



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

CRISTIANI GOMES LAGOEIRO

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO E DA REPOSIÇÃO DE 17 β -ESTRADIOL
EM RATAS OVARIECTOMIZADAS NA MODULAÇÃO DE p-AKT E PARP-1
CLIVADA NO HIPOCAMPO**

**SÃO CARLOS
2016**

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

CRISTIANI GOMES LAGOEIRO

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO E DA REPOSIÇÃO DE 17 β -ESTRADIOL
EM RATAS OVARIECTOMIZADAS NA MODULAÇÃO DE p-AKT E PARP-1
CLIVADA NO HIPOCAMPO**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.
Área de concentração: Fisiologia do Exercício.
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez.

**SÃO CARLOS
2016**

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

L177e Lagoeiro , Cristiani Gomes
 Efeitos do treinamento resistido e da reposição de
17beta-estradiol em ratas ovariectomizadas na
modulação de p-AKT e PARP-1 clivada no hipocampo /
Cristiani Gomes Lagoeiro . -- São Carlos : UFSCar,
2016.
 37 p.

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

 1. Ovariectomia. 2. Treinamento resistido. 3.
PARP-1 clivada . 4. 17beta-estradiol. I. Título.

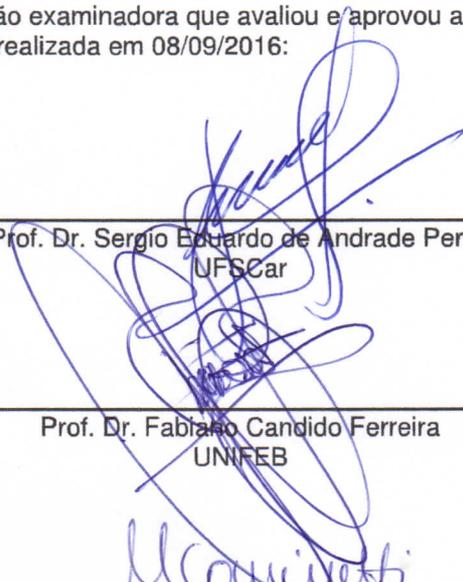


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

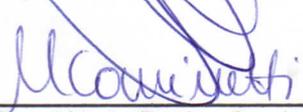
Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Cristiani Gomes Lagoeiro, realizada em 08/09/2016:



Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez
UFSCar

Prof. Dr. Fabiano Candido Ferreira
UNIFEB



Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar

Dedico este trabalho aos meus pais, Wilson e Devanir e a toda minha família que com palavras e gestos de carinho me apoiaram independentemente dos obstáculos e dificuldades presentes ao longo dessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wilson e Devanir o meu eterno agradecimento pela educação, pelos bons princípios, pela confiança, pelas orientações para ser cada vez mais uma pessoa melhor.

Ao casal de amigos Rodrigo e Natalia pela amizade, motivação, pelo apoio e principalmente pelo respeito como pessoa e como profissional.

À amiga Luisa pela amizade, acolhida, companheirismo e pelos momentos de descontração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez pela oportunidade para a realização desse trabalho, pela confiança e credibilidade.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Fisiologia do Exercício Luciane, Marina, Maria Fernanda, Fernanda, Tatiana, Anderson, Mateus, Markus, Fabiano, Gustavo, Jeferson pela amizade e por todos os momentos de trabalho e descontração. Momentos estes que reforçam a ideia de trabalho em equipe.

À professora Dr^a Márcia Regina Cominetti, ao Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues e à Prof^a Dr^a Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo por sempre abrirem as portas do laboratório nos momentos necessários. À aluna do Laboratório de Metabolismo e Nutrição aplicados ao exercício Cynthia Castro, ao aluno do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Vinicius Guzzoni e à aluna Tereza Cristina Buzinari pelos ensinamentos, ajudas nas análises moleculares e conversas.

Ao CNPq pela bolsa e à Fapesp pelo financiamento do projeto tornando possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A menopausa é um processo fisiológico associado a mudanças fisiológicas que levam ao aumento da incidência de algumas doenças como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. O processo apoptótico é essencial para a manutenção e desenvolvimento dos tecidos. Entretanto, a exacerbação desse processo pode levar ao aumento de morte neuronal em doenças neurodegenerativas. **Objetivo:** Investigar os efeitos do treinamento resistido e da reposição de 17β -estradiol na modulação de p-AKT e PARP-1 clivada, proteínas envolvidas no processo apoptótico, no hipocampo de ratas ovariectomizadas. **Metodologia:** 66 ratas Holtzman foram randomicamente distribuídas em seis grupos experimentais: 1) Sham operado Sedentário (Sham-Sed); 2) Sham operado Treinamento Resistido (Sham-TR); 3) Ovariectomizado Sedentário (Ovx-Sed); 4) Ovariectomizado Treinamento Resistido (Ovx-TR); 5) Ovariectomizado Sedentário com Reposição de 17β -estradiol (Ovx-Sed-RE); 6) Ovariectomizado Treinamento Resistido com Reposição de 17β -estradiol (Ovx-TR-RE). O protocolo de TR exigiu dos animais a escalada vertical em escada de 1,1 m com pesos atados às suas caudas. Cada sessão consistiu de 4 a 9 escaladas, com intervalo de 2 minutos entre as escaladas. As sessões foram realizadas uma vez a cada três dias durante 12 semanas. O conteúdo proteico de p-AKT e PARP-1 clivada foram analisados por Western Blotting e as concentrações de 17β -estradiol foram determinadas por ELISA. **Resultados:** Os nossos resultados indicam que os grupos Ovx-TR e Ovx-TR-RE apresentaram menor conteúdo proteico de PARP-1 clivada comparados aos grupos Ovx-Sed e Ovx-Sed-RE respectivamente, e maior conteúdo proteico de p-AKT comparados ao grupo Ovx-Sed no hipocampo. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo mostram que o treinamento resistido realizado por 12 semanas, com ou sem RE, pode ser uma intervenção efetiva para promover maior conteúdo proteico de p-AKT associado à via de sobrevivência celular e menor conteúdo proteico de PARP-1 clivada associada à via de apoptose.

Palavras-chave: Ovariectomia. 17β -estradiol. Treinamento Resistido. p-AKT. PARP-1 clivada.

ABSTRACT

Menopause is a physiological process associated with physiological changes that lead to increased incidence of some diseases such as sarcopenia, cardiovascular disease, diabetes mellitus and neurodegenerative diseases. Apoptotic process is essential for the maintenance and development of tissues. However, exacerbation of this process can lead increase to neuronal death in neurodegenerative diseases. **Objective:** To investigate the effects of resistance training and 17 β -estradiol replacement on the modulation of p-AKT and cleaved PARP-1, proteins involved in apoptotic process, in the hippocampus of ovariectomized rats. **Methods:** 66 female rats Holtzman were randomly divided into six groups: 1) Sham operated Sedentary (Sham-Sed); 2) Sham operated Resistance Training (Sham-RT); 3) Ovariectomized Sedentary (Ovx-Sed); 4) Ovariectomized Resistance Training (Ovx-RT); 5) Ovariectomized Sedentary with 17 β -estradiol Replacement (Ovx-Sed-ER); 6) Ovariectomized Resistance Training with 17 β -estradiol Replacement (Ovx-RT-ER). The RT protocol required the animals to climb a 1.1 m-long vertical ladder with weights attached to their tails. Each session consisted of 4 to 9 climbs with 2 minutes interval between climbing, performed once every three days for 12 weeks. Protein content of p-AKT and cleaved PARP-1 were analyzed by Western Blotting and concentrations of 17 β -estradiol were determined by ELISA. **Results:** Our results indicate that Ovx-RT groups and Ovx-RT-ER had lower protein content of cleaved PARP-1 compared to Ovx-Sed groups and Ovx-Sed-ER respectively and higher protein content of p-AKT compared to the group Ovx-Sed in the hippocampus. **Conclusion:** The results of this study show that resistance training performed for 12 weeks, with or without ER may be an effective intervention to promote greater protein content of p-AKT associated with the pathway of cell survival and lower protein content PARP-1 cleaved associated with apoptosis pathway.

Keywords: Ovariectomy. 17 β -estradiol. Resistance Training. p-AKT. Cleaved PARP-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose	13
FIGURA 2. Via de sinalização BDNF/PI3-K/AKT	14
FIGURA 3. Organograma dos grupos experimentais.....	17
FIGURA 4. Delineamento experimental	18
FIGURA 5. Dimensões da escada utilizada	19
FIGURA 6. Aparato da carga de carregamento fixado na cauda do animal	19
FIGURA 7. Determinação da carga máxima de carregamento	20
FIGURA 8. Organização da carga de carregamento por sessão de treino	21
FIGURA 9. Imagem da membrana de nitrocelulose corada com Ponceau-S	24
GRÁFICO 1. Carga máxima de carregamento nos grupos Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-RE. Os dados estão apresentados em média \pm erro padrão. $p < 0,05$ comparado ao grupo * Semana 1; † Semana 4; ‡ Semana 8.....	27
GRÁFICO 2. Conteúdo proteico de p-AKT/ β -actina no hipocampo. Os dados estão apresentados em média \pm erro padrão. $p < 0,05$ comparado ao grupo * Ovx-Sed; †Ovx-Sed-RE (n=4). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizados; RE: Reposição de Estrogênio; TR: Treinamento Resistido.....	28
GRÁFICO 3. Conteúdo proteico de PARP-1 clivada/ β -actina no hipocampo. Os dados estão apresentados em média \pm erro padrão. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Sham-Sed; †Ovx-Sed; ‡Ovx-Sed-RE; §Ovx-TR (n=4). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizados; RE: Reposição de Estrogênio; TR: Treinamento Resistido.....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Efeitos da Ovariectomia, Treinamento Resistido e Reposição de Estrogênio nos parâmetros dimensionais.....	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT: proteína quinase B

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

DNA: ácido desoxirribonucleico

FasL: Fas Ligante

Ovx: Ovariectomizado

Ovx-Sed: Ovariectomizado Sedentário

Ovx-TR: Ovariectomizado Treinamento Resistido

Ovx-TR-RE: Ovariectomizado Treinamento Resistido com Reposição de 17 β -estradiol

p-AKT: fosfoproteína quinase B

PARP-1: Poly ADP-Ribose Polimerase-1

PI3-K: fosfatidilinositol-3-quinase

RE: Reposição de 17 β -estradiol

Sham-Sed: Sham operado sedentário

Sham-TR: Sham operado Treinamento Resistido

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TR: Treinamento Resistido

TRH: Terapia de Reposição Hormonal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVO.....	15
3. HIPÓTESES.....	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.1 Animais e condições experimentais.....	16
4.2 Grupos Experimentais.....	16
4.3 Procedimentos Cirúrgicos.....	17
4.4 Reposição de 17 β -estradiol (RE).....	18
4.5 TREINAMENTO RESISTIDO.....	19
4.5.1 Aparatos de treinamento.....	19
4.5.2 Familiarização ao treinamento.....	20
4.5.3 Determinação da carga máxima de carregamento.....	20
4.5.4 Sessões de treinamento.....	21
4.6 CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR E DA MASSA CORPORAL.....	21
4.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E RETIRADA DOS TECIDOS.....	22
4.8 DETERMINAÇÃO POR ELISA DA CONCENTRAÇÃO DE 17 β -ESTRADIOL NO SORO.....	22
4.9 WESTERN BLOTTING: ANÁLISE DO CONTEÚDO PROTEICO.....	22
4.9.1 Homogeneização da amostra para Western Blotting.....	22
4.9.2 Determinação da concentração de proteínas totais.....	23
4.9.3 Tratamento das amostras e separação das proteínas por eletroforese.....	23
4.9.4 Incubação com anticorpos primários e secundários.....	24
4.9.5 Revelação e densitometria das bandas.....	24
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
5. RESULTADOS.....	25
5.1 Parâmetros dimensionais.....	25

5.2	Carga máxima de carregamento.....	26
5.3	Concentrações proteicas de p-AKT e PARP-1 clivada.....	27
6.	DISCUSSÃO.....	29
7.	CONCLUSÕES.....	33
8.	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

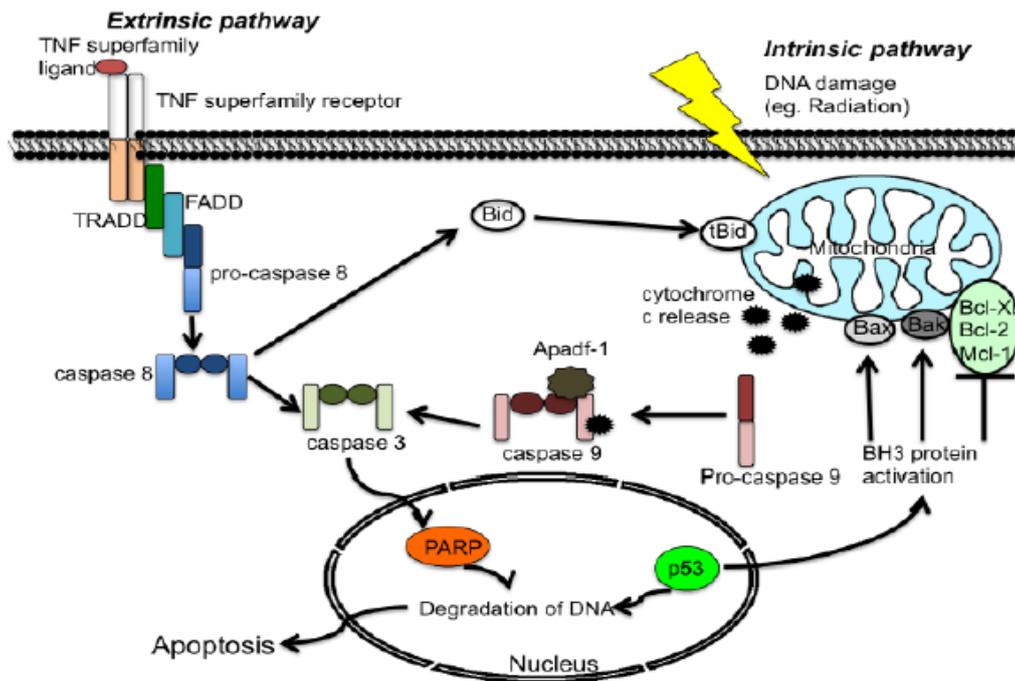
A menopausa é um processo fisiológico que ocorre em mulheres entre os 45 e 55 anos de idade que está relacionado com a cessação da menstruação e o fim da fertilidade devido à redução das funções dos folículos ovarianos (STOJANOUSKA et al., 2014) e dos níveis de estrogênio (SOULES et al., 2001). A redução dos níveis de estrogênio está associada a mudanças fisiológicas que levam ao aumento da incidência de algumas doenças como diabetes mellitus (BRAND et al., 2013) e doenças cardiovasculares (THOM et al., 2006). Além disso, está associada à patogênese de algumas doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e isquemia cerebral (HENDERSON, 2006) promovendo perdas de memória e redução na qualidade de vida das mulheres pós-menopáusicas (COKER et al., 2010).

Dentre as áreas cerebrais fortemente influenciadas pelo estrogênio está o hipocampo, responsável pelas funções cognitivas incluindo memória e aprendizagem (KIM et al., 2016). A redução dos níveis de estrogênio em mulheres pós-menopáusicas diminui a ativação hipocampal aumentando a suscetibilidade de distúrbios do sistema nervoso central e déficit cognitivo (WISE, 2003). Por outro lado, a ativação hipocampal pela ação do estrogênio leva ao aumento da neurogênese, ativação de fatores neurotróficos e inibição de apoptose pelo aumento dos níveis de proteínas anti-apoptóticas ou repressão dos níveis de proteínas pró-apoptóticas (KIM et al., 2016).

A apoptose, conhecida como morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção e desenvolvimento de todos os tecidos incluindo o sistema nervoso central (OKOUCHI et al., 2007). Entretanto, o processo aumentado de apoptose tem sido relatado como um possível mecanismo de morte neuronal associado às doenças neurodegenerativas (KANAZAWA, 2001). Estudos descrevem duas vias apoptóticas principais: a via extrínseca ou receptor de morte iniciada pela ativação de receptores na membrana plasmática como Fator de Necrose Tumoral (TNF), Fas Ligante (FasL) e ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (BOATRIGT et al., 2003); e a via intrínseca ou via mitocondrial iniciada pela liberação de citocromo-C (KAUFMANN e HENGARTNER, 2001). Ambas convergem para a clivagem de caspase-3, conhecida como proteína efetora no processo apoptótico que promove a desintegração da estrutura celular através da clivagem de proteínas específicas (TAYLOR et al., 2008). Dentre as proteínas alvo clivadas por caspase 3 clivada está a Poly ADP-Ribose Polymerase-1 (PARP-1) (STANOJILOVICET et al., 2015), uma proteína nuclear que desempenha um importante papel na manutenção da integridade

genômica e na função celular pelo reparo no DNA na presença de estímulos estressores (LUBBERS et al., 2010) (Figura 1).

FIGURA 1. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose (Retirado de Yuan et al, 2012)



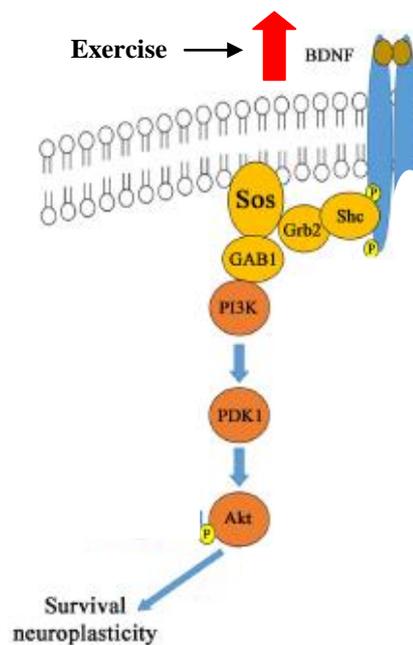
A presença do estrogênio promove grande estabilidade na conexão entre o receptor de estrogênio e PARP-1. Com isso, o estrogênio reduz a clivagem de PARP-1 e, consequentemente, aumenta a habilidade da PARP-1 de reconhecer os danos no DNA potencializando sua função de reparo (MABLEY et al., 2005). Além de sua função reparadora, a PARP-1 também está envolvida no processo apoptótico quando proteolisada pelas caspases em fragmentos catalíticos (LUO e KRAUS, 2012). A ausência do estrogênio enfraquece a ligação entre o receptor de estrogênio e PARP-1 impedindo que PARP-1 reconheça os pontos de quebra do DNA. Com isso, PARP-1 é ativada por clivagem aumentando sua participação no processo apoptótico (MABLEY et al., 2005).

Com o intuito de amenizar os sintomas promovidos pela menopausa, estratégias como a terapia de reposição hormonal e o exercício tem sido investigados. A terapia de reposição hormonal (TRH) tem sido utilizada como uma estratégia farmacológica para a redução dos sintomas da menopausa (SIEBERT et al., 2014). Estudos sugerem que a

utilização do estrogênio na TRH pode levar a efeitos positivos na função cognitiva tanto em ratas (TAKUMA et al., 2007) quanto em mulheres pós-menopáusicas (LIU et al., 2009). Entretanto, tem sido mostrado que o tempo de exposição à TRH pode levar ao desenvolvimento de alguns tipos de cânceres como câncer de mama e câncer endometrial (ZUCCHETTO et al., 2009).

Alguns autores evidenciam o exercício físico como estratégia não farmacológica para prevenir e amenizar os efeitos negativos da menopausa (LU et al., 2014; MAROSI et al., 2012). Kim et al. (2010) verificaram benefícios do treinamento de endurance no remodelamento e manutenção do tecido neural pelo aumento na expressão de fatores neurotróficos e inibição de apoptose. O aumento dos fatores neurotróficos promovidos pelo exercício ativam a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K), que ativa AKT (também conhecida como proteína quinase B) por fosforilação na serina 473 reduzindo a atividade de efetores apoptóticos (PLUM et al., 2005). A maior ativação dessa via está relacionada à sobrevivência, manutenção e excitabilidade neuronal (TORRES ALEMAN, 2010) (Figura 2).

FIGURA 2. Via de sinalização BDNF/PI3-K/AKT (Adaptado de Alam et al., 2016)



Apesar dos benefícios do treinamento de endurance, estudos indicam a efetividade do Treinamento Resistido (TR) na melhoria de alguns parâmetros como força, massa óssea e massa muscular (BARRY e CARSON, 2004). Com isso, o TR tem sido recomendado como estratégia não farmacológica na menopausa considerando que influencia na redução e atenuação de muitas alterações envolvidas nesse período como a sarcopenia, resistência à insulina e inflamação (LEITE et al., 2010).

Em estudos com ratas, a menopausa é mimetizada pela técnica de ovariectomia caracterizada pela remoção dos ovários (QU et al., 2013). Essa técnica é amplamente utilizada em modelos animais para melhor entendimento dos efeitos da redução dos níveis de estrogênio nos diversos sistemas.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a redução dos níveis de estrogênio em ratas ovariectomizadas promoveu efeitos como acúmulo de gordura corporal (LEITE et al., 2009), aumento de gordura no fígado (TOMAZ et al., 2016), além da redução da matriz metaloproteinase 2 (MMP-2) no músculo esquelético (PEREIRA et al., 2010) e que esses efeitos foram menos expressivos nos animais submetidos a um programa de 12 semanas de TR. Apesar disso, estudos dos efeitos desse treinamento sobre biomarcadores de apoptose no hipocampo, em ratas ovariectomizadas, não são apresentados.

Sendo assim, uma vez que a redução dos níveis de estrogênio pode levar com maior suscetibilidade ao aumento do processo apoptótico no hipocampo, diferentes estratégias devem ser investigadas com o intuito de minimizar os efeitos negativos promovidos pela menopausa.

2 OBJETIVO

Investigar os efeitos do treinamento resistido e da reposição de 17β -estradiol na modulação de p-AKT e PARP-1 clivada no hipocampo de ratas ovariectomizadas.

3 HIPÓTESES

- O TR após 12 semanas e a RE seriam estratégias de intervenção eficazes para promover maior conteúdo proteico de p-AKT e menor conteúdo proteico de PARP-1 clivada em relação ao grupo Ovariectomizado Sedentário;

- A associação do TR com a RE seria uma estratégia de intervenção mais eficaz que o TR e a RE isoladamente em promover maior conteúdo proteico de p-AKT e menor conteúdo proteico de PARP-1 clivada em relação ao grupo Ovariectomizado Sedentário.

4 METODOLOGIA

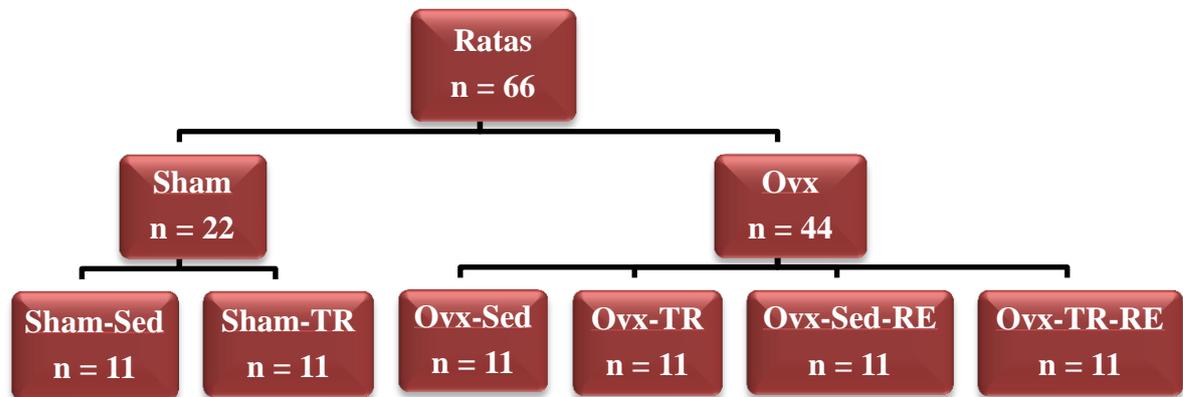
4.1 Animais e condições experimentais

Nesse estudo foram utilizadas 66 ratas Holtzman, adultas, obtidas do biotério da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araraquara. Os animais, durante o período experimental, foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro animais por gaiola) no biotério do laboratório de Fisiologia do Exercício do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da Universidade Federal de São Carlos. O ambiente foi controlado por ciclo reverso de iluminação (20h-08h claro; 08h-20h escuro) e mantido sob condições constantes de temperatura (22 ± 2 °C). Os animais receberam dieta e oferta de água *ad libitum*. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSCar - CEUA (protocolo nº. 005/2013). Os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com as instruções do Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (National Research Council, 1996).

4.2 Grupos Experimentais

Após três semanas em condição de aclimação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais: 1) Sham operado Sedentário (Sham-Sed); 2) Sham operado Treinamento Resistido (Sham-TR); 3) Ovariectomizado Sedentário (Ovx-Sed); 4) Ovariectomizado Treinamento Resistido (Ovx-TR); 5) Ovariectomizado Sedentário com Reposição de 17β -estradiol (Ovx-Sed-RE); 6) Ovariectomizado Treinamento Resistido com Reposição de 17β -estradiol (Ovx-TR-RE) (Figura 3).

FIGURA 3. Organograma dos grupos experimentais



4.3 Procedimentos Cirúrgicos

Os animais dos grupos Ovx e Sham foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos após alcançarem 250g de massa corporal, de acordo com a técnica proposta por Kalu (1991).

Durante os procedimentos da ovariectomia, os animais foram mantidos sob efeito anestésico de Ketamina-Xilazina (61,5-7,6 mg/kg, via intraperitoneal). Os animais dos grupos Ovx (Sed, TR, Sed-RE e TR-RE) foram submetidos à cirurgia bilateral de remoção dos ovários. Primeiramente, foi realizada uma pequena incisão bilateral (1,0-1,5 cm) através da pele e da camada muscular, entre a última costela e a coxa, em paralelo com a linha corporal do animal. A cavidade peritoneal foi aberta e feita uma ligadura abaixo da fimbria. Os ovários foram removidos e, em seguida, a pele e músculos foram suturados. Os animais dos grupos Sham (Sed e TR) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos de ovariectomia, porém sem a remoção dos ovários. Na cirurgia Sham os ovários foram expostos e devolvidos ao local de origem.

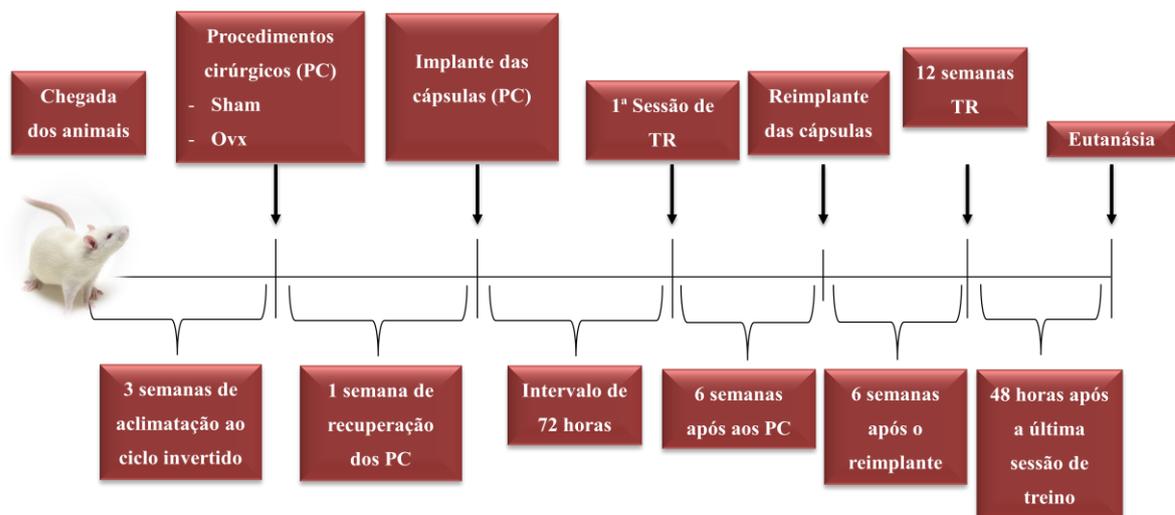
Para o implante das cápsulas silásticas na reposição de 17β -estradiol, os animais foram mantidos sob efeito anestésico de Ketamina-Xilazina (61,5-7,6 mg/kg, via intraperitoneal). A implantação da cápsula foi feita através de uma incisão de 0,5 cm no dorso dos animais com o auxílio de uma pinça. Após a incisão foi realizada a sutura. Todos os animais tiveram o mesmo tempo de exposição para os procedimentos cirúrgicos até a data da eutanásia (92 dias).

4.4 Reposição de 17β -estradiol (RE)

Após uma semana dos procedimentos cirúrgicos da ovariectomia, os animais dos grupos RE (Sed e TR) receberam o implante de cápsulas silásticas com uma solução de óleo- 17β -estradiol (via subcutânea) de acordo com a técnica descrita por Strom et al. (2008). Após sete semanas dos procedimentos cirúrgicos da ovariectomia, novas cápsulas silásticas contendo solução de óleo- 17β -estradiol foram reimplantadas (via subcutânea). As cápsulas silásticas são segmentos de 30mm de tubo de silastic (diâmetro interno/externo 1,02/2,16mm). O veículo utilizado foi solução com o hormônio 17β -estradiol (5% - 50mg/ml). Com auxílio de uma régua foram cortados vários pedaços da cânula de silastic formando-se cápsulas de 1,5 cm. Em cada cápsula foram pipetados 10 μ l da solução com hormônio. Os dois lados das cápsulas foram selados com cola silastic e as cápsulas foram armazenadas durante 24 h para secagem. Após a secagem, as cápsulas foram mantidas em solução fisiológica (salina, 0,9%) por 2h antes de serem implantadas nos animais.

Os animais treinados (Sham e Ovx) realizaram 12 semanas de Treinamento Resistido e foram eutanasiados após 48 horas da última sessão de treinamento (Figura 4).

FIGURA 4. Delineamento experimental



4.5 TREINAMENTO RESISTIDO (TR)

4.5.1 Aparatos de treinamento

Para a escalada dos animais foi utilizada uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degraus de 2 cm, inclinação de 80°) com uma gaiola de dimensões 20 x 20 x 20 cm proposta por Hornberger e Farrar (2004) (Figura 5). Como carga de carregamento foram utilizados tubos *falcon* com chumbada de pesca atados com fita auto-adesiva à porção proximal da cauda dos animais (Figura 6).

FIGURA 5. Dimensões da escada utilizada

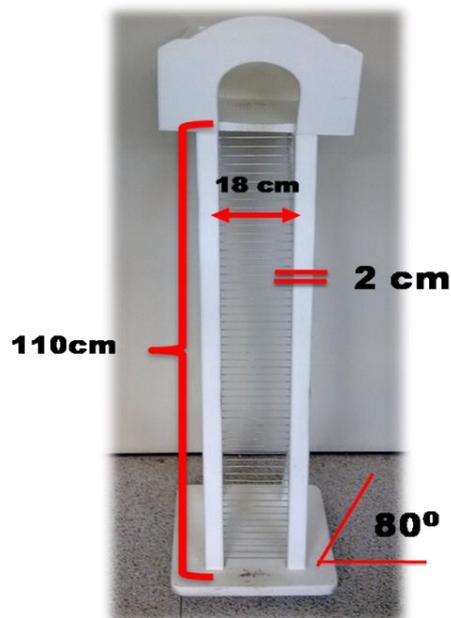


FIGURA 6. Aparato da carga de carregamento fixado na cauda do animal



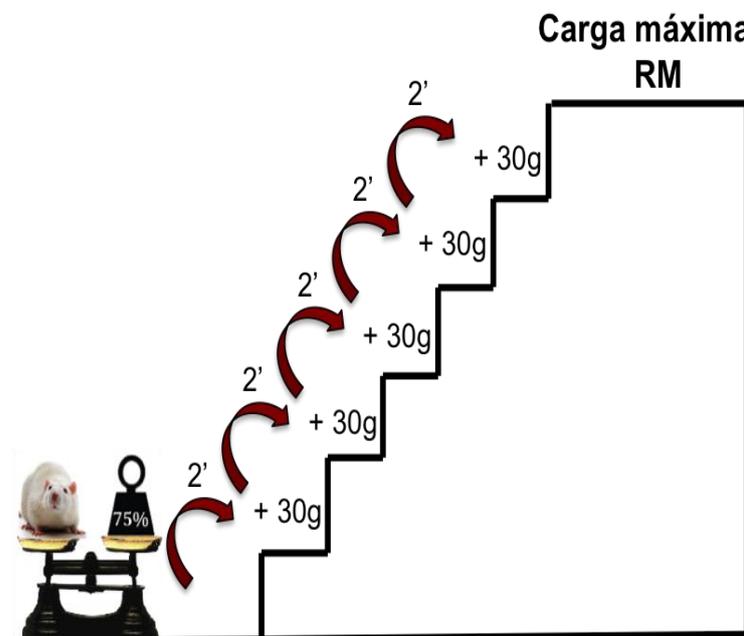
4.5.2 Familiarização ao treinamento

Com o aparato fixado à cauda, os animais foram colocados na parte inferior da escada e familiarizados com a escalada. Quando necessário, um estímulo com os dedos em movimento de pinçar foi aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento de escalada. No topo da escada os animais alcançaram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram durante 2 minutos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem escalar voluntariamente a escada por três vezes consecutivas sem a aplicação do estímulo.

4.5.3 Determinação da Carga Máxima de Carregamento

Três dias após a familiarização, a determinação da carga máxima de carregamento foi iniciada com uma primeira escalada onde o animal deveria carregar uma carga de 75% da sua massa corporal. Após 2 minutos de recuperação, a segunda escalada foi realizada com a adição de um peso de 30g. Este acréscimo de 30g foi repetido nas escaladas subsequentes até uma carga na qual o animal não conseguisse escalar toda a escada mesmo após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento do animal (Figura 7).

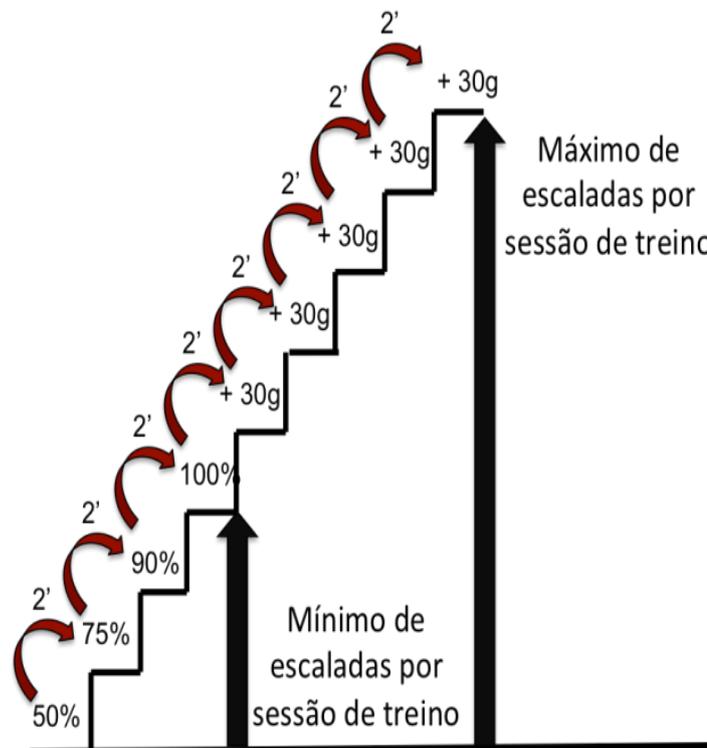
FIGURA 7. Determinação da carga máxima de carregamento



4.5.4 Sessões de Treinamento

As sessões de treinamento foram realizadas a cada três dias e consistiram de quatro escaladas na escada com 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal determinada na sessão anterior. A partir da quinta até a nona escalada foram adicionados 30g até uma nova capacidade máxima de carregamento ser determinada (Figura 8). Esta padronização de sessões de treinamento foi realizada durante 12 semanas, totalizando 27 sessões de Treinamento Resistido. Esse protocolo de treinamento foi adaptado de Hornberger e Farrar (2004).

FIGURA 8. Organização da carga de carregamento por sessão de treino



4.6 CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR E DA MASSA CORPORAL

A ingestão alimentar (gramas de ração consumida por gaiola) foi controlada diariamente sempre no mesmo horário do dia. A massa corporal foi verificada as segundas, quartas e sextas-feiras, sempre no mesmo horário. Esses procedimentos foram realizados

durante todo o período experimental. Esses parâmetros foram realizados para identificar possíveis alterações causadas pelas diferentes intervenções.

4.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E RETIRADA DOS TECIDOS

Ao término do período experimental os animais foram eutanasiados por decapitação. Os grupos treinados foram eutanasiados 48 horas após a última sessão de treino para evitar possíveis efeitos agudos do TR nas diferentes intervenções. Os grupos Sham foram eutanasiados no mesmo período. Os hipocampus foram imediatamente coletados, congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80°C para a realização das análises.

4.8 DETERMINAÇÃO POR ELISA DA CONCENTRAÇÃO DE 17 β -ESTRADIOL NO SORO

O sangue foi coletado após a eutanásia dos animais e o soro foi separado por meio de centrifugação (3000 rpm por 10 minuto em 4°C). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C. A dosagem de 17 β -estradiol foi realizada por ELISA por meio do Kit comercial de acordo com as especificações do fabricante (ADI-900-174, *Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, EUA*). A sensibilidade do ensaio foi de 10 pg/mL. Todas as amostras foram testadas em duplicata. A quantificação foi dada em relação à curva padrão com a utilização do modelo de regressão não linear de quatro parâmetros logística (4PL), análise comumente utilizada em ensaios biológicos ou imunoenaios, como ELISA.

4.9 WESTERN BLOTTING: ANÁLISE DO CONTEÚDO PROTEICO

4.9.1 Homogeneização da amostra para Western Blotting

Os hipocampus foram homogeneizados mecanicamente com aparelho Kinematica Polytron® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) em tubos mantidos em gelo com tampão contendo inibidores de proteases (aprotinina 0,01 mg/mL; PMSF 2 mM) e inibidores de fosfatases (ortovanadato de sódio, 100 mM; pirofosfato de

sódio, 10 mM; Fluoreto de sódio, 10 mM) e centrifugados (2 minutos, 100 rpm; 4°C). Após a centrifugação, os homogenatos foram recuperados em tubos de *eppendorf*.

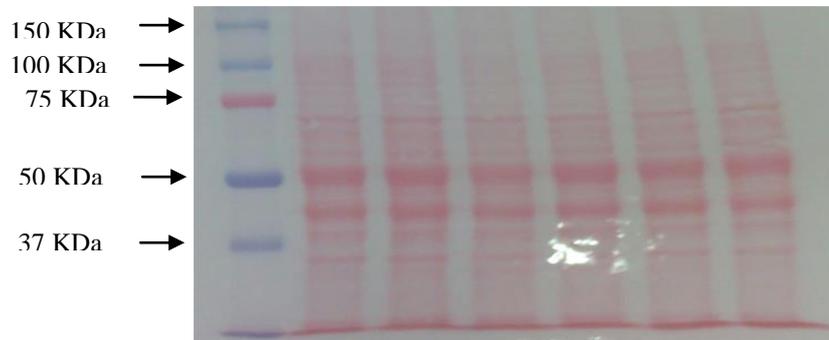
4.9.2 Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Smith (SMITH et al., 1985). O método proposto também é conhecido por método do ácido bicinconínico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'- biquinolina) e baseia-se na reação de cobre com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre e formando um complexo com o BCA, que absorve fortemente na região de 560 nm.

4.9.3 Tratamento das amostras e separação das proteínas por eletroforese

As alíquotas do lisado de células foram ressuspensas em tampão de amostra Laemmli (Glicerol 50%, Tris 312,5mM (pH 6,8), DTT 250mM, SDS 10%, Azul Bromofenol 0,05%) na proporção de 1:4 e as proteínas (50µg) fracionadas por SDS-PAGE (12%). As proteínas fracionadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão de transferência (Tris-HCl- 25 mM, glicina - 192 mM e metanol – 20%) e tensão de 100V. A transferência foi realizada no sistema úmido durante uma hora e meia. Para avaliação das membranas foi realizada a incubação com Ponceau-S (100mg de Ponceau e 0,5ml de ácido acético) durante 5 minutos (Figura 9). Após a incubação com Ponceau-S, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com TBS-T (TBS 1X (TBS 10X –NaCl 1,6M, Tris 0,2M (pH = 7,5) + 900 ml H₂O milli-Q), Tween-20 0,25%). Em seguida, as membranas foram bloqueadas a temperatura ambiente por 1 hora em tampão TBS-T contendo albumina (5%) e por 4 horas em tampão TBS-T contendo leite desnatado Molico®. As membranas bloqueadas em tampão TBS-T contendo albumina (5%) foram incubadas com os anticorpos p-AKT e β-actina da marca CellSignaling Technology®. As membranas bloqueadas em tampão TBS-T contendo leite desnatado Molico® foram incubadas com o anticorpo PARP-1 clivada da marca CellSignaling Technology®.

FIGURA 9. Imagem da membrana de nitrocelulose corada com Ponceau-S



4.9.4 Incubação com anticorpo primário e secundário

As membranas foram incubadas no anticorpo primário em overnight (4°C) com diluições de acordo com as instruções do fabricante:

- ✓ p-AKT (CellSignaling Technology®): 1:1.000 – 20ml (20µl do anticorpo diluído em 19,980ml de tampão TBS-T contendo albumina (5%));
- ✓ PARP-1 clivada (CellSignaling Technology®) 1:1.000 - 20ml (20µl do anticorpo diluído em 19,980ml de tampão TBS-T contendo leite desnatado Molico® (5%);
- ✓ β-actina (#4970) (CellSignaling Technology®): 1:10.000 – 20ml (2µl do anticorpo diluído em 19,998ml de tampão TBS-T contendo albumina (5%).

Após a incubação do anticorpo primário em overnight, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-RabbitIgG(#A0545) por 2 horas. A concentração da diluição do anticorpo secundário foi 1:3000 (6,66µl do anticorpo diluído em 19,993,34ml de tampão TBS-T (TBS 1X, Tween-20 0,25%) conjugado com peroxidase, em TBS-T. Entre cada passo da incubação com anticorpo primário e secundário, foram realizadas três lavagens de 5 minutos com TBS-T.

4.9.5 Revelação e densitometria das bandas

A ligação do anticorpo foi detectada pelo kit de quimiluminescência (kit de ECL) (SuperSignal® West Pico ChemiluminescentSubstrate - PIERCE, IL, EUA), conforme descrito pelo fabricante. As membranas foram digitalizadas por sistema de fotodocumentação

(Epson expressão 1600) e as densitometrias das bandas de proteína determinadas por intensidade de pixel utilizando o software Scion Imagem (Scion Corporation®, MD, EUA). O anti- β -actina foi utilizado como controle padrão de p-AKT e PARP-1 clivada.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O erro α adotado foi de 0,05 para todos os testes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0. Os testes de normalidade de Shapiro-Wilk e homocedasticidade de Levene foram aplicados a todas as amostras de variáveis analisadas. As amostras com distribuições normais e homocedásticas foram comparadas pelo teste de análise de variância ANOVA one-way com análise de post-hoc (Tukey). As amostras com distribuições anormais e/ou heterocedásticas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros Dimensionais

Após a semana da ovariectomia, nas semanas 1, 4, 8 e 12, a ingestão alimentar foi analisada pelos valores médios onde não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 1).

Em relação à massa corporal, o grupo Ovx-Sed apresentou maior massa corporal relativizada pelo comprimento da tíbia quando comparado ao grupo Sham-Sed ($p < 0,05$) (Tabela 1).

As análises de 17β -estradiol mostraram que os grupos Ovx (Sed e TR) apresentaram menores concentrações de 17β -estradiol quando comparados aos grupos Sham (Sed e TR, respectivamente) ($p < 0,05$). Os grupos ovariectomizados com reposição de 17β -estradiol (Sed e TR) apresentaram maior concentração de 17β -estradiol quando comparados ao grupo Ovx-Sed ($p < 0,05$). O grupo Ovx-TR-RE apresentou maior concentração de 17β -estradiol quando comparado ao grupo Ovx-TR (Tabela 1).

TABELA 1. Efeitos da Ovariectomia, Treinamento Resistido e Reposição de Estrogênio nos parâmetros dimensionais

Grupos Experimentais	Sham-Sed (n=11)	Sham-TR (n=11)	Ovx-Sed (n=11)	Ovx-TR (n=11)	Ovx-Sed-RE (n=11)	Ovx-TR-RE (n=11)
Ingestão Alimentar	92,81±6,23	86,06±2,60	91,42±5,37	87,80±4,14	88,20±2,79	84,42±2,22
Massa Corporal/ Tamanho tíbia(g/cm)	76,05±1,00	78,22±1,04	86,86±2,25 *	84,14±1,59	77,30±2,42	79,39±1,48
17β-estradiol (pg/ml)	34,06±0,15	34,13±0,13	14,91±0,27 *	14,64±0,25 †	44,24±0,96 ‡	41,00±0,68 ‡@

Os dados estão apresentados em média ± erro padrão. Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizados; RE: Reposição de Estrogênio; TR: Treinamento Resistido. p<0,05 comparado ao grupo *Sham-Sed; †Sham-TR; ‡Ovx-Sed; @Ovx-TR.

5.2 Carga Máxima de Carregamento

Durante as 12 semanas de treinamento, os grupos Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-RE apresentaram aumento da capacidade de carga máxima de carregamento (Gráfico 1). No grupo Sham-TR as cargas de trabalho aumentaram após as semanas 4, 8 e 12 em comparação com a semana 1, e após as semanas 8 e 12 em comparação com a semana 4. No grupo Ovx-TR as cargas de trabalho aumentaram após as semanas 4, 8 e 12 em comparação com a semana 1, após as semanas 8 e 12 em comparação com a semana 4 e após a semana 12 em comparação com a semana 8. Em relação ao grupo Ovx-TR-RE as cargas de trabalho aumentaram após as semanas 4, 8 e 12 em comparação com a semana 1 e após as semanas 8 e 12 em comparação com a semana 4. No entanto, durante as 12 semanas de treinamento, não houve diferença significativa entre os grupos treinados (Sham, Ovx e Ovx-RE) em relação à carga máxima de carregamento.

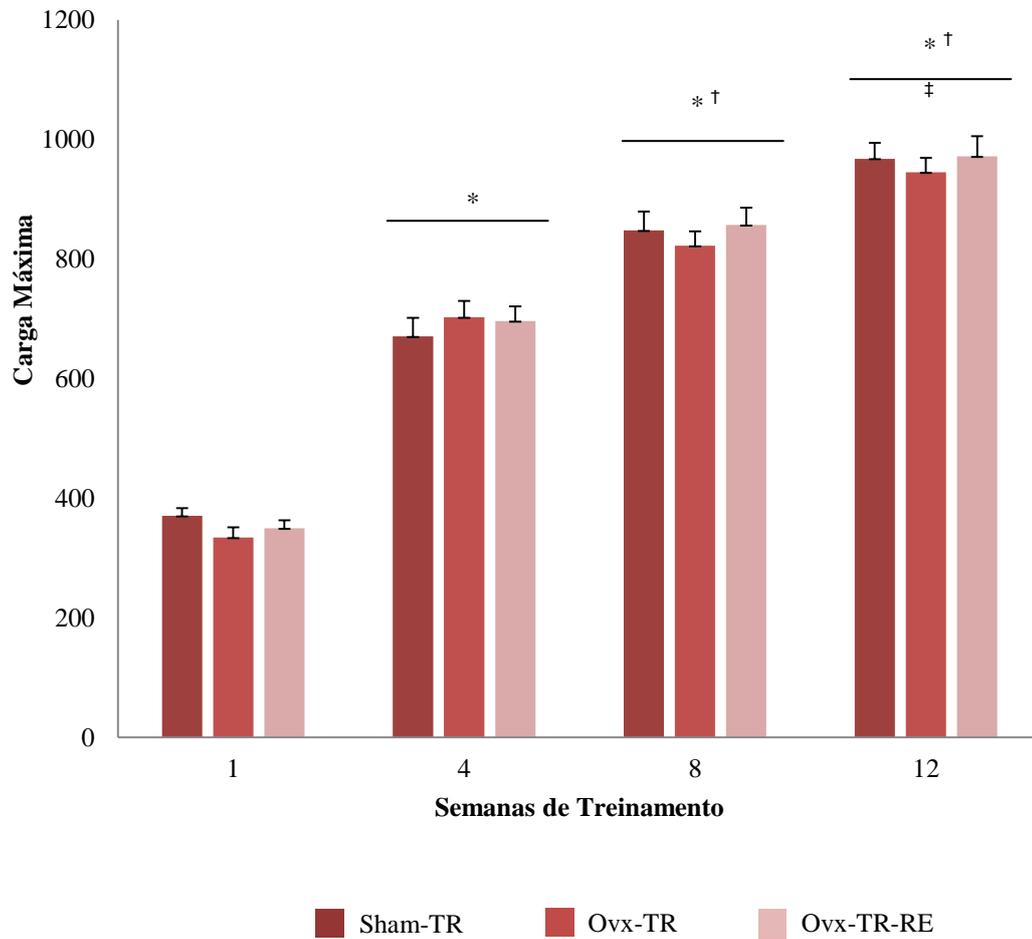


GRÁFICO 1. Carga máxima de carregamento nos grupos Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-RE. Os dados estão apresentados em média \pm erro padrão. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Semana 1; †Semana 4; ‡Semana 8.

5.3 Concentrações proteicas de p-AKT e PARP-1 clivada

Os resultados da concentração de p-AKT demonstraram que os grupos Ovx-TR e Ovx-TR-RE apresentaram maior conteúdo proteico de p-AKT (65%, $p=0,016$ e 106%, $p=0,0002$, respectivamente) quando comparados ao grupo Ovx-Sed. O grupo Ovx-TR-RE apresentou maior conteúdo proteico de p-AKT (85%, $p=0,0005$) em comparação ao grupo Ovx-RE. O conteúdo proteico de p-AKT foi relativizado pelo conteúdo proteico de β -actina e apresentado no Gráfico 2.

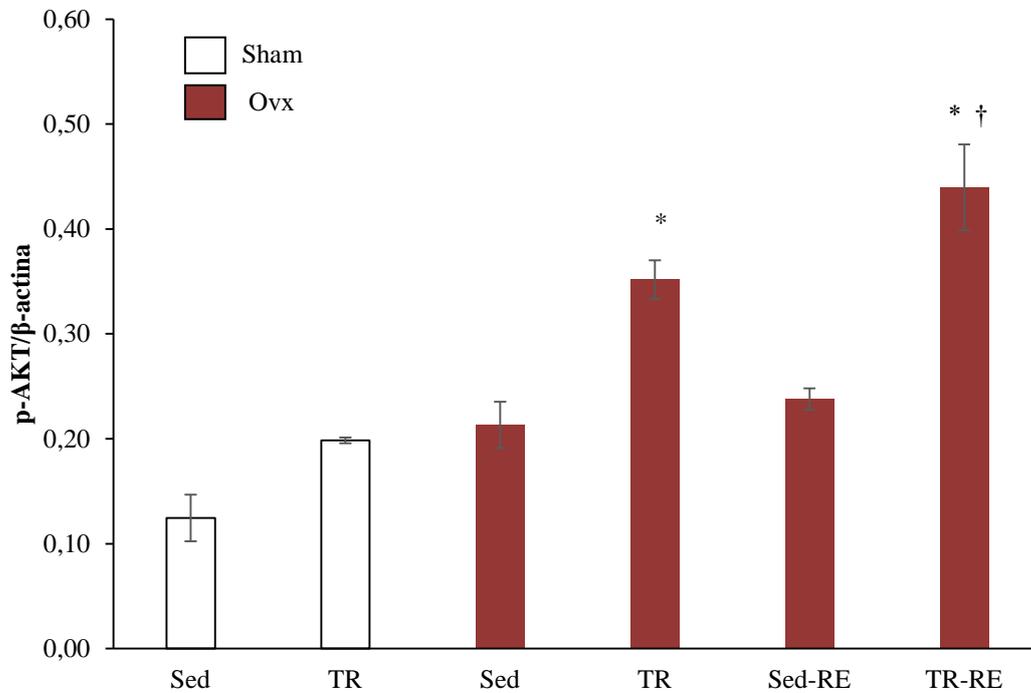
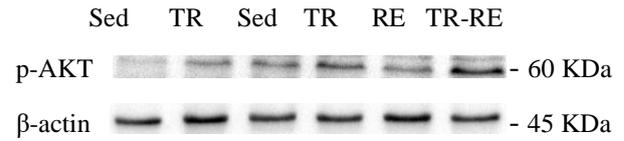


GRÁFICO 2: Conteúdo proteico de p-AKT/β-actina no hipocampo. Os dados estão apresentados em média ± erro padrão. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Ovx-Sed; †Ovx-Sed-RE (n=4). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizados; RE: Reposição de 17β-estradiol; TR: Treinamento Resistido.

Em relação à PARP-1 clivada, o grupo Ovx-Sed, quando comparado ao grupo Sham-Sed, apresentou maior conteúdo proteico de PARP-1 clivada (40%, $p=0,0002$). Em comparação ao grupo Ovx-Sed, o grupo Ovx-TR apresentou menor conteúdo proteico (20%, $p=0,003$) de PARP-1 clivada. No grupo Ovx-TR-RE o conteúdo proteico de PARP-1 clivada foi menor (13%, $p=0,033$) em comparação ao grupo Ovx-Sed-RE e maior em comparação ao grupo Ovx-TR (21%, $p=0,013$). O conteúdo proteico de PARP-1 clivada foi relativizado pelo conteúdo proteico de β-actina e apresentado no Gráfico 3.

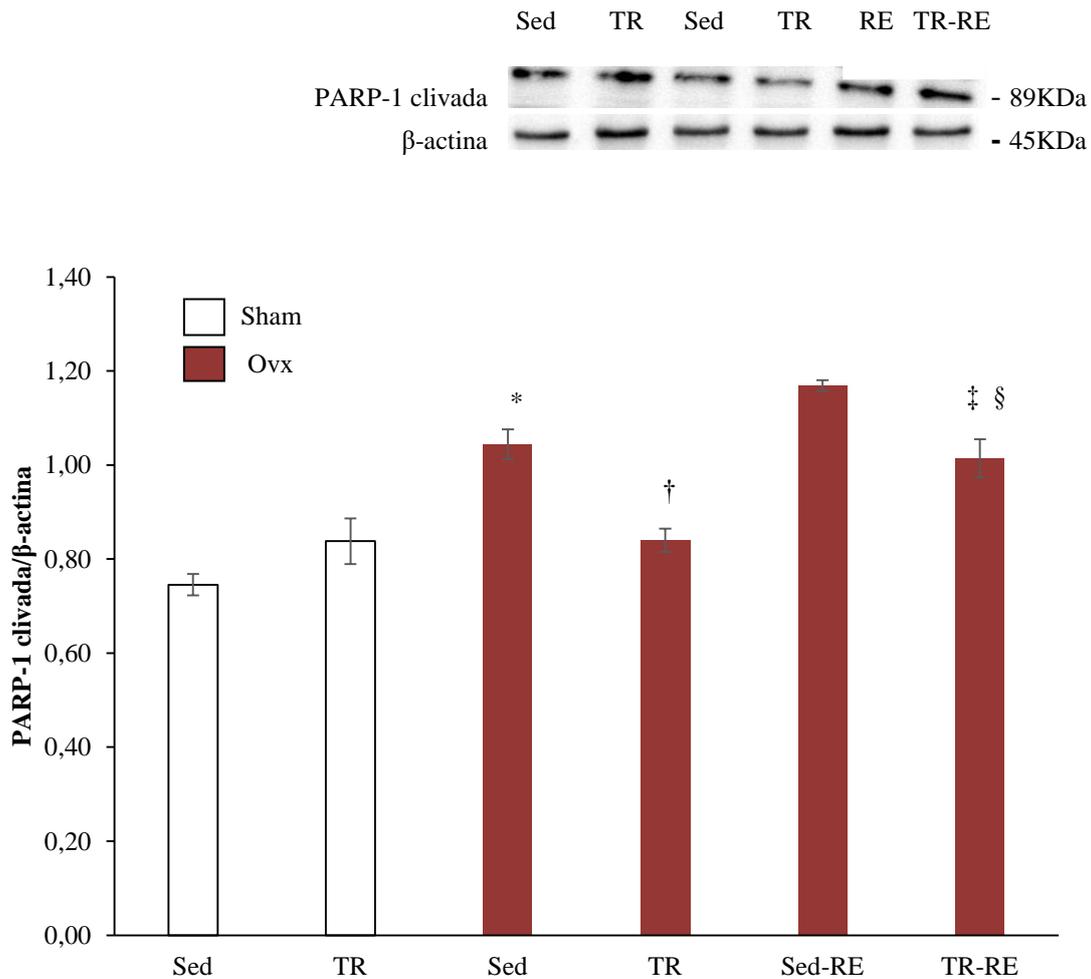


GRÁFICO 3: Conteúdo proteico de PARP-1 clivada/β-actina no hipocampo. Os dados estão apresentados em média ± erro padrão. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Sham-Sed; †Ovx-Sed; ‡Ovx-Sed-RE; §Ovx-TR (n=4). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizados; RE: Reposição de 17β-estradiol; TR: Treinamento Resistido.

6 DISCUSSÃO

O principal achado desse estudo foi que ratas Ovx apresentaram maior conteúdo proteico de PARP-1 clivada no hipocampo, indicando que a ovariectomia pode estimular a via de sinalização para apoptose. Entretanto, os grupos Ovx que realizaram o TR por 12 semanas, com ou sem RE, apresentaram menor conteúdo proteico de PARP-1 clivada e maior conteúdo proteico de p-AKT. Estes resultados demonstram os possíveis benefícios do TR e da sua associação à RE em prevenir o aumento do conteúdo de proteína pró-apoptótica no hipocampo de ratas Ovx como inicialmente hipotetizado. Por outro lado, a RE isoladamente não preveniu o aumento de PARP-1 clivada promovida pela ovariectomia.

Em relação aos parâmetros dimensionais, observamos maior massa corporal no grupo Ovx-Sed em relação ao grupo Sham-Sed apesar de não haver diferença significativa na ingestão alimentar entre os grupos. Pimenta et al. (2015) também verificaram que, independente da ingestão alimentar, ratas Ovx apresentaram maior massa corporal devido às alterações metabólicas promovidas pela redução dos níveis de estrogênio.

Os resultados da RE demonstraram que os grupos Ovx (Sed e TR) apresentaram menores concentrações de 17β -estradiol quando comparados aos grupos Sham (Sed e TR) o que comprova a eficácia da ovariectomia. Por outro lado, maiores concentrações de 17β -estradiol foram observadas nos grupos Ovx com RE (Sed e TR) quando comparados aos grupos Ovx sem RE (Sed e TR), indicando que a redução das concentrações de 17β -estradiol nesses grupos foi revertida com o implante e o reimplante das cápsulas silásticas. Porém, as concentrações de 17β -estradiol nos grupos Ovx com RE (Sed e Ovx) superaram as concentrações dos grupos Sham (Sed e TR). De acordo com esses resultados, sugerimos que as concentrações observadas nos grupos Ovx com RE (Sed e TR) foram suprafisiológicas.

Strom et al. (2008) descrevem que as cápsulas silásticas produzem concentrações fisiológicas de 17β -estradiol entre a segunda e a quarta semana após a administração em ratas Ovx. O reimplante das cápsulas silásticas foi realizado na quinta semana após os procedimentos cirúrgicos do implante, porém, antes do reimplante, não foram realizadas análises das concentrações de 17β -estradiol. Com isso, acreditamos que no momento do implante da segunda cápsula, as concentrações de 17β -estradiol liberadas pela primeira cápsula ainda eram suficientes para produzir seus efeitos fisiológicos e o implante da segunda cápsula sem a retirada da primeira resultou nas concentrações suprafisiológicas.

Para o protocolo de TR, foram utilizadas sobrecargas de acordo com a capacidade de carregamento individual dos animais a cada dia de treino. Esse protocolo de treinamento promoveu uma evolução da carga de carregamento entre as semanas, porém não houve diferença entre os grupos. Esses dados demonstram que a ovariectomia e a reposição hormonal não interferem no aumento da força muscular (RODRIGUES et al., 2013; TOMAZ et al., 2016).

Em resumo, a ovariectomia no presente estudo promoveu maior massa corporal independente da ingestão alimentar, redução das concentrações de 17β -estradiol no soro, maior conteúdo proteico de PARP-1 clivada no hipocampo de ratas mas não afetou a carga de carregamento.

O estrogênio contribui para a manutenção da plasticidade e sobrevivência celular no cérebro adulto e a redução dos seus níveis na pós-menopausa pode inibir a

neurogênese hipocampal induzindo a apoptose (KIM et al., 2015). Nesse sentido, o aumento do conteúdo proteico de PARP-1 clivada, observado em ratas Ovx sem a reposição de estrogênio, foi possivelmente causado pelos níveis reduzidos de 17β -estradiol. Esta redução nos níveis de estrogênio pode impedir maior interação dos receptores de estrogênio com PARP-1, promovendo, conseqüentemente, maior sinalização do processo apoptótico. Esse presente dado corrobora com estudo prévio em que foi verificado o aumento do processo apoptótico promovido por PARP-1 após isquemia cerebral no cérebro de ratas Ovx (SIEGEL et al., 2013).

A ação do estrogênio no cérebro promove maiores níveis de p-AKT, o que, conseqüentemente, diminui a ação das vias apoptóticas intrínscas e extrínscas, reduz a atividade da caspase-3 e subseqüentemente reduz a clivagem de PARP-1 (GATSON et al., 2009). Estudos sugerem que o exercício promove efeitos neuroprotetores pelo aumento da expressão de fatores neurotróficos que ativam a via de sinalização PI3K/AKT (JUNG et al., 2014; CHEN, RUSSO-NEUSTADT, 2005). A fosforilação de AKT influencia no balanço de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e pró-apoptóticas como Bax e caspase 3 (KIM et al., 2010). Com isso, a redução dos níveis de estrogênio na menopausa pode comprometer a atuação dessa via e seus efeitos neuroprotetores.

De acordo com os nossos resultados, o treinamento resistido promove maior conteúdo proteico de p-AKT e menor conteúdo proteico de PARP-1 clivada em ratas ovariectomizadas. Esses dados demonstram que mesmo com a redução dos níveis de 17β -estradiol nos grupos Ovx, o TR foi eficaz em manter o maior conteúdo proteico de p-AKT nesse grupo a qual reduz a ativação de proteínas pró-apoptóticas e, conseqüentemente, a clivagem de PARP-1.

Em estudos prévios foram verificados os benefícios do exercício na via apoptótica. Kim et al. (2015) mostraram que 12 semanas de treinamento de endurance promoveram maior conteúdo proteico de p-AKT no hipocampo de ratos diabéticos, reduzindo a atividade apoptótica de proteínas envolvidas na doença de Alzheimer. Em outro estudo, maior conteúdo proteico de p-AKT foi verificado após 6 semanas de treinamento de endurance onde a atividade de efetores apoptóticos foi suprimida no córtex de ratos (JUNG et al. 2014).

No presente trabalho, além do efeito isolado do TR, a sua associação à RE também promoveu maior conteúdo proteico de p-AKT na condição de ovariectomia. O exercício pode modular alguns neurotransmissores e a expressão de neurotrofinas no hipocampo, como BDNF (STENMAN, LILJA, 2013). Além disso, a administração de 17β -

estradiol também promove maiores níveis de BDNF no hipocampo de ratas fêmeas suportando a ideia de ser uma área focal para o estrogênio (LU et al., 2014). Sendo assim, uma vez que o aumento de fatores neurotróficos ativa a via de sinalização PI3K/AKT e que, tanto o exercício quanto a reposição de estrogênio promovem maior expressão desses fatores, o maior conteúdo proteico de p-AKT observado no grupo Ovx-TR-RE pode ser consequência da maior ativação dessa via pelas duas intervenções.

Quando comparado ao grupo Ovx-RE, o grupo Ovx-TR-RE apresentou maior conteúdo proteico de p-AKT. Apesar disso, não houve diferença significativa no conteúdo proteico de p-AKT nesse grupo quando comparado ao grupo Ovx-TR. Sendo assim, de acordo com nossos resultados, sugerimos que o TR pode ter contribuído de maneira mais efetiva na promoção de maior conteúdo proteico de p-AKT no grupo Ovx-TR-RE, uma vez que, isoladamente, o TR gerou maior conteúdo de p-AKT na condição de ovariectomia que a reposição de 17β -estradiol mesmo em doses suprafisiológicas.

Em relação à PARP-1 clivada, o grupo Ovx-TR-RE apresentou menor e maior conteúdo proteico quando comparado aos grupos Ovx-RE e Ovx-TR, respectivamente, ou seja, a associação do TR com a RE foi parcialmente eficaz em prevenir maiores conteúdos proteicos de PARP-1 clivada nesse grupo. Uma explicação para esses resultados é que a ação do 17β -estradiol pode ter sido comprometida devido aos níveis suprafisiológicos aplicados. Por outro lado, o TR parece ter sido mais efetivo na tentativa de impedir maior conteúdo proteico de PARP-1 clivada no grupo Ovx-TR-RE uma vez que, isoladamente, o grupo Ovx-TR apresentou menor conteúdo proteico de PARP-1 clivada. Nesse sentido, pesquisas descrevem que o exercício e suplementação de IGF-1 aplicados separadamente promovem ações neurotróficas no hipocampo de ratos idosos (KOLTAI et al., 2011) assim como a combinação do treinamento com a RE elimina os efeitos causados pelas intervenções isoladas no hipocampo de ratos idosos (MAROSI et al., 2012).

Apesar dos benefícios proporcionados pelo TR, o presente estudo apresenta limitações que impedem verificar com mais clareza a resposta direta da modulação de p-AKT e PARP-1 clivada, uma vez que não foram realizadas análises que permitem a quantificação do processo apoptótico propriamente dito, como TUNEL e degradação de DNA.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo mostram que:

- O treinamento resistido realizado por 12 semanas, com ou sem RE, pode ser uma intervenção efetiva para promover maior conteúdo proteico de p-AKT relacionada à sobrevivência celular no hipocampo de ratas ovariectomizadas;

- O treinamento resistido foi eficaz em promover menor conteúdo proteico de PARP-1 clivada, em ratas ovariectomizadas, enquanto a reposição de 17β -estradiol não;

- O treinamento resistido isolado foi mais eficaz em promover menor conteúdo proteico de PARP-1 clivada, associada a apoptose celular, em ratas ovariectomizadas que em associação com a reposição de 17β -estradiol.

8 REFERÊNCIAS

- ALAM, M.A.; SUBRAMANYAM RALLANDI, V.P.; ROY, P.K. Systems biology of immunomodulation for post-stroke neuroplasticity: multimodal implications of pharmacotherapy and neurorehabilitation. **Front Neurol** 7:94, 2016.
- BARRY, B.K.; CARSON R.G. The consequences of resistance training for movement control in older adults. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 59:730-754, 2004.
- BOATRRIGHT, K.M.; RENATUS, M.; SCOTT, F.L.; SPERANDIO, S.; SHIN, H.; PEDERSEN, I.M.; RICCI, J.E.; EDRIS, W.A.; SUTHERLIN, D.P.; GREEN, D.R.; SALVESEN, G.S. A unified model for apical caspase activation. **Mol Cell** 11: 529-541, 2003.
- BRAND, J.S.; VAN DER SCHOUW, Y.T.; ONLAND-MORET, N.C. Age at menopause, reproductive life span, and type 2 diabetes risk: results from the EPIC-InterAct study. **Diabetes Care** 36:1012-1019, 2013.
- CHEN, M.; RUSSO-NEUSTADT, A.A. Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Mol Brain Res** 135(1-2):181-93, 2005.
- COKER, L.H.; ESPELAND, M.A.; RAPP, S.R.; LEGAULT, C.; RESNICK, S.M.; HOGAN, P.; GAUSSOIN, S.; DAILEY, M. and SHUMAKER, S.A. Postmenopausal hormone therapy and cognitive outcomes: the Women's Health Initiative Memory Study (WHIMS). **J Steroid Biochem Mol Biol** 118: 304–310, 2010.
- GATSON, J.W.; MAASS, D.L.; SIMPKINS, J.W.; IDRIS, A.H.; MINEI, J.P.; WIGGINTON, J.G. Estrogen treatment following severe burn injury reduces brain inflammation and apoptotic signaling. **J Neuroinflammation** 6:30, 2009.
- GUIA PARA CUIDADOS E USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO. National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research, 1996, p. 1-137.
- HENDERSON, V.W. The neurology of menopause. **Neurologist** 12(3):149-59, 2006.
- HORNBERGER, T.A.; FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol** 29(1):16–31, 2004.
- JUNG, S.Y.; KIM, D.Y.; YUNE, T.Y.; SHIN, D.H.; BAEK, S.B.; KIM, C.J. Treadmill exercise reduces spinal cord injury-induced apoptosis by activating the PI3K/AKT pathway in rats. **Exp Ther Med** 7(3):587-593, 2014.
- KALU, D.N. Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Bone Loss. **Bone Miner** 15:175–92, 1991.
- KANAZAWA, I. How do neurons die in neurodegenerative diseases? **Trends Mol Med** 7:339-44, 2001.

KAUFMANN, S.H. e HENGARTNER, M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. **Trends Cell Biol** 11:526-534, 2001.

KIM, D.H.; KO, I.G.; KIM, B.K.; KIM, T.W.; KIM, S.E.; SHIN, M.S.; KIM, C.J.; KIM, H.; KIM, K.M. and BAEK, S.S. Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury-induced hippocampal apoptosis. **Physiol Behav** 101:660-665, 2010.

KIM, D.Y.; JUNG, S.Y.; KIM, T.W.; LEE, K.S.; KIM, K. Treadmill exercise decreases incidence of Alzheimer's by suppressing glycogen synthase kinase-3 β expression in streptozotocin-induced diabetic rats. **J ExercRehabil** 11(2):87-94, 2015.

KIM, T.W.; KIM, C.S.; KIM, J.Y.; KIM, C.J.; SEO, J.H. Combined exercise ameliorates ovariectomy-induced cognitive impairment by enhancing cell proliferation and suppressing apoptosis. **Menopause** 23(1):18-26, 2016.

KOLTAI, E.; ZHAO, Z.; LACZA, Z.; CSELENYAK, A.; VACZ, G.; NYAKAS, C.; BOLDOGH, ICHINOSEKI-SEKINE, N.I.; RADAK, Z. Combined exercise and insulin-like growth factor-1 supplementation induces neurogenesis in old rats, but do not attenuate age-associated DNA damage. **Rejuvenation** 14(6):585-96, 2011.

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

LEITE, R.D.; PRESTES, J.; BERNARDES, C.F.; SHIGUEMOTO, G.E.; PEREIRA, G.B.; DUARTE, J.O.; DOMINGOS, M.M.; BALDISSERA, V.; DE ANDRADE PEREZ, S.E. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver and heart; fat depots; and lipid profile. **Appl Physiol Nutr Metab** 34(6):1079-86, 2009.

LIU, Y.Y.; HU, L.; JI, C.; CHE, D.W.; SHEN, X.; YANG, N.; YUE, Y.; JIANG, J.M.; HONG, X.; GE, Q.S.; ZUO, P.P. Effects of hormone replacement therapy on magnetic resonance imaging of brain parenchyma hyperintensities in postmenopausal women. **ActaPharmacol Sin** 30(7):1065-1070, 2009.

LU, J.; XU, Y.; HU, W.; GAO, Y.; NI, X.; SHENG, H.; LIU, Y. Exercise ameliorates depression-like behavior and increases hippocampal BDNF level in ovariectomized rats. **Neurosci Lett** 573:13-8, 2014.

LUBBERS, L.S.; ROWE, B.A.; HODGE, L.M.; BROWNE, S.E.; GUNDERSDORF, R.; JONES, P.; HESS, F.J.; REYNOLDS, I.J. PISA, A novel pharmacodynamic assay for assessing poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) activity in situ. **J Pharmacol Toxicol Methods** 61(3):319-28, 2010.

LUO, X.; KRAUS, W.L. On par with parp: cellular stress signaling through poly (adp-ribose) and parp-1. **Genes Dev** 26(5):417-32, 2012.

MABLEY, J.G.; HORVATH, E.M.; MURTHY, K.G.; ZSENGELLÉR, Z.; VASLIN, A.; BENKO, R.; KOLLAI, M.; SZABÓ, C. Gender differences in the endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: potential role of Poly (ADP-ribose) polymerase activation. **J Pharmacol Exp Ther** 315(2):812-20, 2005.

MAROSI, K.; FELSZEGHY, K.; MEHRA, R.D.; RADAK, Z.; NYAKAS, C. Are the neuroprotective effects of estradiol and physical exercise comparable during ageing in female rats? **Biogerontology** 13(4):413-27, 2012.

OKOUCHI, M.; EKSHYYAN, O.; MARACINE, M.; AW, T.Y. Neuronal apoptosis in neurodegeneration. **Antioxid Redox Signal** 9(8):1059-96, 2007.

PEREIRA, G.B.; PRESTES, J.; LEITE, R.D.; MAGOSSO, R.F.; PEIXOTO, F.S.; MARQUETI, R. DE C.; SHIGUEMOTO, G.E.; SELISTRE-DE -ARAÚJO, H.S.; BALDISSERA, V.; PEREZ, S.E. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in rat calcaneal tendon. **Connect Tissue Res** 51(6):459-66, 2010.

PIMENTA, M.; BRINGHENTI, I.; SOUZA-MELLO, V.; DOS SANTOS MENDES, I.K.; AGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice. **Life Sci** 139:75-82, 2015.

PLUM, L.; SCHUBERT, M.; BRUNING, J.C. The role of insulin receptor signaling in the brain. **Trends EndocrinolMetab** 16:59-65, 2005.

QU, N.; WANG, L.; LIU, Z.C.; TIAN, Q.; ZHANG, Q. Oestrogen receptor α agonist improved long-term ovariectomy-induced spatial cognition deficit in young rats. **Int J Neuropsychopharmacol** 16(5):1071-82, 2013.

RODRIGUES, M.F.; STOTZER, U.S.; DOMINGOS, M.M.; DEMENICE, R.; SHIGUEMOTO, G.E.; TOMAZ, L.M.; SOUSA, N.M.; FERREIRA, F.C.; LEITE, R.D.; SELISTRE-DE ARAUJO, H.S.; JORDÃO-JÚNIOR, A.A.; BALDISSERA, V.; PEREZ, S.E. Effects of ovariectomy and resistance training on oxidative stress markers in the rat liver. **Clinics (São Paulo)** 68(9):1247-54, 2013.

SIEBERT, C.; KOLLING, J.; SCHERER, E.B.; SCHMITZ, F.; DA CUNHA, M.J.; MACKEDANZ, V.; DE ANDRADE, R.B.; WANNMACHER, C.M.; WYSE, A.T. Effect of physical exercise on changes in activities of creatine kinase, cytochrome c oxidase and ATP levels caused by ovariectomy. **Metab brain Dis** 29(3):825-35, 2014.

SIEGEL, C.S.; McCULLOUGH, L.D. NAD⁺ and nicotinamide: sex differences in cerebral ischemia. **Neuroscience** 237(1):223-31, 2013.

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** 150(1):76-85, 1985.

SOULES, M.R.; SHERMAN, S.; PARROTT, E. Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). **J Womens Health Gen Based Med** 10(9):843-848, 2001.

STANOJLOVIC, M.; GUSEVAC, I.; GRKOVIC, I.; ZLATKOVIC, J.; MITROVIC, J.; ZARIC, M.; HORVA, A.; DRAKULIC, D. Effects of chronic cerebral hypoperfusion and low-dose progesterone treatment on apoptotic processes, expression and subcellular localization of key elements within Akt and Erk signaling pathways in rat hippocampus. **Neuroscience** 311:308-21, 2015.

STENMAN, E.; LILJA, A. Increased monoaminergic neurotransmission improves compliance with physical activity recommendations in depressed patients with fatigue. **Med Hypotheses** 80(1):47-9, 2013.

STOJANOUSKA, L.; APOSTOLOPOULOS, V.; POLMAN, R.; BORKOLES, E. To exercise, or, not to exercise, during menopause and beyond. **Maturitas** 77(4):318-23, 2014.

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

TAKUMA, K.; MATSUO, A.; HIMENO, Y.; HOSHINA, Y.; OHNO, Y.; FUNATSU, Y.; ARAI, S.; KAMEI, H.; MIZOQUCHI, H.; NAGAI, T.; KOIKE, K.; INOVE, M.; YAMADA, K. 17 beta-estradiol attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction induced by chronic restraint stress in ovariectomized rats. **Neuroscience** 146(1):60-8, 2007.

TAYLOR, R.C. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol** 9: 231-241, 2008.

THOM, T.; HAASE, N.; ROSAMOND, W. Heart disease and stroke statistics V2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation** 113:e85-e151, 2006.

TOMAZ, L.M.; BARBOSA, M.R.; FARAHNAK, Z.; LAGOEIRO, C.G.; MAGOSSO, N.S.S.; LAVOIE, J-M.; PEREZ, S.E.A. GLUT 2 proteins and PPAR γ transcripts levels are increased in liver of ovariectomized rats: reversal effects of resistance training. **J Exerc Nutrition Biochem** 20(2):051-057, 2016.

TORRES-ALEMAN, I. Toward a comprehensive neurobiology of IGF-1. **Dev Neurobiol** 70:384-396, 2010.

WISE, P.M. Estrogens: protective or risk factors in brain function? **Prog Neurobiol** 69(3):181-191, 2003.

YUAN, C.H.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. **Viruses**. 4(12):3831-50, 2012.

ZUCCHETTO, A.; SERRAINO, D.; POLESEL, J.; NEGRI, E.; DE PAOLI, A.; DAL MASO, L.; MONTELLA, M., LA VECCHIA, C.; FRANCESCHI, S. and TALAMINI, R. Hormone-related factors and gynecological conditions in relation to endometrial cancer risk. **Eur J Cancer Prev** 18:316-321, 2009.