reversa em tempo real
PGC-1 α Proliferador de peroxissoma 1 alfa
PKA Proteína quinase A
RC Restrição Calórica
SIRT 1 a 7 Sirtuína 1 a 7
TR Treinamento resistido
TR-RC Treinamento resistido com restrição calórica

RESUMO

A menopausa, fase de interrupção permanente da atividade folicular ovariana, desencadeia alterações teciduais e moleculares no organismo das mulheres. O ganho de massa corporal e a sarcopenia são dois importantes efeitos deletérios que ao longo do tempo, afetam a independência funcional e consequente qualidade de vida das mesmas. O treinamento resistido (TR), a restrição calórica (RC) são intervenções que podem amenizar e retardar esses processos degenerativos relacionados à menopausa. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do TR e RC sobre os marcadores de biogênese e dinâmica mitocondrial sobre o quadríceps de ratas ovariectomizadas. Ratas *Holtzman* foram alocadas em 8 grupos (n=10) Sham sedentárias, treinadas, restrição calórica e associação treinamento com restrição calórica (SHAM SED, SHAM TR, SHAM RC E SHAM TR-RC), ovariectomizadas sedentárias, treinadas, restrição calórica e associação treinamento com restrição calórica (OVX SED, OVX TR, OVX RC e OVX TR-RC). As cirurgias ovariectomia (OVX) e pseudo-ovariectomia (SHAM) foram realizadas quando as ratas alcançaram 250g de massa corporal. Dois dias após as cirurgias, iniciou-se o controle do consumo alimentar e após 10 dias de recuperação das cirurgias, iniciou o TR que consistiu em 13 semanas de treinamento de escalada em escada vertical, com 72 horas de intervalo entre as sessões de treinamento. A intensidade do TR foi de 65, 85, 95 e 100% da carga máxima de carregamento previamente determinada para cada rata. Após a quarta escalada, acrescentou-se 30g para determinar a nova carga máxima de carregamento. A eutanásia dos animais ocorreu após 13 semanas de TR e 48 horas após a última sessão de treino. O músculo quadríceps da pata traseira direita foi excisado e armazenado a -80°C para as análises da expressão gênica e proteica dos mediadores da biogênese e dinâmica mitocondrial. A ovariectomia em ratas alterou a biogênese e dinâmica mitocondrial, bem como a massa corporal e o consumo alimentar. As intervenções propostas foram eficazes em amenizar os ganhos da massa corporal e reverter as alterações moleculares encontradas na ovariectomia, principalmente em relação à biogênese e dinâmica mitocondrial.

Palavras-chave: Ovariectomia, treinamento resistido, restrição calórica, biogênese e dinâmica mitocondrial, músculo quadríceps.

ABSTRACT

Menopause, permanent discontinuation phase of ovarian follicular activity, triggers tissue and molecular changes in the body of women. The obesity and sarcopenia are two important deleterious effects, affect the functional independence and therefore the quality of life of the same. Resistance training (RT), caloric restriction (CR) are interventions that can minimize and slow down these degenerative processes related to menopause. The objective of this study was evaluate the effects of TR and RC on the biogenesis markers and mitochondrial dynamics on the quadriceps muscle of ovariectomized rats. Rats Holtzman were divided into 8 groups (n = 10) Sham sedentary, trained, caloric and association training restriction with caloric restriction (SHAM SED, SHAM TR, SHAM RC AND SHAM TR-RC), ovariectomized sedentary, trained, caloric restriction and association training with caloric restriction (OVX SED, OVX TR, OVX and OVX RC TR-RC). The ovariectomy surgery (OVX) and pseudo-ovariectomy (Sham) was conducted when the rats reached 250g body weight. Two days after surgery, began the control of food intake and after 10 days of recovery from surgery, began the TR which consisted of 13 weeks of climbing training vertical ladder, with 72 hours between training sessions. The intensity of TR was 65, 85, 95 and 100% of the predetermined maximum load for each load proportion. After the fourth climbing, it was added 30g to determine the new maximum filler loading. Euthanasia of the animals after 13 weeks was TR and 48 hours after the last training session. The quadriceps muscle of the right hind foot was excised and stored at -80°C for analysis of gene expression and protein mediators of biogenesis and mitochondrial dynamics. The ovariectomy in rats altered mitochondrial biogenesis and dynamics as well as body weight and food consumption. The proposed interventions have been effective in minimized the body mass gains and reverse the molecular changes found in ovariectomy, especially in relation to mitochondrial biogenesis and dynamics.

Keywords: Ovariectomy, resistance training, caloric restriction, mitochondrial biogenesis and dynamics, quadriceps muscle

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados do IBGE (2012), no Brasil as mulheres representam mais de 50% da população brasileira com expectativa de vida por volta dos 73,9 anos. Portanto, a mulher irá alcançar e ultrapassar a idade da fase de interrupção permanente da atividade folicular ovariana, denominada menopausa. Durante a vida reprodutiva da mulher, cerca de 400 dos folículos primordiais crescem em folículos maduros e ovulam, sendo que, centenas de milhares de óvulos degeneram. Em torno dos 45 anos de idade, poucos folículos primordiais continuam sendo estimulados pelas gonadotropinas (hormônio folículo-estimulante – FSH e hormônio luteinizante – LH) e, a produção dos estrogênios pelos ovários diminui à medida que os folículos primordiais se aproxima do zero (HALL, 2011).

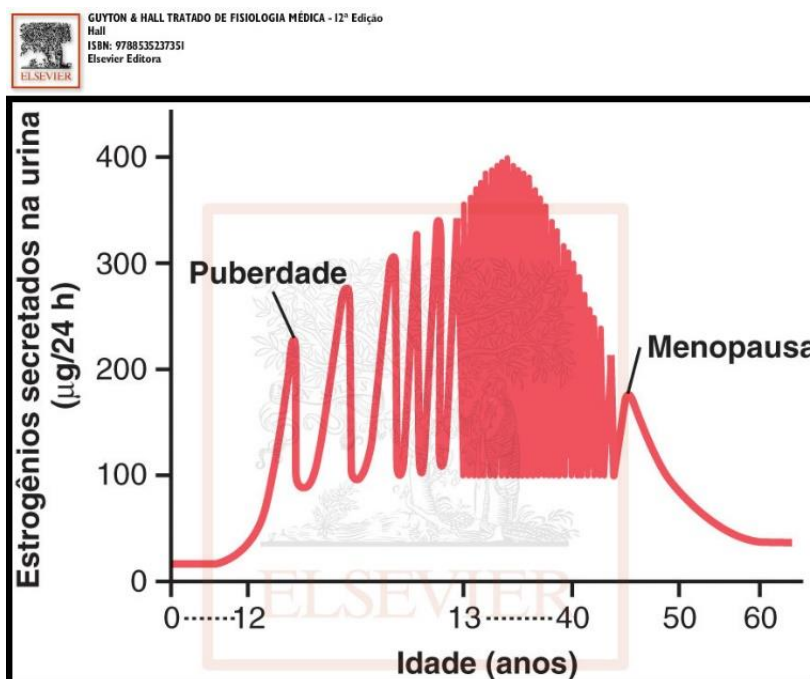


Figura 1. Secreção de estrogênio durante toda a vida sexual da mulher (adaptado de HALL, 2011).

O estrogênio é uma molécula de sinalização sistêmica, que além dos ovários é produzido pelas glândulas adrenais. Conduzido através do sistema circulatório, este hormônio possui importante função na regulação e coordenação das funções de órgãos, células e genes. Para isto, o estrogênio utiliza um repertório de receptores e vias de sinalização para ativar e regular as respostas moleculares e genômicas necessárias à sobrevivência celular. Existem três formas de estrógeno no organismo: estrona (E1),

estradiol (E2) e estriol (E3). Durante a vida reprodutiva da mulher o principal estrógeno circulante é 17 β -estradiol (E2), este é a forma mais potente (KUIPER *et al.*, 1997).

A diminuição da produção de estrogênios pelos ovários ocorre de forma gradual e podemos dividi-la em três etapas: pré-menopausa, perimenopausa e pós-menopausa. Estima-se que as mulheres permaneçam um terço das suas vidas em estado de deficiência hormonal, o que nos leva a investigar e compreender as consequências deste quadro, com o objetivo de amenizar e retardar os efeitos deletérios associados (MORAES; VANDENBERGHE; SILVA, 2007).

A ovariectomia em ratas jovens (13 semanas de vida) é uma técnica amplamente utilizada e consiste na retirada bilateral dos ovários na idade reprodutiva do animal saudável. Brinton (2012) mostra que após 1 a 2 semanas da ovariectomia, quase não é possível detectar a presença de 17 β -estradiol no plasma sanguíneo, sendo considerado um modelo translacional da menopausa humana em animais. O fato da ovariectomia ser realizada em ratas jovens, promove a diferenciação entre características que poderiam ser confundidas com o envelhecimento fisiológico e não, com a ausência do estrogênio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Menopausa e Sarcopenia

A diminuição da produção de estrogênio contribui para a redução da densidade mineral óssea, redistribuição da gordura subcutânea para as áreas viscerais, aumento do risco de doenças cardiovasculares e alterações na homeostase da glicemia. Portanto, a menopausa gera um impacto negativo na saúde da mulher e a redução do estrogênio pode causar um impacto negativo direto no tecido muscular (MALTAIS *et al.*, 2009).

De uma forma geral, a diminuição da massa muscular inicia a partir da terceira década de vida, com um declínio significativo a partir da quinta década. Porém, essa perda não ocorre de forma homogênea entre homens e mulheres. As mulheres apresentam uma perda de massa e força muscular ligeiramente acelerada durante o processo de menopausa (MALTAIS *et al.*, 2009). Goodpaster *et al.* (2006) citam que a partir da quarta década de vida há uma redução da massa magra de quase 0,6% ao ano, enquanto Rolland *et al.* (2007) demonstrou um declínio de 1% ao ano após a menopausa e, que a quantidade de potássio corporal total, um marcador de massa muscular magra, também apresentou um declínio do primeiro para o terceiro ano da menopausa.

A composição muscular da mulher na fase pós-menopausa apresenta o dobro de tecido não-contrátil por unidade de área de secção transversa muscular, quando comparada a mulheres jovens (BROWN, 2008; MALTAIS *et al.*, 2009). Grande parte deste tecido não-contrátil é constituído por gordura intramuscular, a qual está aumentada de forma significativa na menopausa. Segundo Brown (2008), a mulher estoca mais gordura intramuscular e utiliza menos glicogénio muscular, quando comparada ao homem.

Na menopausa, além da redução dos níveis de estrogénio, outros fatores são importantes para o declínio da massa muscular. A inatividade física, o baixo consumo de proteínas, o déficit de vitamina D, o aumento de citocinas inflamatórias e o estresse oxidativo contribuem para o desenvolvimento da sarcopenia na pós-menopausa (SIGNORELLI *et al.*, 2006; ANAGNOSTIS *et al.*, 2015). Rosenberg, em 1989, foi o pioneiro a utilizar o termo sarcopenia para descrever a perda involuntária de massa muscular livre de gordura, associada ao envelhecimento humano fisiológico (ROSENBERG, 2011).

Kang (2014) evidencia que ambos fatores intrínsecos e extrínsecos contribuem para o desenvolvimento da sarcopenia. Os fatores intrínsecos incluem: a redução da capacidade de síntese proteica, diminuição dos níveis de estrogénio, testosterona, hormônio do crescimento (GH) e o IGF-1 (*Insulin-like growth factor I*), aumento da proteólise e da autofagia devido ao aumento do estresse oxidativo e das citocinas inflamatórias, um declínio do controle motor neural, na junção neuromuscular e um aumento da apoptose com redução da atividade das células satélites quiescentes. Os fatores extrínsecos incluem: redução da atividade física, alteração da nutrição devido à mudanças nos hábitos alimentares, doenças que afetam o metabolismo muscular, como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares e, medicamentos, tabagismo e drogas que alteram a homeostase das proteínas musculares.

A fisiopatologia da sarcopenia inclui um desequilíbrio entre síntese e catabolismo das proteínas musculares, com redução da síntese e aumento do catabolismo (FIELDING *et al.*, 2011). Na pós-menopausa há uma diminuição do tamanho e do número das fibras musculares, com alteração da razão entre fibras tipo I e II, com uma perda preferencial das fibras tipo II, quando comparadas a mulheres jovens (KUBO *et al.*, 2003). Porém, este processo de atrofia e desnervação das fibras tipo II não está exclusivamente associado à redução do estrogénio, e sim, ao processo fisiológico do envelhecimento.

Concomitante à redução da massa muscular, a capacidade de produzir força muscular também está reduzida na menopausa. Autores sugerem um declínio significativo na força muscular a partir da quinta e sexta década de vida da mulher, com uma diminuição de 21% da força entre os 25 e 55 anos (MALTAIS *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012). A diminuição desta capacidade causa impacto negativo nas atividades funcionais como sentar e levantar, caminhar com velocidade, subir e descer degraus e manter o equilíbrio.

A ausência do estrogênio também se relaciona à redução da força muscular durante a menopausa, pois este também apresenta características anabólicas e estimula os receptores IGF-1, fator de recrutamento insulínico importante na síntese do músculoesquelético. Há evidências da presença de receptores de estrogênio (ER) no músculoesquelético, na forma de ER α (núcleo da fibra muscular) e ER β (nos capilares) e o estudo de Wiik *et al.*, (2009) mostra que há maior quantidade de ER em homens, mulheres e crianças, quando comparado à mulheres na menopausa.

Em decorrência à sarcopenia há um declínio de mais de 15% no metabolismo basal, que acontece devido à redução da massa muscular, principalmente de células musculares metabolicamente ativas. A mitocôndria é uma organela complexa envolvida nos processos de síntese de ATP, na regulação osmótica das células, na modulação do estado redox, na homeostasia do cálcio e nos processos de morte celular, por meio da via intrínseca da apoptose (SEO *et al.*, 2010).

A disfunção mitocondrial parece ser a chave para explicar esse declínio na qualidade muscular (PETERSON *et al.*, 2012). Em contrapartida, entender e identificar os fatores que estimulam a biogênese mitocondrial pode amenizar este quadro de queda na qualidade muscular e consequente redução da capacidade funcional.

2.2 Biogênese Mitocondrial

O equilíbrio energético entre o meio ambiente e o metabolismo celular é realizado por meio de vias nervosas e hormonais. Os estímulos externos chegam às células pela ativação de cadeias de sinalização intracelular, transmitindo mensagens a fatores relacionados à transcrição de genes que codificam enzimas. Entre as proteínas que fazem parte dessas cadeias de sinalização está o PGC-1 α (“*Peroxisome Proliferator – Activated Receptor – Co-activator 1 alpha*”). A Fosforilação Oxidativa (OXPHOS) e a Beta

Oxidação são mecanismos importantes regulados pelo PGC-1 α (PUIGSERVER *et al.*, 2003).

A figura 2 representa a via da biogênese mitocondrial através da expressão do gene PGC-1 α . Receptores de citocinas e β -adrenérgicos na superfície celular, por meio do AMP cíclico (cAMP) disparam a sinalização em cascata, envolvendo as vias PKA e p38 MAPK. A via PKA fosforila o fator de transcrição CREB, o qual está envolvido no aumento da expressão do gene PGC-1 α . A estimulação da via p38 MAPK fosforila diretamente a proteína PGC-1 α , resultando em sua ativação e estabilização. PGC-1 α ativa a expressão das subunidades da cadeia respiratória e do fator de transcrição mitocondrial (mtTFA) por meio da indução da expressão dos fatores respiratórios (NRF1 e 2). A ativação do mtTFA transloca para fora do núcleo e aumenta diretamente a transcrição e replicação do DNA mitocondrial (mtDNA) (PUIGSERVER *et al.*, 2003; FINK *et al.*, 2006).

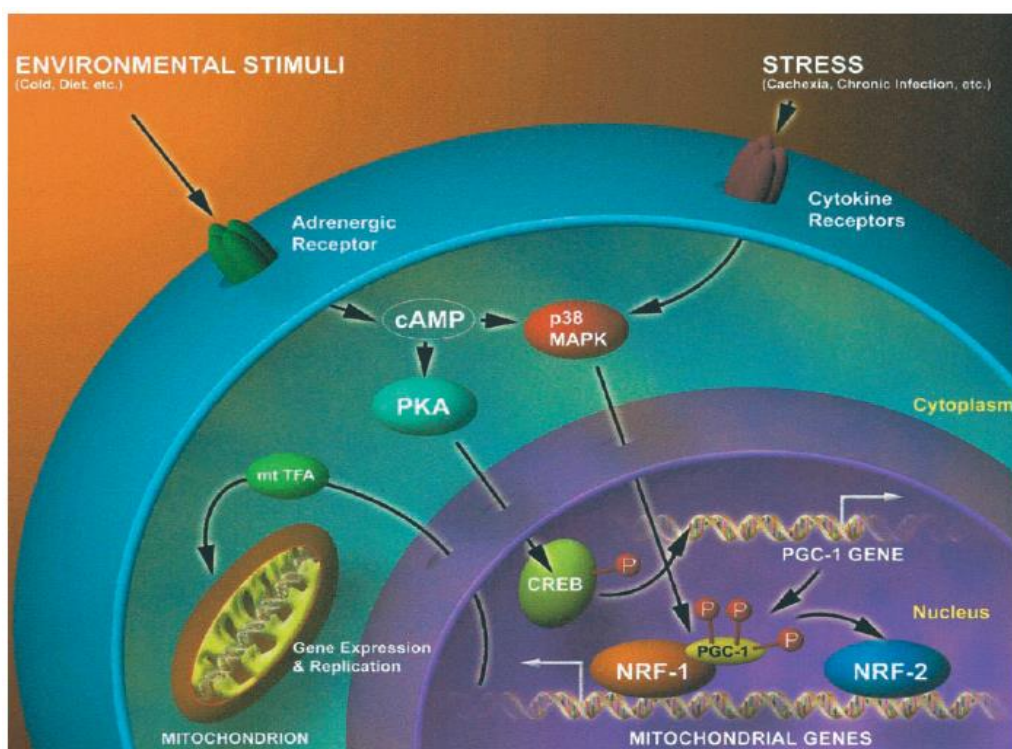


Figura 2. Biogênese mitocondrial e expressão gênica com ativação da via PGC-1 α (adaptado de Puigserver & Spiegelman, 2003).

Alguns autores citam um possível envolvimento da via PGC-1 α no controle dos tipos de fibras musculares, evidenciado pela expressão de diferentes concentrações de PGC-1 α de acordo com o tipo de fibra muscular (LIN *et al.*, 2002; MORTENSEN *et al.*, 2007). As fibras tipo I e IIA possuem maior capacidade oxidativa e maior conteúdo mitocondrial. A expressão das isoformas PGC-1 α no músculo esquelético é predominante

nas fibras oxidativas (tipo I e IIA). John Holloszy (1967) publicou o primeiro estudo mostrando que o treinamento físico promove biogênese mitocondrial no músculo esquelético, por meio de análises da atividade enzimática mitocondrial e marcadores de proteínas relacionadas aos músculos recrutados. Avanços em pesquisas com biologia molecular tem demonstrado que a biogênese mitocondrial induzida pelo treinamento é um processo que envolve a coordenação entre os genomas nucleares e mitocondriais (DRAKE *et al.*, 2015).

O exercício induz adaptações mitocondriais no músculo esquelético, estimulando a atividade e expressão da via PGC-1 α , a qual promove a biogênese mitocondrial, coordenando a transcrição do genoma nuclear e mitocondrial. Uma nova mitocôndria é formada e regulada por meio da dinâmica mitocondrial (fusão e fissão), a fim de garantir o fornecimento de energia e o equilíbrio do potencial de membrana (DRAKE *et al.*, 2015).

O PGC-1 α tem profunda influência na biogênese mitocondrial, porém, uma vez ativado em resposta ao exercício, ele recebe a cooperação do receptor de estrogênio (ER- α) e do fator respiratório nuclear (NRF-1), para aumentar a transcrição da maioria dos genes mitocondriais no músculo esquelético. Portanto, a interação funcional entre PGC-1 α , ER- α e NRF-1 permitem a regulação coordenada da transcrição dos genomas necessários para a biogênese mitocondrial induzida pelo exercício (SAFDAR *et al.*, 2011).

Desta forma, o PGC-1 α tem sido implicado na regulação da biogênese mitocondrial do músculo esquelético em resultado do treinamento físico e, portanto, um marcador comumente utilizado na adaptação muscular ao treinamento (PILEGAARD *et al.*, 2003).

2.3 Dinâmica Mitocondrial

A mitocôndria é uma organela extremamente complexa e dinâmica, podendo alterar sua organização, tamanho e forma, dependendo da sinalização intra e extracelular (RUBE & VAN DER BLICK, 2004). O músculo esquelético possui dois tipos distintos de subpopulações de mitocôndrias, sendo que um grupo está localizado logo abaixo do sarcolema e é denominado mitocôndrias subsarcolemais (SS) e o outro grupo está posicionado entre as miofibrilas, denominado mitocôndrias intermiofibrilares (IMF). Cada subpopulação mitocondrial possui diferentes componentes e funções que respondem especificamente à duração e intensidade da contração muscular. As

mitocôndrias intermiofibrilares (IMF) são altamente especializadas na produção de energia para a contração muscular e as subsarcolemas responsáveis por mediar os processos transmembranas (HOOD, 2001; FERREIRA *et al.*, 2010; LUNDBY & JACOBS, 2016).

A dinâmica mitocondrial é composta por um ciclo contínuo de fissão e fusão e, o equilíbrio entre esses eventos, irá determinar a morfologia e função desta organela (CHEN & CHAN, 2004). A diminuição da fusão pode resultar em uma fragmentação mitocondrial, pelo excesso de fissão, porém, a fissão diminuída pode gerar mitocôndrias longas e interconectadas (SEO *et al.*, 2010).

Portanto, o desequilíbrio entre fusão e fissão mitocondrial pode causar uma redução da atividade da cadeia respiratória e da produção de ATP, quebra da homeostase do cálcio, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e início da sinalização da apoptose e morte celular (SEO *et al.*, 2010). Os mecanismos de fissão e fusão são mediados por diversos componentes proteicos que foram identificados em levedura e se repetem em mamíferos (OKAMOTO *et al.*, 2005).

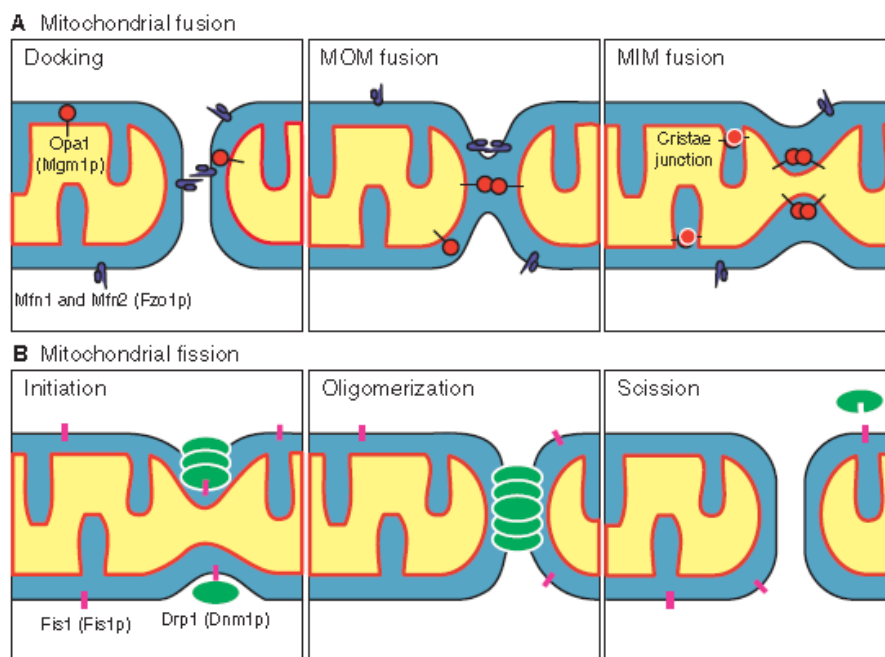


Figura 3. Esquema ilustrando as proteínas responsáveis pela fusão e fissão mitocondrial (adaptado de SEO *et al.*, 2010).

A figura 3 apresenta as proteínas envolvidas no processo de fusão e fissão mitocondrial. As proteínas da fusão mitocondrial são relacionadas à guanosina fosfatases (GTPases) e denominadas mitofusina 1 (MFN-1) e mitofusina 2 (MFN-2). Ambas as proteínas MFN-1 e 2 vão mediar a fusão por ativar os domínios da GTPases na membrana

mitocondrial externa. A fissão mitocondrial é controlada por proteínas dinâmicas relacionadas (DRP-1) e a proteína de fissão (FIS-1) também da família das GTPases e localizadas também na membrana externa (SEO *et al.*, 2010; WESTERMANN, 2010).

O constante ciclo de renovação mitocondrial é imprescindível para que haja a manutenção das suas funções durante o processo da vida celular. O *turnover* mitocondrial requer a coordenação entre os processos de biogênese mitocondrial e degradação seletiva (autofagia) (SEO *et al.*, 2010). A figura 4 apresenta as alterações morfológicas da mitocondrial em função da dinâmica.

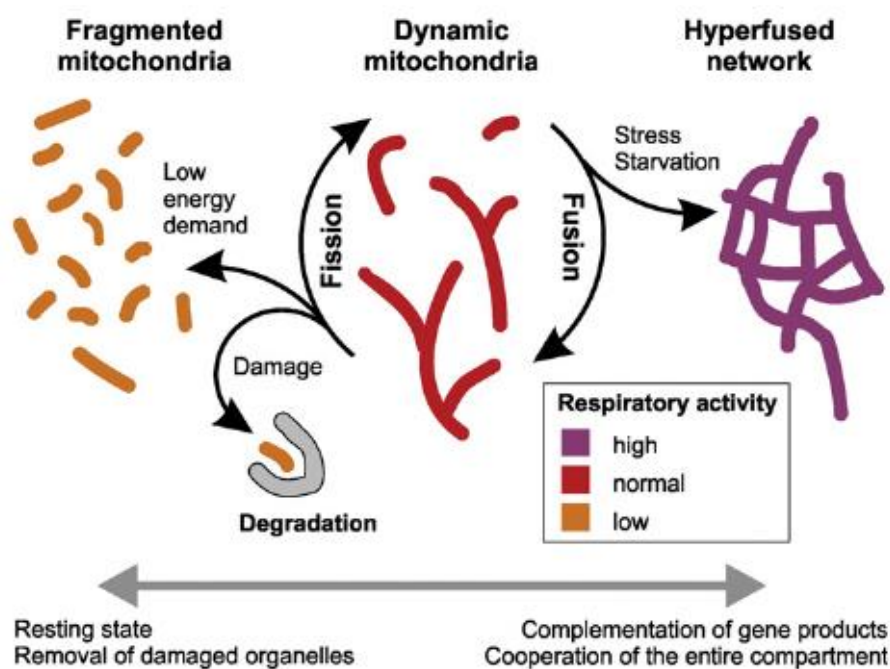


Figura 4. Exemplo da adaptação da morfologia mitocondrial e sua atividade respiratória (adaptado de Westermann, 2012).

2.3.1 Papel Bioenergético da Fusão Mitocondrial.

A fusão mitocondrial permite uma interconexão dos conteúdos mitocondriais, e a geração de extensas redes de novas mitocôndrias, sendo vantajoso para a célula sob condição de alta demanda energética. O rompimento da fusão desta rede mitocondrial resulta em disfunção e perda da capacidade respiratória (CHEN & CHAN, 2004).

Além da manutenção desta capacidade respiratória, a fusão mitocondrial é crucial para manter suas funções durante a formação dos subprodutos da respiração celular, as espécies reativas de oxigênio (EROS). Durante o processo de envelhecimento celular, o

acúmulo de ROS compromete a função mitocondrial, com perda da capacidade bioenergética e eventuais patologias, até a morte celular (BALABAN *et al.*, 2005).

Tondera *et al.* (2009) relatam a importância da fusão mitocondrial em condições de alta demanda energética em mamíferos, em situações de estresse como inibição da função celular por medicamentos e drogas e, sob restrição calórica. O estresse induz à hiperfusão mitocondrial, que é acompanhada pelo aumento da produção de ATP. O estado bioenergético da célula torna-se crítico durante a restrição calórica. A autofagia, um processo de autodegradação, ocorre por meio da fagocitose de componentes celulares em resposta à restrição de nutrientes (CHEN *et al.*, 2010).

2.3.2 *Papel Bioenergético da Fissão Mitocondrial*

A fissão mitocondrial possui uma variedade de diferentes funções como a distribuição da herança durante a divisão celular, o lançamento para o espaço intermembranoso de proteínas durante a apoptose e a geração de unidades mitocondriais transportáveis durante o movimento de alongamento do citoesqueleto (DETMER *et al.*, 2007). Estas funções não estão diretamente relacionadas à bioenergética, e sim a eliminação de organelas danificadas pela fusão mitocondrial, durante a formação de novas redes, a fim de permitir a autofagia. Portanto a fissão mitocondrial é um mecanismo de controle de qualidade que contribui para a manutenção da capacidade bioenergética celular (WESTERMANN, 2012).

Fusão e fissão são processos antagonistas que predominam em diferentes condições para adaptar a morfologia e a dinâmica mitocondrial de acordo com as necessidades bioenergéticas das células. A interação da dinâmica mitocondrial em ratas ovariectomizadas ainda permanece desconhecida, nos levando a investigar suas relações e efeitos no metabolismo muscular.

2.4 *Restrição Calórica e Sirtuínas*

Nisoli *et al.* (2005), descreve que a restrição calórica (RC) prolonga a vida de inúmeros organismos, desde leveduras e roedores, até possíveis primatas. Um dos mecanismos estudados para justificar os efeitos da restrição calórica na longevidade é a redução da produção de espécies reativas de oxigênio. A restrição calórica diminui a expressão de genes associados ao envelhecimento e promove a biogênese mitocondrial

muscular, aumentando a disponibilidade energética celular (CIVITARESE *et al.*, 2007). Entretanto, algumas evidências sugerem que a chave para o entendimento da longevidade celular promovida pela RC, está na família das sirtuínas.

As sirtuínas foram isoladas e caracterizadas por Sinclair & Guarente (1997) e compreendem proteínas deacetiladoras dependentes da coenzima NAD, envolvidas no controle do metabolismo energético e associadas à longevidade. São proteínas reguladoras da defesa e sobrevivência celular em resposta ao estresse (NISOLI *et al.*, 2005). Encontram-se no organismo dos mamíferos, sete tipos de sirtuínas (SIRT 1-7). SIRT1, SIRT6 e SIRT7 são nucleares; SIRT3, SIRT4 e SIRT5 são mitocondriais; e SIRT2 é citoplasmática (GUARENTE, 2015).

A SIRT3 é a principal proteína deacetiladora mitocondrial, sua expressão é aumentada em resposta à RC e participa do processo de regulação da produção de ATP e da sinalização da apoptose celular (VERDIN *et al.*, 2010). É responsável pela deacetilação de várias enzimas da maquinaria mitocondrial, como a regulação da cadeia transportadora de elétrons, na subunidade NDUFA9 do complexo I, succinato desidrogenase no complexo II e ATP5A do complexo ATP sintase. Também atua aumentando as ações antioxidantes, deacetilando MnSOD e isocitrato desidrogenase 2 (LIN, 2014).

No músculo esquelético, a RC aumenta a sensibilidade à insulina, modula o *turnover* proteico e protege contra o declínio da atividade mitocondrial e função muscular (LIN, 2014). A função da SIRT3 no músculo esquelético não está totalmente esclarecida. Muitos estudos sugerem que a RC e o exercício induzem a biogênese mitocondrial e a tolerância ao estresse oxidativo no músculo esquelético de camundongos e humanos (BAUR *et al.* 2006; LAGOUGE *et al.* 2006; FEIGE *et al.* 2008; KOLTAI *et al.* 2010).

Três vias metabólicas têm sido utilizadas para explicar esses efeitos: a via da síntese de óxido nítrico (eNOS) induzida pela RC; a deacetilação de PGC-1 α que se encontra aumentada na condição de RC; e a ligação da adiponectina a receptores musculares que ativam o eixo SIRT3/AMPK, sendo que esta via também pode ser desencadeada pelo exercício (GUARENTE, 2015).

A RC também altera a dinâmica mitocondrial promovendo o aumento da fusão gerando mitocôndrias alongadas em diversos tipos de células. Este aumento da fusão em decorrência da RC torna-se um efeito protetor na manutenção das células, promovendo a capacidade de produzir ATP e reduzindo a apoptose (PUTTI *et al.*, 2015).

A diminuição da expressão de SIRT3 leva a redução da capacidade oxidativa muscular e aumento do estresse oxidativo, resultando em defeitos na sinalização da via muscular da insulina (LIN, 2014). Entretanto, são escassos os estudos correlacionando a expressão da SIRT3 e a ausência de estrogênio.

2.5 *Treinamento Resistido*

Como relatado anteriormente neste trabalho, após a menopausa ocorre um grande declínio na quantidade de massa muscular e força, gerando uma possível redução do gasto energético e alterações metabólicas. O exercício físico tem sido utilizado como uma intervenção não farmacológica capaz de prevenir e reverter as alterações promovidas pela menopausa nos sistemas musculoesquelético e ósseo, no perfil lipídico e na capacidade cardiorrespiratória (LEITE *et al.*, 2010; PRESTES *et al.*, 2011; SHIGUEMOTO *et al.*, 2012).

O Treinamento Resistido (TR) tem sido associado ao aumento da força e massa muscular, além da massa óssea. Estudos anteriores, conduzidos por nosso grupo de pesquisadores, utilizaram ratas ovariectomizadas submetidas ao TR e concluíram que o TR foi capaz de aumentar a área do músculo sóleo (PRESTES *et al.*, 2011), reduzir o conteúdo de lipídios no fígado, músculos e depósitos de gordura visceral (LEITE *et al.*, 2009), reestabelecer a atividade de MMP-2 nos músculos das patas inferiores e no tendão do calcâneo (PRESTES *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010).

Nota-se que a prática de TR, assim como a RC, pode ser estratégias para a melhora da resposta fisiológica em função dos efeitos deletérios instalados pela ausência de estrogênio durante a menopausa. No entanto, existem poucas evidências da associação entre o TR e a RC neste período metabólico, sobre as alterações bioenergéticas do músculo esquelético.

Estas reflexões apontam para a importância de estudar os efeitos do TR associado à RC sobre a biogênese e dinâmica mitocondrial de ratas ovariectomizadas. Nossa hipótese foi que a ovariectomia promovesse alterações na expressão dos marcadores de biogênese e dinâmica mitocondrial e que as intervenções (TR e RC) associadas ou não, fossem capazes de reverter estas alterações.

3. OBJETIVO

3.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da ovariectomia sobre a biogênese e dinâmica mitocondrial do músculo quadríceps de ratas.

3.2 Específicos

Avaliar os efeitos do treinamento resistido e da restrição calórica em ratas ovariectomizadas e intactas sobre:

- Expressão Gênica do marcador da Biogênese Mitocondrial (PGC-1 α);
- Expressão Gênica dos marcadores da Dinâmica Mitocondrial (MFN-1 e FIS-1);
- Expressão Proteica da Sirtuína Mitocondrial (SIRT3);
- Massa Corporal.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Para a realização desta pesquisa foram utilizadas 80 ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Holtzman*, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP-Araraquara/SP), com massa corporal inicial 165 ± 5 g. Durante o período de adaptação, os animais foram agrupados em gaiolas coletivas contendo cinco ratas cada e foram mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício, no Departamento de Ciências Fisiológicas (UFSCar), em temperatura ambiente de 22 ± 2 °C. A iluminação do Biotério foi adequada para manter o ciclo invertido claro/escuro de 12h, com as luzes acesas das 19h às 7h. Durante este período de adaptação, água e ração foram ofertadas *ad libitum*. Todos os cuidados e procedimentos realizados seguiram as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e, foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), de acordo com o protocolo 004/13.

4.2 Grupos Experimentais

A ratas chegaram ao Biotério com seis semanas de vida e completaram a fase de adaptação na décima segunda semana de vida, quando alcançaram aproximadamente 250g de massa corporal, sendo consideradas ratas jovens adultas (SOUZA *et al.*, 2007; HORCAJADA *et al.*, 2008). Neste momento foi realizado o procedimento de Ovariectomia (OVX) e Pseudo Ovariectomia (SHAM). Após as cirurgias, as ratas foram mantidas em gaiolas individuais até o término do experimento.

Dois dias após as cirurgias, iniciou-se a avaliação do consumo alimentar das ratas, individualmente, a fim de estipular a média de consumo por animal. Esta avaliação ocorreu uma semana antes do início da restrição alimentar e, para o cálculo do consumo, utilizou-se a diferença entre a quantidade de ração ofertada e a sobra diária na gaiola.

A partir deste momento, foi realizada a distribuição aleatória das ratas em oito grupos experimentais:

- 1) Sham Intacto Sedentário (SHAM SED);
- 2) Ovariectomia Sedentário (OVX SED);
- 3) Sham Intacto Treinado (SHAM TR);
- 4) Sham Intacto Restrição Calórica (SHAM RC);
- 5) Sham Intacto Treinado com Restrição Calórica (SHAM TR-RC);

- 6) Ovariectomia Treinado (OVX TR);
- 7) Ovariectomia Restrição Calórica (OVX RC);
- 8) Ovariectomia Treinado com Restrição Calórica (OVX TR-RC).

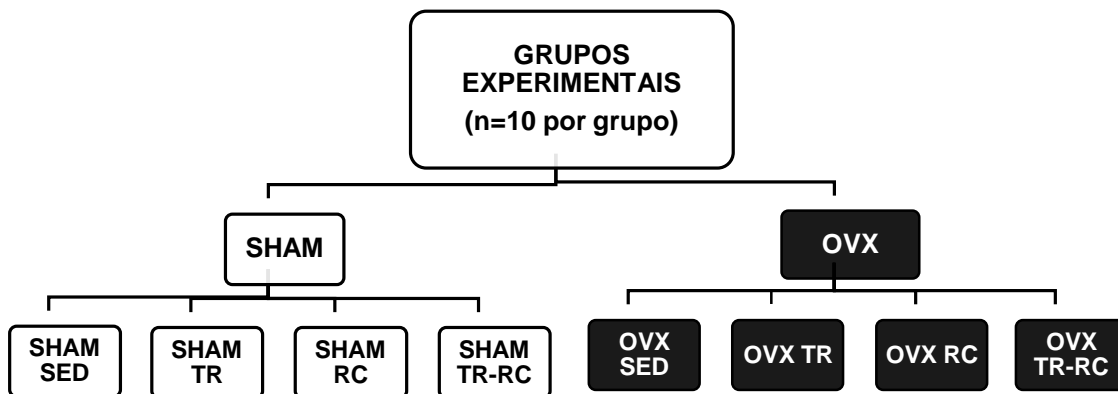


Figura 5. Organograma dos grupos experimentais.

Animais Sedentários

O grupo de animais denominado Sedentários (SHAM SED e OVX SED) foi assim denominado por não realizarem qualquer tipo de treinamento e receberem ração *ad libitum*, permanecendo em suas gaiolas individuais por todo o período do experimento.

Animais Treinados

O grupo de animais denominado Treinados (SHAM TR e OVX TR) realizou uma sessão de treinamento resistido de escalada com 72h de intervalo entre cada sessão, durante 13 semanas e, recebeu ração *ad libitum*.

Animais Restrição Calórica

O grupo de animais denominado Restrição Calórica (SHAM RC e OVX RC), recebeu a ração restrita em 30% de acordo com o consumo calculado no período de adaptação e não realizou qualquer tipo de treinamento, permanecendo em suas gaiolas individuais por todo o período do experimento.

Animais Treinados Restrição Calórica

O grupo de animais denominado Treinados Restrição Calórica (SHAM TR-RC e OVX TR-RC) realizou uma sessão de treinamento resistido de escalada com 72h de

intervalo entre cada sessão, durante 13 semanas e recebeu a ração restrita em 30% de acordo com o consumo calculado no período de adaptação.

4.3 Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito abaixo e, após este procedimento, todos os animais permaneceram em recuperação durante 10 dias, antes do início do Treinamento Resistido e da Restrição Calórica.

Ovariectomia (Ovx)

Após os animais alcançarem doze semanas de vida e no mínimo 250g de massa corporal, foi realizada a retirada bilateral dos ovários das ratas dos grupos OVX. Esta técnica de ovariectomia foi proposta por Kalu (1991) e recomendada pela FDA (*USA Food and Drug Administration*) para os trabalhos pré-clínicos na menopausa (THOMPSON *et al.*, 1995). As ratas foram anestesiadas utilizando ketamina – xylazina (61,5-7,6mg/100g). Uma pequena incisão bilateral (1-1,5cm) foi feita através da pele e da camada muscular, entre a última costela e a pata traseira. A cavidade peritoneal foi aberta e após a identificação da fímbria, os ovários foram removidos. Após a remoção, a camada muscular e a pele foram suturadas. Os animais foram medicados durante três dias com antibióticos (Penicilina-Streptomicina, 5mg/kg).

Sham

A cirurgia SHAM foi realizada com os mesmos procedimentos da OVX, exceto que os ovários não foram retirados, apenas expostos e devolvidos ao local de origem. Durante a recuperação anestésica, todos os animais foram observados por cerca de quatro horas. Os procedimentos cirúrgicos e anestésicos foram acompanhados pelo médico veterinário Dr. Thiago Francisco de Moraes (CRMV-24016/SP).

4.4 Eutanásia dos Animais

A ordem dos animais para a eutanásia foi rotativa em relação aos grupos para minimizar possíveis interferências do tempo de jejum e horário da eutanásia, ou seja, um animal de cada grupo foi eutanasiado até que se repetiu o mesmo grupo. Com isso, os grupos apresentaram a mesma média de jejum de quatro horas após a remoção da ração e 48h após a última sessão de treinamento resistido.

A eutanásia foi realizada por meio de decapitação após a última sessão de treinamento resistido, caracterizando o efeito crônico e agudo do exercício. Em seguida, foi dissecado e removido o músculo quadríceps (vasto lateral) de ambas as patas, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C .

4.5 Protocolo de Treinamento Resistido

Para a intervenção do Treinamento Resistido foi utilizado o protocolo de Hornberger & Farrar (2004), adaptado por Prestes *et al.* (2009). O treinamento consiste em séries de escaladas, com incremento de carga, a cada 72h do final de cada sessão, durante 13 semanas.

4.5.1 Escada Vertical e Aparato de Carga

Para a realização do protocolo de treinamento, foi utilizada uma escada vertical (110cm x 18cm, degrau de 2cm e 80° de inclinação) que possui uma gaiola (20 x 20 x 20cm) em sua altura final, na qual as ratas repousaram (dois minutos) após a escalada completa. A dimensão da escada fez com que as ratas realizassem de 8 a 12 movimentos por escalada.

O aparato utilizado para o incremento de carga é constituído por tubos falcon unidos por barbante e acoplados na porção proximal da cauda do animal com a utilização de uma fita adesiva. O incremento da carga é colocado dentro dos tubos falcon, descontando o peso do aparato.

4.5.2 Protocolo de Familiarização

As ratas iniciaram a familiarização ao treinamento com escaladas parciais (de pontos mais próximos à gaiola) até conseguirem realizar três escaladas completas consecutivas, sem a utilização do aparato na cauda e com dois minutos de descanso dentro da gaiola. Na sessão seguinte, repetiu-se o protocolo, porém com a utilização do aparato sem carga adicional. A familiarização foi realizada para todos os grupos treinados, durante uma semana (três sessões).

4.5.3 Determinação da Carga Máxima de Carregamento

Após a familiarização, foi realizada a primeira determinação da carga máxima de carregamento. Para isto, utilizou-se a massa corporal de cada animal e calculou-se 75% desta massa. Portanto, a primeira escalada foi realizada com a sobrecarga de 75% da

massa corporal. Após dois minutos de descanso na gaiola, acrescentou-se 30g para a segunda escalada. Este procedimento foi repetido até a falha, quando o animal não realizou a escalada completa. A última carga na qual o animal conseguiu realizar a escalada completa foi determinada como a Carga Máxima de Carregamento da sessão de treinamento.

4.5.4 Sessão de Treinamento Resistido

Todas as sessões de treinamento foram realizadas no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício da UFSCar, com duração aproximadamente de duas horas (das 12h às 14h) em ambiente escuro, pois de acordo com Richter (1978), a rata é ativa em períodos de escuridão e inativa em períodos com a luz acesa. Para a melhor visualização do pesquisador, foi utilizada uma lâmpada vermelha de 150W.

As sessões do treinamento resistido foram realizadas com 72h de intervalo, durante 13 semanas. Consistiu em quatro escaladas com 65, 85, 95 e 100% da carga máxima de carregamento previamente determinada para cada rata. Após a quarta escalada, acrescentou-se 30g para determinar a nova carga máxima de carregamento. Os acréscimos de 30g foram realizados por no máximo cinco escaladas extras (HORNBERGER & FARRAR, 2004; SHIGUEMOTO *et al.*, 2012), contabilizando a nova Carga Máxima de Carregamento em cada sessão de treino.

4.6 Ração e Restrição Calórica

A ração utilizada no presente estudo foi preparada no Instituto de Química e de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (IQ/FCF-USP) e seguiu as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para roedores adultos (AIN-93M) (REEVES *et al.*, 1993).

Os grupos Restrição Calórica (SHAM RC, SHAM TR-RC, OVX RC e OVX TR-RC) receberam uma restrição de 30% na quantidade ofertada, de acordo com o cálculo do consumo. Porém, os micronutrientes da ração dos grupos RC foram ajustados para que não houvesse deficiência nutricional, aumentando sua quantidade em relação à proporção da restrição alimentar (PUGH *et al.*, 1999; PEDROSO *et al.*, 2014). A oferta da ração para os grupos RC foi realizada duas porções durante o dia, às 10h e após o TR (14h).

Tabela 1. Composições das rações utilizadas no experimento (AIN-93M controle e a modificada) (REEVES *et al.*, 1993).

Ingredientes	Ração	Ração	Ração	
	AIN-93M	Restrição Calórica	controle	restrição calórica
	g/Kg	g/Kg	100g	70g
Amido	620,692	501,14	62,07	35,08
Sacarose	100,000	100,000	10,00	7,00
Celulose	50,000	71,430	5,00	5,00
Caseína	140,000	200,000	14,00	14,00
L-cistina	1,800	2,430	0,18	0,17
Óleo de soja	40,000	57,140	4,00	4,00
Mistura de minerais	35,000	50,000	3,5	3,5
Mistura de vitaminas	10,000	14,290	1,00	1,00
Bitartarato de colina	2,500	3,570	0,25	0,25
Tetrabutyl-hidroquinona	0,008	0,008	0,008	0,008
Total	1000g	1000g	100g	70g

Tabela 2. Distribuição do valor calórico dos macronutrientes.

Distribuição dos macronutrientes	Ração controle Kcal/100g	Ração restrição calórica Kcal/70g
Carboidratos	288,276	168,3
Proteínas	56,7	56,7
Lipídeos	36	36
Total	381	261

4.7 Conversão e Obtenção do cDNA dos Genes *PGC-1 α* , *Mitofusina 1* (MFN-1) e *FIS-1*

A quantificação da expressão gênica das proteínas de biogênese e dinâmica mitocondrial (*PGC-1 α* , *MFN-1* e *FIS-1*) foi realizada pela conversão do seu RNA mensageiro pela técnica PCR-RT.

4.7.1 Extração do RNA total

Para a extração, foi utilizado 100mg de tecido do músculo quadríceps da pata traseira direita, previamente armazenado a -80°C , homogeneizado (*FastPrep*[®] 24 – *MP Biomedicals*) em 1ml de TRIzol[®] (*Invitrogen Corporation, Calsbad, California*). O RNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante, quantificado por leitura a 260nm e verificado o grau de pureza (260nm/280nm e 260/230) por espectrofotometria. A integridade do RNA foi confirmada pela visualização, em luz ultravioleta, do padrão de eletroforese as bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

4.7.2 Tratamento com DNase e Transcrição Reversa

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

4.7.3 PCR em tempo real

A quantificação do RNAm das amostras dos grupos experimentais foi realizada em duplicata no sistema de detecção PCR em tempo real CFX 96 (*Bio-Rad, San Francisco, USA*) a partir de aproximadamente 20ng de cDNA, 0,4 μL de cada iniciador e 10 μL de *SsoFastTM Eva Green*[®] (*Bio-Rad, San Francisco, USA*) e água suficiente para completar o volume total de reação de 20 μL .

O programa de ciclos térmicos consistiu de 10 minutos a 95°C , seguidos de 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos, 54 a 62°C durante 30 segundos (temperatura dos *primers*), e 72°C durante 30 segundos. Os *primers* utilizados e suas sequencias foram os seguintes:

Tabela 3. Sequência de *primers* utilizados.

Gene	Sequência <i>Primers</i>	
PGC-1 α	Sense	AGGTATGACAGCTATGAAGC
	Antisense	GTGTCAGGTCTGATTTTACC
MFN-1	Sense	GAGAAGAGGGTTTATTCAATGG
	Antisense	TCATCAACCAAAAACAGACAG
FIS-1	Sense	GGCTCAAGGAATATGAAAAGG
	Antisense	CAGTCCATCTTTCTTCATGG
GAPDH	Sense	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG
	Antisense	GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA

PGC-1 α = Proliferador de Peroxisoma 1 α ; MFN-1 = Proteína de fusão mitocondrial (Mitofusina 1); FIS-1 = Proteína de fissão mitocondrial (FIS-1); GAPDH = Gene constitutivo (Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase).

As temperaturas de anelamento (T_m) dos *primers* foram previamente padronizadas e determinadas pelos picos das curvas de MELT.

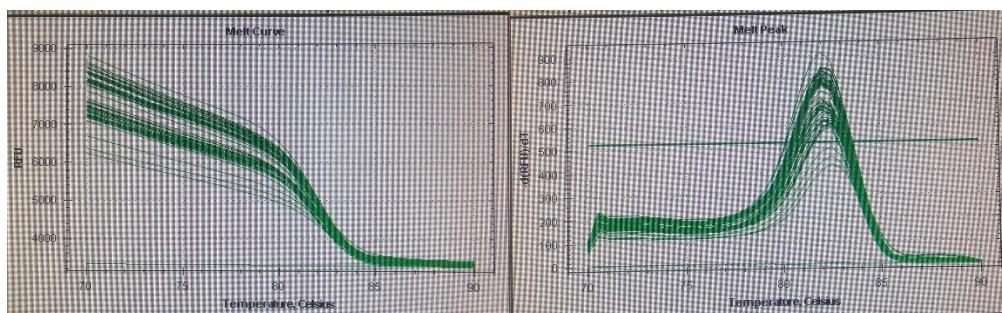


Figura 6. Curva de Melt obtida para a determinação da temperatura de anelamento do gene GAPDH (62°C).

O nível de expressão comparativa de cada condição do experimento foi realizado pelo método $\Delta\Delta C_t$. Depois de calculada a média dos C_t (ΔC_t) de cada gene (PGC-1 α , MFN1, FIS1 e GAPDH) foi realizada subtração do C_t (gene alvo) pelo C_t (gene constitutivo). Posteriormente, é calculado o $\Delta\Delta C_t$, que é a subtração do ΔC_t pela média do ΔC_t (grupo controle – Sham SED). O negativo deste resultado ($-\Delta\Delta C_t$) é então elevado a potência de 2 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) e assim, os dados ficaram preparados para o tratamento estatístico convencional.

4.8 Expressão Proteica – Western Blotting

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método BCA (Ácido Bicinonínico) (SMITH *et al.*, 1985) e a quantificação proteica pela técnica *Western Blotting*.

4.8.1 Extração de Proteínas

Após a dissecação do tecido, 400mg das amostras do músculo quadríceps da pata traseira direita, foram mantidas em microtubos e armazenadas a -80°C até a extração.

As amostras foram então homogeneizadas em tampão para lise e extração das proteínas contendo 20mM Tris HCL (pH 7,4), 150mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 1mM EDTA (pH 8,0), 10% glicerol, 20mM fluoreto de sódio, 30mM pirofosfato de sódio, 0,2% SDS, 0,5% deoxicolato de sódio e água ultrapura. O tampão foi mantido no gelo e, no momento do uso, acrescentou-se inibidores de proteases (aprotinina, 0,01mg/mL; PMSF, 2mM) e inibidores de fosfatase (ortovanadato de sódio, 100mM; pirofosfato de sódio, 10mM; Fluoreto de sódio, 10mM), todos adquiridos da *Sigma-Aldrich*.

Para a homogeneização, utilizou-se homogeneizador elétrico *Polytron (Ika T10 basic)*, com velocidade máxima e, três *bursts* de 30 segundos. Entre a homogeneização das diferentes amostras, o homogeneizador foi lavado com álcool 70% e água ultrapura. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm e temperatura de -4°C . Após a centrifugação, a camada intermediária (proteínas extraídas) foi coletada e transferida para um microtubo (1,5ml). Alíquotas de 50 μL foram armazenadas a -80°C .

Para maior adstringência dos resultados, foi realizada uma curva de proteínas para a escolha da diluição ideal (diluição sequenciada – 2x, 4x, 8x, 16x, 32x, 64x, 128x). Para isto, foi utilizado amostras de cada grupo controle (SHAM SED e OVX SED). A diluição escolhida foi de 4x e após a corrida em gel de eletroforese, escolheu-se o volume de 40 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ de proteína por amostra.

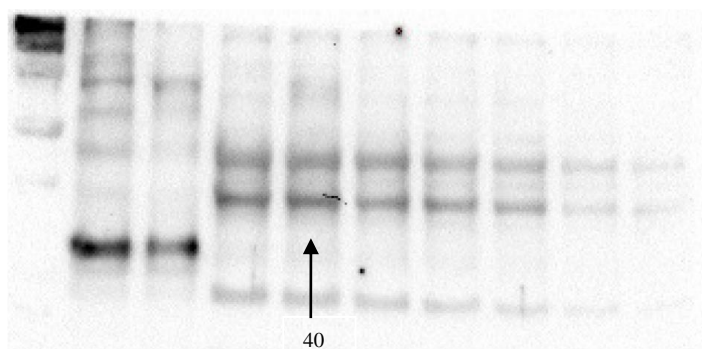


Figura 7. Gel poliacrilamida corrido em eletroforese para escolha do volume/concentração proteica da amostra (Grupo Controle Sham Sed).

4.8.2 SDS-PAGE Eletroforese

Os géis foram preparados em bicamadas, sendo a camada superior (gel de empilhamento) constituído de 5% Tris (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônia e 0,1% TEMED. Os géis inferiores (resolutivos) foram preparados com poliacrilamida nas concentrações de 7,5 e 10%, 380mM Tris (pH 8,8), 0,1% persulfato de amônia e 0,77%

TEMED. As alíquotas foram ressuspensas em tampão de amostra Laemmli (1:4). Para a desnaturação das proteínas, foi utilizado banho seco a 100°C, durante cinco minutos. Após a desnaturação, as amostras foram pipetadas em SDS-PAGE e mergulhadas em tampão de eletroforese (250mM Tris, 1,92M Glicina, 1% SDS - 1:10) a 100V de potência.

4.8.3 Transferência de Proteínas do Gel para a Membrana (Nitrocelulose)

Foi preparado um “sanduíche” contendo esponja, duas folhas de papel filtro de 3mm, gel, membrana, duas folhas de papel filtro novamente e esponja. A transferência das proteínas para o gel foi realizada em cuba de eletroforese com tampão (3mM glicina, 48mM Tris base, 0,037% SDS e 20% metanol) por 90 minutos a 150V. A eficácia da transferência foi verificada corando-se a membrana por cinco minutos com Ponceau-S, seguida de lavagem com TBS-T (8% NaCl, 0,2% KCl, 0,2% KH₂(PO)₄, 1,15% Na₂H(PO)₄ e 0,5% Tween).

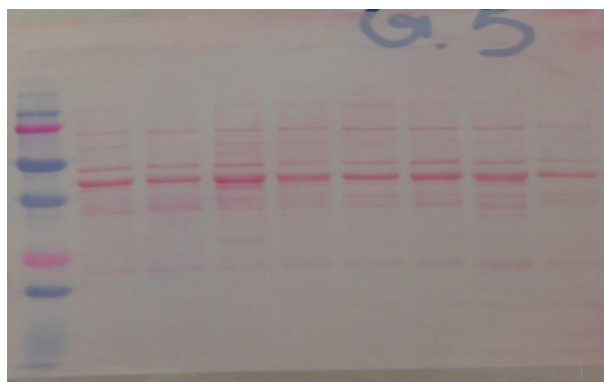


Figura 8. Transferência úmida do gel para a membrana de nitrocelulose, corada com Ponceau-S.

4.8.4 Imunodeteção das Proteínas com Anticorpos

Para o bloqueio dos sítios sem proteínas, foi utilizado 30ml de leite 9% durante três horas. Após o bloqueio, foi realizada uma lavagem de cinco minutos com TBS-T e aplicado o anticorpo primário (SIRT3 - *Cell Signaling Technology* – 1:1000 – 28KDa) e incubado *overnight*, sob agitação em geladeira a 4°C. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos com TBS-T e foi aplicado o anticorpo secundário anti-IgG Rabbit (HRP 7074-S - 1:10.000) durante três horas em agitação e temperatura ambiente.

4.8.5 Revelação com Quimioluminescência

Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi novamente lavada três vezes por cinco minutos com TBS-T e preparada para a revelação. A solução de revelação foi constituída pela mistura de volumes iguais (500µL) dos reagentes 1 e 2 do *Kit ECL Advance*

(*GE Healthcare*), composto por luminol, fenol e peróxido de hidrogênio. As membranas ficaram mergulhadas por cinco minutos na solução. Os *blots* foram visualizados e analisados pelo sistema *ImageLab* (*Bio-Rad*). Após a revelação, a membrana passou pelo processo de *Deblot Stripping Buffer*, para ser incubada novamente com o anticorpo da proteína constitutiva Alfa-Tubulina (*Cell Signalling* – 1:10.000 - 52KDa) e seu respectivo anticorpo secundário (*Cell Signalling* - *anti-rabbit* HRP 7074-S).

4.9 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* e com as variáveis apresentando distribuição normal, foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA *one-way* com a análise de *post-hoc* (*Tukey's test*) para comparações múltiplas ($p < 0,05$). O teste *t Student* ($p < 0,05$) foi utilizado para o pareamento entre as intervenções (SHAM TR com OVX TR, SHAM RC com OVX RC e SHAM TR-RC com OVX TR-RC). As análises estatísticas foram realizadas com o programa *Statistica*[®] 7 (*StatSoft*). Os resultados foram apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM).

5 RESULTADOS

5.1 Evolução da Massa Corporal, Massa do Útero e Quadríceps.

Os dados iniciais da massa corporal dos grupos experimentais não apresentaram diferença estatística ($p < 0,165$), demonstrando a homogeneidade da amostra. Ao final do experimento, a ovariectomia alterou a massa do grupo ovariectomia sedentário quando comparado ao grupo controle intacto SHAM (OVX SED vs SHAM SED, $p < 0,0001$). Todas as intervenções no grupo ovariectomia foram capazes de reduzir a massa corporal, comparadas ao grupo ovariectomia sedentário (OVX TR vs OVX SED, $p < 0,04$; OVX RC vs OVX SED, $p < 0,007$; OVX TR-RC vs OVX SED, $p < 0,001$). Entre as intervenções no grupo ovariectomia, a associação do treinamento com restrição calórica foi mais eficiente em reduzir a massa corporal do que o treinamento isolado (OVX TR-RC vs OVX TR, $p < 0,02$). Não houve diferença estatística entre o grupo associação do treinamento com restrição calórica em relação à restrição calórica isolada (OVX TR-RC vs OVX RC, $p < 0,088$).

Em relação ao grupo intacto SHAM, as intervenções restrição calórica e a associação do treinamento com restrição calórica, reduziram a massa corporal comparada ao grupo intacto sedentário (SHAM RC vs SHAM SED, $p < 0,03$; SHAM TR-RC vs SHAM SED, $p < 0,01$).

A massa do útero foi utilizada como controle da eficácia da cirurgia, sendo esperado sua redução em todos os grupos OVX, indicando alterações negativas na produção dos hormônios ovarianos. Os resultados mostraram a eficácia da cirurgia, sendo que, houve uma redução estatisticamente significativa da massa do útero em todos os grupos ovariectomia comparados ao grupo intacto SHAM (todos os grupos OVX vs SHAM SED, $p < 0,0001$).

Os valores da massa do quadríceps também apresentaram diferença estatística. Os grupos que realizaram o treinamento resistido apresentaram um aumento na massa do quadríceps em relação aos grupos sedentários (OVX TR vs OVX SED, $p < 0,04$; SHAM TR vs SHAM SED, $p < 0,008$).

Em relação ao consumo alimentar, o grupo OVX consumiu em média 18,4g/dia de ração e o grupo SHAM consumiu 15,8g/dia. O consumo dos grupos intactos restrição calórica e associação do treinamento com a restrição calórica apresentou uma redução significativa quando comparado ao grupo intacto controle SHAM (SHAM RC e SHAM TR-RC vs SHAM SED, $p < 0,05$). Da mesma forma que o grupo ovariectomia submetido

a associação do treinamento com a restrição calórica, apresentou redução significativa quando comparado com o grupo ovariectomia sedentário (OVX TR-RC vs OVX SED, $p < 0,02$).

Tabela 4. Dados da massa corporal inicial e final, massa do útero, massa do quadríceps e consumo alimentar dos grupos experimentais (gramas).

<i>Grupos experimentais</i>	<i>Massa corporal inicial (g)</i>	<i>Massa corporal final (g)</i>	<i>Massa do útero (g)</i>	<i>Massa do quadríceps (g)</i>	<i>Consumo alimentar (g/dia)</i>
SHAM SED	276±05	372±14	0,75±0,01	4,43±0,15	18,64±0,5
OVX SED	274±05	468±13 ^a	0,13±0,01 ^a	4,66±0,14	20,83±0,9
OVX TR	292±04	416±16 ^b	0,21±0,03 ^a	5,46±0,19 ^a	20,4±0,7
OVX RC	293±06	404±10 ^b	0,13±0,01 ^a	5,30±0,34	17,82±0,8
OVX TR-RC	283±06	358±09 ^{b, c}	0,12±0,01 ^a	4,53±0,23	14,67±0,7 ^{a, b}
SHAM TR	283±09	357±13	0,64±0,08	5,38±0,22 ^b	19,02±0,5
SHAM RC	285±08	322±07 ^a	0,55±0,03	4,36±0,14	13,31±0,2 ^a
SHAM TR-RC	279±08	304±06 ^a	0,31±0,03	4,60±0,16	12,27±0,3 ^a

Valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM), n = 10 por grupo. **Grupo Ovariectomia:** Ovariectomia Sedentário (OVX SED), Ovariectomia Treinado (OVX TR), Ovariectomia Restrição Calórica (OVX RC) e Ovariectomia Treinado com Restrição Calórica (OVX TR-RC). **Grupo Intacto (Sham):** Sham Sedentário (SHAM SED), Sham Treinado (SHAM TR), Sham Restrição Calórica (SHAM RC) e Sham Treinado com Restrição Calórica (SHAM TR-RC). As letras subscritas ^a e ^b representam diferença estatística entre grupos pela ANOVA *one-way* seguida de *Post-Hoc Tukey's test* ($p < 0,05$). ^a SHAM SED; ^b OVX SED; ^c OVX TR-RC vs SHAM TR-RC *Test t Student* ($p < 0,05$).

5.2 Carga Máxima de Carregamento

Houve um aumento gradual na Carga Máxima de Carregamento Absoluta das ratas em todos os grupos experimentais treinados. Os grupos OVX TR e OVX TR-RC aumentaram em média 211% a CMC ao final do período de treinamento, enquanto que os grupos SHAM TR e SHAM TR-RC obtiveram um aumento médio de 206%. No entanto, não houve diferença entre as CMC comparando os grupos OVX e SHAM.

Tabela 5. Dados da Carga Máxima de Carregamento Absoluta dos grupos experimentais treinados (gramas).

<i>Grupos experimentais</i>	<i>Semana 1 (Inicial)</i>	<i>Semana 7</i>	<i>Semana 13 (Final)</i>
OVX TR	491±24	1012±38 ^a	1065±40 ^a
OVX TR-RC	527±19	1029±31 ^a	1095±28 ^a
SHAM TR	544±18	1024±17 ^a	1089±16 ^a
SHAM TR-RC	472±20	1017±22 ^a	1060±27 ^a

Valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM), n = 10 por grupo. **Grupo Ovariectomia Treinado:** Ovariectomia Treinado (OVX TR) e Ovariectomia Treinado com Restrição Calórica (OVX TR-RC). **Grupo Intacto Treinado (Sham):** Sham Treinado (SHAM TR) e Sham Treinado com Restrição Calórica (SHAM TR-RC). A letra ^a subscrita representam diferença estatística entre grupos pela ANOVA *one-way* seguida de *Post-Hoc Tukey's test* ($p < 0,05$). ^a Semana 1.

5.3 Quantificação da Expressão do RNAm dos Genes relacionados à Biogênese e Dinâmica Mitocondrial

PGC-1 α

A ovariectomia diminuiu a expressão gênica do PGC-1 α , principal regulador da biogênese mitocondrial, com função sobre o metabolismo oxidativo, em comparação ao grupo intacto SHAM (OVX SED *vs* SHAM SED, $p < 0,04$). As intervenções treinamento, restrição calórica e treinamento com restrição calórica aumentaram a expressão em todos os grupos, comparados ao grupo controle intacto SHAM e ao grupo ovariectomia sedentário (OVX SED), $p < 0,05$. Comparando as intervenções, houve diferença estatística significativa apenas nos grupos experimentais treinados (OVX TR *vs* SHAM TR, $p < 0,01$).

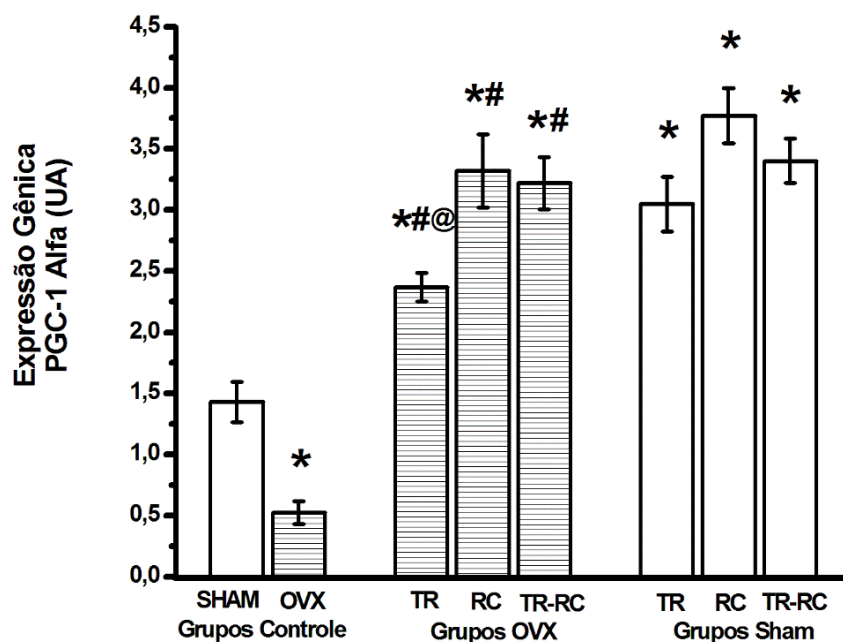


Figura 9. Expressão de RNAm do PGC-1 α no músculo quadríceps de ratas. Os valores apresentados são em Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). **Grupo Ovariectomia:** Ovariectomia Sedentário (OVX SED), Ovariectomia Treinado (OVX TR), Ovariectomia Restrição Calórica (OVX RC) e Ovariectomia Treinado com Restrição Calórica (OVX TR-RC). **Grupo Intacto (Sham):** Sham Sedentário (SHAM SED), Sham Treinado (SHAM TR), Sham Restrição Calórica (SHAM RC) e Sham Treinado com Restrição Calórica (SHAM TR-RC). Os símbolos * e # representam diferença estatística entre grupos pela ANOVA *one-way* seguida de *Post-Hoc Tukey's test* ($p < 0,05$). * SHAM SED, # OVX SED. O símbolo @ demonstra diferença estatística entre as intervenções OVX TR vs SHAM TR pelo *Test t Student* ($p < 0,01$).

MFN-1

Em relação à proteína de membrana mitocondrial MFN-1, responsável pela fusão mitocondrial, a ovariectomia reduziu sua expressão quando comparada ao grupo controle intacto SHAM, (OVX SED vs SHAM SED, $p < 0,04$). O treinamento resistido aumentou a expressão gênica tanto no grupo ovariectomia quanto no grupo intacto Sham. Porém, apenas o grupo SHAM treinado (SHAM TR) apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle SHAM (SHAM TR vs SHAM SED, $p < 0,007$). O grupo ovariectomia treinado (OVX TR) apresentou diferença apenas quando comparado ao grupo ovariectomia sedentário (OVX TR vs OVX SED, $p < 0,0001$).

A restrição calórica e a associação treinamento com restrição calórica também demonstrou um aumento significativo na expressão gênica de MFN-1, quando comparada ao grupo controle intacto SHAM e ao grupo ovariectomia sedentário ($p < 0,05$). Comparando as intervenções, houve diferença estatística significativa apenas nos grupos

experimentais associação treinamento com restrição calórica (OVX TR-RC vs SHAM TR-RC, $p < 0,02$).

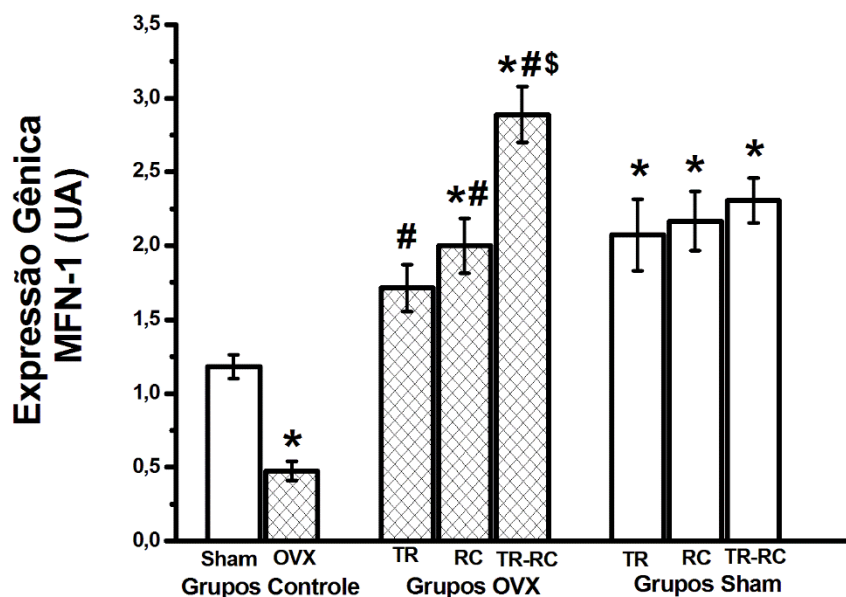


Figura 10. Expressão de RNAm da proteína MFN-1, no músculo quadríceps de ratas. Os valores a apresentados são em Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). **Grupo Ovariectomia:** Ovariectomia Sedentário (OVX SED), Ovariectomia Treinado (OVX TR), Ovariectomia Restrição Calórica (OVX RC) e Ovariectomia Treinado com Restrição Calórica (OVX TR-RC). **Grupo Intacto (Sham):** Sham Sedentário (SHAM SED), Sham Treinado (SHAM TR), Sham Restrição Calórica (SHAM RC) e Sham Treinado com Restrição Calórica (SHAM TR-RC). Os símbolos * e # representam diferença estatística entre grupos pela ANOVA *one-way* seguida de *Post-Hoc Tukey's test* ($p < 0,05$). * SHAM SED, # OVX SED. O símbolo \$ demonstra diferença estatística entre as intervenções OVX TR-RC vs SHAM TR-RC pelo *Test t Student* ($p < 0,02$).

FIS-1

A ovariectomia não alterou a expressão da proteína de membrana mitocondrial FIS-1, cuja função é participar do processo de fissão mitocondrial. Todas as intervenções dos grupos ovariectomia aumentaram significativamente a expressão de FIS-1, quando comparadas ao grupo controle intacto SHAM, bem como as intervenções, restrição calórica e a associação treinamento com restrição calórica dos grupos SHAM ($p < 0,05$).

O treinamento resistido apresentou aumento significativo no grupo ovariectomia treinado (OVX TR) quando comparado apenas ao grupo controle intacto SHAM (OVX TR vs SHAM SED, $p < 0,02$).

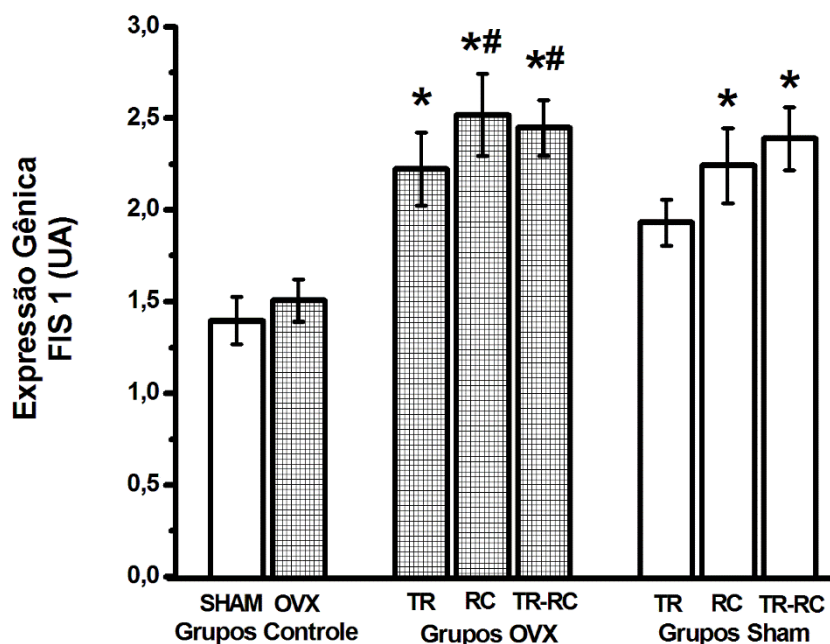


Figura 11. Expressão de RNAm da proteína FIS-1, no músculo quadríceps de ratas. Os valores a apresentados são em Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). **Grupo Ovariectomia:** Ovariectomia Sedentário (OVX SED), Ovariectomia Treinado (OVX TR), Ovariectomia Restrição Calórica (OVX RC) e Ovariectomia Treinado com Restrição Calórica (OVX TR-RC). **Grupo Intacto (Sham):** Sham Sedentário (SHAM SED), Sham Treinado (SHAM TR), Sham Restrição Calórica (SHAM RC) e Sham Treinado com Restrição Calórica (SHAM TR-RC). Os símbolos * e # representam diferença estatística entre grupos pela ANOVA *one-way* seguida de *Post-Hoc Tukey's test* ($p < 0,05$). * SHAM SED; # OVX SED Não houve diferença estatística entre as intervenções.

5.4 Quantificação da Expressão Proteica da SIRT3.

SIRT 3

A figura 12 demonstra que a ovariectomia reduziu os níveis proteicos de SIRT3 em relação ao grupo controle intacto SHAM (OVX SED vs SHAM SED, $p < 0,0001$). As intervenções restrição calórica e a associação treinamento com restrição calórica elevou os níveis de SIRT3 quando comparados aos grupos controle intacto SHAM (SHAM SED) e ovariectomia sedentário (OVX SED), $p < 0,05$.

O treinamento resistido isolado não foi capaz de aumentar significativamente os níveis de SIRT3 em ambos os grupos treinados (OVX TR e SHAM TR). Porém, a discreta elevação no nível de SIRT3 apresentado no grupo ovariectomia treinado (OVX TR), continuou com redução significativa quando comparado ao grupo controle intacto SHAM (OVX TR vs SHAM SED, $p < 0,04$).

A comparação entre todas as intervenções apresentou diferença significativa (OVX TR vs SHAM TR, $p<0,01$); (OVX RC vs SHAM RC, $p<0,01$); (OVX TR-RC vs SHAM TR-RC, $p<0,02$).

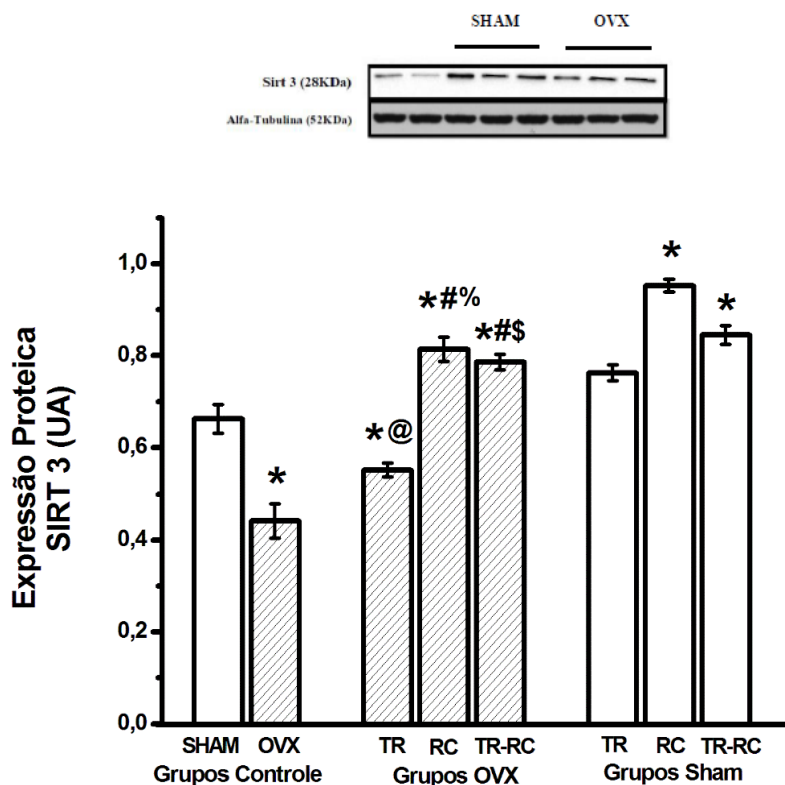


Figura 12. Expressão Proteica da proteína SIRT 3, no músculo quadríceps de ratas. Os valores a apresentados são em Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). **Grupo Ovariectomia:** Ovariectomia Sedentário (OVX SED), Ovariectomia Treinado (OVX TR), Ovariectomia Restrição Calórica (OVX RC) e Ovariectomia Treinado com Restrição Calórica (OVX TR-RC). **Grupo Intacto (Sham):** Sham Sedentário (SHAM SED), Sham Treinado (SHAM TR), Sham Restrição Calórica (SHAM RC) e Sham Treinado com Restrição Calórica (SHAM TR-RC). Os símbolos * e # representam diferença estatística entre grupos pela ANOVA *one-way* seguida de *Post-Hoc Tukey's test* ($p<0,05$). * SHAM SED, # OVX SED. Os símbolos demonstram diferença estatística entre as intervenções pelo *Test t Student* ($p<0,02$). @ OVX TR vs SHAM TR; % OVX RC vs SHAM RC; \$ OVX TR-RC vs SHAM TR-RC.

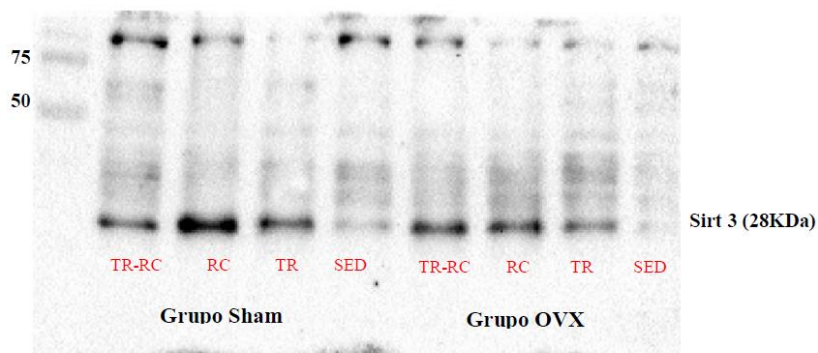


Figura 13. Membrana de nitrocelulose revelada pelo *Kit ECL* com os níveis de expressão proteica da proteína SIRT3.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos da ovariectomia e as intervenções treinamento resistido, restrição calórica e a associação do treinamento resistido com a restrição calórica em parâmetros teciduais e moleculares do músculo quadríceps de ratas ovariectomizadas. A hipótese era de que a ovariectomia alteraria os parâmetros moleculares relacionados à biogênese e dinâmica mitocondrial do músculoesquelético, e que as intervenções propostas reverteriam as possíveis alterações.

A massa corporal das ratas ovariectomizadas apresentaram diferenças típicas quando comparadas às ratas intactas, apresentando um ganho ponderal. O estrogênio é capaz de manter a distribuição da gordura corporal e a manutenção da massa magra com a preservação do gasto calórico (SHIMEMURA *et al.*, 2002). Portanto, a ausência do estrogênio, promove o aumento da massa de gordura, a redução da massa muscular e o aumento do consumo alimentar (FISCHER *et al.*, 2000). É interessante destacar que as ratas ovariectomizadas submetidas às intervenções restrição calórica (OVX RC) e associação do treinamento resistido com restrição calórica (OVX TR-RC), apresentaram massa corporal menor quando comparadas ao grupo ovariectomizado sedentário (OVX SED).

A restrição calórica tem sido indicada como intervenção nutricional para reduzir a massa corporal, pois além da redução ponderal, previne e atenua a expressão de genes relacionados ao processo de envelhecimento, retarda o aparecimento de doenças relacionadas à idade e aumenta a longevidade (ANDERSON *et al.*, 2012). No estudo de Pighon *et al.* (2010), animais ovariectomizados com restrição calórica e treinamento resistido por oito semanas apresentaram um menor ganho de massa corporal quando comparados aos animais ovariectomizados sedentários.

Pósa *et al.* (2015) também observaram que a combinação da dieta controlada associada ao exercício aeróbio foi mais efetiva na redução da massa corporal, aumentando os níveis sanguíneos de leptina e restaurando a glicemia e o perfil lipídico de ratas ovariectomizadas, quando comparadas ao grupo sedentário. O trabalho de Vieira-Potter *et al.* (2012) mostra que a redução no consumo de calorias afeta a composição corporal e os parâmetros metabólicos em humanos e roedores. Prasannarong *et al.* (2012) mostraram que a restrição calórica durante 12 semanas reduziu a massa corporal e a gordura visceral de ratas ovariectomizadas.

Consistente com trabalhos anteriores, tanto a massa corporal (CORRIVEAU *et al.*, 2008; SAENGSIRISUWAN *et al.*, 2009) quanto o consumo alimentar (CAO *et al.*, 2013; ZENGIN *et al.*, 2013) aumentaram no grupo ovariectomizado. No entanto, a restrição calórica e a associação do treinamento com a restrição calórica foi capaz de prevenir tanto o aumento do consumo quanto, parcialmente, da massa corporal.

A sarcopenia decorrente da menopausa não está exclusivamente associada à redução dos hormônios ovarianos, mas também relacionada à redução da atividade física voluntária de mulheres na menopausa, bem como em roedores (CONCEIÇÃO *et al.*, 2013; FONSECA *et al.*, 2011). A redução da área de secção transversa muscular e a expressão da cadeia pesada de miosina, encontrada em ratas ovariectomizadas, podem ser aumentadas com o treinamento resistido (FONSECA *et al.*, 2011). O treinamento resistido também promove benefícios sobre o quadro de obesidade sarcopênica, característico da menopausa em mulheres (OLIVEIRA *et al.*, 2011), bem como de roedores ovariectomizados (VIEIRA-POTTER *et al.*, 2012). Conceição *et al.* (2013) demonstraram que o treinamento resistido de 16 semanas em mulheres na pós-menopausa foi efetivo em reduzir o risco de síndrome metabólica, aumentar a força muscular dos membros inferiores, aumentar a massa magra e diminuir a quantidade de gordura corporal .

O modelo de exercício resistido em escada já demonstrou ser eficaz em aumentar a massa do músculo esquelético (PRESTES *et al.*, 2011) assim como reduzir os depósitos de gordura (LEITE *et al.*, 2009) e reverter os efeitos deletérios da ovariectomia sobre o osso de ratas ovariectomizadas (SHIGUEMOTO *et al.*, 2012). Esta modalidade de treinamento preocupa-se com os princípios do treinamento (TUBINO, 1984), promovendo a manutenção do número de séries (4 a 9), com o princípio da sobrecarga (carga máxima de carregamento) e com a regularidade do exercício (uma sessão a cada 72h).

O treinamento resistido desenvolvido nesse trabalho, promoveu o aumento gradual da capacidade de carregamento das ratas, em todos os grupos treinados (OVX TR, OVX TR-RC, SHAM TR e SHAM TR-RC) de forma semelhante. Isto nos faz concluir que tanto a ovariectomia quanto a restrição calórica não interferiram na capacidade de carregamento das ratas, mostrando a efetividade do treinamento resistido. Estudos com o mesmo modelo de treinamento, comparando ratas ovariectomizadas e intactas treinadas, não apresentaram diferença na capacidade de carregamento de carga, durante 10 e 12 semanas de treinamento resistido (DOMINGOS *et al.*, 2012; SHIGUEMOTO *et al.*, 2012).

A biogênese mitocondrial envolve a proliferação (aumento do conteúdo mitocondrial) e a diferenciação (aumento da capacidade oxidativa mitocondrial) (VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2008). Capllonch-Amer *et al.* (2014) demonstraram que a ausência de estrogênio em ratas ovariectomizadas sedentárias reduziu o conteúdo mitocondrial músculoesquelético e, a reposição de estrogênio em outro grupo de ratas ovariectomizadas sedentárias, aumentou a expressão gênica de PGC-1 α . Em nosso estudo, o grupo de ratas ovariectomizadas sedentárias (OVX-SED) apresentou uma redução significativa quando comparado ao grupo controle intacto.

A presença do estrogênio aumenta a massa mitocondrial nos miotúbulos pela regulação do PGC-1 α e estimula a proliferação mitocondrial intermiofibrilar, com aumento da capacidade oxidativa (SCARPULLA, 2011). As isoformas de receptores de estrogênio (alfa e gama) atuam na via da biogênese mitocondrial, estando relacionados ao aumento da expressão de PGC-1 α (HUSS *et al.*, 2004).

Está bem estabelecido na literatura que o treinamento resistido, assim como o aeróbico, aumentam a expressão do marcador PGC-1 α , de maneira suficiente a induzir a biogênese mitocondrial (HOOD, 2009). Estudos demonstraram que animais nocaute para PGC-1 α apresentaram um aumento na sua expressão após exercício de *endurance* e animais com superexpressão de PGC-1 α apresentaram um aumento significativo do fenótipo oxidativo no músculo esquelético, também, com grande aumento das proteínas mitocondriais nas fibras glicolíticas (contração rápida) (DRAKE *et al.*, 2015).

O PGC-1 α é regulado por fosforilação e acetilação pós-traducional, sendo que sua acetilação reversível modifica significativamente sua atividade transcripcional, com a participação da SIRT3 (proteína mitocondrial deacetiladora dependente de NAD⁺) (NOGUEIRAS *et al.*, 2012). Portanto, qualquer situação que imponha déficit de energia, como a restrição calórica, ou intensa atividade catabólica de substratos energéticos, pode resultar em aumento do NAD⁺, que ativará as sirtuínas. Esta ativação da SIRT3 pode elevar a expressão de PGC-1 α , independente da presença ou não do exercício físico (LIN *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, houve um aumento significativo do PGC-1 α em todos os grupos que foram submetidos as intervenções, relacionando o aumento da expressão do PGC-1 α com o treinamento resistido e com a restrição calórica. Em relação ao grupo que recebeu a associação do treinamento com a restrição calórica, sabe-se que em condições de restrição energética, a dinâmica mitocondrial eleva suas funções para a manutenção do fornecimento de energia. Quando isso ocorre, um sensor que indica essa deficiência

bioenergética (como o AMPK), estimula a deacetilação de PGC-1 α pela SIRT3 (PEREIRA, 2015).

Hokari *et al.* (2010) realizaram estudo com ratas ovariectomizadas que foram submetidas a corrida em esteira, uma hora por dia, sete dias por semana, durante três semanas. Os resultados mostram que houve um aumento da expressão gênica de PGC-1 α e da expressão proteica da SIRT3 nos músculos sóleo e plantar, comparado ao grupo sedentário. Autores citam que em humanos há um aumento da expressão proteica de SIRT3 nos músculos sóleo e gastrocnêmio após jejum e exercício e, que a expressão de SIRT3 é reduzida com o envelhecimento e aumentada com o treinamento aeróbico e resistido (LANZA *et al.*, 2008). Da mesma forma que o músculo esquelético de indivíduos sedentários apresenta uma redução da expressão de SIRT3 e PGC-1 α , quando comparados com indivíduos jovens ou idosos ativos (JOSEPH *et al.*, 2012).

A restrição calórica é uma intervenção que promove a longevidade dos mamíferos, retardando o aparecimento de doenças relacionadas ao envelhecimento, como o diabetes e doenças neurodegenerativas (COLMAN *et al.*, 2009). Esta hipótese baseia-se no fato de que a restrição calórica reduz o estresse oxidativo mitocondrial (NISOLI *et al.*, 2005). Lombard *et al.* (2007) investigaram a expressão proteica da SIRT3 em ratos nocaute, comparando com ratos selvagens que possuíam proteína, associados à restrição calórica. O resultado apontou uma redução significativa do estresse oxidativo no grupo selvagem associado à restrição calórica, sendo que o mesmo não foi observado no grupo de ratos nocaute. Qiu *et al.* (2010), determinaram que a proteína que compõe o complexo antioxidante mitocondrial MnSOD2 (superóxido dismutase mitocondrial) é deacetilada pela SIRT 3, explicando sua relação com a longevidade e o combate ao estresse oxidativo.

Neste trabalho, identificamos o aumento da expressão proteica de SIRT3 em todos os grupos que foram submetidos à restrição calórica, corroborando com a literatura. O grupo de ratas ovariectomizadas apresentou uma redução da expressão de SIRT3, o qual podemos relacionar com o aumento estresse oxidativo em condição de ausência de estrogênio, característico da menopausa (DOMINGOS *et al.*, 2012).

Westermann (2010) cita que o equilíbrio entre a fissão e a fusão mitocondrial é fundamental para que ocorra a manutenção dos processos biológicos, incluindo o fornecimento de energia, o combate ao estresse oxidativo e o funcionamento adequado das membranas em relação a apoptose e a morfologia mitocondrial. A mitofusina 1 (MFN-1) é a proteína que regula a fusão mitocondrial, produzindo as redes mitocondriais conectadas. A redução da sua expressão causa uma falha na arquitetura morfológica

mitocondrial com diminuição da capacidade oxidativa e da oxidação aeróbia da glicose (CARTONI *et al.*, 2005).

Estudo realizado com obesos humanos demonstrou uma redução da capacidade oxidativa entre 36 e 43% associado à redução da expressão proteica de MFN-1 (BACH *et al.*, 2003). O treinamento resistido aumenta a função mitocondrial, representado pela elevação da expressão de PGC-1 α e esses resultados sugerem que esta adaptação em parte se deve ao aumento da expressão de MFN-1, produzindo a fusão entre mitocôndrias para a manutenção do aporte energético. Este mesmo estudo concluiu que o exercício resistido induz o aumento da expressão gênica de MFN-1, MFN-2 e ER α (receptor de estrogênio) no músculo esquelético humano (CARTONI *et al.*, 2005). Observamos em nosso trabalho resultado similar nos grupos intactos Sham, que foram submetidos ao treinamento resistido.

Rambold *et al.* (2011) demonstraram por meio da cultura de células que a restrição calórica induz o aumento da fusão mitocondrial, dependente de MFN-1, para manter o aporte energético, enquanto que a atividade da FIS-1 (fissão), tende também a aumentar para induzir os fragmentos defeituosos de mitocôndria à fagocitose. O aumento da fusão mitocondrial foi associado ao aumento da produção de ATP para sustentar a viabilidade mitocondrial das células musculares na condição de restrição calórica (GOMES *et al.*, 2011). Em contrapartida, estudos recentes mostraram que a atividade de fissão (FIS1) é inibida durante a restrição calórica, o que induz a um alongamento mitocondrial, induzido pela fusão. Esta condição dificulta a fagocitose desta mitocôndria alongada e permite maximizar a capacidade de produção de energia e sustentar a viabilidade celular durante a restrição de nutrientes (WESTERMANN, 2012).

Os estudos que comparam a dinâmica mitocondrial com a redução do estrogênio associados às intervenções propostas por este estudo, são escassos na literatura, nos levando a refletir sobre as alterações causada pela menopausa e suas possíveis relações ao comportamento das proteínas mitocondriais. O estudo de Lionetti *et al.* (2013), utilizando ratas ovariectomizadas sedentárias, demonstrou que a redução do estrogênio causa uma disfunção mitocondrial, um aumento das espécies reativas de oxigênio e uma desregulação na expressão das proteínas da dinâmica mitocondrial. Houve aumento da expressão das proteínas de fissão (FIS-1), como o aparecimento de inúmeras frações mitocondriais e, a redução da expressão das proteínas de fusão (MFN-1 e MFN-2). Em nosso estudo, o grupo de ratas ovariectomizadas sedentárias (OVX SED) apresentou

resultado similar, com redução da expressão de MFN-1 e um discreto aumento da expressão de FIS-1.

Em resumo, os resultados deste trabalho demonstraram que na ausência dos hormônios ovarianos ocorre uma alteração na expressão gênica dos marcadores de dinâmica mitocondrial, bem como na expressão proteica da sirtuína mitocondrial. O treinamento resistido, a restrição calórica e sua associação foram capazes de elevar a expressão das proteínas supracitadas, revertendo a condição determinada pela ovariectomia. Brinton (2012) ressalta a importância em validar estratégias que utilizam os avanços das pesquisas experimentais com células e animais, possibilitando que seus resultados sejam utilizados com segurança, em um modelo translacional da menopausa humana. Aprofundar os estudos da biogênese e dinâmica mitocondrial associado a propostas de intervenções terapêuticas, parece ser um caminho seguro na prevenção de doenças associadas à menopausa.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que o treinamento resistido, a restrição calórica e associação entre ambas intervenções são importantes intervenções propostas para amenizar a instalação de algumas desordens típicas da ausência de hormônios ovarianos, como o aumento da massa corporal e o consumo alimentar. Podemos enfatizar que estas intervenções também revertem as alterações moleculares mitocondriais causadas pela ovariectomia, principalmente relacionadas à biogênese e dinâmica mitocondrial.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAGNOSTIS, P.; DIMOPOULO, C.; KARRAS, S.; LAMBRINOUDAKI, I.; GOULIS, D. G. Sarcopenia in post-menopausal women: Is there any role for vitamin D? *Maturitas*, v.82, p.56-64, 2015.

ANDERSON, R. M., WEINDRUCH, R. The caloric restriction paradigma: implications for health women aging. *Am J Hum Biol*, v.24, p. 101-106, 2012.

BACH, D.; PICH, S.; SORIANO, F. X.; VEGA, N.; BAUMGARTNER, B.; ORIOLA, J.; *et al.* Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* v.278, p.17190–17197, 2003.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, v.120, p.483–495, 2005.

BAUER, J. H.; MORRIS, S. N.; CHANG, C.; FLATT, T.; WOOD, J. G.; HELFAND, S. L. Sir2 and Dmp53 interact to mediate aspects of CR dependent lifespan extension in *D. melanogaster*. *Aging*, v.1, p.38–48, 2006.

BRINTON, R. D. Minireview: Translational Animal Models of Human Menopause: Challenges and Emerging Opportunities. *Endocrinology*, v.8, n153, p. 3571-3578, 2012.

BROWN, M. Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. *Adv Physiol Educ*, v.32, p. 120-6, 2008.

CAO, Y. K. Daidzein improves insulin resistance in ovariectomized rats. *Climateric*, v. 16, p.111-116, 2013.

CAPLLONCH-ARMER, G.; PROENZA, A. M.; GARCIA-PALMER, F. J. Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle. *J Endocrinol*, v.221, p.391-403, 2014.

CARTONI, R.; LEGER, B.; HOCK, M.B. et al. Mitofusins 1/2 and ERR alpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol*, v.567, p.349-358, 2005.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* v.59, p.119-144, 2004.

CHEN, H.; VERMULST, M.; WANG, Y. E.; CHOMYN, A.; PROLLA, T. A.; MCCAFFERY, J. M.; CHAN, D. C. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell*, v.141, p.280–289, 2010.

CIVITARESE, A. E. Calorie restriction increase muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *Plos Med*, v.4, p.76, 2007.

COLMAN, R. J.; ANDERSON, R. M.; KASTMAN, S. C. *et al.* Caloric restriction delay disease onset and mortality in rhesus monkey. *Science*, v.325, p.201-204, 2009.

CONCEIÇÃO, M. S.; BONGANHA, V.; VECHIN, F. C.; LIBARDI, C. Sixteen weeks of resistance training can decrease the risk of metabolic syndrome in healthy postmenopausal women. *Clin Interv Aging*, v.8, p.221-228, 2013.

CORRIVEAU, P.; *et al.* Resistance training prevents liver fat accumulation in ovariectomized rats. *Maturitas*, v.59, p. 259-267, 2008.

DETMER, S. A.; EWALD, A. J.; GRIFFIN, E. E.; FRASER, S. E.; CHAN, D. C. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol*, v.160, p.189-200, 2007.

DOMINGOS, M. M.; RODRIGUES, M. F. C.; STOTZER, U. S.; BERTUCCI, D. R.; SOUZA, M. V.; MARINE, D. A. *et al.* Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. *Eur J Apply Physiol*, v.112, p. 1437-1444, 2012.

DRAKE, J.; WILSON, R. J.; YAN, Z. Molecular mechanisms for adaptation to exercise training in skeletal muscle. *The FASEB J*, v.30, p.1-10, 2015.

FEIGE, J. N.; LAGOUGE, M.; CANTO, C.; STREHLE, A.; *et al.* Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab*, v.8, p.347-358, 2008.

FERREIRA, R.; VITORINO, R.; ALVES, R. M. P.; APELL, H. K.; POWERS, S.; DUARTE, J. A.; AMADO, F. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteoma differences disclose functional specializations in skeletal muscle. *Proteomics*, v.10, p.3142-3154, 2010.

FIEBIGER, R. A.; VELLAS, B.; EVANS, W. J.; BHASIN, S.; MORLEY, J. E.; NEWMAN, A. B.; *et al.* Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc*, v.1, n.2, p.249-56, 2011.

FINCK, B. N.; KELLY, D. P. PGC-1 α coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest*, v.116, p.615-622, 2006.

FISCHER, J. S.; KOHRT, W. M.; BROWN, M. Food restriction suppresses muscle growth and osteopenia in ovariectomized rats. *J Appl Physiol*, v. 88, p. 265-271, 2000.

FONSECA, H.; POWERS, S. K.; GONÇALVES, D.; SANTOS, A.; *et al.* Physical Inactivity is a major contributor to ovariectomy-induced sarcopenia. *Int J Sport Med*, v.33, p.268-278, 2011.

GOMES, Y.; GIANOTTI, M.; PROENZA, A. M.; LLADO, I. Age-related decline of skeletal muscle insulin sensitivity in rats: effect of sex and muscle type. *Rejuvenation Research*, v.14, p.153-161, 2011.

GOODPASTER, B. H.; PARK, S. W.; HARRIS, T. B.; *et al.* “The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the Health, Aging and Body Composition Study,” *Journals of Gerontology*, v.61, n.10, p.1059–1064, 2006.

GUARENTE, L. Caloric restriction and sirtuin revisited. *Genes & Development*, v.27, p.2072-2085, 2015.

HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica.12.ed. Rio de Janeiro, 2011.

HOKARI, F.; KAWASAKI, E.; SAKAI, A.; SAKUMA, K.; KAWANAKA, K. Muscle contractile activity regulates SIRT3 protein expression in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.109, p.332-340, 2010.

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* v.242, p.2278–2282, 1967.

HOOD, D. A. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, v.90, p.1137-1157, 2001.

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

HORCAJADA, M. N.; *et al.* Hesperidin inhibits ovariectomized-induced osteopenia and shows differential effects on bone mass and strenght in Young and adult intact rats. *J Appl Physiol*, v.104, n.3, p.648-654, 2008.

HORNBERGER, T. A. Jr. & FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*, v.29,n.1, p.16-31, 2004.

HUSS, J. M.; TORRA, I. P.; ISTAELS, B.; KELLY, D. P. Estrogen-related receptor alpha directs PGC-1 alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol and Cell Biol*, v.24, p.9079-9091, 2004.

JOSEPH, A. M.; BUFORD, T. W.; LEES, H. A.; MARZETTI, E. The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathway in skeletal muscle of sedentary high-and-low functioning elderly individuals. *Aging Cell*, v.11, p.801-809, 2012.

KALU, D. N.; LIU, C. C.; SALERNO, E.; HOLLIS, B.; ECHON, R.; RAY, M. Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17 beta-estradiol. *Bone Miner*, v.14, n.3, p.175-87, 1991.

KANG, L. C. Role of PGC-1 α in Sarcopenia: Etiology and Potential Intervention: a Mini-Review. *Gerontology*, 2014.

KOLTAI, E.; SZABO, Z.; ATALAY, M.; BOLDOGH, I.; NAITO, H.; GOTO, S.; *et al.* Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech Ageing Dev*, v.131, p.21–28, 2010.

KUBOK, K. A.; NEHISA, H.; AZUMA, K.; ISHIZU, M.; KUNOS, Y.; OKADA, M.; *et al.* Muscle architectural characteristics in young and elderly women. *Int J Sports Med* v.24, p.125–30, 2003.

KUIPER, G. J. M.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; *et al.* Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . *Endocrinology*, v.138, n.3, p.49-52, 1997.

LAGOUGE, M.; ARGMANN, C.; GERHART-HINES, Z.; *et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, v.127, p.1109–1122, 2006.

LANZA, I. R.; SHORT, D. K.; SHORT, K. R.; RAGHAVAKAIMAL, S.; BASU, R.; JOYNER, M. J.; MCCONNELL, J. P.; NAIR, K. S. Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes*, v.57, p.2933- 942, 2008.

LEITE, R.D.; *et al.* Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver and heart; fat depots and lipid profile. *Appl Physiol Nutr Metabol*, v.34, n.6, p.1079-1086, 2009.

LEITE, R. D.; PPRESTES, J.; PEREIRA, G. E.; SHIGUEMOTO, G. E.; PEREZ, S. E. A. Menopause: Highlighting the effects of resistance training. *Int J Sports Med*, v.31, p.761-767, 2010.

LIN L.; CHEN, K.; KHALEK, W.A.; YANG, H.; CHABI, B.; TONG, Q. Regulation of skeletal muscle oxidative capacity and muscle mass by SIRT3. *Plos One*, v.9, p.1-13, 2014.

LIN, J.; WU, H.; TARR, P. T.; ZHANG, C.Y.; WU, Z.; BOSS, O.; MICHAEL, L. F.; PUIGSERVER, P.; ISOTANI, E.; OLSON, E. N.; LOWELL, B. B.; BASSEL-DUBY, R.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fiber. *Nature*, v.418, p.797-801, 2002.

LIONETTI, L.; SICA, L.; MOLLICA, M. P.; PUTTI, R. High-lard and high-fish oil diets differ in their effects on insulin resistance developments, mitochondrial morphology and dynamic behavior in rat skeletal muscle. *Food Nutri Sci*, v.4, p.105-112, 2013.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using rela-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LOMBARD, D. B.; ALT, F. W.; CHENG, H. L.; BUNKENBORG, J.; *et al.* Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, v.27, p.8807–8814, 2007.

LUNDBY, C. & JACOBS, R. A. Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. *Exp. Physiol*, v.101, n.1, p.17-22, 2016.

MALTAIS, M. L.; DESROCHES, J.; DIONNE, I. J. Changes in muscle mass and strength after menopause. *J. Musculoskelet Neuronal Interact*, v.9, n.4, p.186-197, 2009.

MORAES, V. M.; VANDENBERGHE, L.; SILVA, N. A. Humor, atenção concentrada e qualidade de vida no climatério: um estudo no Brasil Central. *Psic, Saúde & Doenças*, v.8, n.2, 2007.

MORTENSEN, O. H.; PLOMGAARD, P.; FISCHER, C. P.; HANSE, A. K.; PILEGAARD, H.; PEDERSEN, B. K. PGC-1 β is downregulated by training in human skeletal muscle: no effect of training twice every second day. *J Apply Physiol*, v.103, p.1536-1542, 2007.

NISOLI, E.; TONELLO, C.; CARDILE, A.; COZZI, V.; BRACALE, R.; TEDESCO, L.; *et al.* Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*, v.310, p.314-317, 2005.

NOGUEIRAS, R.; HABEGGER, K. M.; CHAUDHARY, N.; *et al.* Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev*, v.92, p.1479-514, 2012.

OKAMOTO, K.; SHAW, J. M.; *et al.* Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, v.39, p.503-536, 2005.

OLIVEIRA, R. J.; *et al.* Identification of sarcopenic obesity in postmenopausal women: a cut off proposal. *Braz J Med Biol Res*, v.44, p.1171-1176, 2011.

PEDROSO, J. A.; NISHIMURA, L. S.; de MATOS-NETO, E. M.; DONATO, J. Jr.; TIRAPÉGUI, J. Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. *Cell biochemistry and function*, v.32, n.4, p.326-32, 2014.

PEREIRA, B. Biogênese mitocondrial e exercício físico: hipótese do acoplamento elétrico-transcricional. *Rev Bras Edu Fis Esp*, v.29, p.687-703, 2015.

PEREIRA, G.B.; *et al.* Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in rat calcaneal tendon. *Connect Tissue Res*, v.51, n.6, p.459-466, 2010.

PETERSON, C. M.; JOHANNSEN, D. L.; RAVUSSIN, E. Skeletal muscle mitochondria and aging. *Journal of Aging Research*, v.2, p.1-20, 2012.

PIGHON, A.; BARSALARRI, R.; YASARI, S.; LAVOIE, J. M. Does exercise training priori ovariectomy protect against liver and adipocyte fat accumulation in rats? *Climateric*, v.13, p.238-248, 2010.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J. Physiol.*, v.546, p.851-858, 2003.

PÓSA, A.; SAZABÓ, R.; KUPAI, K.; VARGA, C. Exercise training and calorie restriction influence the metabolic parameters in ovariectomized female rats. *Oxid Med Cell Long*, v.10, p.1-8, 2015.

PRASANNARONG, M.; VICHAIWONG, K.; SAENGSIRISUWAN, V. Calorie restriction prevents the development of insulin resistance and impaired insulin signaling in skeletal muscle of ovariectomized rats. *BBA*, v.1822, p.1051-1061, 2012.

PRESTES, J.; *et al.* Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metabol*, v.34, n.4, p.700-706, 2009.

PRESTES, J.; *et al.* Resistance Training and Glycogen content in Ovariectomized Rats. *Int J Sports Med*, 2011.

PUGH, T. D.; KLOPP, R. G.; WEINDRUCH, R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkey. *Neurobiology of aging*, v.20, n.2, p.157-65, 1999.

PUIGSERVER, P. & SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator-1 α : Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. *Endocrine Reviews*, v.24, n.1, p.78-90, 2003.

PUTTI, R.; SICA, R.; MIGLIACCIO, V.; LIONETTI, L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Frontiers in Physiol*, v.6, p.1-7, 2015.

QIU, X.; BROWN, K.; CHEN, D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3 mediated SOD2 activation. *Cell Metabolism*, v.12, p.662-667, 2010.

RAMBOLD, A. S.; ELIA, N.; LIPINCOTT-SCHWARTZ. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.108, p.10190-10195, 2011.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY Jr., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, v.123, n.11, p.1939-51, 1993.

RITCHER, C. P. "Dark-active" rat transformed into "light active" rat by destruction of 24-hr clock: function of 24-hr clock and synchronizers. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.75, n.12, p.6276-6280, 1978.

ROLLAND, Y. M.; PERRY, H. M.; PATRICK, P.; BANKS, W. A.; MORLEY, J. E. Loss of appendicular muscle mass and loss of muscle strength in young postmenopausal women. *J. Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v.62, p.330-335, 2007.

ROSENBERG, I. H. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *Clinic. Geriatr. Med.*, v.27, n.3, p.337-339, 2011.

RUBE, D. A.; VAN DER BLIEK, A. M. Mitochondrial morphology is dynamic and varied. *Mol. Cell Biochem.*, v.256-257, p.331-339, 2004.

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

SAFDAR, A.; LITTLE, J. P.; STOKL, A. J.; HETTINGA, B. P.; AKHTAR, M.; TARNOPOLSKY, M. A. Exercise increases mitochondrial PGC-1 α content and promotes nuclear-mitochondrial crosstalk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J. Biol. Chem.*, v.286, p.10605–10617, 2011.

SCARPULLA, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1813, p.1269–1278, 2011.

SEO, A. Y.; JOSEPH, A. M.; DUTTA, D.; HWANG, J. C. Y.; ARIS, J. P.; LEEUWENBURG. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondria dynamics and more. *Journal of Cell Science*, v.123, n.15, p.2533-2542, 2010.

SHIGUEMOTO, G. E.; PRESTES, J.; LEITE, G. B.; PEREIRA, C. L. S.; PONTES, F. V.; BOTERO, J. P.; BALDISSERA, V.; SELISTRE-DE ARAÚJO, H.; PEREZ, S. E. A. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. *J Med Sci Sports*, v.22, p.607-617, 2012.

SHIMEMURA, K.; *et al.* Is leptina a key fator which develops obesity by ovariectomy? *Endocr J*, v.49, p.417-423, 2002.

SIGNORELLI, S. S.; NERI, S.; SCIACCHITANO S.; PINO, L. D.; COSTA, M. P.; MARCHESE, G. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas*, v. 53, p.77-82, 2006.

SILVA, W. J. M. & FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Rev Bras Geriat Gerontol*, v.3, p.441-451, 2012.

SINCLAIR, D. A. & GUARENTE, L. Extrachromosomal DNA circles: a cause of aging in yeast. *Cell*, v.91, p.1033-42, 1997.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem*, v.150, p.76-85, 1985.

SOUZA, S. B.; *et al.* Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension*, v.50, n.4, p.786-791, 2007.

THOMPSON, D. D.; SIMMONS, H. A.; PIRIE, C. M.; KE, H. Z. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*, v.17, p.125-133, 1995.

TONDERA, D.; GRANDEMANGE, S.; JOURDAIN, A.; KARBOWSKI, M.; MATTENBERGER, Y.; *et al.* SLP-2 is requiredfor stress-induced mitochondrial hyperfusion. *Embo J.*, v.28, p.1589–1600, 2009.

TUBINO, M. J. G. *Metodologia científica do treinamento desportivo*. São Paulo: Ibrasa, 1984.

VENTURA-CLAPIER, R.; GARNIER, A.; VEKSLER, V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular Research*, v.79, p.208–217, 2008.

VERDIN, E.; HIRSCHEY, M. D.; FINLEY, L. W. S.; HAIGIS, M. C. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis and signaling. *Trends in Biochem Sci*, v.35, p.669-675, 2010.

VIEIRA POTTER, V. J. Adipose tissue inflammation and reduced insulin sensitivity in ovariectomized mice occur in the absence of increase adiposity. *Endocrinology*, v.53, p.1164-1171, 2012.

WESTERMANN, B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim et Biophys Acta*, v.18, n.7, p.1833-1838, 2012.

WESTERMANN, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature*, v.11, p.872-884, 2010.

WIJK, A.; EKMAN, M.; JOHANSSON, O.; JANSSON, E.; ESBJORNSSON, M. Expression of Both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol*, v.131, p.181-9, 2009.

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

www.ibge.gov.br