

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

**JONATO PRESTES**

**EFEITO DO TREINAMENTO DE FORÇA SOBRE A ATIVIDADE  
DE METALOPROTEASE-2 NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E  
MARCADORES SISTÊMICOS DE INFLAMAÇÃO EM  
DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS**

**SÃO CARLOS – SP**  
**2009**

**JONATO PRESTES**

**EFEITO DO TREINAMENTO DE FORÇA SOBRE A ATIVIDADE  
DE METALOPROTEASE-2 NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E  
MARCADORES SISTÊMICOS DE INFLAMAÇÃO EM  
DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez

Apoio Financeiro: CNPQ

SÃO CARLOS – SP

2009

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

P936et

Prestes, Jonato.

Efeito do treinamento de força sobre a atividade de metaloprotease-2 no músculo esquelético e marcadores sistêmicos de inflamação em diferentes modelos experimentais / Jonato Prestes. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

111 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Fisiologia do exercício físico. 2. Treinamento de força. 3. Menopausa. 4. Metaloprotease. 5. Inflamação. 6. Ovariectomia. I. Título.

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

Universidade Federal de São Carlos  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Convênio UFSCar/UNESP-Araraquara

Defesa de Tese de Jonato Prestes

Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez.....

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto.....

Prof. Dr. Francisco Navarro.....

Prof. Dr. Roberto Fares Simão Junior.....

Profª. Drª. Márcia Regina Cominetti.....

## ***BANCA EXAMINADORA:***

Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez (PPG-CF – UFSCAR - Orientador)

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto (PPG- IB - UNESP)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Cominetti (DEnf - UFSCAR)

Prof. Dr. Francisco Navarro (PPG-EF- GAMA FILHO)

Prof. Dr. Roberto Fares Simão Júnior (EEFD - UFRJ)

## ***SUPLENTES:***

Prof. Dr. Marcelo Marcos Piva Demarzo (DMed - UFSCAR)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Denise Vaz de Macedo (PPG-IB - UNICAMP)

*“Dificuldades e obstáculos são fontes valiosas de saúde  
e força para qualquer sociedade”*

ALBERT EINSTEIN

## **DEDICATÓRIA**

Primeiramente agradeço a Deus pela força e perseverança em orientar meu caminho.

Aos meus pais, Hedvirges Prestes e Jauri de Oliveira Prestes, tudo que aprendi de correto e de como um ser humano deve se desenvolver em sua integralidade devo aos meus pais, peço desculpas pelos erros da vida e digo que sou o que vocês me ensinaram a ser. Obrigado pelo apoio incondicional em todas as fases que me fizeram chegar a este momento, que é um dos mais importantes da minha vida, a realização de um sonho. Aos meus queridos irmãos, Danuza Prestes, Janaina Prestes e Lucas Prestes, que também me incentivaram em todos os momentos e dificuldades.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao Professor Sérgio Eduardo de Andrade Perez,

Por confiar no meu trabalho, pela sensibilidade indescritível demonstrada na minha defesa de mestrado, pela oportunidade de fazer o doutorado e crescer no conhecimento científico. Gostaria de expressar a minha admiração pela pessoa além do orientador, pelo amigo e companheiro. Somando tudo isso, posso dizer que o Professor Sérgio Perez é um indivíduo que fornece conhecimento científico e sobre a vida em cada momento de conversa, ou seja, vale à pena sentar e ouvir. Serei grato eternamente. Muito Obrigado!



## **AGRADECIMENTOS**

Mencionar os nomes destas pessoas é uma honra para mim, tenho certeza que estão entre os escolhidos para o futuro da Fisiologia do Exercício. O mais interessante desta tese é que ela não é realmente só minha. Gostaria de agradecer as pessoas que me ajudaram em todo o processo, no treinamento dos animais, dosagens, momentos de dificuldades e acima de tudo por serem meus amigos de verdade: Richard Diego Leite, Guilherme Borges Pereira, Gilberto Eiji Shiguemoto, Rodrigo Ferro Magosso, Rodrigo Dias, Rita de Cássia Marqueti, Anelena Bueno Frollini e João Paulo Botero.

A todos os outros professores que ajudaram no processo de constituição deste projeto, Mateus Moraes Domingos, Josiane Duarte de Oliveira e Fabiana Sobral pelo auxílio no treinamento e procedimentos experimentais.

Em especial ao grande amigo e exemplo de ser humano Gilberto Eiji Shiguemoto, o Juca. Buscar palavras para explicar o exemplo de pessoa e de atitude do professor Juca é difícil, mas posso dizer que sempre sentirei saudades, sempre o tomarei como exemplo e espero que um dia possamos trabalhar juntos numa Universidade. Aquele amigo do peito que guardamos em nossas memórias sem nunca esquecer, não importa o local ou a condição.

Para os indivíduos especiais que me ajudaram Richard Diego Leite, Guilherme Borges Pereira, Gilberto Eiji Shiguemoto e Rodrigo Ferro Magosso, a tese é de vocês também. Um sonho a ser realizado seria conseguir trabalhar com vocês pelo resto da minha vida. Vocês enfrentaram todos os obstáculos juntos comigo sem reclamar, sem hesitar e com a coragem de verdadeiros guerreiros. Sem vocês, não me resta dúvidas, esta tese não seria produzida.

Ao inestimável amigo Denis Foschini e sua esposa Bianca Foschini, pelo acolhimento e oportunidades proporcionados, dois amigos que me guiaram aqui no estado de São Paulo e me ajudam até hoje. Com certeza continuaremos trabalhando juntos.

Ao grande amigo João Durigan, por todas as conversas sobre as vias moleculares e sobre a fisioterapia, com quem pude aprender muito. Dois anos e meio morando juntos e convivendo me levaram a um crescimento pessoal incomensurável.

Eu não poderia deixar de enaltecer a amizade e o meu apreço por Rita de Cássia Marqueti. Tudo que eu aprendi sobre Biologia Molecular foi contigo. Obrigado pelas oportunidades de escrevermos juntos, conversarmos sobre a vida e pelo seu exemplo de esforço. Eu também fico muito feliz por ter participado da sua união com o João Durigan, realmente dois amigos para a vida.

A minha eterna orientadora, Profa. Dra. Claudia Regina Cavaglieri, sempre ajudando, dando conselhos sobre a pesquisa e sobre a vida. Uma mulher de fibra e que é um exemplo para mim, nunca me esquecerei por ter me dado a chance de fazer mestrado e aprender muito sobre ciência.

Gostaria de agradecer também os meus amigos de infância e adolescência em Cascavel-PR e aos amigos da graduação em Maringá-PR. Aos meus companheiros e amigos da época do mestrado, Claudio de Oliveira Assumpção, Felipe Fedrizi Donatto, Christiano Bertoldo Urtado, Gerson dos Santos Leite e todos com quem pude conviver em Piracicaba.

Amiga e orientada de graduação Cristiane de Lima, muito obrigado pela oportunidade de te orientar e ser seu amigo.

A amiga Anelena Bueno Frollini, pelos quase quatro anos de convivência, obrigado por ter me ensinado sobre sensibilidade e de como viver melhor a vida, pela sua maravilhosa família e pelo acolhimento no estado de São Paulo.

Ao amigo José Carlos Lopes, nosso técnico do Laboratório de Fisiologia do Exercício o “cacau”, obrigado pela prontidão e ajuda nos experimentos.

À professora Heloísa, por ter aberto o seu Laboratório para as dosagens de Biologia Molecular. Ao professor Vilmar Baldissera pela abertura no Laboratório de Fisiologia do Exercício, pelo apoio financeiro do Laboratório e pelos ensinamentos.

A todos os alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado do Laboratório de Fisiologia do Exercício que auxiliaram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

Ao amigo Fabiano Candido Ferreira e esposa Telma Ferreira, obrigado pela oportunidade de participar do seu trabalho de mestrado e também pela amizade e acolhimento em São Carlos.

Aos professores Dr. Francisco Navarro e Dr. Luciano Pontes, pelas oportunidades oferecidas no cenário nacional da Fisiologia do Exercício. Agradeço também a Profa. Dra. Rozangela Verlengia pelas oportunidades na pesquisa e publicações em conjunto.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar e aos Professores da Unesp de Araraquara pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

A todos os amigos de Pós-Graduação pela agradável convivência.

Agradeço ao pessoal da secretaria do Laboratório de Fisiologia do Exercício, secretária antiga, Fernanda Milanetto e atual Marcia Luiza Vidotti. Ao Alexandre da secretária da Pós-Graduação do Programa de Ciências Fisiológicas pelo apoio administrativo.

A todos os membros da minha banca que aceitaram esse convite e ajudaram no crescimento deste trabalho com suas observações.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro na forma de bolsa de Doutorado.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>MANUSCRITO I.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b>	Resumo.....	<b>7</b>
<b>2.2</b>	Introdução.....	<b>8</b>
<b>2.3</b>	Métodos.....	<b>10</b>
<b>2.4</b>	Resultados.....	<b>15</b>
<b>2.5</b>	Discussão.....	<b>22</b>
<b>2.6</b>	Conclusão.....	<b>25</b>
<b>2.7</b>	Referências Bibliográficas.....	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>MANUSCRITO II.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	Resumo.....	<b>33</b>
<b>3.2</b>	Introdução.....	<b>34</b>
<b>3.3</b>	Métodos.....	<b>36</b>
<b>3.4</b>	Resultados.....	<b>41</b>
<b>3.5</b>	Discussão.....	<b>48</b>
<b>3.6</b>	Conclusão.....	<b>53</b>
<b>3.7</b>	Referências Bibliográficas.....	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>Apêndice I – Manuscrito aceito para publicação no periódico <i>Applied Physiology Nutrition and Metabolism</i>.....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>Apêndice II – Manuscrito submetido ao periódico <i>Journal of Sports Sciences</i>.....</b>	<b>85</b>

## APRESENTAÇÃO

O primeiro contato com o Professor Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez foi um convite feito para participação na minha banca de mestrado, qualificação e defesa. Neste processo, tivemos a oportunidade de conversar sobre o interesse em ingressar no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar. No mestrado realizei um trabalho experimental sobre os efeitos do exercício físico sobre variáveis imunológicas, especificamente, citocinas e funcionalidade de linfócitos. Neste sentido, o Professor Sérgio manifestou o interesse em introduzir esta nova linha de pesquisa no Laboratório de Fisiologia do Exercício da UFSCar, tendo surgido assim o convite para fazer um estágio no laboratório. Após um ano de experimentos e trabalhos de alunos de mestrado, nos quais pude participar ativamente, fui matriculado no programa em nível de doutorado. Um dos projetos que tive participação gerou o seguinte trabalho submetido à publicação:

Ferreira FC, Medeiros AI, Nicioli C, Nunes JED, Shiguemoto GE, Prestes J, Verzola RMM, Baldissera V, Perez SEA. Circuit resistance training in sedentary women: body composition and serum cytokine levels. **Appl Physiol Nutr Metab**, 2009.

Outro trabalho que tive participação foi o da Profa. Rita Marqueti, aluna de doutorado da Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo vinculada ao Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. Neste estudo foi avaliada a expressão da metaloprotease de matriz-2 (MMP-2), morfologia e aspectos mecânicos de tendões e músculos de ratos submetidos ao treinamento de carga mecânica associado ao uso de esteróide anabolizante. As seguintes publicações e submissões foram geradas:

Marqueti RC, Prestes J, Stotzer, US, Paschoal M, Leite RD, Perez SE, Selistre-de-Araujo HS. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. **Int J Sports Med**, v.29, p.559-63, 2008a.

Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OHP, Perez SEA, Carvalho HF, Selistre-de-Araujo HS. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. **Eur J Appl Physiol**, v.104, p.1087-93, 2008b.

Marqueti RC, Prestes J, Wang CC, Ramos OHP, Perez SEA, Carvalho HF, Selistre-de-Araujo HS. Biomechanical responses of different rat tendons to decanoate nandrolone and load exercise. **Biomech Mod Mechanobiol**, 2009.

Tanto o trabalho com as mulheres de meia idade (Ferreira e colaboradores), quanto os trabalhos no Laboratório de Biologia Molecular foram essenciais para a minha formação, possibilitando a padronização do treinamento de força, dosagem de citocinas e aprendizado das técnicas nesta área.

Um dos interesses do Laboratório de Fisiologia do Exercício tem sido estudar os efeitos do treinamento de força sobre a composição corporal, força, sinalizadores do remodelamento muscular e biomarcadores inflamatórios. Na seqüência dos estudos supracitados resolvemos estudar com um modelo experimental de menopausa, os efeitos do treinamento de força sobre a expressão de MMP-2 no músculo esquelético e, as alterações nos marcadores inflamatórios sistêmicos em mulheres idosas menopausadas.

Por conseguinte, o trabalho de doutorado ficou dividido em duas grandes pesquisas: uma com ratas ovariectomizadas submetidas ao treinamento de força e outra com mulheres idosas menopausadas que também realizaram treinamento de força. A razão para a escolha das ratas ovariectomizadas é que esta técnica tem sido utilizada como modelo experimental de menopausa e, como o objetivo foi analisar o remodelamento muscular por meio da atividade da MMP-2 em diferentes músculos, o modelo animal tornou-se mais viável e aplicável. Este projeto originou também dados do metabolismo intermediário, remodelamento de tendões e liberação de

neurotransmissores em diferentes áreas do encéfalo, que são objetos de estudo do Laboratório de Fisiologia do Exercício com a inserção de três alunos de mestrado: Richard Diego Leite, Guilherme Borges Pereira e Josiane de Oliveira Duarte.

Por meio da parceria com o Laboratório de Biologia Molecular da Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo e com a ajuda da Profa. Rita de Cássia Marqueti foi realizada a análise da MMP-2 em diferentes músculos nas ratas ovariectomizadas. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade da MMP-2 nos músculos gastrocnêmio, sóleo, tibial anterior (TA) e extensor longo dos dedos (EDL) após treinamento de força. Outro objetivo foi analisar a influência da ovariectomia sobre o remodelamento muscular, por meio da atividade da MMP-2. O resultado deste trabalho apresentado no corpo da Tese na forma de artigo foi aceito para publicação no periódico internacional indexado *Applied Physiology Nutrition and Metabolism* (APNM):

Manuscrito I – aceito no periódico *Applied Physiology Nutrition and Metabolism* (Apêndice I):

Prestes J, Marqueti RC, Shiguemoto GE, Leite RD, Pereira GB, Selistre-de-Araújo HS, Baldissera V, Perez SEA. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab**, *in press*, 2009.

A atividade da MMP-2 se manifesta em diversos tecidos, assim sendo, o músculo cardíaco e os ossos foram coletados estando em fase de processamento, o que ensejará novas publicações do Laboratório. No soro destes animais será realizada a mensuração de citocinas relacionadas ao metabolismo ósseo. Outro aspecto que está sendo analisado é a morfologia da área de secção transversal dos músculos sóleo e tibial anterior associada à expressão gênica de alguns sinalizadores de hipertrofia e atrofia.

O modelo experimental em ratas ovariectomizadas tem como vantagem uma análise mais invasiva e, portanto, mais aprofundada sobre o remodelamento muscular.



No entanto, é preocupação do Laboratório estabelecer relações entre a pesquisa básica e a aplicada, deste modo, foi desenvolvido paralelamente um estudo dos marcadores inflamatórios sistêmicos que também podem influenciar o remodelamento muscular frente ao treinamento de força em mulheres idosas na menopausa.

A parte experimental, especificamente, o treinamento de força durante 12 meses foi concluída, e a análise de outros biomarcadores, além daqueles apresentados nesta tese, encontra-se em desenvolvimento sob responsabilidade dos alunos de doutorado, Gilberto Eiji Shiguemoto e João Paulo Botero.

É desejável que um projeto com tal abrangência seja desenvolvido com parcerias de Laboratórios que compartilham dos mesmos interesses científicos. Deste modo, o grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Claudia Regina Cavaglieri, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Metodista de Piracicaba foi convidado para participar ativamente nas dosagens e compilação dos dados dos marcadores inflamatórios sistêmicos, considerando a vasta experiência deste grupo nesta área.

A relevância dos resultados obtidos permitiu a elaboração do segundo artigo científico apresentado no corpo desta Tese, submetido à publicação na revista internacional indexada *Journal of Sports Sciences*.

Manuscrito II - submetido ao periódico *Journal of Sports Sciences* (Apêndice II):

Prestes J, Shiguemoto GE, Botero JP, Frollini AB, Dias R, Leite RD, Pereira GB, Magosso RF, Baldissera V, Cavaglieri CR, Perez SEA. Effects of Resistance Training on Resistin, Leptin, Cytokines and Muscle Force in Elderly Post-Menopausal Women.

**MANUSCRITO I**

## **EFEITOS DA OVARIECTOMIA E TREINAMENTO DE FORÇA SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Jonato Prestes<sup>1</sup> (MS), Rita de Cássia Marqueti<sup>1</sup> (MS), Gilberto Eiji Shiguemoto<sup>1</sup> (MS), Richard Diego Leite<sup>1</sup> (MS), Guilherme Borges Pereira<sup>1</sup> (MS), Heloisa Sobreiro Selistrede-Araújo<sup>1</sup> (PhD), Vilmar Baldissera<sup>1</sup> (PhD), Sérgio Eduardo de Andrade Perez<sup>1</sup> (PhD).

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Fisiologia do Exercício, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos/SP, Brasil.

**Título resumido:** Ovariectomia, treinamento de força e MMP-2

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer ao Senhor José Carlos Lopes pela assistência técnica laboratorial e ao apoio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Laboratório de Fisiologia do Exercício da Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

\*Autor para correspondência: Jonato Prestes. Rua Major José Inácio, n.2400, CEP: 13560-161, apto: 13, São Carlos, São Paulo, Brasil. Telefone: +55 (16) 3361-6439. **E-mail:** [jonatop@gmail.com](mailto:jonatop@gmail.com)

## RESUMO

As metaloproteases de matriz (MMPs) são cruciais para manutenção do tecido saudável. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade da MMP-2 nos músculos gastrocnêmio, sóleo, tibial anterior (TA) e extensor longo dos dedos (EDL) após treinamento de força em ratas ovariectomizadas. Ratas *Wistar* adultas foram alocadas nos grupos: sedentário (Sed-Intacto); sedentário ovariectomizado (Sed-Ovx); sedentário pseudo-ovariectomizado (Sed-Pseudo); exercício agudo (AgudoEx-Intacto); exercício agudo ovariectomizado (AgudoEx-Ovx); treinamento de força (CrônicoEx-Intacto) e treinamento de força ovariectomizado (CrônicoEx-Ovx) (n= 10 por grupo). Foi utilizado um treinamento de força de 12 semanas no qual os animais escalaram uma escada vertical de 1,1-m com pesos presos as suas caudas. As sessões foram realizadas com intervalo de três dias, 4-9 escaladas e 8-12 movimentos dinâmicos por escalada. A atividade da MMP-2 foi analisada por zimografia. Houve uma maior atividade da MMP-2 nos grupos CrônicoEx-Intacto e CrônicoEx-Ovx e menor atividade no AgudoEx-Ovx comparado com o grupo Sed-Intacto no sóleo ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos Sed-Ovx e CrônicoEx-Ovx apresentaram menor atividade da MMP-2 comparado com o grupo Sed-Intacto no TA. Houve maior atividade da MMP-2 no AgudoEx-Intacto e AgudoEx-Ovx comparado com Sed-Intacto e Sed-Ovx no TA, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ). Nos músculos TA e EDL o treinamento aumentou a atividade da MMP-2 comparado com o grupo Sed-Intacto. Não foram observadas alterações estatisticamente significativas para o músculo gastrocnêmio. O treinamento de força aumenta a atividade da MMP-2 nos músculos sóleo, TA e EDL, o que pode ser importante para o remodelamento muscular. A ovariectomia reduz a atividade da MMP-2 no TA e EDL, possivelmente comprometendo a função muscular.

**Palavras-chave:** treinamento de força, MMP-2, músculo esquelético, ovariectomia, ratas.

## INTRODUÇÃO

A ovariectomia em animais é um modelo experimental utilizado para mimetizar a menopausa e induz a uma redução na massa muscular (sarcopenia), geração de força, fração de miosina de ligação forte durante a contração e massa óssea (osteopenia) (Moran, Warren e Lowe, 2006; Moran et al., 2007). Os mecanismos exatos acerca desse processo catabólico não estão completamente elucidados. Neste sentido, são necessários experimentos destinados a estudar o remodelamento muscular e propor as vias envolvidas. Em contrapartida, a reposição hormonal tem sido utilizada para minimizar os efeitos da sarcopenia e osteopenia causadas pela ovariectomia e menopausa (Sipila et al., 2001; Sorensen et al., 2001; Gorzek et al., 2007; Moran et al., 2007). No entanto, existem alguns riscos associados com esta terapia em humanos, por exemplo, o aumento na incidência de alguns tipos de câncer (mama e útero), visto que os efeitos colaterais das dosagens hormonais utilizadas ainda precisam ser mais investigados (Stefanick et al., 2006; Olson, Bandera e Orlow, 2007; Zhang et al., 2007).

Por outro lado, o treinamento físico como o exercício de força, salto na água ou natação, corrida em roda ou esteira rolante realizados por roedores resulta em adaptações positivas no músculo esquelético e cardíaco (Allen et al., 2001; Hornberger Jr e Farrar, 2004), osso (Yao et al., 2004; Shiguemoto et al., 2007), e sistema imune (Kapasi et al., 2003; Prestes et al., 2008). No que se refere ao músculo esquelético, este tecido é circundado pela matriz extracelular (MEC) que fornece suporte estrutural, proteção e manutenção para a função das fibras musculares (Birkedal-Hansen, 1995). A MEC intramuscular aumenta com o exercício físico, (Kjaer, 2004) e sua manutenção depende de uma variedade de enzimas proteolíticas, como as metaloproteases de matriz (MMPs). As MMPs são usualmente encontradas nos tecidos como pró-MMPs (Kjaer,

2004) e sua expressão é altamente regulada por fatores de crescimento, citocinas produzidas durante o remodelamento tecidual (Carmeli et al., 2004), agentes bioquímicos e interações célula-MEC (Lluri e Jaworski, 2005). Estas MMPs são cruciais para manutenção do tecido saudável. A MMP-2 exerce um papel essencial na proliferação e diferenciação miofibrilar, recuperação após dano e homeostasia do tecido conjuntivo local (Carmeli et al., 2004; Lluri e Jaworski, 2005). Uma das MMPs mais importantes associadas com a função e disfunção do músculo esquelético é a MMP-2 (Matrisian, 1992). Tendo em vista que a ovariectomia causa redução na massa muscular e a MMP-2 está relacionada com a manutenção do músculo esquelético, a ausência de importantes hormônios anabólicos pode modular a atividade da MMP-2 muscular.

Recentemente, nós mostramos que o remodelamento do tendão de ratos pode ser comprometido quando dois tipos de Esteróides Anabólicos-Androgênicos (EAA) (Decadurabolin e Durateston) são associados com ou sem o exercício de cargas, como resultado da redução da atividade da MMP-2 (Marqueti et al., 2006). Outro estudo do nosso grupo mostrou que o exercício com sobrecarga aumenta a atividade da MMP-2 nos músculos gastrocnêmio e sóleo, o que foi abolido pela administração de EAA (Marqueti et al., 2008a). Alguns estudos na literatura alçaram a necessidade da investigação do remodelamento do tendão e músculo esquelético, e moléculas de sinalização muscular como as MMPs em ratas (Heinemeir et al., 2007), especialmente com relação aos processos de adaptação fisiológica induzidos pela ovariectomia (Gorzek et al., 2007; Moran et al., 2007). Foi demonstrado que o treinamento de força exerce um potencial efeito sobre a hipertrofia muscular (Hornberger Jr e Farrar, 2004), sendo assim, esta modalidade de exercício pode ser importante para a atividade da MMP-2 e manutenção da função muscular.

No entanto, não foram encontrados estudos que investigaram os efeitos do exercício de força sobre a atividade da MMP-2 em ratas ovariectomizadas. Em vista das informações mencionadas acima, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade da MMP-2 nos músculos gastrocnêmio, sóleo, tibial anterior (TA) e extensor longo dos dedos (EDL) após treinamento de força. Adicionalmente, este estudo teve como objetivo analisar a influência da ovariectomia sobre o remodelamento muscular, por meio da atividade da MMP-2. Nossa hipótese era que o exercício de força poderia minimizar os efeitos deletérios da ovariectomia sobre o remodelamento muscular.

## **MÉTODOS**

### **Animais**

Foram utilizadas 70 ratas *Wistar* (*Rattus norvegicus* var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*) com 13 semanas e peso inicial de aproximadamente 250±30g, obtidas do biotério da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), SP, Brasil. Os animais tiveram acesso livre a água e ração, foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratas por gaiola) numa temperatura constante de 23±2<sup>0</sup>C, ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro, com luzes acesas das 06:00 h às 18:00 h. Todos os animais foram alimentados com Labina® (uma dieta com ração padrão para ratos fornecida pela Purina, Brasil). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (n<sup>o</sup>. protocolo 048/2007). Todos os procedimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América (*National Research Council's*, 1996).

## **Grupos Experimentais**

Os animais foram randomicamente distribuídos em sete grupos experimentais (10 animais por grupo) na seguinte ordem: 1) sedentário (Sed-Intacto); 2) sedentário ovariectomizado (Sed-Ovx); 3) pseudo-ovariectomizado (Sed-Pseudo); 4) exercício agudo (AgudoEx-Intacto); 5) exercício agudo ovariectomizado (AgudoEx-Ovx); 6) treinamento de força (CrônicoEx-Intacto) e 7) treinamento de força ovariectomizado (CrônicoEx-Ovx).

### **Grupos sedentários e pseudo- ovariectomizado**

Os animais sedentários e pseudo-ovariectomizados foram mantidos em suas gaiolas durante três meses sem nenhum tipo de exercício. O grupo pseudo-ovariectomizado foi submetido aos procedimentos de cirurgia sem remoção dos ovários. Os animais do grupo sedentário ovariectomizado tiveram seus ovários removidos.

### **Grupos de exercício agudo**

Depois de três meses de alojamento os grupos de exercício agudo AgudoEx-Intacto e AgudoEx-Ovx foram adaptados ao exercício de força (uma sessão) e suas cargas máximas foram determinadas em outra sessão. Após estes procedimentos, três dias após, os animais realizaram apenas uma sessão aguda de exercício de força.



## **Grupos treinados**

Os animais treinados CrônicoEx-Intacto e CrônicoEx-Ovx realizaram 12 semanas de exercício de força. O treinamento foi iniciado no mesmo período para ambos os grupos.

## **Ovariectomia**

A ovariectomia e a pseudo-ovariectomia foram realizadas quando os animais completaram 13 semanas de idade, de acordo com a técnica descrita por Kalu (1991) e o anestésico utilizado foi o éter etílico. Todos os animais submetidos aos procedimentos da cirurgia tiveram uma semana de recuperação.

## **Treinamento de força**

O treinamento de força de 12 semanas foi realizado uma vez a cada três dias. Inicialmente, as ratas foram adaptadas ao protocolo de treinamento de força que exigia que os animais escalassem uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2-cm, inclinação de 80°) com pesos presos as suas caudas. O tamanho da escada fazia com que os animais realizassem 8-12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi preso a porção proximal da cauda com uma fita auto-adesiva. Com o aparato fixado a cauda as ratas foram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada. Caso necessário um estímulo com pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento. No topo da escada as ratas alcançavam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde

descansavam durante 120 segundos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem estímulo.

Três dias após esta familiarização, a primeira sessão de treinamento consistiu de 4-8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas. A escalada inicial consistia em carregar uma carga de 75% do peso corporal do animal. Em seguida, era adicionado um peso de 30g até uma carga com a qual a rata não conseguia escalar toda a escada fosse atingida. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguia progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento da rata para aquela sessão de treinamento.

As sessões de treinamento consistiam de quatro escalas na escada, com 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subsequentes eram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada. O protocolo de treinamento de força foi adaptado de Hornerberg e Farrar (2004), de acordo com as necessidades do presente estudo.

### **Determinação da MMP-2 no músculo**

Os animais foram eutanasiados por decapitação imediatamente após a última sessão de exercício de força e após as sessões agudas. Em seguida, os músculos gastrocnêmio, sóleo, tibial anterior (TA) e extensor longo dos dedos (EDL) foram removidos de ambas as patas posteriores. Os músculos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-84^{\circ}\text{C}$  para a análise bioquímica.

As amostras de músculo foram tratadas conforme já descrito por Cleutjens et al. (1995) para extratos musculares. O tecido congelado (25 mg) foi incubado em 2mL de tampão de extração (10mM ácido cacodílico, pH 5,0; 0,15M NaCl; 1M ZnCl<sub>2</sub>; 20mM CaCl<sub>2</sub>; 1,5mM NaN<sub>3</sub>; 0,01% Triton X- 100 [v/v]), a 4<sup>0</sup>C, em agitação contínua, por um período de 24 horas. Após este período, a solução foi centrifugada por 10 minutos (13000 × g a 4<sup>0</sup>C). As amostras foram concentradas para 20 µg de proteína total em cada poço dos géis poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% com 1mg/mL de gelatina. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes em 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS. Os géis foram incubados no tampão de substrato (50mM Tris-HCl, pH 8,0; 5mM CaCl<sub>2</sub>; 0,02% NaN<sub>3</sub>) a 37<sup>0</sup>C durante 20 horas. Os géis foram então corados com Coomassie brilliant blue por 1 hora e 30 minutos e descorados com ácido acético:metanol: água (1:4:5) para visualização da atividade das bandas. Foram avaliadas amostras de 10 animais em cada grupo para garantir a precisão e linearidade das análises, e cada amostra foi normalizada para a quantidade total de proteína incluída. Os géis foram fotografados com uma câmera Canon G6 Power Shot 7.1 mega pixels (Virginia, USA). As médias de intensidade de banda foram mensuradas por meio do *software* Gene Tools. As bandas encontradas em todos os grupos foram de 72–62 kDa, sugerindo a ativação da MMP-2 conforme proposto por Birkedal-Hansen (1995). A banda ativa foi enfatizada de acordo com a proposta de Marqueti et al. (2008a).

### **Análise estatística**

Todos os dados foram apresentados pela média ± erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi inicialmente realizada pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Todas as variáveis

apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, então foi utilizado o teste Anova *two-way* (levando-se em consideração as variáveis treinamento de força x ovariectomia). Na análise da capacidade máxima de carregamento foi utilizado o teste Anova *two-way* (levando-se em consideração as variáveis ovariectomia x tempo). Para os dados de massa corporal (g) dos animais na semana 1 e semana 12, foi utilizado o Anova *three-way* (exercício x ovariectomia x semana). Quando a diferença apresentada era significativa, foi aplicado o teste de Tukey para comparações múltiplas. O *software* utilizado foi o Statistica® 6.1 (Stat. Soft Inc., Tulsa, OK, USA) com um nível de alfa de 0,05.

## RESULTADOS

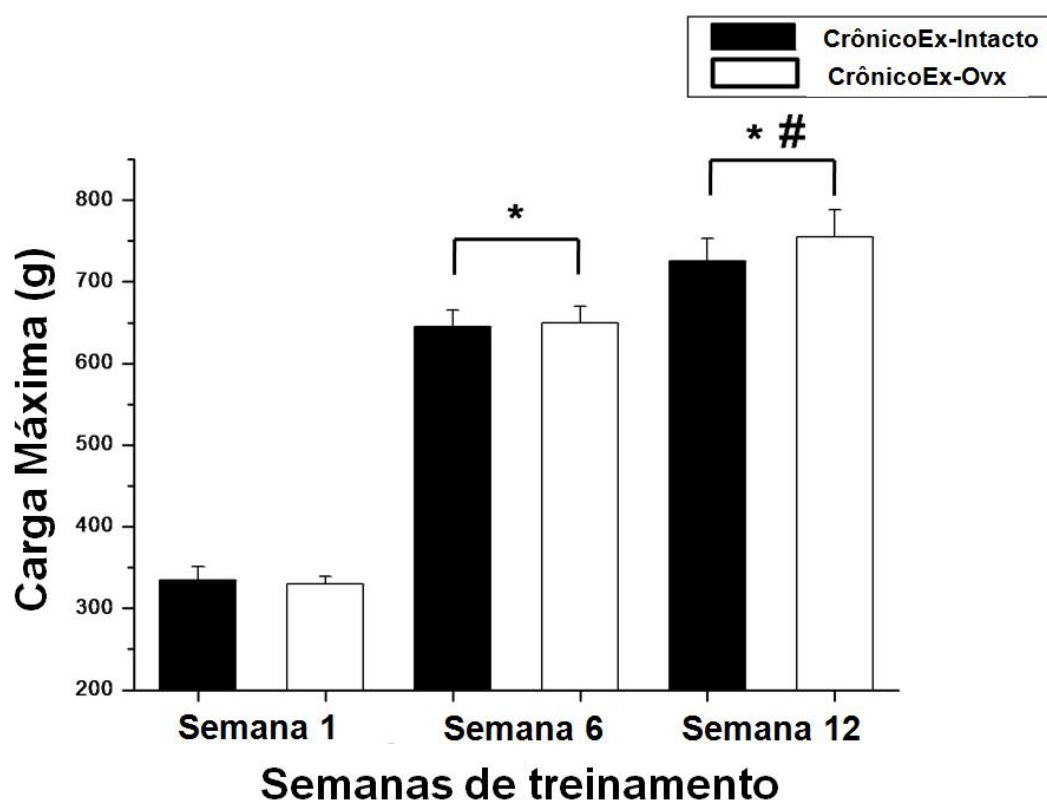
Na massa corporal dos animais não houve nenhuma interação estatisticamente significativa entre as intervenções. Isso indica que o aumento na massa corporal da semana 1 para a semana 12 foi similar para todos os grupos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Massa corporal (g) dos animais na semana 1 e semana 12.

<b>Grupos experimentais (n=10 por grupo)</b>	<b>Semana 1</b>	<b>Semana 12</b>
Sed-Intacto	247,7 ± 3,5	301,1 ± 8,8*
Sed-Ovx	249,0 ± 7,4	283,0 ± 9,7*
Sed-Pseudo	239,4 ± 1,6	287,8 ± 3,2*
AgudoEx-Intacto	244,1 ± 2,1	286,5 ± 7,0*
AgudoEx-Ovx	236,6 ± 3,3	306,1 ± 5,8*
CrônicoEx-Intacto	246,9 ± 7,0	289,0 ± 8,2*
CrônicoEx-Ovx	246,3 ± 3,5	292,6 ± 6,4*

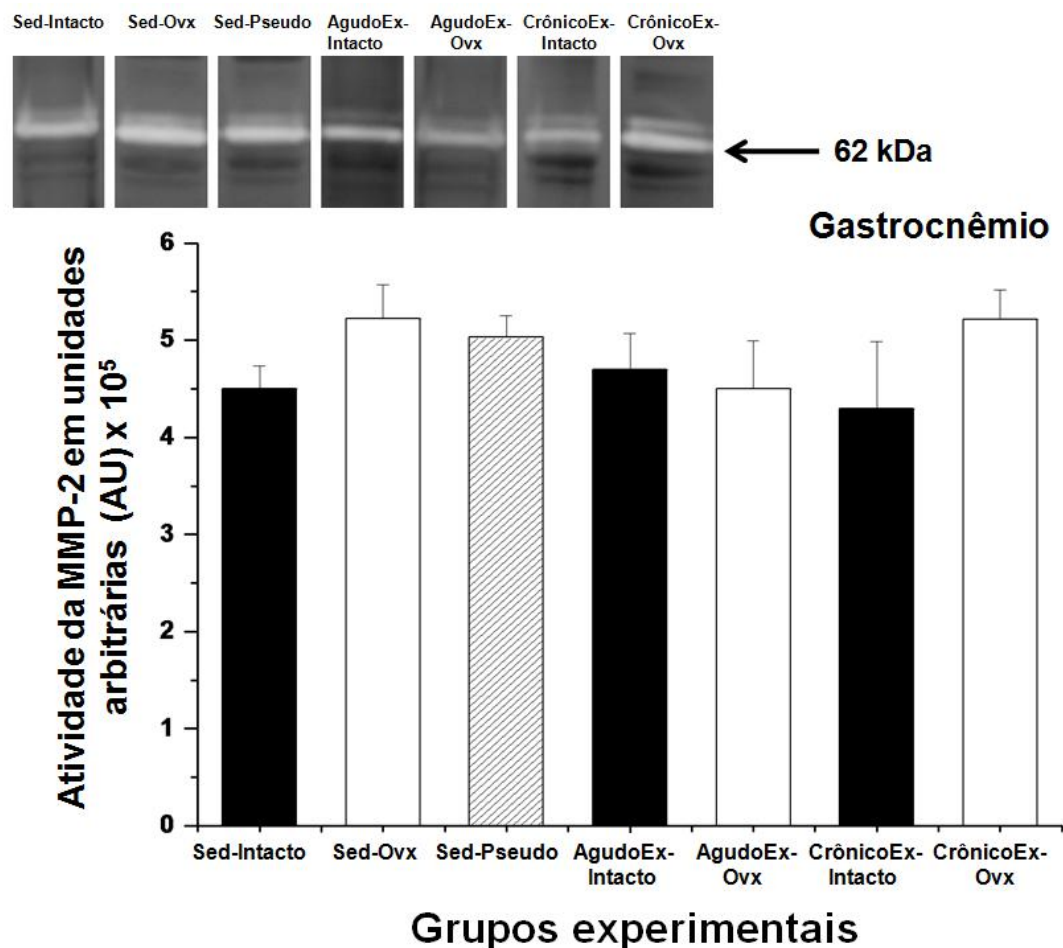
\*Diferença estatisticamente significativa comparado a semana 1. Os valores estão apresentados pela média ± erro padrão da média,  $p \leq 0,05$ .

Para a carga máxima durante as 12 semanas de treinamento, não houve nenhuma interação entre grupo e tempo, indicando que os grupos CrônicoEx-Intacto e CrônicoEx-Ovx aumentaram a capacidade máxima de carregamento de maneira similar durante o treinamento (Figura 1). As cargas aumentaram após a semana 6 e semana 12 quando comparado com a semana 1, e após a semana 12 comparado com a semana 6 (Figura 1). Deste modo, não houve nenhuma diferença nas cargas máximas entre ambos os grupos treinados em força cronicamente no período de 12 semanas.



**FIGURA 1.** Carga máxima (g) dos grupos CrônicoEx-Intacto e CrônicoEx-Ovx nas semanas 1, 6 e 12. Os valores estão apresentados pela média  $\pm$  erro padrão da média,  $p \leq 0,05$  ( $n = 10$  por grupo). \*Diferença estatisticamente significativa comparado com a semana 1; #Diferença estatisticamente significativa entre a semana 6 e semana 12.

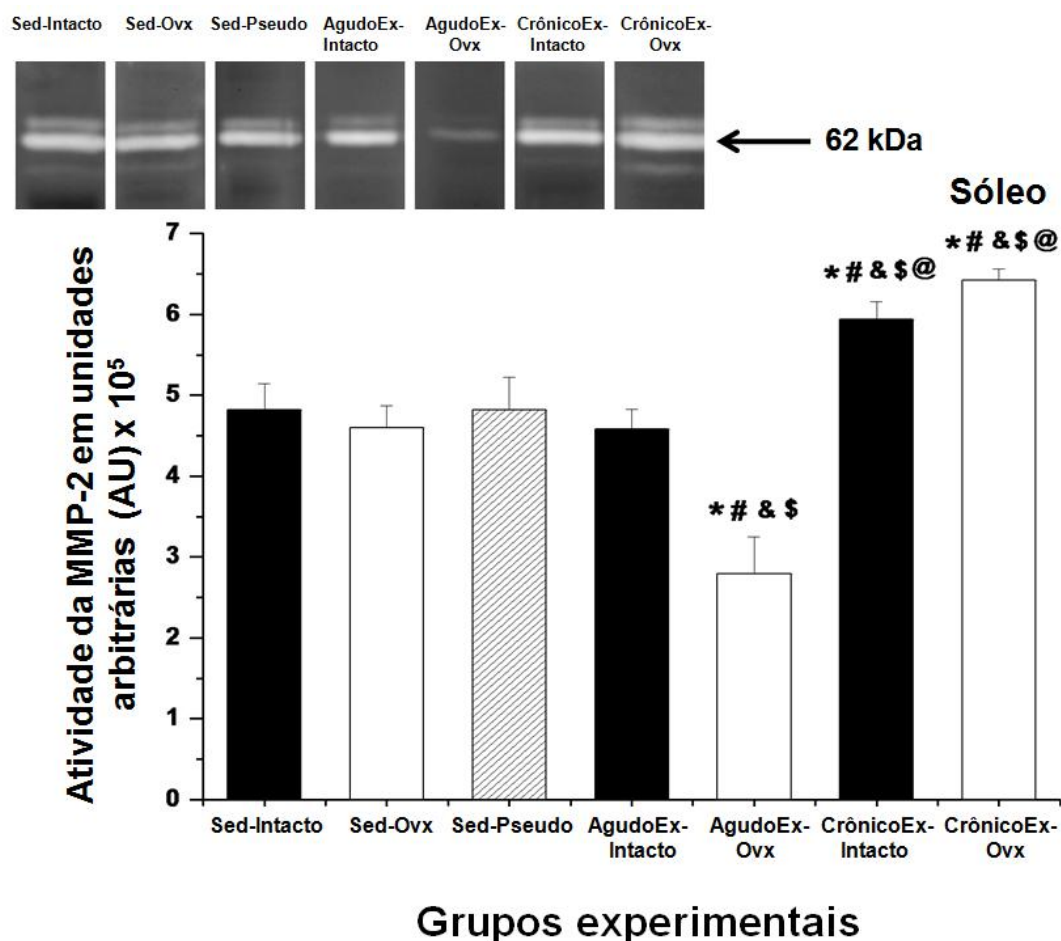
Não foram encontradas interações estatisticamente significativas entre as intervenções e grupos para a atividade da MMP-2 no músculo gastrocnêmio (Figura 2).



**FIGURA 2.** Análise da atividade da MMP por zimografia nos extratos do músculo gastrocnêmio (n = 10 por grupo). A atividade da banda foi expressa em unidades arbitrárias. Os valores estão apresentados pela média  $\pm$  erro padrão da média,  $p \leq 0,05$ .

No entanto, houve uma interação estatisticamente significativa entre as intervenções (exercício de força x estado ovariano) no músculo sóleo. Assim, o grupo AgudoEx-Ovx apresentou atividade da MMP-2 significativamente menor quando comparado com todos os grupos experimentais no músculo sóleo. Os grupos treinados

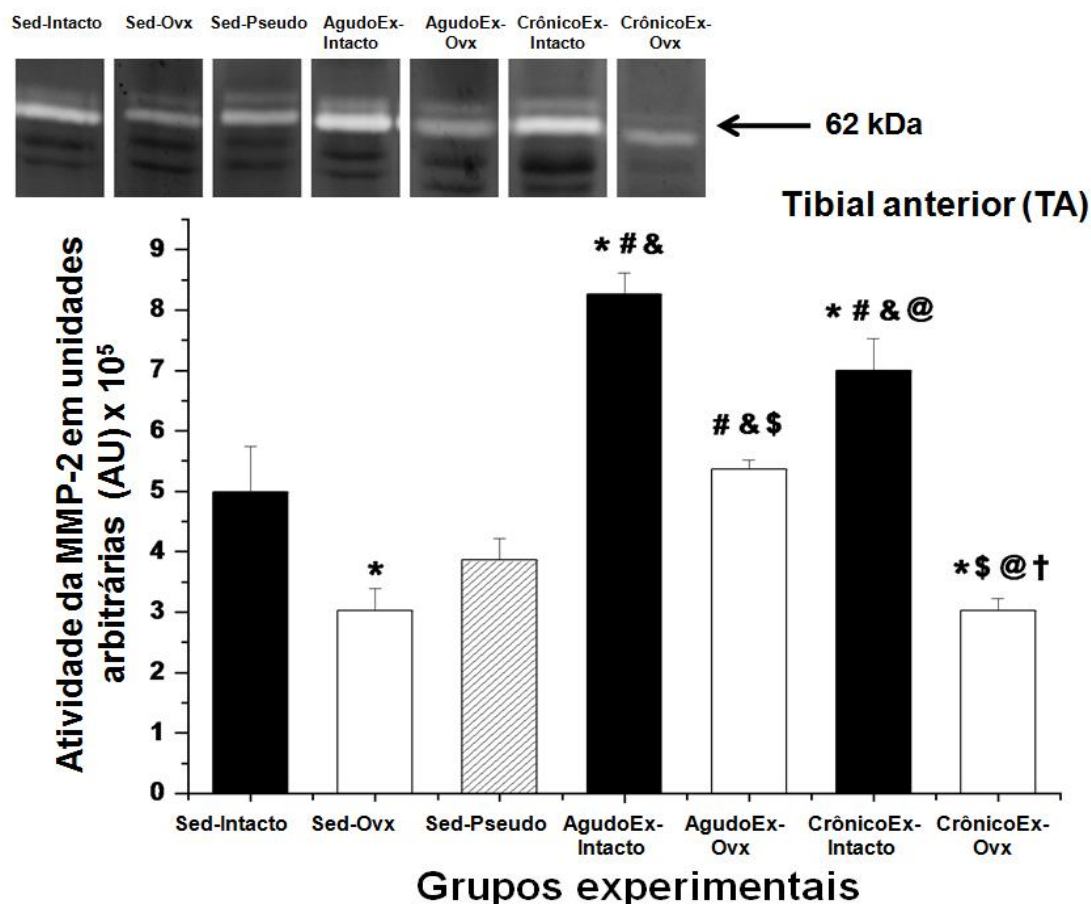
em força (CrônicoEx-Intacto e CrônicoEx-Ovx) apresentaram maior atividade da MMP-2 quando comparados com o Sed-Intacto, Sed-Ovx, Sed-Pseudo, AgudoEx-Intacto e AgudoEx-Ovx, sem diferenças entre CrônicoEx-Intacto e CrônicoEx-Ovx no músculo sóleo (Figura 3).



**FIGURA 3.** Análise da atividade da MMP por zimografia nos extratos do músculo sóleo (n = 10 por grupo). A atividade da banda foi expressa em unidades arbitrárias. Os valores estão apresentados pela média  $\pm$  erro padrão da média,  $p \leq 0,05$ . \*Diferença estatisticamente significativa quando comparado com o Sed-Intacto; #comparado com Sed-Ovx; &comparado com Sed-Pseudo; \$comparado com AgudoEx-Intacto; @comparado com AgudoEx-Ovx.

No músculo TA também houve interação significativa entre os grupos, indicando que a atividade da MMP-2 foi alterada dependendo do estado ovariano. A ovariectomia (Sed-Ovx) reduziu a atividade da MMP-2 quando comparado com o grupo Sed-Intacto. O exercício de força agudo (AgudoEx-Intacto) induziu a um aumento na atividade da MMP-2 comparado com o Sed-Intacto, Sed-Pseudo, Sed-Ovx, AgudoEx-Ovx e CrônicoEx-Ovx no músculo TA (Figura 4). O grupo AgudoEx-Ovx apresentou maior atividade da MMP-2 quando comparado com os grupos Sed-Pseudo, Sed-Ovx e CrônicoEx-Ovx no músculo TA. O treinamento de força (CrônicoEx-Intacto) aumentou a atividade da MMP-2 no músculo TA quando comparado com os grupos Sed-Intacto, Sed-Ovx, Sed-Pseudo, AgudoEx-Ovx e CrônicoEx-Ovx. Diferentemente, o grupo CrônicoEx-Ovx apresentou menor atividade da MMP-2 quando comparado com os grupos Sed-Intacto, AgudoEx-Intacto, AgudoEx-Ovx e CrônicoEx-Intacto (Figura 4).

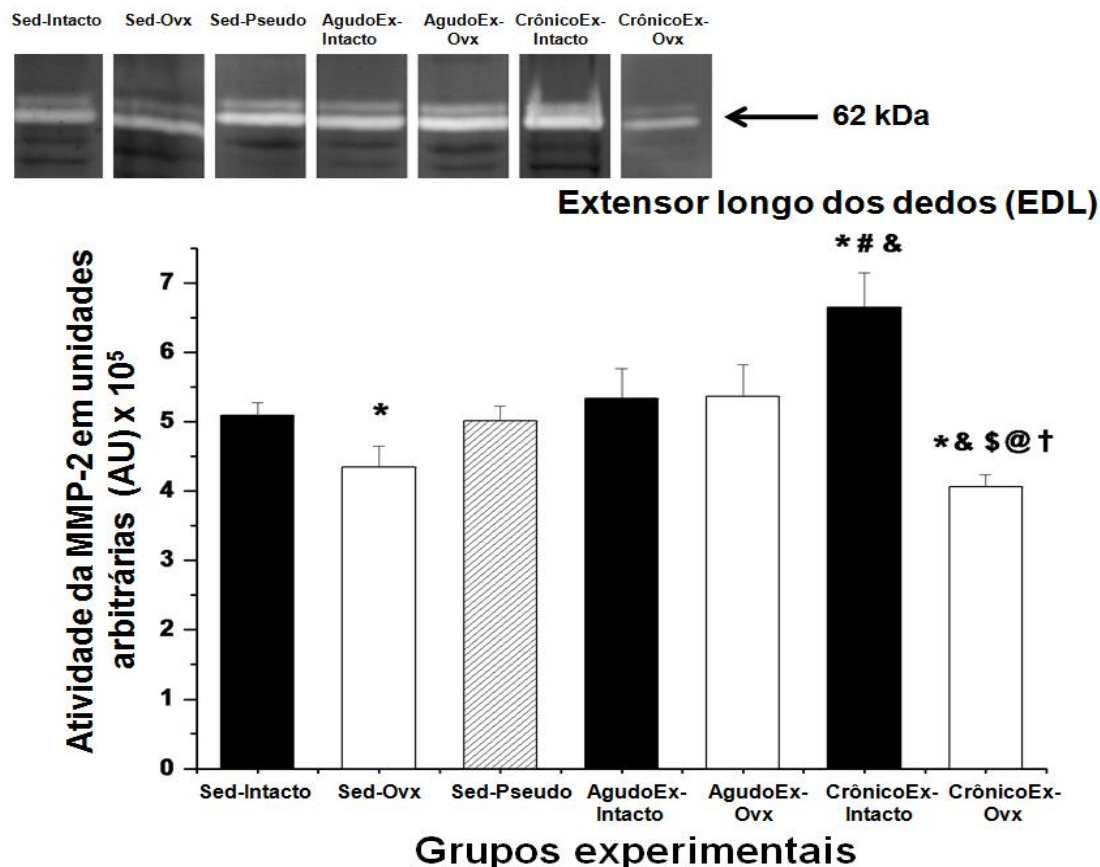




**FIGURA 4.** Análise da atividade da MMP por zimografia nos extratos do músculo tibial anterior (TA) (n = 10 por grupo). A atividade da banda foi expressa em unidades arbitrárias. Os valores estão apresentados pela média  $\pm$  erro padrão da média,  $p \leq 0,05$ . \*Diferença estatisticamente significativa quando comparado com o Sed-Intacto; #comparado com Sed-Ovx; &comparado com Sed-Pseudo; \$comparado com AgudoEx-Intacto; @comparado com AgudoEx-Ovx; †comparado com CrônicoEx-Intacto.

No EDL houve uma interação significativa, mostrando que a atividade da MMP-2 é modificada pelo estado ovariano. A ovariectomia (Sed-Ovx) reduziu a atividade da MMP-2. Foi observada maior atividade da MMP-2 no CrônicoEx-Intacto comparado com o Sed-Intacto, Sed-Ovx e Sed-Pseudo no EDL. O CrônicoEx-Ovx apresentou

menor atividade da MMP-2 comparado com os grupos Sed-Intacto, Sed-Pseudo, AgudoEx-Intacto, AgudoEx-Ovx e CrônicoEx-Intacto no EDL (Figura 5).



**FIGURA 5.** Análise da atividade da MMP por zimografia nos extratos do músculo extensor longo dos dedos (EDL) (n = 10 por grupo). A atividade da banda foi expressa em unidades arbitrárias. Os valores estão apresentados pela média ± erro padrão da média,  $p \leq 0,05$ . \*Diferença estatisticamente significativa quando comparado com o Sed-Intacto; #comparado com Sed-Ovx; &comparado com Sed-Pseudo; \$comparado com AgudoEx-Intacto; @comparado com AgudoEx-Ovx; †comparado com CrônicoEx-Intacto.

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos do treinamento de força sobre a atividade da MMP-2 nos músculos gastrocnêmio, sóleo, TA e EDL de ratas ovariectomizadas. A hipótese inicial levantada pelo nosso estudo foi parcialmente confirmada, haja vista que a ovariectomia reduziu a atividade da MMP-2 nos músculos TA e EDL. Outro resultado importante foi que o exercício de força aumentou a atividade da MMP-2 muscular. No entanto, o treinamento de força preveniu a redução na MMP-2 induzida pela ovariectomia apenas no músculo sóleo. Apesar da ovariectomia, a carga máxima aumentou em proporções similares para os grupos treinados em força cronicamente.

Os estudos sobre geração de força muscular em animais ovariectomizados apresentaram diferentes resultados. Por exemplo, McCormick et al. (2004) mostraram que a força tetânica isométrica máxima do sóleo ( $P_o$ ) não foi afetada pela ovariectomia em ratas jovens. No entanto, Moran, Warren e Lowe (2006) mostraram que durante a contração, a fração de ligação forte de miosina foi reduzida em fibras de camundongos fêmeas ovariectomizadas. De acordo com os autores esta redução ocorreu na mesma proporção que a redução na força. Em contraste, no presente estudo nós analisamos a capacidade máxima de carregamento no exercício de escalada em escada, uma avaliação mais geral da força que depende de vários músculos, e não uma forma isolada como a utilizada nos estudos citados acima. Por esta razão, nós propomos a realização de mais estudos e diferentes tipos de análises da força geral e específica para avaliar estas alterações de performance.

O sarcolema do músculo esquelético possui uma lamina basal externa associada que fornece suporte para as fibras musculares e é importante na manutenção da

integridade fisiológica das miofibrilas. A lamina basal também serve como uma barreira seletiva a eletrólitos e possui um papel central no reparo da fibra muscular após lesão ou exercício excessivo (Carmeli et al., 2004). Todavia, no músculo esquelético as MMPs e seus inibidores exercem funções fisiológicas essenciais na homeostasia das fibras musculares e da MEC (Kjaer, 2004). As MMPs estão envolvidas numa ampla faixa de processos funcionais, patológicos e de desenvolvimento no músculo. As MMPs têm papéis regulatórios no desenvolvimento muscular pelo fato de liberarem fatores de crescimento locais e também são importantes no processo de reparo seguido de lesão por trauma ou miopatia por desuso (Kherif et al., 1999; Kjaer et al., 2006).

Adicionalmente, as MMPs são responsáveis pela degradação da MEC durante o desenvolvimento embrionário, migração celular, morfogênese e remodelamento tecidual (Murphy e Gavrilovic, 1999). Elas exercem funções fundamentais para o funcionamento normal de diversos tecidos durante o crescimento, desenvolvimento e envelhecimento, e estão envolvidas em processos como o remodelamento muscular, tendíneo e ósseo. Uma das mais importantes MMPs associada com a função do músculo esquelético é a MMP-2, também denominada de gelatinase-A, ou colagenase tipo IV de 72 kDa, que pode ser transformada numa forma ativa de 62 kDa (Carmeli et al., 2004). A atividade da MMP-2 é encontrada em tecidos durante *turnover* constante (Kjaer, 2004), e o aumento nesta atividade é usualmente indicativo de degradação da matriz que é necessária para permitir o crescimento tecidual (Koskinen et al., 2001; Marqueti et al., 2008b). O tecido conjuntivo possui um importante papel na manutenção da força no músculo (Kjaer, 2004). Conforme mostrado pelos resultados do presente estudo a ovariectomia reduziu a atividade da MMP-2 no TA e EDL, o que pode comprometer o processo de remodelamento muscular, visto que, a MMP-2 é um marcador de *turnover* do músculo esquelético que permite seu crescimento. Para confirmar esta hipótese, McClung et al.

(2006) mostraram que a ovariectomia compromete a recuperação da atrofia por desuso na área de secção-transversal das fibras musculares do sóleo durante 2 semanas de ambulação normal em gaiola, enquanto a reposição com estrógeno permite a restauração do tamanho da miofibrila.

Similarmente, foi demonstrado que a remoção dos hormônios ovarianos de camundongos fêmeas via ovariectomia é prejudicial para a função muscular contrátil do sóleo e EDL (Moran, Warren e Lowe, 2006). Moran et al., (2007) mostraram que a ovariectomia induz a disfunção muscular contrátil do EDL e que as concentrações circulantes de estradiol estão positivamente correlacionadas com a geração de força muscular e função de miosina, fornecendo suporte para a argumentação de que o estradiol afeta o músculo esquelético. A partir dos resultados do presente estudo nós podemos especular que essa fraqueza e disfunção muscular induzida pela ovariectomia podem também estar relacionadas à redução da atividade da MMP-2, afetando o remodelamento do músculo. De fato, em outro estudo do nosso grupo submetido à publicação, nós observamos que ratas sedentárias ovariectomizadas exibiram redução da área de secção-transversal dos músculos sóleo e tibial anterior quando comparado com o grupo sedentário intacto. Neste mesmo estudo também houve aumento significativo da área de secção-transversal muscular no sóleo e tibial anterior após 12 semanas de exercício de escalada nas ratas intactas e ovariectomizadas.

Com relação aos efeitos do exercício força, sóleo, TA e EDL apresentaram aumento da atividade da MMP-2, o que pode ser importante para o remodelamento muscular. Marqueti et al. (2008a) também mostraram aumento da atividade da MMP-2 nos músculos sóleo e gastrocnêmio após treinamento de salto em água. A ausência de aumento na atividade da MMP-2 no gastrocnêmio para o protocolo de exercício de força com escalada pode estar relacionado ao tipo de exercício, visto que, neste

protocolo os animais iniciam o exercício com uma flexão parcial de joelho, diminuindo o trabalho sobre o gastrocnêmio. Foi demonstrado que o exercício de alta intensidade induz a um aumento na atividade da MMP-2 em músculos com predominância de fibras tipo I e II (Carmeli et al., 2005; Marqueti et al., 2008a). Esses dados estão de acordo com os resultados do presente estudo, de modo que a atividade da MMP-2 aumentou no músculo com predominância de fibra tipo I (sóleo) e nos músculos com predominância de fibra tipo II (TA e EDL). Carmeli et al. (2005) submeteu ratos a corrida de baixa intensidade (~40% do  $VO_2\text{max}$ ) ou a corrida de alta intensidade (70–75% do  $VO_2\text{max}$ ) e observou que a expressão da proteína da MMP-2 aumentou no gastrocnêmio e porção superficial do quadríceps apenas no exercício de alta intensidade.

Outro resultado interessante do presente estudo foi que uma sessão aguda de exercício de força aumentou a atividade da MMP-2 no músculo TA, mas não nos outros músculos analisados. Este resultado é difícil de explicar e estudos para investigar mecanismos adicionais são necessários, com vistas a determinar as razões exatas para este efeito isolado no músculo TA. Finalmente, para nossa surpresa, o exercício de força preveniu a redução na atividade da MMP-2 induzida pela ovariectomia apenas no músculo sóleo. Para os músculos TA e EDL o treinamento de força falhou em prevenir a redução na atividade da MMP-2 nas ratas ovariectomizadas.

## **CONCLUSÃO**

Sumariamente, este estudo propõe um mecanismo adicional para a disfunção do músculo esquelético causada pela ovariectomia, que envolve a redução na atividade da MMP-2, provavelmente comprometendo o remodelamento muscular. O exercício de força preveniu esta redução de atividade, especificamente no músculo sóleo. Estudos

futuros, incluindo modelos de desuso e reposição hormonal em humanos e animais serão necessários para um melhor entendimento dos efeitos da atividade da MMP-2 em estados catabólicos, doenças e exercício.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALLEN, D.L.; HARRISON, B.C.; MAASS, A.; BELL, M.L.; BYRNES, W.C.; LEINWAND, L.A. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. **J Appl Physiol**, v.90, p.1900–1908, 2001.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr Opin Cell Biol**, v.7, p.728-735, 1995.

CARMELI, E.; MOAS, M.; REZNICK, A.Z.; COLEMAN, R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, v.29, p.191-197, 2004.

CARMELI, E.; MOAS, M.; LENNON, S.; POWERS, S.K. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. **Exp Physiol**, v.90, p.613–619, 2005.

CLEUTJENS, J.P.M.; KANDALA, J.C.; GUARDA, E.; GUNTAKA, R.V.; WEBER, K.T. Regulation of collagen degradation in rat myocardium after infarction. **J Mol Cell Cardiol**, v.27, p.1281-1292, 1995.

GORZEK, J.F.; HENDRICKSON, K.C.; FORSTNER, J.P.; RIXEN, J.L.; MORAN, A.L.; LOWE, D.A. Estradiol and tamoxifen reverse ovariectomy-induced physical inactivity in mice. **Med Sci Sports Exerc**, v.39, p.248-256, 2007.

HEINEMEIER, K.M.; OLESEN, J.L.; SCHJERLING, P.; HADDAD, F.; LANGBERG, H.; BALDWIN, K.M.; KJAER, M. Short-term strength training and the expression of

myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. **J Appl Physiol**, v.102, p.573–581, 2007.

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

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v.15, p.175-92, 1991.

KAPASI, Z.F.; CATLIN, P.A.; ADAMS, M.A.; GLASS, E.G.; MCDONALD, B.W.; NANCARROW, A.C. Effect of duration of a moderate exercise program on primary and secondary immune responses in mice. **Phys Ther**, v.83, p.638–647, 2003.

KHERIF, S.; LAFUMA, C.; DEHAUPAS, M.; LACHKAR, S.; FOURNIER, J.G.; VERDIERE-SAHUQUE, M.; FARDEAU, M.; ALAMEDDINE, H.S. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally\ injured and mdx muscles. **Dev Biol**, v.205, p.158–170, 1999.

KJAER, M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. **Physiol Rev**, v.84, p.649-698, 2004.

KJAER, M.; MAGNUSSON, P.; KROGSGAARD, M.; BOYSEN MOLLER, J.; OLESEN, J.; HEINEMEIER, K.; HANSEN, M.; HARALDSSON, B.; KOSKINEN, S.; ESMARCK, B.; LANGBERG, H. Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. **J Anat**, v.208, p.445–450, 2006.

KOSKINEN, S.O.A.; HÖYHTYÄ, M.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T.; MARTIKKALA, V.; MÄKINEN, T.T.; OKSA, J.; RINTAMÄKI, H.; LÖFBERG, M.; SOMER, H.; TAKALA, T.E.S. Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running. **Scand J Med Sci Sports**, v.11, p.9–15, 2001.



LLURI, G.; JAWORSKI, D.M. Regulation of TIMP-2, MT1-MMP, and MMP-2 expression during C2C12 differentiation. **Muscle Nerve**, v.32, p.492-499, 2005.

MARQUETI, R.C.; PARIZOTTO, N.A.; CHRIGUER, R.S.; PEREZ, S.E.A.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. **Am J Sport Med**, v.34, p.1274–1280, 2006.

MARQUETI, R.C.; PRESTES, J.; STOTZER, U.S.; PASCHOAL, M.; LEITE, R.D.; PEREZ, S.E.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. **Int J Sports Med**, v.29, p.559-563, 2008a.

MARQUETI, R.C.; PRESTES, J.; PASCHOAL, M.; RAMOS, O.H.P.; PEREZ, S.E.A.; CARVALHO, H.F.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. **Eur J Appl Physiol**, v.104, p.1087-1093, 2008b.

MATRISIAN, L.M. The matrix-degrading metalloproteinases. **Bioessays**, v.14, p.455-463, 1992.

MCCORMICK, K.M.; BURNS, K.L.; PICCONE, C.M.; GOSSELIN, L.E.; BRAZEAU, G.A. Effects of ovariectomy and estrogen on skeletal muscle function in growing rats. **J Muscle Res Cell Motil**, v.25, p.21–27, 2004.

MCCLUNG, J.M.; DAVIS, J.M.; WILSON, M.E.; GOLDSMITH, E.C.; CARSON, J.A. Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. **J Appl Physiol**, v.100, p.2012–2023, 2006.

MORAN, A.L.; WARREN, G.L.; LOWE, D.A. Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. **J Appl Physiol**, v.100, p.548–559, 2006.

MORAN, A.L.; NELSON, S.A.; LANDISCH, R.M.; WARREN, G.L.; LOWE, D.A. Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. **J Appl Physiol**, v.102, p.1387-1393, 2007.

MURPHY, G.; GAVRILOVIC, J. Proteolysis and cell migration: creating a path? **Curr Opin Cell Biol**, v.11, p.614–621, 1999.

OLSON, S.H.; BANDERA, E.V.; ORLOW, I. Variants in Estrogen Biosynthesis Genes, Sex Steroid Hormone Levels, and Endometrial Cancer: A HuGE Review. **Am J Epidemiol**, v.165, p.235–245, 2007.

PRESTES, J.; FERREIRA, C.K.O.; DIAS, R.; FROLLINI, A.B.; DONATTO, F.F.; CURY-BOAVENTURA, M.F.; GUERESCHI, M.G.; PITHON-CURI, T.C.; VERLENGIA, R.; PALANCH, A.C.; CURI, R.; CAVAGLIERI, C.R. Lymphocyte and Cytokines after Short Periods of Exercise. **Int J Sports Med**, v.29, p.1010-1014, 2008.

SHIGUEMOTO, G.E.; ROSSI, E.A.; BALDISSERA, V.; GOUVEIA, C.H.; VALDEZ VARGAS, G.M.; PEREZ, S.E.A. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. **Maturitas**, v.57, p.261-270, 2007.

SIPILA, S.; TAAFFE, D.R.; CHENG, S.; PUOLAKKA, J.; TOIVANEN, J.; SUOMINEN, H. Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. **Clin Sci**, v.101, p.147-157, 2001.

SORENSEN, M.B.; ROSENFALCK, A.M.; HOJGAARD, L.; OTTESEN, B. Obesity and sarcopenia after menopause are reversed by sex hormone replacement therapy. **Obes Res**, v.9, p.622–626, 2001.

- STEFANICK, M.L.; ANDERSON, G.L.; MARGOLIS, K.L.; HENDRIX, S.L.; RODABOUGH, R.J.; PASKETT, E.D.; LANE, D.S.; HUBBELL, F.A.; ASSAF, A.R.; SARTO, G.E.; SCHENKEN, R.S.; YASMEEN, S.; LESSIN, L.; CHLEBOWSKI, R.T. Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. **JAMA**, v.295, p.1647-1657, 2006.
- YAO, Z.; LAFAGE-PROUST, M.H.; PLOUET, J.; BLOOMFIELD, S.; ALEXANDRE, C.; VICO, L. Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF. **J Bone Miner Res**, v.19, p.1471–1480, 2004.
- ZHANG, S.M.; MANSON, J.E.; REXRODE, K.M.; COOK, N.R.; BURING, J.E.; LEE, I. Use of Oral Conjugated Estrogen Alone and Risk of Breast Cancer. **Am J Epidemiol**, v.165, p.524-529, 2007.

**MANUSCRITO II**

## **EFEITOS DO TREINAMENTO DE FORÇA SOBRE A RESISTINA, LEPTINA, CITOCINAS E FORÇA MUSCULAR EM MULHERES IDOSAS PÓS-MENOPAUSADAS**

Jonato Prestes<sup>1</sup> (MS), Gilberto E. Shiguemoto<sup>1</sup> (MS), João Paulo Botero<sup>1</sup> (MS), Anelena B. Frollini<sup>2</sup> (MS), Rodrigo Dias<sup>2</sup> (MS), Richard D. Leite<sup>1</sup> (MS), Guilherme B. Pereira<sup>1</sup> (MS), Rodrigo F. Magosso<sup>1</sup> (MS), Vilmar Baldissera<sup>1</sup> (PhD), Claudia R. Cavaglieri<sup>2</sup> (PhD), Sergio E. A. Perez<sup>1</sup> (PhD).

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Fisiologia do Exercício, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos-SP, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Rodovia do Açúcar, km 156, CEP 13400-911, Piracicaba-SP, Brasil.

**Título resumido:** Treinamento de força, marcadores inflamatórios e mulheres idosas.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Laboratório de Fisiologia do Exercício da Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

\*Autor para correspondência: Jonato Prestes. Rua Major José Inácio, n.2400, CEP: 13560-161, apto: 13, São Carlos, São Paulo, Brasil. Telefone: +55 (16) 3361-6439. **E-mail:** [jonatop@gmail.com](mailto:jonatop@gmail.com)

## RESUMO

A redução gradual na liberação de estrógeno no envelhecimento e no período pós-menopausa induz ao aumento nas concentrações plasmáticas dos biomarcadores sistêmicos de inflamação. Neste sentido, o treinamento de força pode ser uma ferramenta interessante para prevenir os processos degenerativos e inflamatórios associados ao envelhecimento. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do treinamento de força periodizado sobre citocinas, leptina, resistina e força muscular em mulheres idosas pós-menopausadas. Foram selecionadas 35 mulheres sedentárias com idade de  $63,18 \pm 4,8$  anos, estatura  $163,5 \pm 6,7$  cm, massa corporal  $57,84 \pm 7,7$  kg. O treinamento de força periodizado de 16 semanas consistiu de duas sessões semanais com 3 séries de 6-14RM, dependendo da semana de treinamento. A força máxima foi testada no supino, leg press  $45^0$  e rosca direta. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-15, Leptina e Resistina plasmáticas foram determinadas por ELISA. A força máxima no supino, leg press  $45^0$  e rosca direta exibiu um aumento significativo após 16 semanas. Foi observada mínima ou nenhuma modificação aguda e crônica no TNF- $\alpha$  e na IL-15. A IL-6 reduziu agudamente 48 horas após quando comparado com as concentrações basais e reduziu cronicamente após 16 semanas comparado com os valores basais antes do treinamento. A leptina plasmática reduziu 24 horas após a primeira sessão comparado com as concentrações basais e reduziu cronicamente nos valores basais e 48 horas após quando comparado com as avaliações pré-treinamento. Houve uma redução significativa na resistina após 24 e 48 horas comparado com as concentrações basais e também uma diminuição crônica nas concentrações basais e imediatamente após quando comparado com os valores pré-treinamento. Além do esperado aumento na força muscular, o treinamento de força periodizado parece ser uma importante intervenção para reduzir a inflamação sistêmica induzida pelo envelhecimento em mulheres idosas.

**Palavras-chave:** envelhecimento, Inflamação, biomarcadores sistêmicos, treinamento de força.

## INTRODUÇÃO

O aumento na proporção de mulheres idosas e o aumento na expectativa de vida elevaram a preocupação de pesquisadores e profissionais da área da saúde, especialmente com relação às alterações fisiológicas relacionadas ao período pós-menopausa. Aproximadamente 40% das mulheres procuram cuidados médicos para tratar os sintomas induzidos pela menopausa, incluindo: ondas de calor, transpiração noturna, ressecamento vaginal e distúrbios do sono (Nedrow et al., 2006). Outra importante disfunção biológica em mulheres pós-menopausadas idosas é a “inflamação senil”, com uma forte relação temporal entre envelhecimento, inflamação e menopausa.

A redução gradual na liberação de estrógeno no período pós-menopausa e envelhecimento induz ao aumento nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (Pfeilschifter et al., 2002). As elevações nas citocinas inflamatórias estão associadas com o aumento no risco de desenvolvimento de diversos tipos de doenças cardiovasculares (Reilly et al., 2005), osteoporose (Pfeilschifter et al., 2002), diabetes mellitus (Kadoglou et al., 2007) e caquexia geriátrica (Yeh et al., 2001) na vida tardia. Vários marcadores sanguíneos são utilizados como indicadores de inflamação sistêmica, incluindo a IL-6, TNF- $\alpha$ , interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), resistina, leptina e proteína C reativa (PCR) (Reilly et al., 2005; Tilg e Moschen 2006; Stewart et al., 2007).

A terapia de reposição hormonal (TRH) reduz as concentrações de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em mulheres pós-menopausadas saudáveis e também previne o aumento das concentrações plasmáticas de IL-6 em ratas ovariectomizadas (Pfeilschifter et al., 2002). No entanto, a TRH não é universalmente aceita, principalmente devido a contra-indicações e baixa adesão de alguns pacientes, a aversão das mulheres está associada

aos efeitos colaterais e riscos de alguns tipos de cânceres a longo prazo (Olson, Bandera e Orlow, 2007; Zhang et al., 2007).

Outra intervenção é a prática regular de exercício que vem sendo utilizada como uma modalidade terapêutica na prevenção do aumento dos marcadores sistêmicos de inflamação e dos processos degenerativos associados ao envelhecimento (Greiwe et al., 2001; Fatouros et al., 2005). No entanto, com relação aos marcadores inflamatórios os estudos são controversos; por exemplo, as concentrações de leptina plasmática permaneceram inalteradas após uma sessão aguda de exercício aeróbio (Ferguson et al., 2004) e reduziram (Nindl et al., 2002) com uma sessão aguda de exercício de força em jovens adultos. As concentrações de leptina reduziram 24 h depois de uma sessão aguda de exercício de força, com nenhum efeito crônico do treinamento, ou seja, nenhuma diferença entre os valores pré e após-treinamento em pacientes diabéticos tipo 2 (Kanaley et al., 2001).

Existe apenas um estudo que encontrou redução nas concentrações de leptina em homens idosos após treinamento de força com protocolos variados (Fatouros et al., 2005). Kadoglou et al. (2007) observaram uma redução na concentração de resistina e citocinas inflamatórias após 16 semanas de exercício aeróbio com quatro sessões semanais de 45-60 minutos a 50-85% do consumo máximo de oxigênio ( $VO_2max$ ). Indivíduos idosos frágeis apresentam aumentos nas concentrações de TNF- $\alpha$  no músculo comparado com jovens, o que está associado com perda de proteína muscular. Após três meses de treinamento de força as concentrações musculares de TNF- $\alpha$  reduziram (Greiwe et al., 2001).

Exercícios dinâmicos, que incluem o treinamento de força, podem aumentar a força, massa muscular e massa óssea (Barry e Carson, 2004). No entanto, não existe consenso sobre a influência de um programa envolvendo treinamento de força sobre as



concentrações de marcadores inflamatórios em indivíduos saudáveis e idosos (Stewart et al., 2007). Evidências recentes enalteceram a necessidade de estudos para fornecer suporte ou para refutar o uso do exercício de força como uma intervenção na redução da inflamação em pessoas idosas (Stewart et al., 2007; Fatouros et al., 2005).

Este é o primeiro estudo a investigar os efeitos do treinamento de força sobre marcadores inflamatórios sistêmicos em mulheres idosas pós-menopausadas. Nossa hipótese era que o treinamento de força induziria a uma redução nos biomarcadores sistêmicos de inflamação. Por esta razão, o objetivo principal do presente estudo foi investigar os efeitos do treinamento de força periodizado sobre a resistina, leptina, citocinas e força muscular em mulheres idosas pós-menopausadas.

## **MÉTODOS**

### **Sujeitos**

As participantes foram recrutadas voluntariamente a partir da comunidade local por meio da divulgação de cartazes e palestra sobre o estudo. Cada voluntária foi submetida a exames físicos gerais, que incluíram histórico médico, eletrocardiograma de repouso e esforço, medida da pressão arterial e avaliação ortopédica antes do início do programa de treinamento de força. Após completarem os exames clínicos para inclusão, foram selecionadas 35 mulheres previamente sedentárias com idade de  $63,18 \pm 4,8$  anos, estatura  $163,5 \pm 6,7$  cm, massa corporal  $57,84 \pm 7,7$  kg. Os critérios de inclusão foram: índice de massa corporal  $\leq 26 \text{ kg/m}^2$ , que o indivíduo fosse sedentário sem nenhum exercício consistente nos 6 meses anteriores ao estudo, não estivesse realizando reposição hormonal e não tivesse manifestação de doença cardiovascular ou

pulmonar. Todas as participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos. A pesquisa foi conduzida de acordo com as recomendações estabelecidas pelo *American College of Sports Medicine* para procedimentos com seres humanos.

### **Avaliações da força máxima**

Após duas semanas de adaptação aos exercícios de força e avaliações clínicas, foram realizados os testes de carga máxima (1RM). Os testes de 1RM foram realizados no mesmo dia com no mínimo 10 minutos de intervalo entre os exercícios testados na seguinte ordem: supino com barra livre, leg press 45<sup>o</sup> e rosca direta em pé (Cybex International, Medway, MA). Em seguida do aquecimento geral (10 minutos de esteira em intensidade leve), os indivíduos foram submetidos a oito repetições com 50% de 1RM estimada (de acordo com a capacidade de cada participante verificada no período de adaptação de duas semanas), após um minuto de intervalo, foram realizadas três repetições com 70% de 1RM estimada. Depois de três minutos as tentativas subsequentes foram realizadas para uma repetição com cargas progressivamente mais pesadas até que a 1RM fosse determinada em três tentativas, utilizando 3-5 minutos de descanso entre as tentativas. As padronizações das angulações e movimentos dos exercícios foram conduzidas de acordo com as descrições de Brown e Weir (2001). Para certificar que as 1RM pré-treinamento fossem ajustadas antes do início do treinamento, as 1RM foram determinadas em três dias separados com dois dias entre estes testes. A correlação intraclasse foi determinada entre a segunda e a terceira tentativa do teste de 1RM. Uma alta correlação intraclasse foi observada entre as segundas e terceiras

tentativas nos testes (supino com barra livre  $r= 0,99$ , leg press  $45^0$   $r= 0,99$  e rosca direta em pé  $r= 0,99$ ). A maior 1RM determinada a partir das últimas duas tentativas foi utilizada como medida inicial.

### **Treinamento de força**

O treinamento de força foi realizado com o modelo de periodização linear. Neste modelo, também conhecido como clássico, a intensidade do treinamento é aumentada em cada microciclo (1 a 4 semanas) e o volume é reduzido. O número de repetições foi reduzido (mantendo-se a faixa mínima estabelecida para cada ciclo), em razão do aumento na intensidade. A periodização aplicada está baseada em um estudo prévio (Prestes et al., 2009). As cargas de treinamento foram monitoradas em cada sessão, de acordo com o aumento na capacidade muscular das participantes. Antes do início da periodização, as participantes foram submetidas a duas semanas de adaptação ao treinamento de força, elas realizaram um exercício para cada grupo muscular principal com duas séries de 15 repetições em cada exercício; foram enfatizadas a execução correta do movimento e a familiarização aos tipos de exercício de força.

Após o período de adaptação, a periodização foi iniciada. A ordem dos exercícios nas sessões de treinamento foi: 1- supino reto com barra, 2- leg press  $45^0$ , 3- remada sentada, 4- cadeira extensora, 5- elevação lateral, 6- mesa flexora, 7- tríceps *pulley*, 8- cadeira adutora e abdução, 9- rosca direta e 10- flexão plantar em pé. Adicionalmente, ao final de cada sessão de treinamento foram incluídos exercícios abdominais, três séries de 20-30 repetições. O treinamento teve duração de quatro meses, com duas sessões semanais. Em cada um dos exercícios listados foram realizadas três séries até a falha concêntrica (impossibilidade de realizar uma repetição

com padrão correto de movimento); o número de repetições e intervalo entre as séries e exercícios foram conduzidos de acordo com a intensidade semanal prescrita, conforme apresentado na figura 1. A duração média de cada sessão foi de 50 minutos. A duração de cada repetição foi 3-4s, contando com a ação muscular concêntrica e excêntrica. Todas as sessões foram supervisionadas por um profissional com experiência em treinamento de força.

Nas quatro semana iniciais 3 séries de 12-14RM foram realizadas; da 5<sup>a</sup> até a 8<sup>a</sup> semana 3 séries de 10-12RM; da 9<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana 3 séries de 8-10RM; e da 13<sup>a</sup> a 16<sup>a</sup> 3 séries de 6-8RM. Em todas as semanas, foram realizadas repetições máximas até a falha concêntrica para as intensidades propostas. As cargas foram monitoradas em cada sessão. Durante todo o treinamento, três séries foram realizadas, independentemente da intensidade; o intervalo de descanso foi realizado de acordo com a intensidade (figura 1); as cargas foram ajustadas para manter o número de repetições máximas.

**FIGURA 1.** Programa de treinamento de força.

Séries x repetições	Intervalo de descanso entre as séries e os exercícios
<b>3 x 12-14 RM</b>	<b>1 minuto</b>
<b>3 x 10-12 RM</b>	<b>1 minuto e 20 segundos</b>
<b>3 x 8-10 RM</b>	<b>1 minuto e 40 segundos</b>
<b>3 x 6-8 RM</b>	<b>2 minutos</b>

### **Determinação das citocinas, leptina e resistina plasmáticas**

Amostras sanguíneas de 3ml foram coletadas da veia antecubital em tubos a vácuo antes, imediatamente após, 24h e 48h após a primeira sessão de treinamento de força e nos mesmos períodos após quatro meses. Essas amostras foram centrifugadas a 2500rpm em 4°C durante 20 minutos. As amostras foram armazenadas em alíquotas com eppendorfs num freezer -80°C até a realização das análises. As dosagens de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-15, leptina e resistina foram determinadas pelo método ELISA (Ensaio Imuno Enzimático em Fase Sólida), de acordo com as especificações do Kit de Alta Sensibilidade R&D Systems Quantikine (R&D Systems Minneapolis, MN). Os resultados foram apresentados em pg/ml. Para garantir à precisão dos resultados todas as dosagens foram determinadas em duplicata. O coeficiente de variação intra-ensaio (CV) foi 3,1-9,7%, o CV inter-ensaio foi 6,3-7% e a sensibilidade foi de 0,0086 pg/ml.

### **Análise estatística**

Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Inicialmente, foram realizados os testes de normalidade Shapiro Wilk e de homocedasticidade (critério de Bartlett). Todas as variáveis apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, de modo que foi aplicada a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). Quando indicado pelo ANOVA o teste de Tukey post hoc foi utilizado. Para testar as diferenças significativas nos testes de 1RM entre os valores pré versus pós-treinamento foi utilizado o teste t de *student* pareado. Em todos os cálculos foi utilizado um alfa de  $p \leq 0,05$ . O *software* estatístico utilizado para todas as análises foi o Statistica<sup>®</sup> 6.1 (Stat. Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

## RESULTADOS

### Força máxima

Houve um aumento significativo na força máxima no supino com barra, leg press 45<sup>0</sup> e rosca direta em pé comparando a avaliação inicial com a avaliação após 16 semanas de treinamento,  $p \leq 0,05$  (tabela 1).

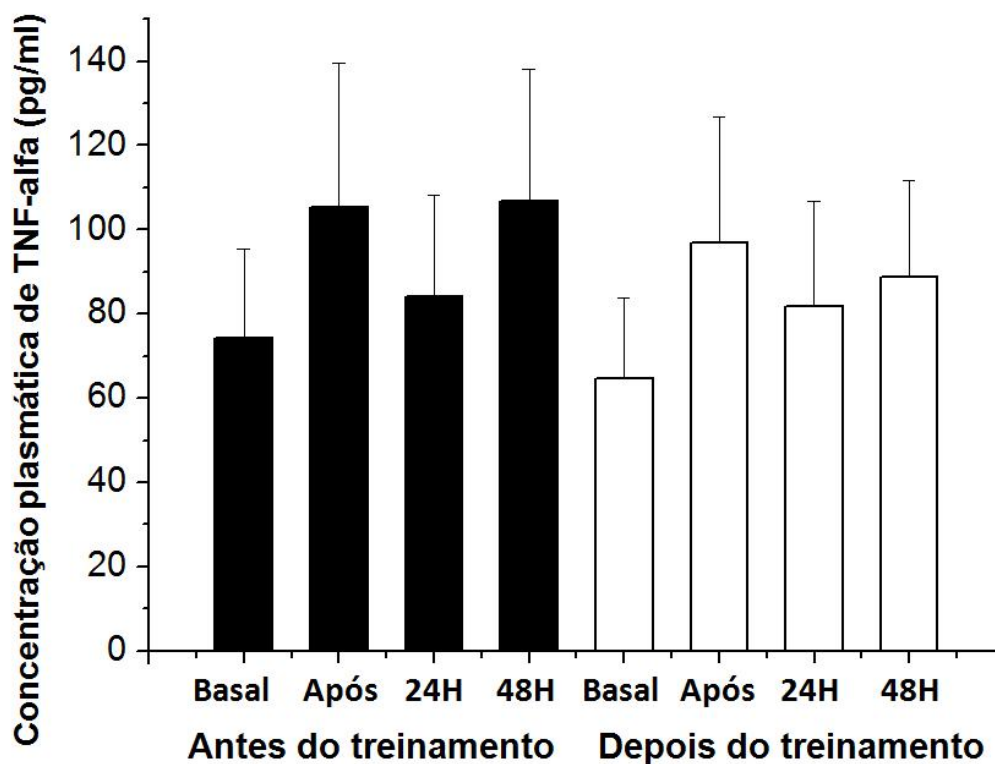
**Tabela 1.** Testes de força máxima dinâmica (1RM) antes e após 16 semanas de treinamento.

<b>Teste de Força Máxima (1RM)</b>	<b>Avaliação antes do treinamento</b>	<b>Avaliação após 16 semanas</b>
Supino reto com barra (kg)	31,83 ± 0,80	38,34 ± 1,15*
Leg press 45 <sup>0</sup> (kg)	172,21 ± 5,57	225,17 ± 7,06*
Rosca direta em pé (kg)	20,76 ± 0,45	22,75 ± 0,51*

Os resultados estão apresentados em média ± erro padrão da média (SEM). \*Diferença estatisticamente significativa quando comparado com a avaliação antes do treinamento, (n= 35),  $p \leq 0,05$ .

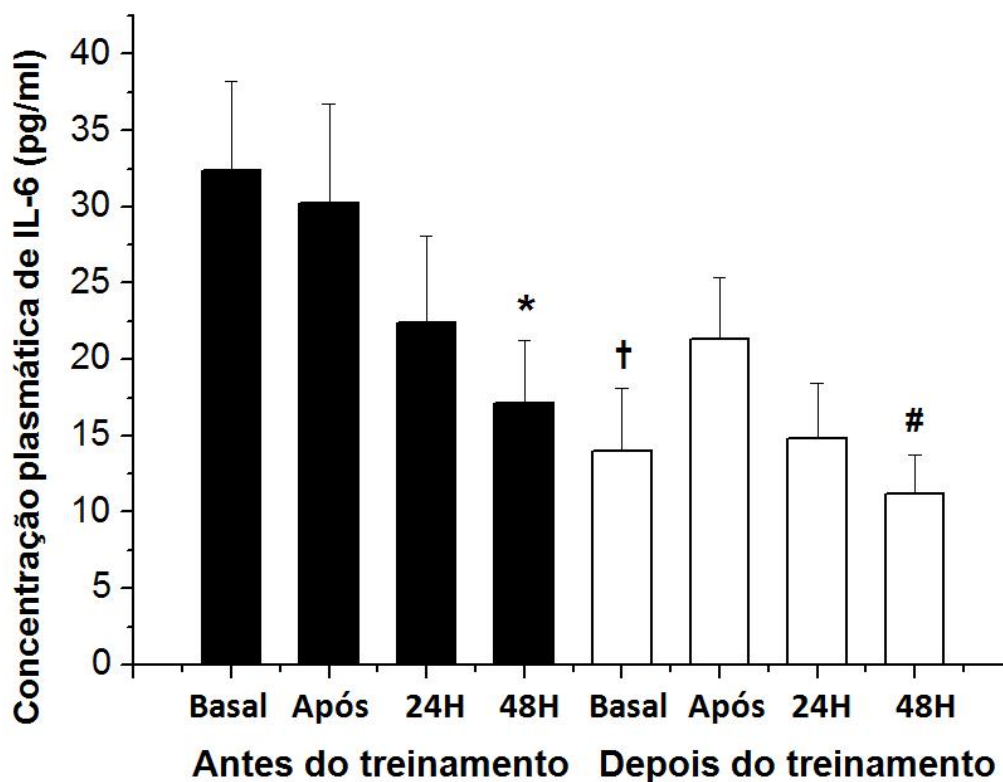
## Citocinas, leptina e resistina

Não houve nenhuma alteração significativa aguda ou crônica nas concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  durante o estudo (figura 2).



**FIGURA 2.** Concentrações plasmáticas do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (pg/ml). Os valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) ( $n=35$ ),  $p \leq 0,05$ . O TNF- $\alpha$  foi avaliado no basal (Basal), imediatamente após (Após), 24 horas (24H) e 48 horas (48H) depois da primeira sessão de exercício de força (barras escuras) e depois de 16 semanas de treinamento (barras claras).

Por outro lado, as concentrações plasmáticas de IL-6 reduziram agudamente após 48 horas quando comparado com as concentrações basais na avaliação pré-treinamento. Adicionalmente, a IL-6 também reduziu agudamente após 48 horas quando comparado com os valores imediatamente após na avaliação depois de 16 semanas de treinamento. Houve uma redução crônica na IL-6, evidenciada pela diferença entre os valores basais antes e depois do treinamento (figura 3).

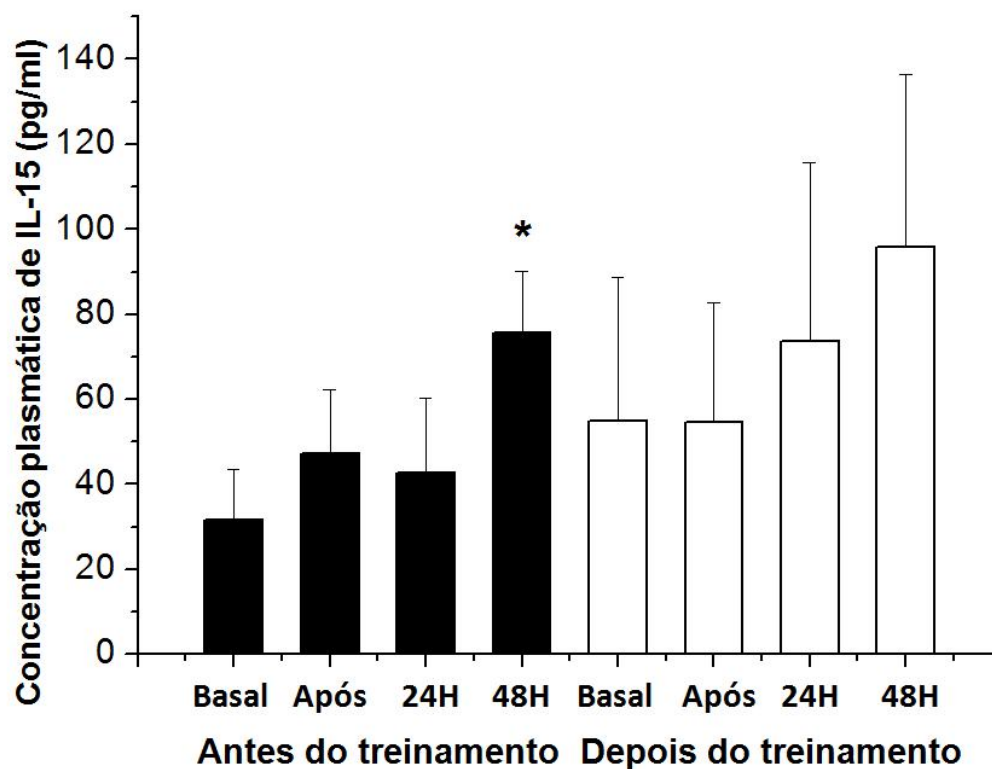


**FIGURA 3.** Concentrações plasmáticas de interleucina-6 (IL-6) (pg/ml). Os valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) ( $n=35$ ),  $p \leq 0,05$ . A IL-6 foi avaliada no basal (Basal), imediatamente após (Após), 24 horas (24H) e 48 horas (48H) depois da primeira sessão de exercício de força (barras escuras) e depois de 16 semanas de treinamento (barras claras). \*Diferença estatisticamente significativa



quando comparado com as concentrações basais. <sup>#</sup>Diferença estatisticamente significativa quando comparado com imediatamente após. <sup>†</sup>Diferença estatisticamente significativa quando comparado com o mesmo período de avaliação antes do treinamento.

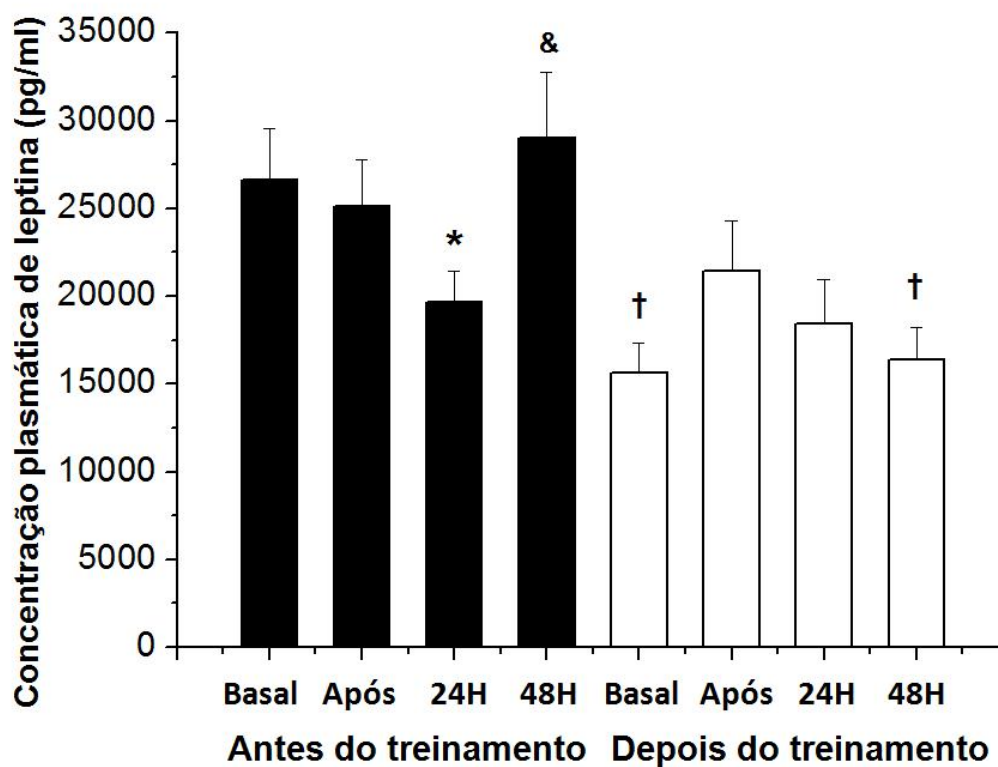
A única alteração observada nas concentrações plasmáticas de IL-15 foi um aumento agudo após 48 horas comparado com as concentrações basais na avaliação pré-treinamento (figura 4). Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa aguda ou crônica para a IL-15 nos outros períodos.



**FIGURA 4.** Concentrações plasmáticas de interleucina-15 (IL-15) (pg/ml). Os valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) ( $n=35$ ),  $p \leq 0,05$ . A IL-15

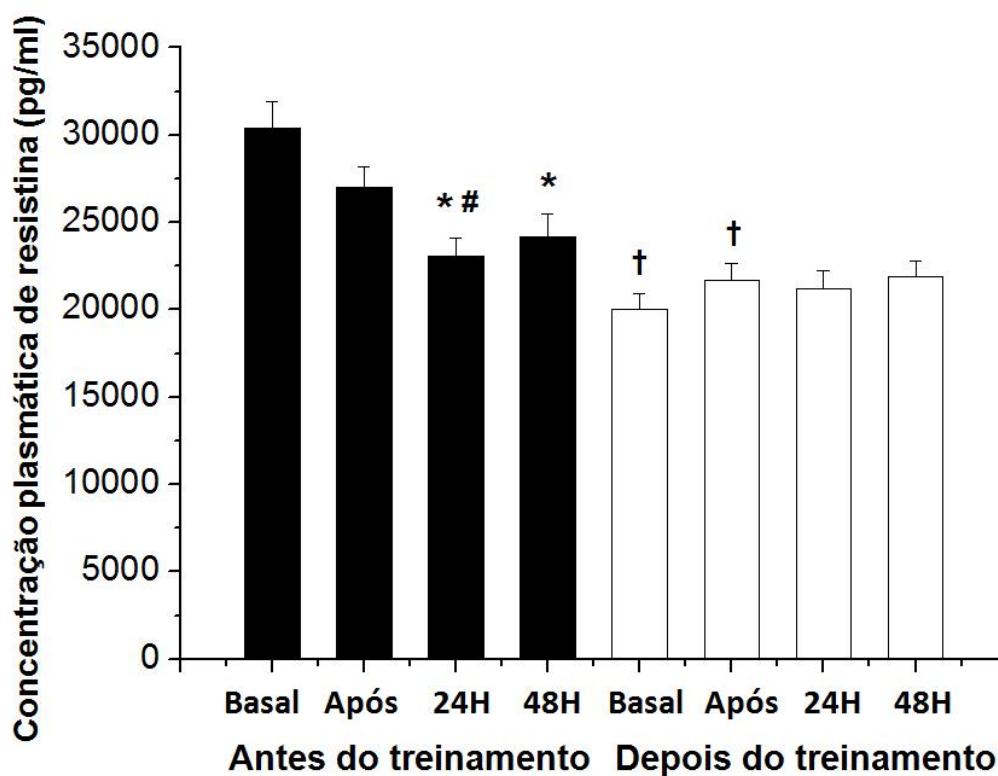
foi avaliada no basal (Basal), imediatamente após (Após), 24 horas (24H) e 48 horas (48H) depois da primeira sessão de exercício de força (barras escuras) e depois de 16 semanas de treinamento (barras claras). \*Diferença estatisticamente significativa quando comparado com as concentrações basais.

As concentrações plasmáticas de leptina exibiram uma redução 24 horas após a primeira sessão de exercício de força quando comparado as concentrações basais. No entanto, após 48 horas essas concentrações aumentaram quando comparado com 24 horas após na avaliação pré-treinamento. Tanto os valores basais como após 48 horas reduziram cronicamente quando comparado com o basal e 48 horas após 16 semanas de treinamento, respectivamente (figura 5).



**FIGURA 5.** Concentrações plasmáticas de leptina (pg/ml). Os valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) (n= 35),  $p \leq 0,05$ . A leptina foi avaliada no basal (Basal), imediatamente após (Após), 24 horas (24H) e 48 horas (48H) depois da primeira sessão de exercício de força (barras escuras) e depois de 16 semanas de treinamento (barras claras). \*Diferença estatisticamente significativa quando comparado com as concentrações basais. &Diferença estatisticamente significativa quando comparado com 24 horas após. †Diferença estatisticamente significativa quando comparado com o mesmo período de avaliação antes do treinamento.

Houve redução significativa nas concentrações de resistina após 24 e 48 horas comparado com as concentrações basais, e após 24 horas comparado com imediatamente após na avaliação pré-treinamento. A resistina também exibiu uma redução crônica nas concentrações basais e imediatamente após quando comparado com os mesmos períodos da avaliação pré-treinamento (figura 6).



**FIGURA 6.** Concentrações plasmáticas de resistina (pg/ml). Os valores estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) ( $n=35$ ),  $p \leq 0,05$ . A resistina foi avaliada no basal (Basal), imediatamente após (Após), 24 horas (24H) e 48 horas (48H) depois da primeira sessão de exercício de força (barras escuras) e depois de 16 semanas de treinamento (barras claras). \*Diferença estatisticamente significativa quando comparado com as concentrações basais. #Diferença estatisticamente significativa quando comparado com imediatamente após. †Diferença estatisticamente significativa quando comparado com o mesmo período de avaliação antes do treinamento.

## DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo foram o aumento na força máxima nos membros superiores e inferiores, redução crônica nas concentrações plasmáticas de IL-6, leptina e resistina, com pequena ou nenhuma alteração na IL-15 e TNF- $\alpha$  após 16 semanas de treinamento de força. Até o momento, este é o primeiro estudo a investigar conjuntamente esses importantes marcadores inflamatórios em mulheres idosas menopausadas após o treinamento de força. Deste modo, nossa hipótese inicial foi confirmada, visto que, foram observadas reduções nos marcadores plasmáticos de inflamação, associado com o aumento na força muscular.

Barry e Carson (2004) comentaram que idosos realizam programas de treinamento de força para combater os declínios substanciais na força e potência muscular com objetivo de melhorar ou manter as capacidades funcionais. No presente estudo houve um aumento significativo na força máxima dinâmica dos membros superiores e inferiores em mulheres idosas menopausadas submetidas a 16 semanas de treinamento de força periodizado com cargas entre 6-14RM.

De acordo com Starkweather (2007) diversos marcadores bioquímicos de inflamação têm sido utilizados em estudos recentes de intervenção com atividade física. Por exemplo, a IL-6 e o TNF- $\alpha$  são citocinas pró-inflamatórias definidas como mediadores solúveis que são liberados a partir de várias células (linhagem de macrófago/monócito). Particularmente, a IL-6 é uma citocina multifuncional que exerce ações pleiotrópicas na regulação imune e inflamatória, e sua superprodução está ligada a doença cardiovascular, osteoporose, artrite reumatóide, diabetes tipo 2 e doença de Alzheimer associados ao envelhecimento (Kiecolt-Glaser et al., 2003). Concentrações elevadas de IL-6 também estão relacionadas com fragilidade, queda da capacidade

funcional, redução de força muscular e podem ser utilizadas como preditor de futura incapacidade em idosos (Cohen et al., 1997; Ferrucci et al., 2002).

A IL-6 plasmática aumenta durante o exercício agudo em proporção a intensidade, duração e nível de aptidão física. A IL-6 tem sido sugerida como um importante fator para o processo de reparação muscular e *turnover* celular, assim como para alguns efeitos benéficos do exercício a saúde (Maggio et al., 2006). Em contraste a estes efeitos agudos, indivíduos exercitados cronicamente tendem a exibir menores concentrações de IL-6 e outros marcadores inflamatórios (Elosua et al., 2005). Por exemplo, homens e mulheres idosos entre 60-90 anos submetidos a 30 minutos de caminhada, cinco vezes por semana a 60% de sua frequência cardíaca máxima durante 10 semanas, exibiram redução significativa na IL-6 plasmática e melhoras no estado de estresse, humor e vários índices de qualidade de vida (Starkweather, 2007). Um estudo com 3.075 adultos de 70 a 79 anos demonstrou que indivíduos que possuíam níveis mais elevados de atividade física apresentavam concentrações significativamente menores de IL-6 (Colbert et al., 2004). A literatura apresenta suporte para reduções (Castaneda et al., 2004) ou concentrações inalteradas (White, Castellano e McCoy, 2006) das citocinas plasmáticas/séricas inflamatórias induzidas pelo exercício.

No entanto, os estudos que investigaram os efeitos do treinamento de força em idosos são esparsos e apresentam resultados contrastantes. Bautmans et al. (2005) mostraram tendência para redução nas concentrações circulantes de IL-6 após seis semanas de treinamento de força periodizado em indivíduos idosos. Não houve nenhuma alteração significativa na IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 ou IL-6 circulantes após 12 semanas de treinamento de força progressivo em sujeitos idosos (Kapasi et al., 2003). Diferentemente, no presente estudo houve uma redução crônica nas concentrações plasmáticas de IL-6 após 16 semanas de treinamento de força. É possível que um maior

tempo (>12 semanas) seja necessário para que se manifestem alterações crônicas significativas na IL-6 plasmática. Não foi observado nenhum efeito crônico de 16 semanas de treinamento de força sobre o TNF- $\alpha$  plasmático, consistente com os estudos citados acima.

A IL-15 foi inicialmente identificada como um fator de crescimento para as células T e possui muitas propriedades e funções em comum com a IL-2 (Giri et al., 1995). Além das funções imunes da IL-15, esta citocina atua como um fator de crescimento que é altamente expresso no músculo esquelético, resultando em hipertrofia tecidual (Nielsen e Pedersen, 2007). Um estudo *in vivo* indica que a administração sistêmica de IL-15 em ratos com caquexia induzida por câncer reduz a degradação de proteína muscular, preservando a massa magra (Carbo et al., 2000). Ostrowski et al. (1998) não encontraram alterações na IL-15 plasmática (mensurada até 6 horas após o exercício) em resposta a 2,5h de corrida em esteira a 75% do VO<sub>2</sub>max. Após 10 semanas de treinamento de força, três sessões/semana com cargas fixadas em 80% de 1RM houve um aumento agudo imediatamente após o exercício, mas não crônico na IL-15 plasmática em indivíduos jovens (Riechman et al., 2004). No presente estudo, foi observado um aumento nas concentrações plasmáticas de IL-15 48h após a primeira sessão de exercício de força comparado com os valores basais. Similarmente aos estudos mencionados acima, não foi observado nenhum efeito crônico do treinamento. É possível que esta citocina esteja envolvida na reparação muscular aguda e crescimento após sessões de treinamento de força agindo mais de forma local do que apresentando alterações plasmáticas crônicas.

A leptina é um hormônio/citocina liberada pelo tecido adiposo que pode ter efeitos sobre o apetite. As concentrações de leptina circulante aumentam com o ganho de peso e reduzem com a perda de peso (Fatouros et al., 2005). Com relação ao sistema

imune, a leptina exerce tipicamente efeitos pró-inflamatórios sobre o organismo. Existem evidências de que a leptina pode iniciar o crescimento de várias células cancerosas, incluindo pancreáticas, ovarianas, prostáticas, carcinomas pulmonares e células gástricas (Tilg e Moschen, 2006). A leptina sinaliza diretamente para receptores OBR<sub>b</sub> na superfície da membrana de macrófagos, induzindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , a IL-6 e a IL-12 (Tilg e Moschen, 2006).

O exercício altera a homeostasia do balanço energético, descarga simpato-adrenal, assim como respostas hormonais e metabólicas que podem influenciar as concentrações de leptina em repouso ou durante o exercício. Alguns estudos prévios examinaram os efeitos do exercício agudo, mas não crônico, sobre as concentrações de leptina plasmática. Por exemplo, indivíduos diabéticos tipo 2 exibiram uma redução significativa de 30% nas concentrações de leptina de repouso 24h após uma única sessão de exercício de força, com nenhum efeito crônico do treinamento após seis semanas (Kanaley et al., 2001). Após um protocolo agudo de exercício de força para os principais grupos musculares com cargas entre 70-85% de 1RM, a leptina exibiu uma redução tardia na circulação sistêmica de 9-13 horas (Nindl et al., 2002). As alterações agudas nas concentrações plasmáticas de leptina resultantes de diferentes intensidades do exercício de força, força máxima (4 séries de cinco repetições a 88% de 1RM com 3 minutos de intervalo entre as séries), hipertrofia muscular (4 séries de 10 repetições a 75% de 1RM com 2 minutos de intervalo entre as séries), e resistência de força (4 séries de 15 repetições a 60% de 1RM com 1 minuto de intervalo entre as séries) foram testadas em indivíduos jovens; os resultados mostraram uma redução significativa na leptina 30 minutos após o exercício, com nenhuma diferença entre os protocolos (Zafeiridis et al., 2003). Similarmente, no presente estudo a leptina reduziu 24 horas



após a primeira sessão aguda de exercício de força e retornou aos valores pré-exercício após 48 horas em mulheres idosas pós-menopausadas.

No entanto, existem poucas informações disponíveis em relação aos efeitos crônicos do treinamento de força sobre a leptina em idosos. Fatouros et al. (2005) testaram o efeito de diferentes intensidades do exercício de força em sujeitos idosos com sobrepeso, intensidade baixa (45-50% de 1RM), intensidade moderada (60-65% de 1RM) e intensidade alta (80-85% de 1RM). O protocolo de treinamento foi realizado três vezes por semana durante 24 semanas, todos os grupos apresentaram redução crônica nas concentrações plasmáticas de leptina, com maiores reduções para o grupo de alta intensidade. Depois de 24 semanas de destreinamento os valores de leptina aumentaram novamente. No presente estudo, foi observada uma redução crônica na leptina plasmática após 16 semanas de treinamento de força. Possíveis explicações para o declínio na leptina induzido pelo exercício de força podem ser: a elevada captação de glicose pelos tecidos periféricos na presença de lactato, acidose, descarga simpato-adrenal e gasto energético aumentados, depleção de glicogênio e inibição da glicólise (Fatouros et al., 2005).

Outro biomarcador de inflamação e fator de risco de doença cardiovascular aterosclerótica é a resistina (Reilly et al., 2005). Jamurtas et al. (2006) não mostraram alteração aguda das concentrações plasmáticas de resistina até 48h após uma sessão de 45 minutos em cicloergômetro a 65% do  $VO_2$ max em homens de meia idade com sobrepeso. Outro estudo não encontrou alterações crônicas nas concentrações de resistina após 14 semanas de treinamento aeróbio que consistiu de um programa de caminhada supervisionada realizado 3-4 vezes por semana com 60 minutos a 65-70% do  $VO_2$  pico em mulheres diabéticas pós-menopausadas (Giannopoulou et al., 2005). Por outro lado, indivíduos diabéticos idosos submetidos a 16 semanas de treinamento

aeróbio com quatro sessões semanais de 45-60 minutos a 50-85% do  $VO_2\text{max}$  exibiram redução crônica nas concentrações de resistina (Kadoglou et al., 2007). Um estudo recente encontrou redução significativa nas concentrações de resistina após oito semanas de treinamento aeróbio supervisionado em adolescentes com sobrepeso (Jones et al., 2009). O presente estudo é o primeiro que examinou os efeitos do treinamento de força agudo e crônico sobre as concentrações plasmáticas de resistina em mulheres idosas pós-menopausadas. Os resultados apontaram para uma redução após 24 e 48h depois da sessão de exercício agudo comparado com os valores basais e diminuições significativas após 16 semanas de treinamento comparado com os valores basais e imediatamente após. É possível que a resistina seja afetada pela intensidade e tipo de exercício, treinamento aeróbio versus força, duração do estudo e população analisada.

## **CONCLUSÃO**

Sumariamente, o presente estudo traz importantes informações que podem subsidiar a prática clínica, considerando os efeitos do treinamento de força periodizado sobre a força muscular e biomarcadores inflamatórios em mulheres idosas pós-menopausadas. Um treinamento de força de fácil aplicabilidade, durante apenas 16 semanas já é capaz de induzir a um aumento na força muscular dos membros superiores e inferiores, redução crônica nas concentrações plasmáticas de IL-6, leptina e resistina, com mínimo ou nenhum efeito sobre a IL-15 e o TNF- $\alpha$ . Esses resultados enaltecem a importância deste tipo de treinamento como uma ferramenta não farmacológica no tratamento da inflamação associada ao envelhecimento e a menopausa.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BARRY, B.K.; CARSON, R.G. The Consequences of Resistance Training for Movement Control in Older Adults. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.59, p.730-754, 2004.
- BAUTMANS, I.; NJEMINI, R.; VASSEUR, S.; CHABERT, H.; MOENS, L.; DEMANET, C.; METS, T. Biochemical changes in response to intensive resistance exercise training in the elderly. **Gerontology**, v.51, p.253-265, 2005.
- BROWN, L.E.; WEIR, J.P. Procedures Recommendation I: Accurate Assessment of Muscular Strength and Power. **J Exerc Physiol**, v.4, p.1-21, 2001.
- CARBO, N.; LOPEZ-SORIANO, J.; COSTELLI, P.; BUSQUETS, S.; ALVAREZ, B.; BACCINO, F.M.; QUINN, L.S.; LOPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILES, J.M. Interleucin-15 antagonizes muscle proyein waste in tumor-bearing rats. **Br J Cancer**, v.83, p.526-531, 2000.
- CASTANEDA, C.; GORDON, P.L.; PARKER, R.C.; UHLIN, K.L.; ROUBENOFF, R.; LEVEY, A.S. Resistance training to reduce the malnutrition-inflammation complex syndrome of chronic kidney disease. **Am Kidney Dis**, v.43, p.607-616, 2004.
- COHEN, H.J.; PIEPER, C.F.; HARRIS, T.B.; RAO, K.M.; CURRIE, M.S. The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.52, p.201-208, 1997.
- COLBERT, L.H.; VISSER, M.; SIMONSICK, E.M.; TRACY, R.P.; NEWMAN, A.B.; KRITCHEVSKY, S.B.; SATTERFIELD, S.; KANAYA, A.M.; TAAFFE, D.R.; HARRIS, T.B. Physical activity, exercise, and inflammatory markers in older adults: Findings from the Health, Aging, and Body Composition Study. **J Am Geriatr Soc**, v.52, p.1098-1104, 2004.

ELOSUA, R.; BARTALI, B.; ORDOVAS, J.M.; CORSI, A.M.; LAURETANI, F.; FERRUCCI, L.; InCHIANTI Investigators. Association between physical activity, physical performance, and inflammatory biomarkers in an elderly population: the InCHIANTI study. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.60, p.760–767, 2005.

FATOUROS, I.G.; TOURNIS, S.; LEONTSINI, D.; JAMURTAS, A.Z.; SXINA, M.; THOMAKOS, P.; MANOUSAKI, M.; DOUROUDOS, I.; TAXILDARIS, K.; MITRAKOU, A. Leptin and Adiponectin Responses in Overweight Inactive Elderly following Resistance Training and Detraining Are Intensity Related. **J Clin Endocrinol Metab**, v.90, p.5970–5977, 2005.

FERGUSON, M.A.; WHITE, L.J.; MCCOY, S.; KIM, H.W.; PETTY, T.; WILSEY, J. Plasma adiponectin response to acute exercise in healthy subjects. **Eur J Appl Physiol**, v.91, p.324–329, 2004.

FERRUCCI, L.; PENNINX, B.W.J.; VOLPATO, S.; HARRIS, T.B.; BANDEEN-ROCHE, K.; BALFOUR, J.; LEVEILLE, S.G.; FRIED, L.P.; MD, J.M. Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. **J Am Geriatr Soc**, v.50, p.1947-1954, 2002.

GIANNOPOULOU, I.; FERNHALL, B.; CARHART, R.; WEINSTOCK, R.S.; BAYNARD, T.; FIGUEROA, A.; KANALEY, J.A. Effects of diet and/or exercise on the adipocytokine and inflammatory cytokine levels of postmenopausal women with type 2 diabetes. **Metabolism**, v.54, p.866-875, 2005.

GIRI, J.G.; ANDERSON, D.M.; KUMAKI, S.; PARK, L.S.; GRABSTEIN, K.H.; COSMAN, D. IL-15, a novel T-cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. **J Leukoc Biol**, v.57, p.763–766, 1995.

GREIWE, J.S.; CHENG, B.O.; RUBIN, D.C.; YARASHESKI, K.E.; SEMENKOVICH, C.F. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor  $\alpha$  in frail elderly humans. **FASEB J**, v.15, p.475-482, 2001.

JAMURTAS, A.Z.; THEOCHARIS, V.; KOUKOULIS, G.; STAKIAS, N.; FATOUROS, I.G.; KOURETAS, D.; KOUTEDAKIS, Y. The effects of acute exercise on serum adiponectin and resistin levels and their relation to insulin sensitivity in overweight males. **Eur J Appl Physiol**, v.97, p.122-126, 2006.

JONES, T.E.; BASILIO, J.L.; BROPHY, P.M.; MCCAMMON, M.R.; HICKNER, R.C. Long-term Exercise Training in Overweight Adolescents Improves Plasma Peptide YY and Resistin. **Obesity**, v.26, in press, 2009.

KADOGLOU, N.P.; PERREA, D.; ILIADIS, F.; ANGELOPOULOU, N.; LIAPIS, C.; ALEVIZOS, M. Exercise Reduces Resistin and Inflammatory Cytokines in Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v.30, p.719–721, 2007.

KANALEY, J.A.; FENICCHIA, L.M.; MILLER, C.S.; PLOUTZ-SYNDER, L.L.; WEINSTOCK, R.S.; CARHART, R.; AZEVEDO JR, J.L. Resting leptin responses to acute and chronic resistance training in type 2 diabetic men and women. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.25, p.1474-1480, 2001.

KAPASI, Z.F.; OUSLANDER, J.G.; SCHNELLE, J.F.; KUTNER, M.; FAHEY, J.L. Effects of an exercise intervention on immunologic parameters in frail elderly nursing home residents. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.58, p.636–643, 2003.

KIECOLT-GLASER, J.K.; PREACHER, K.J.; MACCALLUM, R.C.; ATKINSON, C.; MALARKEY, W.B.; GLASER, R. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. **PNAS**, v.100, p.9090-9095, 2003.

MAGGIO, M.; GURALNIK, J.M.; LONGO, D.L.; FERRUCCI, L. Interleukin-6 in Aging and Chronic Disease: A Magnificent Pathway. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.61, p.575–584, 2006.

NEDROW, A.; MILLER, J.; WALKER, M.; NYGREN, P.; HUFFMANN, L.H.; NELSON, H.D. Complementary and Alternative Therapies for the Management of Menopause-Related Symptoms. **Arch Inter Med**, v.166, p.1453-1465, 2006.

NIELSEN, A.R.; PEDERSEN, B.K. The biological roles of exercise-induced cytokines: IL-6, IL-8, and IL-15. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.32, p.833-839, 2007.

NINDL, B.C.; KRAEMER, W.J.; ARCIERO, P.J.; SAMATALLEE, N.; LEONE, C.D.; MAYO, M.F.; HAFEMAN, D.L. Leptin concentrations experience a delayed reduction after resistance exercise in men. **Med Sci Sports Exerc**, v.34, p.608-613, 2002.

OLSON, S.H.; BANDERA, E.V.; ORLOW, I. Variants in Estrogen Biosynthesis Genes, Sex Steroid Hormone Levels, and Endometrial Cancer: A Huge Review. **Am J Epidemiol**, v.165, p.235–245, 2007.

OSTROWSKI, K.; HERMANN, C.; BANGASH, A.; SCHJERLING, P.; NIELSEN, J.N.; PEDERSEN, B.K. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. **J Physiol**, v.513, p.889-894, 1998.

PFEILSCHIFTER, J.; KÖDTIZ, R.; PFHOL, M.; SCHATZ, H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. **Endocr Rev**, v.23, p.90-119, 2002.

PRESTES, J.; DE LIMA, C.; FROLLINI, A.B.; DONATTO, F.F.; CONTE, M. Comparison of linear and reverse linear periodization effects on maximal strength and body composition. **J Strength Cond Res**, v.23, p.266-274, 2009.

REILLY, M.P.; LEHRKE, M.; WOLFE, M.L.; ROHATGI, A.; LAZAR, M.A.; RADER, D.J. Resistin Is an Inflammatory Marker of Atherosclerosis in Humans. **Circulation**, v.111, p.932–939, 2005.

RIECHMAN, S.E.; BALASEKARAN, G.; ROTH, S.M.; FERRELL, R.E. Association of interleukin-15 protein and interleukin-15 receptor genetic variation with resistance exercise training responses. **J Appl Physiol**, v.97, p.2214–2219, 2004.

STARKWEATHER, A. The Effects of Exercise on Perceived Stress and IL-6 Levels Among Older Adults. **Biol Res Nurs**, v.8, p.186–194, 2007.

STEWART, L.K.; FLYNN, M.G.; CAMPBELL, W.W.; CRAIG, B.A.; ROBINSON, J.P.; TIMMERMAN, K.L.; MCFARLIN, B.K.; COEN, P.M.; TALBERT, E. The Influence of Exercise Training on Inflammatory Cytokines and C-Reactive Protein. **Med Sci Sports Exerc**, v.39, p.1714-1719, 2007.

TILG, H.; MOSCHEN, R.A. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature**, v.6, p.772-783, 2006.

WHITE, L.J.; CASTELLANO, V.; MCCOY, S.C. Cytokine responses to resistance training in people with multiple sclerosis. **J Sports Sci**, v.24, p.911-914, 2006.

YEH SS, WU S, LEVINE, D.M.; PARKER, T.S.; OLSON, J.S.; STEVENS, M.R.; SCHUSTER, M.W. The correlation of cytokine levels with body weight after megestrol acetate treatment in geriatric patients. **J Gerontol A Med Sci**, v.56, p.48-54, 2001.

ZAFEIRIDIS, A.; SMILIOS, I.; CONSIDINE, R.V.; TOKMAKIDIS, S.P. Serum leptin responses after acute resistance exercise protocols. **J Appl Physiol**, v.94, p.591–597, 2003.

ZHANG, S.M.; MANSON, J.E.; REXRODE, K.M.; COOK, N.R.; BURING, J.E.; LEE, I. Use of Oral Conjugated Estrogen Alone and Risk of Breast Cancer. **Am J Epidemiol**, v.165, p.524–529, 2007.

**APÊNDICE I:** Manuscrito aceito para publicação no periódico *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*.



**APPLIED PHYSIOLOGY, NUTRITION,  
AND METABOLISM**      **PHYSIOLOGIE APPLIQUÉE,  
NUTRITION  
ET MÉTABOLISME**

apnm.nrc.ca

panm.cnrc.ca

April 9, 2009

Dr. Jonato Prestes, PhD  
Federal University of São Carlos  
Major José Inácio st, n.2400  
Sao Carlos, Brazil

Dear Dr. Jonato Prestes PhD:

We are pleased to inform you that your manuscript entitled ' EFFECTS OF OVARECTOMY AND RESISTANCE TRAINING ON MMP-2 ACTIVITY IN SKELETAL MUSCLE' by authors Jonato Prestes, Rita de Cássia Marqueti, Gilberto Eiji Shiguemoto, Richard Diego Leite, Guilherme Borges Pereira, Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araújo, Vilmar Baldissera, and Sérgio Eduardo de Andrade Perez has been accepted for publication in *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*.

Thank you for choosing *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* to publish your research.

Sincerely,

Dr. T.E. Graham  
Editor-in-Chief  
*Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*

EDITOR:  
**Terry Graham**  
EDITORIAL ASSISTANT:  
**Rhonda Wilson**

EDITORIAL OFFICE:  
***Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism***  
Department of Human Health & Nutritional Sciences  
University of Guelph  
Guelph, ON N1G 2W1, Canada  
Tel: 519-824-4120 ext. 53472      Fax: 519-763-5902      E-mail: apnm@uoguelph.ca



**Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle**

Jonato Prestes<sup>1</sup>; Rita de Cássia Marqueti<sup>1</sup>; Gilberto Eiji Shiguemoto<sup>1</sup>; Richard Diego Leite<sup>1</sup>; Guilherme Borges Pereira<sup>1</sup>; Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araújo<sup>1</sup>; Vilmar Baldissera<sup>1</sup> and Sérgio Eduardo de Andrade Perez<sup>1</sup>.

1-Department of Physiological Sciences, Federal University of São Carlos, São Carlos/SP, Brazil.

\*Corresponding author: Jonato Prestes. Major José Inácio st, n.2400, zip code: 13560-161, ap: 13, São Carlos, São Paulo, Brazil. Phone number: +55 (16) 3361-6439. **E-mail:** [jonatop@gmail.com](mailto:jonatop@gmail.com)

### Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) are crucial to the maintenance of healthy tissue. The aim of this study was to investigate MMP-2 activity in gastrocnemius, soleus, tibialis anterior (TA) and extensor digitorum longus (EDL) muscle after resistance training in ovariectomized rats. Wistar adult female rats were grouped into: sedentary (Sed-Intact); ovariectomized sedentary (Sed-Ovx); pseudo-ovariectomized sedentary (Sed-Pseudo); acute exercise (AcuteEx-Intact); ovariectomized acute exercise (AcuteEx-Ovx); strength trained (ChronicEx-Intact) and ovariectomized strength trained (ChronicEx-Ovx) (n= 10 per group). A 12-week resistance training that required the animals to climb a 1.1-m vertical ladder with weights secured to their tail was used. The sessions were performed once every 3 days with 4-9 climbs and 8-12 dynamic movements per climb. The MMP-2 activity was analyzed by zymography. There was a higher MMP-2 activity in ChronicEx-Intact and ChronicEx-Ovx groups and a lower activity in AcuteEx-Ovx compared with the Sed-Intact in soleus ( $p \leq 0.05$ ). Sed-Ovx and ChronicEx-Ovx groups presented lower MMP-2 activity compared with the Sed-Intact group in TA. There was a higher MMP-2 activity in AcuteEx-Intact and AcuteEx-Ovx compared with Sed-Intact and Sed-Ovx in TA, respectively ( $p \leq 0.05$ ). In TA and EDL training increased MMP-2 activity compared with Sed-Intact group. No statistically significant alterations were observed for gastrocnemius muscle. Strength training increases MMP-2 activity in soleus, TA and EDL muscle, which may be important for muscle remodeling. Ovariectomy downregulates MMP-2 in TA and EDL, which may compromise muscle function.

**Key words:** resistance training; MMP-2; skeletal muscle; ovariectomy; rats

## **Introduction**

Ovariectomy in animals is an experimental model used to mimic menopause and induces a decrease in muscle mass (sarcopenia), muscle force generation, fraction of strong-binding myosin during contraction and bone mass (osteopenia) (Moran, Warren e Lowe, 2006; Moran et al. 2007). The exact mechanisms underlining this catabolic process are not clearly understood. In this sense, experiments designed to study muscle remodeling and the proposal of pathways involved are necessary. The hormonal replacement has been used to minimize the effects sarcopenia and osteopenia caused by ovariectomy and menopause (Sipila et al. 2001; Sorensen et al. 2001; Gorzek et al. 2007; Moran et al. 2007). However, there are some risks associated with this therapy in humans, for example, the increased incidence of some types of cancer (breast and uterus), since that, the collateral effects of hormonal dosages used still need more investigations (Stefanick et al. 2006; Olson, Bandera and Orlow, 2007; Zhang et al. 2007).

On the other hand, physical training such as resistance, jumping or swimming exercise, wheel or treadmill running by rodents results in positive adaptations in cardiac and skeletal muscle (Allen et al. 2001; Hornberger Jr and Farrar, 2004), bone (Yao et al. 2004; Shiguemoto et al. 2007), and immune system (Kapasi et al. 2003; Prestes et al. 2008). With regard to skeletal muscle, this tissue is surrounded by the extracellular matrix (ECM) that provides structural support, protection and maintenance of muscle fibers function (Birkedal-Hansen, 1995). The intramuscular ECM increases with physical exercise, (Kjaer, 2004) and its maintenance depends on a variety of proteolytic enzymes, such as the matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs are usually found in tissues as pro-MMPs (Kjaer, 2004) and their expression is highly regulated by growth factors, cytokines produced during tissue remodeling (Carmeli et al. 2004), biochemical

agents, and cell–matrix interactions (Lluri and Jaworski, 2005). MMPs are crucial to the maintenance of healthy tissue. MMP-2 plays an essential role in myofibril proliferation and differentiation, recovery after damage and local connective tissue homeostasis (Carmeli et al. 2004; Lluri and Jaworski, 2005). One of the most important MMPs associated with skeletal muscle function and dysfunction is the MMP-2 (Matrisian, 1992). Since ovariectomy causes a decrease in muscle mass and MMP-2 is related to skeletal muscle maintenance, the lack of such important anabolic hormone could modulate muscle MMP-2 activity.

We have recently shown that rat tendon remodeling might be impaired when two types of Anabolic-Androgenic Steroids (AAS) are associated (Decadurabolin and Durateston) with or without loading exercise, as a result of decreased MMP-2 activity (Marqueti et al. 2006). Another study of our group found that mechanical loading exercise increases MMP-2 activity in gastrocnemius and soleus muscle, which is abolished by AAS administration (Marqueti et al. 2008a). Some studies in the literature raised the need of investigating tendon and skeletal muscle remodeling, and muscle signal molecules such as MMPs in female rats (Heinemeir et al. 2007), especially concerning to the physiological adaptations process induced by ovariectomy (Gorzek et al. 2007; Moran et al. 2007). It has been shown that resistance exercise has a potential effect on muscle hypertrophy (Hornberger Jr and Farrar, 2004), this may be important to MMP-2 activity and muscle function maintenance.

However, there are no studies that investigated the effects of resistance exercise on MMP-2 activity in ovariectomized rats. In view of the above mentioned, the aim of this study was to investigate MMP-2 activity in gastrocnemius, soleus, tibialis anterior (TA) and extensor digitorum longus (EDL) muscle after resistance training. Additionally, the study aimed to analyze the influence of ovariectomy on muscle remodeling, trough

MMP-2 activity. Our hypothesis was that resistance exercise may minimize the deleterious effects of ovariectomy on skeletal muscle remodeling.

## **Methods**

### *Animals*

Seventy female Wistar rats (*Rattus norvegicus var. albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*) (13 weeks old) from the breeding colony of Federal University of São Carlos (UFSCar), SP, Brazil, with an initial weight of approximately 250±30g were used. The animals had free access to water and chow, were kept in collective cages (5 rats per cage) at a constant temperature of 23±2<sup>0</sup>C, and had a cycle of 12 hours light/12 hours dark, with light from 06:00 h to 18:00 h. All the animals were fed with Labina® (a standard rat chow diet provided by Purina, Brazil). The research was approved by the Federal University of São Carlos Committee of Experimental Animals (protocol n<sup>o</sup>. 048/2007). All animal procedures were conducted in accordance with the USA Guide for care and use of laboratory animals (National Research Council's, 1996).

### *Experimental Groups*

The rats were randomly distributed into seven experimental groups (10 animals each group) in the following order: 1) sedentary (Sed-Intact); 2) sedentary ovariectomized (Sed-Ovx); 3) pseudo ovariectomized (Sed-Pseudo); 4) acute exercise (AcuteEx-Intact); 5) acute exercise ovariectomized (AcuteEx-Ovx); 6) trained (ChronicEx-Intact) and 7) trained ovariectomized (ChronicEx-Ovx).

### *Sedentary and pseudo ovariectomized groups*

The sedentary and pseudo ovariectomized animals were kept in their cages during three months without any type of exercise. The pseudo ovariectomized group was submitted to the surgery procedures without removing the ovaries. The sedentary ovariectomized animals had their ovaries removed.

### *Acute exercise groups*

After three months of housing the acute exercise groups AcuteEx-Intact and AcuteEx-Ovx were adapted to resistance exercise (one session) and their maximal loads were determined in another session. After this they performed only one acute resistance exercise session.

### *Trained groups*

The trained animals ChronicEx-Intact and ChronicEx-Ovx performed 12 weeks of resistance exercise. The training started at the same time for both groups.

### *Ovariectomy*

Ovariectomy and pseudo-ovariectomy were performed when the rats were 13 weeks old, according to the technique described by Kalu (1991) and ethyl ether as anesthetic. All animals submitted to surgery procedures had a week of recovery.

### *Resistance exercise training*

The 12-week resistance training was performed once every 3 days. Initially, the rats were adapted to the resistance training protocol that required the animals to climb a vertical ladder (1.1 x 0.18 m, 2-cm grid, 80° incline) with weights secured to rats' tail.

The size of the ladder induced the animals to perform 8-12 dynamic movements per climb. The load apparatus was secured to the tail by wrapping the proximal portion of the tail with a self-adhesive foam strip. The Velcro strap was wrapped around the foam strip and fastened. With the load apparatus secured to the tail, the rats were placed at the bottom of the ladder and familiarized with climbing. If necessary a stimuli with a tweezers was applied to the animals' tail to initiate the movement. At the top of the ladder the rats reached a housing chamber (20 x 20 x 20 cm) where they were allowed to rest for 120 seconds. This procedure was repeated until the rats would voluntarily climb the ladder, three consecutive times, without stimuli.

Three days after this familiarization, the first training session consisted of 4-8 ladder climbs while carrying progressively heavier loads. The initial climb consisted of carrying a load that was 75% of the animal's body weight. After this, an additional 30g weight was added until a load was reached with which the rat could not climb the entire length of the ladder. Failure was determined when the animal could not progress up the ladder after three successive stimuli to the tail. The highest load successfully carried the entire length of the ladder was considered as the rat's maximal carrying capacity for that training session.

Training sessions consisted of 4 ladder climbs, with 50%, 75%, 90%, and 100% of their previous maximal carrying capacity, determined in the previous session. During subsequent ladder climbs an additional 30g load was added until a new maximal carrying capacity was determined. The resistance training protocol was adapted from Hornerberg and Farrar (2004), according to the needs of the present research.

### *Determination of MMP-2 in the muscle*

The animals were killed by decapitation immediately after the last resistance exercise session and after the acute sessions. Next, the whole gastrocnemius, soleus, tibialis anterior (TA) and extensor digitorum longus (EDL) muscle were removed from both posterior hindlimbs. The muscles were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-84^{\circ}\text{C}$  for biochemical analysis.

The muscle samples were treated as previously described for muscle extracts (Cleutjens et al. 1995). Frozen tissue (25 mg) was incubated in 2mL of extraction buffer (10mM cacodylic acid, pH 5.0; 0.15M NaCl; 1M ZnCl<sub>2</sub>; 20mM CaCl<sub>2</sub>; 1.5mM NaN<sub>3</sub>; 0.01% Triton X- 100 [v/v]), at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight in continuous stirring. After this period, the solution was centrifuged for 10 minutes ( $13000 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$ ). Samples applied 20  $\mu\text{g}$  of total protein in each lane of sodium dodecyl sulfate (SDS) -10% polyacrylamide gels prepared with 1mg/mL gelatin. After electrophoresis, the gels were washed twice in 2.5% Triton X-100 to remove the SDS. Gels were incubated in buffer substrate (50mM Tris-HCl, pH 8.0; 5mM CaCl<sub>2</sub>; 0.02% NaN<sub>3</sub>) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 20 hours. Gels were stained with Coomassie brilliant blue for 1.5 hours and destained with acetic acid:methanol: water (1:4:5) for visualization of the activity bands. Samples of 10 animals in each group were evaluated, to guarantee the precision and linearity of the analysis and each sample was normalized for the total amount of protein included. The gels were photographed with a Canon G6 Power Shot 7.1 mega pixels camera (Virginia, USA). The averages of band intensity were measured using Gene Tools software. The bands found in all groups were 72–62 kDa, suggesting the activation of MMP-2 as proposed by Birkedal-Hansen (1995). Active band was emphasized as proposed by Marqueti et al. (2008a).



### *Statistical analysis*

All data were presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The statistical analysis was initially done by the normality Kolmogorov-Smirnov test and by the homocedasticity test (Bartlett criterion). All variables presented normal distribution and homocedasticity so the two-way Anova test was used, (taking in consideration the variables resistance exercise x ovariectomy). In the maximal workload analysis two-way Anova test was used, (taking in consideration the variables ovariectomy x time). For the data of the animals' body mass (g) at week 1 and week 12, Anova three-way was conducted (exercise x ovariectomy x week). When the difference presented was significant, the Tukey test was applied for multiple comparisons. The software package Statistica® 6.1 (Stat. Soft Inc., Tulsa, OK, USA) was used with an alpha level of 0.05.

### **Results**

There was no statistically significant interaction between the interventions in the animals' body mass. This indicates that the increase in body mass from week 1 to week 12 was similar for all groups (Table 1).

For the maximal workload during the 12 weeks of training, there was no interaction between group and time, indicating that the ChronicEx-Intact and ChronicEx-Ovx groups increased maximal carrying load capacity by the same amount during training (Figure 1). The workloads did increase after week 6 and week 12 as compared with week 1, and after week 12 compared with week 6 (Figure 1). Nevertheless, there was no difference in maximal loads between both chronically resistance trained groups within 12 weeks period.

No statistically significant interactions between the interventions and groups were found for MMP-2 activity in gastrocnemius muscle (Figure 2). However, there

was a statistically significant interaction between the interventions (resistance exercise x ovarian status) in soleus muscle. Therefore, the AcuteEx-Ovx group presented a significant lower MMP-2 activity as compared with all experimental groups in soleus muscle. The resistance trained groups (ChronicEx-Intact and ChronicEx-Ovx) presented higher MMP-2 activity as compared with Sed-Intact, Sed-Ovx, Sed-Pseudo, AcuteEx-Intact and AcuteEx-Ovx, with no differences between ChronicEx-Intact and ChronicEx-Ovx in soleus muscle (Figure 3).

Again, there was a statistically significant interaction between groups, indicating that MMP-2 activity changed differently depending on the ovarian status in TA muscle. Ovariectomy (Sed-Ovx) decreased MMP-2 activity as compared with the Sed-Intact group. Acute resistance exercise (AcuteEx-Intact) induced an increase in MMP-2 activity as compared with Sed-Intact, Sed-Pseudo, Sed-Ovx, AcuteEx-Ovx and ChronicEx-Ovx in TA muscle (Figure 4). The AcuteEx-Ovx group presented higher MMP-2 activity as compared with Sed-Pseudo, Sed-Ovx and ChronicEx-Ovx groups in TA muscle. The resistance training (ChronicEx-Intact) increased MMP-2 activity in TA muscle as compared with Sed-Intact, Sed-Ovx, Sed-Pseudo, AcuteEx-Ovx and ChronicEx-Ovx groups. Differently, ChronicEx-Ovx group presented lower MMP-2 activity as compared with Sed-Intact, AcuteEx-Intact, AcuteEx-Ovx and ChronicEx-Intact groups (Figure 4).

There was a significant interaction between the two factors, showing that MMP-2 activity in EDL is modified differently by ovarian status. Similarly, ovariectomy (Sed-Ovx) decreased MMP-2 activity as compared with Sed-Intact group. Higher MMP-2 activity was observed for ChronicEx-Intact group as compared with Sed-Intact, Sed-Ovx and Sed-Pseudo in EDL muscle. ChronicEx-Ovx presented lower MMP-2 activity

as compared with Sed-Intact, Sed-Pseudo, AcuteEx-Intact, AcuteEx-Ovx and ChronicEx-Intact groups in EDL muscle (Figure 5).

## **Discussion**

This is the first study to evaluate the effects of resistance training on MMP-2 activity in gastrocnemius, soleus, TA and EDL muscle of ovariectomized rats. The initial hypothesis raised by our study has been partially confirmed, as ovariectomy decreased MMP-2 activity in TA and EDL muscle. Another important finding was that resistance exercise increased muscle MMP-2 activity. However, resistance training prevented ovariectomy induced MMP-2 decrease only in soleus muscle. Additionally, despite of ovariectomy, maximal workload increased by the same amount for chronically resistance trained groups.

The studies on muscle force generation in ovariectomized animals bring out different results. For example, McCormick et al. (2004) reported that soleus muscle maximal isometric tetanic force ( $P_o$ ) was not affected by ovariectomy in young, growing rats. However, Moran, Warren and Lowe (2006) showed that the fraction of strong-binding myosin during contraction was reduced in fibers from ovariectomized mice. According to the authors this reduction occurred to the same extent as the reduction in force. In contrast, in the present study we analyzed the maximal carrying load capacity in stair climbing exercise, a more general force evaluation that depends on several muscles, not an isolated form as used by the above mentioned studies. Therefore, we propose more studies and different types of specific and general muscle analysis to evaluate these performance alterations.

The skeletal muscle sarcolemma has an associated external basal lamina that provides structural support for muscle fibers and is important in maintaining the

physiological integrity of the myofibers. Basal lamina also serves as a select barrier to electrolytes and has a major role in muscle fiber repair after injury or excessive exercise (Carmeli et al. 2004). Nevertheless, the MMPs and their inhibitors in skeletal muscle have important physiological functions in the homeostasis of muscle fibers and of the ECM (Marqueti et al. 2008a). In skeletal muscle, MMPs have been implicated in a range of developmental, functional, and pathological processes. MMPs have regulatory roles in muscle development because they release local growth factors, and are also important in repair processes after traumatic injury or disuse myopathy (Kherif et al. 1999; Kjaer et al. 2006).

Additionally, MMPs are responsible for the degradation of the ECM during embryonic development, cell migration, morphogenesis, and tissue remodeling (Murphy and Gavrilovic, 1999). They play essential roles in normal functioning of diverse tissues during growth, development, and aging, and are involved in processes such as muscle, tendon and bone remodeling. One of the most important MMP associated with skeletal muscle function is MMP-2, also known as gelatinase-A, or type IV collagenase of 72 kDa, which can be transformed into an active form of 62 kDa (Carmeli et al. 2004). MMP-2 activity is found in tissues under constant turnover (Kjaer, 2004), and the increase in this activity is usually indicative of matrix degradation that is needed to allow tissue growth (Koskinen et al. 2001; Marqueti et al. 2008b). The connective tissue has an important role in maintenance of force in muscle (Kjaer, 2004). As shown by the results of the present study ovariectomy decreased MMP-2 activity in TA and EDL, which may compromise muscle remodeling process, since MMP-2 is a marker of skeletal muscle turnover that allows its growth. To confirm this hypothesis, McClung et al. (2006) shown that ovariectomy prevents the recovery of soleus muscle fibers cross-

sectional area from disuse atrophy during 2 weeks of normal cage ambulation, while oestrogen replacement allows for the restoration of myofiber size.

Similarly, it has been shown that the removal of ovarian hormones from female mice via ovariectomy is detrimental to soleus and EDL muscle contractile function (Moran, Warren and Lowe, 2006). Moran et al. (2007) found that ovariectomy induces EDL muscle contractile dysfunction and that circulating estradiol levels are positively correlated with muscle force generation and myosin function, further supporting the contention that estradiol affects skeletal muscle. From the results of the present study we can speculate that this ovariectomy induced muscle dysfunction and weakness may also be related to MMP-2 decreased activity, affecting muscle remodeling. In fact, in other study of our group submitted to publication, we found that ovariectomized sedentary rats exhibited decreased cross sectional area of soleus and tibialis anterior muscles as compared with sedentary intact group. Additionally, there was a significant increase in soleus and tibialis anterior muscle cross sectional area after 12 weeks of stair climbing exercise in intact and ovariectomized rats.

Concerning the effects of resistance exercise, soleus, TA and EDL presented increased MMP-2 activity, which may be important for muscle growth. Marqueti et al. (2008a) also showed MMP-2 increased activity in soleus and gastrocnemius muscle after water jumping exercise. The absence of MMP-2 increased activity in gastrocnemius for the stair climbing resistance exercise protocol may be related to the type of exercise, since in this protocol the animals start exercise with a partial knee flexion, decreasing the work on gastrocnemius. It has been demonstrated that high-intensity exercise induces an increase in MMP-2 activity in both type I and II fiber-predominant muscles (Carmeli et al. 2005; Marqueti et al. 2008a). These results are in accordance to the findings of the present study, since MMP-2 activity was increased in

type I fiber-predominant muscle (soleus) and in type II fiber-predominant muscle (TA and EDL). Carmeli et al. (2005) submitted rats to low-intensity running (~40% of the  $\text{VO}_2\text{max}$ ) or to high-intensity running (70–75% of the  $\text{VO}_2\text{max}$ ), and found that MMP-2 protein expression was increased in the gastrocnemius and superficial portion of the quadriceps only after high intensity exercise.

Another interesting result of the present study was that an acute resistance exercise session increased MMP-2 activity in TA muscle, but not in the other analyzed muscles. This result is difficult to explain and further mechanistic studies are required to exactly set the reasons for this isolated effect in TA muscle. Finally, to our surprise, resistance exercise prevented ovariectomy induced MMP-2 decreased activity only in soleus muscle. For TA and EDL muscle resistance exercise training failed to prevent the decreased MMP-2 activity in ovariectomized rats.

In summary, this study proposes a new additional mechanism for ovariectomy induced skeletal muscle dysfunction, involving the decrease in MMP-2 activity, probably compromising muscle remodeling. Resistance exercise prevented this decreased activity specifically in soleus muscle. Future studies, including hindlimb suspension, hormone replacement and human subjects are necessary to increase the knowledge on the effects of modified MMP-2 activity in catabolic states, disease and exercise.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Mr. José Carlos Lopes for the laboratory technical assistance and the financial support provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by the Exercise Physiology Laboratory of Federal University of São Carlos, Brazil.

## References

- Allen, D.L., Harrison, B.C., Maass, A., Bell, M.L., Byrnes, W.C., and Leinwand, L.A. 2001. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J. Appl. Physiol.* **90**:1900–1908.
- Birkedal-Hansen, H. 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**:728-735.
- Carmeli, E., Moas, M., Reznick, A.Z., and Coleman, R. 2004. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve.* **29**:191-197.
- Carmeli, E., Moas, M., Lennon, S., and Powers, S.K. 2005. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp. Physiol.* **90**:613–619.
- Cleutjens, J.P.M., Kandala, J.C., Guarda, E., Guntaka, R.V., and Weber, K.T. 1995. Regulation of collagen degradation in rat myocardium after infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**:1281-1292.
- Gorzek, J.F., Hendrickson, K.C., Forstner, J.P., Rixen, J.L., Moran, A.L., and Lowe, D.A. 2007. Estradiol and tamoxifen reverse ovariectomy-induced physical inactivity in mice. *Med. Sci. Sports Exerc.* **39**:248-56.
- Heinemeier, K.M., Olesen, J.L., Schjerling, P., Haddad, F., Langberg, H., Baldwin, K.M., Kjaer, M. 2007. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. *J Appl Physiol.* **102**:573–581.
- Hornberger Jr, T.A., and Farrar, R.P. 2004. Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. *Can. J. Appl. Physiol.* **29**:16-31.

- Kalu, D.N. 1991. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* **15**:175-92.
- Kapasi, Z.F., Catlin, P.A., Adams, M.A., Glass, E.G., McDonald, B.W., and Nancarrow, A.C. 2003. Effect of duration of a moderate exercise program on primary and secondary immune responses in mice. *Phys. Ther.* **83**:638–647.
- Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J.G., Verdiere-Sahuque, M., et al. 1999. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev. Biol.* **205**:158–170.
- Kjaer, M. 2004. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiol. Rev.* **84**:649-698.
- Kjaer, M., Magnusson, P., Krogsgaard, M., Boysen Moller, J., Olesen, J., Heinemeier, K., et al. 2006. Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. *J. Anat.* **208**:445–450.
- Koskinen, S.O.A., Höyhty, M., Turpeenniemi-Hujanen, T., Martikkala, V., Mäkinen, T.T., Oksa, J., et al. 2001. Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* **11**:9–15.
- Lluri, G., and Jaworski, D.M. 2005. Regulation of TIMP-2, MT1-MMP, and MMP-2 expression during C2C12 differentiation. *Muscle Nerve.* **32**:492-499.
- Marqueti, R.C., Parizotto, N.A., Chrigher, R.S., Perez, S.E.A., and Selistre-de-Araujo, H.S. 2006. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. *Am. J. Sport. Med.* **34**:1274–1280.



- Marqueti, R.C., Prestes, J., Stotzer, U.S., Paschoal, M., Leite, R.D., Perez, S.E., et al. 2008a. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. *Int. J. Sports Med.* **29**:559-63.
- Marqueti, R.C., Prestes, J., Paschoal, M., Ramos, O.H.P., Perez, S.E.A., Carvalho, H.F., et al. 2008b. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur. J. Appl. Physiol.* **104**:1087-93.
- Matrisian, L.M. 1992. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays.* **14**:455-463.
- McCormick, K.M., Burns, K.L., Piccone, C.M., Gosselin, L.E., and Brazeau, G.A. 2004. Effects of ovariectomy and estrogen on skeletal muscle function in growing rats. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **25**:21–27.
- McClung, J.M., Davis, J.M., Wilson, M.E., Goldsmith, E.C., and Carson, J.A. 2006. Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *J. Appl. Physiol.* **100**:2012–2023.
- Moran, A.L., Warren, G.L., and Lowe, D.A. 2006. Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. *J. Appl. Physiol.* **100**:548–559.
- Moran, A.L., Nelson, S.A., Landisch, R.M., Warren, G.L., and Lowe, D.A. 2007. Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J. Appl. Physiol.* **102**:1387-1393.
- Murphy, G., and Gavrilovic, J. 1999. Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**:614–621.

- Olson, S.H., Bandera, E.V., and Orlov, I. 2007. Variants in Estrogen Biosynthesis Genes, Sex Steroid Hormone Levels, and Endometrial Cancer: A HuGE Review. *Am. J. Epidemiol.* **165**:235–245.
- Prestes, J., Ferreira, C.K.O., Dias, R., Frollini, A.B., Donatto, F.F., Cury-Boaventura, M.F., et al. 2008. Lymphocyte and Cytokines after Short Periods of Exercise. *Int. J. Sports Med.* **29**:1010-1014.
- Shiguemoto, G.E., Rossi, E.A., Baldissera, V., Gouveia, C.H., Valdez Vargas, G.M., and Perez, S.E.A. 2007. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. *Maturitas.* **57**:261-70.
- Sipila, S., Taaffe, D.R., Cheng, S., Puolakka, J., Toivanen, J., and Suominen, H. 2001. Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. *Clin. Sci.* **101**:147-157.
- Sorensen, M.B., Rosenfalck, A.M., Hojgaard, L., and Ottesen, B. 2001. Obesity and sarcopenia after menopause are reversed by sex hormone replacement therapy. *Obes. Res.* **9**:622–626.
- Stefanick, M.L., Anderson, G.L., Margolis, K.L., Hendrix, S.L., Rodabough, R.J., Paskett, E.D., et al. 2006. Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA.* **295**:1647-1657.
- Yao, Z., Lafage-Proust, M.H., Plouet, J., Bloomfield, S., Alexandre, C., and Vico, L. 2004. Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF. *J. Bone Miner. Res.* **19**:1471–1480.

Zhang, S.M., Manson, J.E., Rexrode, K.M., Cook, N.R., Buring, J.E., and Lee, I. 2007.

Use of Oral Conjugated Estrogen Alone and Risk of Breast Cancer. *Am. J.*

*Epidemiol.* **165**:524-529.

Table 1. Animals' body mass (g) at week 1 and week 12.

<b>Experimental groups (n=10 each group)</b>	<b>Week 1</b>	<b>Week 12</b>
Sed-Intact	247.7 ± 3.5	301.1 ± 8.8*
Sed-Ovx	249.0 ± 7.4	283.0 ± 9.7*
Sed-Pseudo	239.4 ± 1.6	287.8 ± 3.2*
AcuteEx-Intact	244.1 ± 2.1	286.5 ± 7.0*
AcuteEx-Ovx	236.6 ± 3.3	306.1 ± 5.8*
ChronicEx-Intact	246.9 ± 7.0	289.0 ± 8.2*
ChronicEx-Ovx	246.3 ± 3.5	292.6 ± 6.4*

\*Statistically significant difference compared to week 1. Values are presented by means ± standard error of the mean,  $p \leq 0.05$ .

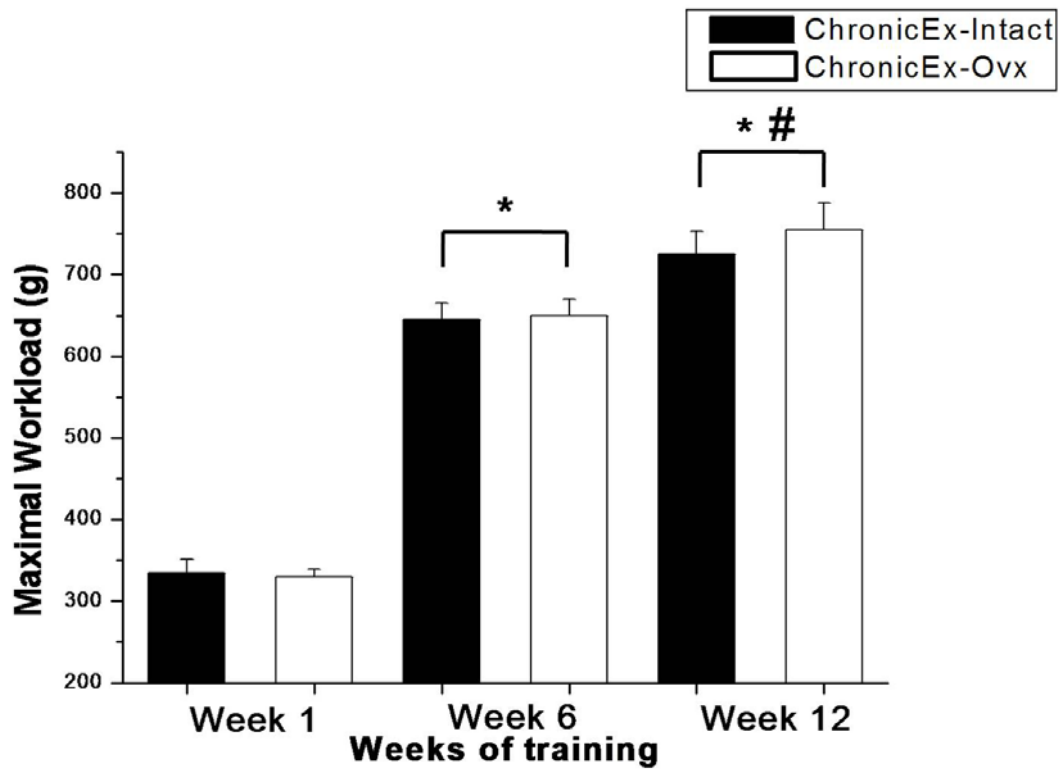


Figure 1. The ChronicEx-Intact and ChronicEx-Ovx groups' maximal workload (g) at weeks 1, 6 and 12. Values are presented by means  $\pm$  standard error of the mean,  $p \leq 0.05$ , (n = 10 each group). \*Statistically significant difference as compared with week 1; #Statistically significant difference between week 6 and week 12.

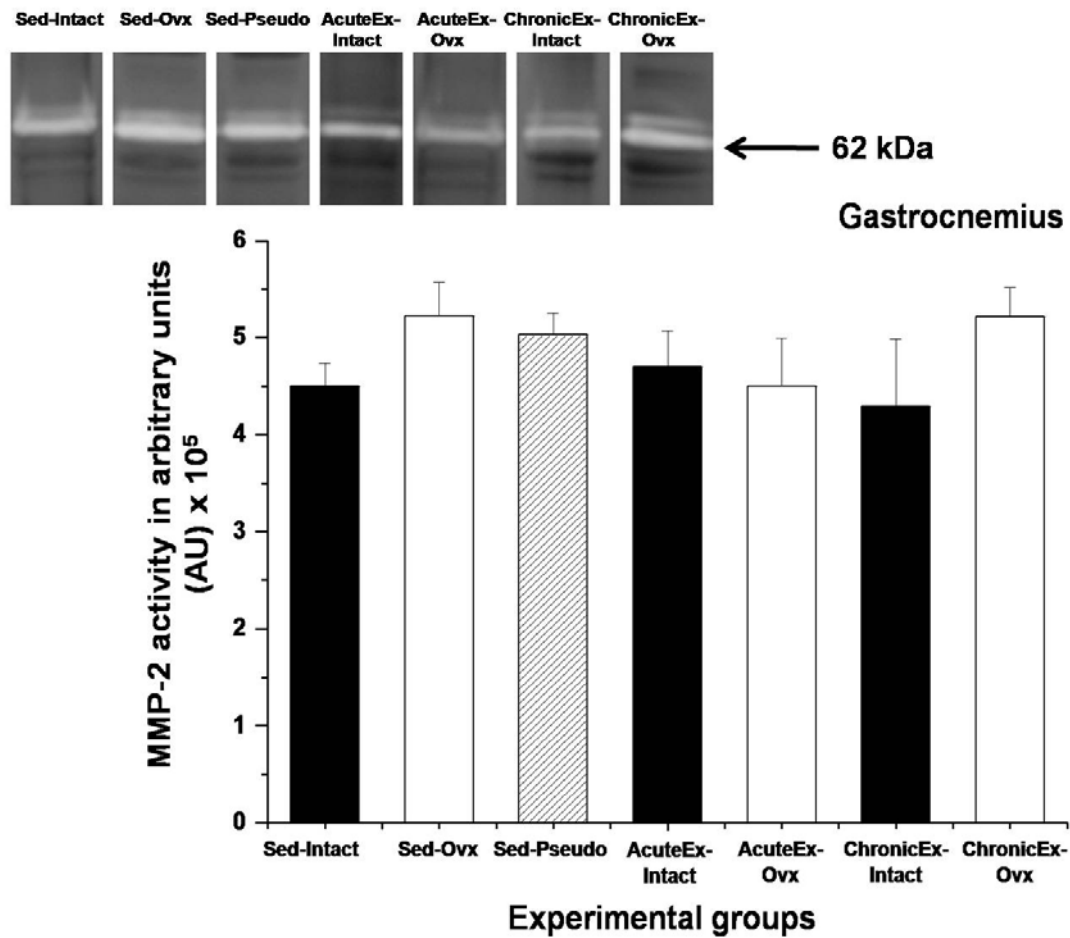


Figure 2. Analysis of MMP activity in gastrocnemius muscle extracts by zymography (n = 10 each group). The activity of the band was expressed as arbitrary units. Values are presented by means  $\pm$  standard error of the mean,  $p \leq 0.05$ .

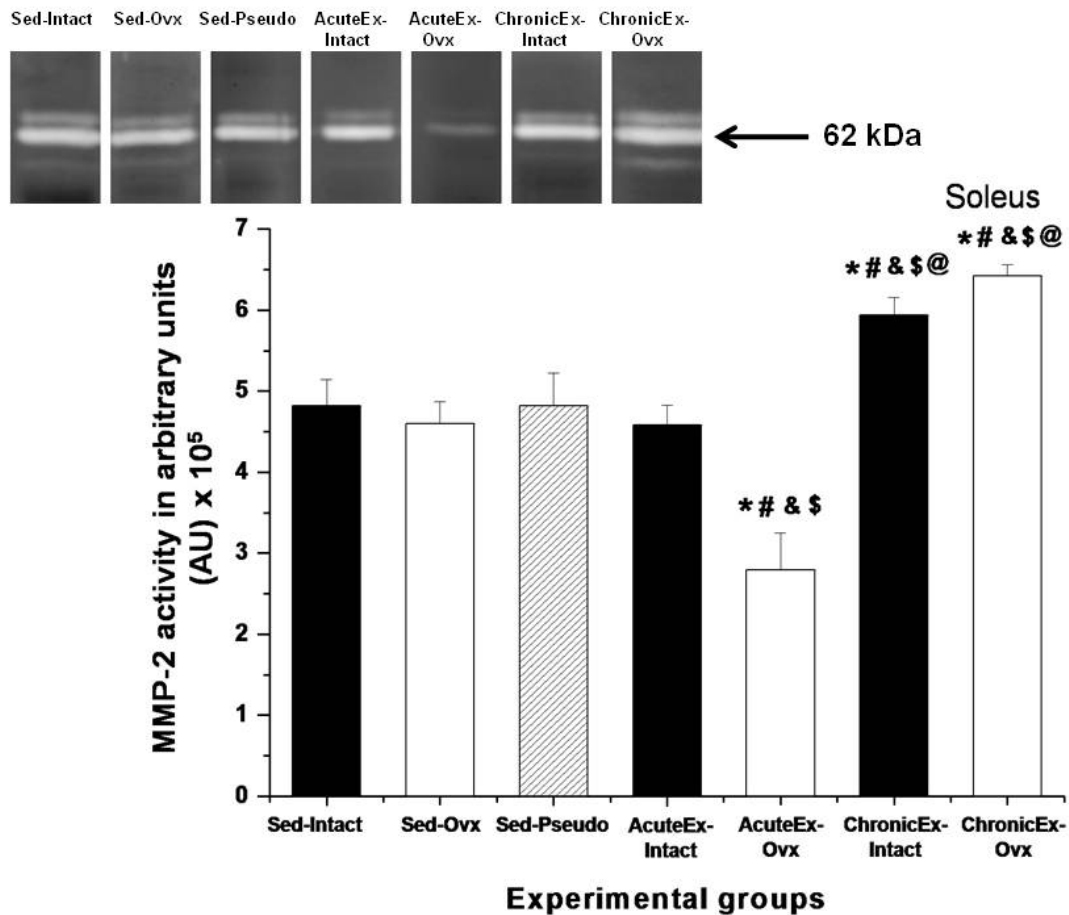


Figure 3. Analysis of MMP activity in soleus muscle extracts by zymography (n = 10 each group). The activity of the band was expressed as arbitrary units. Values are presented by means  $\pm$  standard error of the mean,  $p \leq 0.05$ . \*Statistically significant difference as compared with sedentary; #compared with Sed-Ovx; &compared with Sed-Pseudo; \$compared with AcuteEx-Intact; @compared with AcuteEx-Ovx.

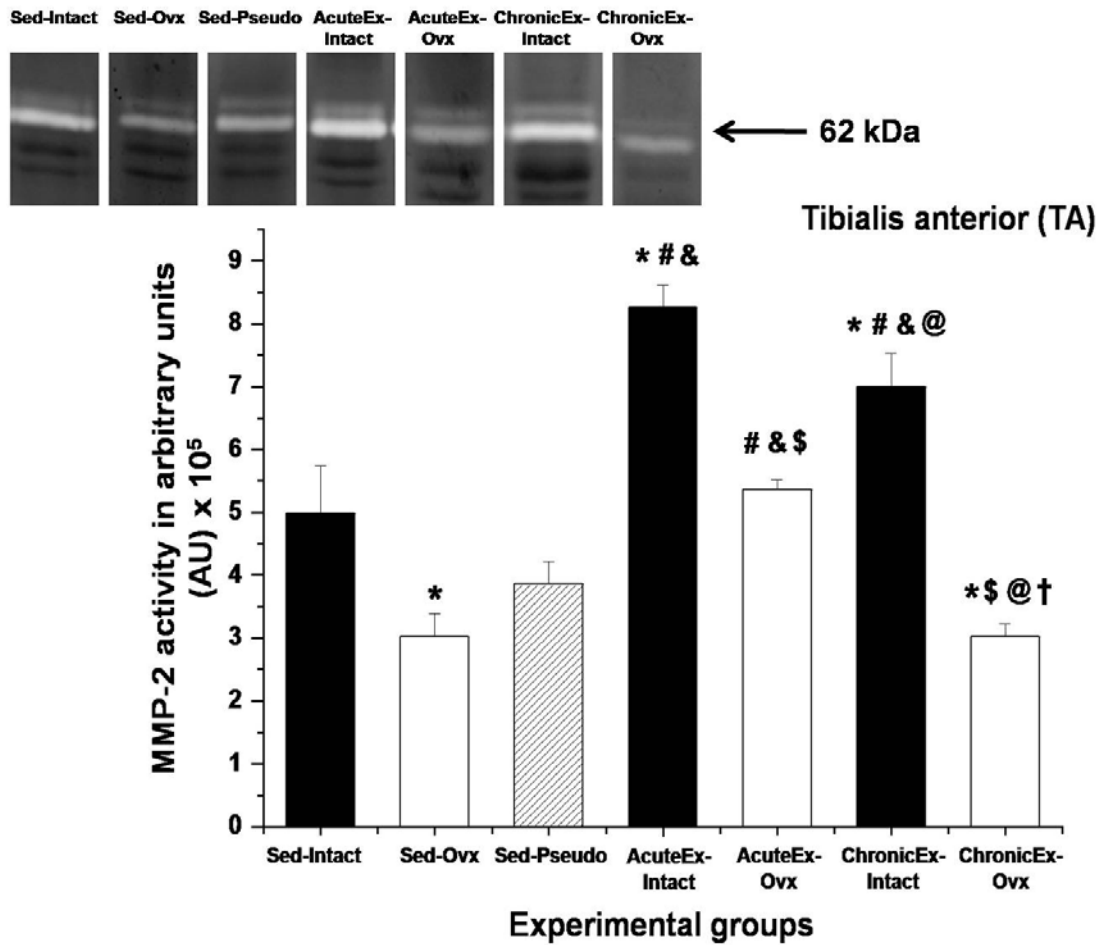


Figure 4. Analysis of MMP activity in tibialis anterior (TA) muscle extracts by zymography (n = 10 each group). The activity of the band was expressed as arbitrary units. Values are presented by means  $\pm$  standard error of the mean,  $p \leq 0.05$ . \*Statistically significant difference as compared with sedentary; #compared with Sed-Ovx; &compared with Sed-Pseudo; \$compared with AcuteEx-Intact; @compared with AcuteEx-Ovx; †compared with ChronicEx-Intact.



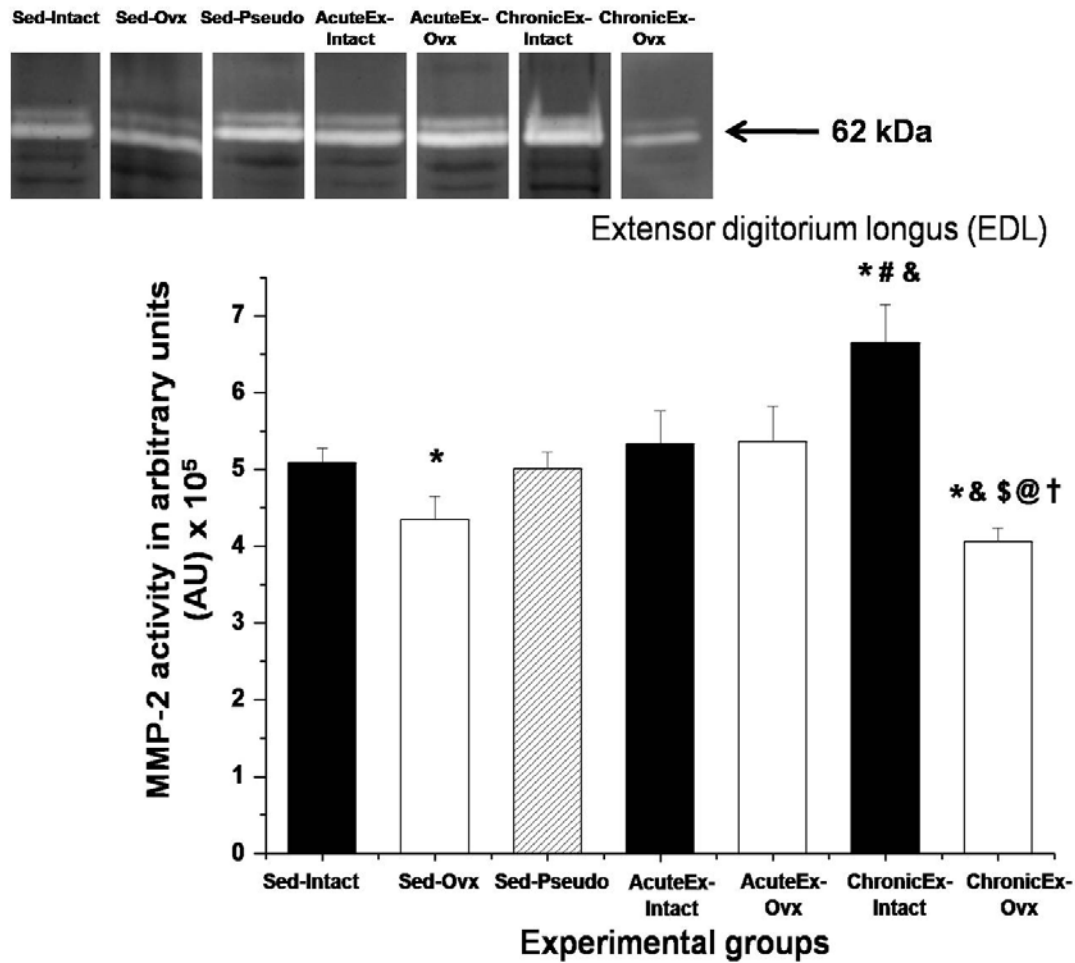


Figure 5. Analysis of MMP activity in extensor digitorum longus (EDL) muscle extracts by zymography ( $n = 10$  each group). The activity of the band was expressed as arbitrary units. Values are presented by means  $\pm$  standard error of the mean,  $p \leq 0.05$ . \*Statistically significant difference as compared with sedentary; #compared with Sed-Ovx; &compared with Sed-Pseudo; \$compared with AcuteEx-Intact; @compared with AcuteEx-Ovx; †compared with ChronicEx-Intact.

**APÊNDICE II:** Manuscrito submetido ao periódico *Journal of Sports Sciences*.

**Effects of Resistance Training on Resistin, Leptin, Cytokines and Muscle Force in Elderly Post-Menopausal Women**

Jonato Prestes<sup>a\*</sup>, Gilberto E. Shiguemoto<sup>a</sup>, João Paulo Botero<sup>a</sup>, Anelena B. Frollini<sup>b</sup>, Rodrigo Dias<sup>b</sup>, Richard D. Leite<sup>a</sup>, Guilherme B. Pereira<sup>a</sup>, Rodrigo F. Magosso<sup>a</sup>, Vilmar Baldissera<sup>a</sup>, Claudia R. Cavaglieri<sup>b</sup>, Sergio E. A. Perez<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Department of Physiological Sciences, Exercise Physiology Laboratory, Federal University of São Carlos, São Carlos-SP, Brazil.

<sup>b</sup>Health Sciences Faculty, Methodist University of Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Short Title: Resistance Training and Inflammation in Elderly Women.

\* Corresponding author: Jonato Prestes. Major José Inácio st, n.2400, zip code: 13560-161, ap: 13, São Carlos, São Paulo, Brazil. Phone number: +55 (16) 3413-2203. **E-mail:** [jonatop@gmail.com](mailto:jonatop@gmail.com)

**Abstract**

The objective of the present study was to evaluate the effects of resistance training on cytokines, leptin, resistin, and muscle strength in women. 35 sedentary post-menopausal women aged  $63.18 \pm 4.8$  years, height  $163.5 \pm 6.7$  cm, body mass  $57.84 \pm 7.7$  kg were selected. The 16 weeks periodized resistance training consisted of two weekly sessions with 3 sets of 6-14RM. Maximal strength was tested in bench press, leg press  $45^{\circ}$  and arm curl. Plasma TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-15, Leptin and Resistin were determined by ELISA. Maximal strength in bench press, leg press  $45^{\circ}$  and arm curl exhibited a significant increase. IL-6 chronically decreased compared with baseline before training. Leptin and resistin decreased 24 hours after compared with basal and reduced at baseline compared with pre-training. Periodized resistance training seems to be an important intervention to reduce systemic inflammation induced by aging.

**Keywords:** aging, inflammation, systemic biomarkers, strength training.

## Introduction

The increasing proportion of elderly women and the increased life expectancy have been raising concerns on researchers and professionals in the health field, especially regarding the physiological alterations involved in the post-menopausal period. Approximately 40% of women search for medical care to treat menopause induced symptoms, including: heat waves, night transpiration, vaginal dryness and sleep disturbances (Nedrow et al., 2006). Another important biological dysfunction in post-menopausal women is the “senile inflammation”, with a strong temporal relationship between aging, inflammation and menopause.

The gradual decrease in estrogen release in aging and post-menopausal period induce the increase in the levels of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) (Pfeilschifter et al., 2002). Elevated inflammatory cytokines are associated with increased risks of developing several types of cardiovascular disease (Reilly et al., 2005), osteoporosis (Pfeilschifter et al., 2002), diabetes mellitus (Kadoglou et al., 2007), and geriatric cachexia (Yeh et al., 2001) in later life. Several blood biomarkers are used as indicators of systemic inflammation, including IL-6, TNF- $\alpha$ , interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ ), resistin, leptin, and C reactive protein (CRP) (Reilly et al., 2005; Tilg & Moschen 2006; Stewart et al., 2007).

Hormone replacement therapy (HRT) decrease the levels of IL-6, IL-1 and TNF- $\alpha$  in healthy post-menopausal women and also prevents the increase of IL-6 plasma levels in ovariectomized rats (Pfeilschifter et al., 2002). However, HRT is not universally accepted, mainly because of contra-indications and low adhesion of some patients, the aversion by women is associated to the collateral effects, and long term risks of some type of cancers (Olson, Bandera & Orlow, 2007; Zhang et al., 2007).

The regular practice of exercise can be used as therapeutic modality to prevent aging associated degenerative processes and the increase in systemic markers of inflammation (Greiwe et al., 2001; Fatouros et al., 2005). However, with regard to inflammations markers, the studies are controversial; for example, plasma leptin levels remained unchanged after acute aerobic exercise (Ferguson et al., 2004) and decreased (Nindl et al., 2002) with acute resistance exercise in young adults. Leptin was decreased after approximately 24 h post-acute resistance exercise session, with no chronic training effect (no difference between pre-training and chronic) in type 2 diabetic patients (Kanaley et al., 2001).

There is only one study that found decreased leptin levels in older men after RT of various protocols configurations (Fatouros et al., 2005). Kadoglou et al. (2007) found a decrease in resistin and inflammatory cytokines after 16 weeks of aerobic exercise consisting of four 45-60 min sessions per week (50-85% maximum oxygen consumption [ $VO_2max$ ]). Frail elderly individuals present increased levels of TNF- $\alpha$  in the muscle compared to younger correlates, which is associated to muscle protein loss. After 3 months of resistance training muscle TNF- $\alpha$  levels were decreased (Greiwe et al., 2001).

Active exercises, that include resistance training, can increase muscle strength, skeletal muscle mass and bone mass (Barry & Carson, 2004). However, there is no consensus on the influence of a program involving resistance training on inflammatory markers levels in healthy and older individuals (Stewart et al., 2007). Recent evidence highlighted the need of studies either supporting or refuting the use of resistance exercise as an intervention in reducing inflammation in elderly people (Stewart et al., 2007; Fatouros et al., 2005).

This is the first study to investigate the effects of resistance training on systemic inflammatory markers in elderly post-menopausal women. Our hypothesis was that resistance exercise training would induce a decrease in systemic biomarkers of inflammation. Therefore, the main objective of the present study was to investigate the effects of periodized resistance training on resistin, leptin, cytokines and muscle strength in older post-menopausal women.

## **Material and methods**

### **Subjects**

Participants were recruited on a voluntary basis from local community following informative poster and lecture about the study. Each volunteer underwent a thorough physical examination, which included a medical history, resting and exercise electrocardiogram, blood pressure, and orthopedic evaluation prior to initiation of the resistance training program. After completing the clinical examinations for the inclusion, thirty five women aged  $63.18 \pm 4.8$  years, height  $163.5 \pm 6.7$  cm, body mass  $57.84 \pm 7.7$  kg, previously sedentary were selected. The inclusion criteria were: body mass index  $\leq 26 \text{ kg/m}^2$ , sedentary without any consistent exercise in the 6 months prior to the study, no hormonal reposition and no manifestation of cardiovascular or pulmonary disease. All participants signed an informed consent document which was approved by the Federal University of São Carlos Research Ethics Committee for Human use. The present research procedures were in accordance with guidelines for use of human subjects set forth by the American College of Sports Medicine.

### **Maximal strength assessments**

After two weeks of adaptation to the resistance exercise machines and clinical evaluations, maximal strength tests were performed (1RM). The 1RM tests were performed in the same day with a minimal 10 minutes of rest interval between the tests in the following order: free weight barbell bench press, leg press 45<sup>0</sup> and standing arm curl (Cybex International, Medway, MA). After a general warm-up (10 minutes of low intensity treadmill running), individuals were submitted to eight repetitions with estimated 50% of 1RM (according to each participant's capacity), after one minute of rest, three repetitions with estimated 70% of 1RM were performed. After three minutes subsequent trials were performed for one repetition with progressively heavier weights until the 1 RM was determined within three attempts, using 3- to 5-min rest periods between trials. The standardization of range of motion and movement of the exercises were conducted according to the descriptions of Brown & Weir (2001). To make sure the pre-training 1RM were stable prior to beginning training the pre-training 1RM were determined on three separate days with 2 days between them. The interclass correlation was determined between the second and the third 1RM trials. A high interclass correlation was found between the second and the third 1 RM trials (barbell bench press  $r= 0.99$ , 45<sup>0</sup> leg press  $r= 0.99$  and standing arm curl  $r= 0.99$ ). The greatest 1 RM determined from the last two trials was used as the baseline measure.

### **Resistance training**

The resistance training was conducted in the linear periodization model. In this model, also known as classic, the intensity of the training is increased in each microcycle (1 to 4 weeks) and the volume is decreased. The number of repetitions were reduced (maintaining the minimal zone established for each cycle), in reason of the increased

intensity. The applied periodization is based in previous study (Prestes et al., 2009). Training loads were monitored in each session, according to the increase in muscle capacity of the participants. Before the initiation of the periodization, participants were submitted to two weeks of resistance training adaptation, they performed one exercise for each main muscle group with two sets of 15 repetitions in each exercise; correct movement execution and familiarization to resistance exercise types were emphasized.

After adaptation period, periodization was initiated. The order of the exercises in the training sessions were: 1- barbell bench press, 2- leg press  $45^{\circ}$ , 3- seated row, 4- knee extension, 5- lateral raise, 6- knee flexion, 7- arm extension, 8- hip adduction and abduction, 9- arm curl and 10- standing calf raise. Additionally, at the end of each training session abdominal crunches, 3 sets of 20-30 repetitions were included. Training lasted 4 months, with two weekly sessions, in each of the listed exercises three sets to concentric failure were performed (impossibility to perform a repetition with the correct movement pattern); the number of repetitions and rest between sets and exercises were followed according to the weekly prescribed intensity, as presented in figure 1. The mean duration of each session was of 50 minutes. The duration of each repetition was 3-4s, counting with the concentric and eccentric muscle actions. All sessions were supervised by an experienced strength training professional.

In the four initial weeks 3 sets of 12-14RM were be performed; from the 5<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup> week 3 sets of 10-12RM; from the 8<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> week 3 sets of 8-10RM; and from the 13<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> 3 sets of 6-8RM. In all weeks, maximal repetitions to concentric failure were performed for the proposed intensities. The loads were monitored in each session. At the entire training duration, three sets were performed, independently of the intensity; the rest interval was followed according to the intensity (figure 1); loads were adjusted to maintain the number of maximal repetitions.



### **Serum cytokines, Leptin and Resistin determination**

Blood samples of 3ml were drawn from the antecubital vein in vacuutainer tubes. These samples were centrifuged at 2500rpm in 4°C during 20 minutes. Samples were stored in aliquots with eppendorffs at -80°C freezer until analysis. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-15, Leptin and Resistin dosages were determined by ELISA method (Immune Enzymatic Essay in Solid Phase), according to specifications of the R&D Systems Quantikine High Sensitivity Kit (R&D Systems Minneapolis, MN). The results were presented in pg/ml. All samples were determined in duplicate to guarantee the precision of the results. Cytokines and biomarkers were evaluated before, immediately after, 24h and 48h after the first resistance training session and at the same periods after four months. The intra-assay coefficient of variance (CV) was 3.1–9.7%, the inter-assay CV was 6.3–7%, and the sensitivity was 0.0086 pg/ml.

### **Statistical Analysis**

Data were presented as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). Initially, the normality Shapiro Wilk and the homocedasticity (Bartlet criteria) tests were done. All variables presented a normal distribution and homocedasticity, so a repeated measures analysis of variance (ANOVA) was used. The Tukey's post hoc test was applied where indicated by ANOVA. To test for significant differences between pre versus post-training 1RM tests, paired student t test was used. In all calculations the alpha level was set at  $p \leq 0.05$ . The software package used for all analyses was Statistica<sup>®</sup> 6.1 (Stat. Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

## Results

### Maximal strength

There was a significant increase in barbell bench press, leg press 45<sup>0</sup> and standing arm curl maximal strength comparing the evaluation before with the evaluation after 16 weeks of training,  $p \leq 0.05$  (table 1).

### Cytokines, Leptin and Resistin

There were no statistically significant acute or chronic alterations in TNF- $\alpha$  plasma levels during the study (figure 2). On the other hand, IL-6 plasma levels were acutely decreased after 48 hours as compared with basal levels in the evaluation before training. Additionally, IL-6 was also acutely decreased after 48 hours as compared with immediately after in the evaluation after 16 weeks of training. There was a chronic decrease in IL-6, evidenced by the difference between basal levels before and after training (figure 3). The only alteration observed in IL-15 plasma levels was an acute increase after 48 hours compared with basal levels in the evaluation before training, (figure 4). In the other periods, no acute or chronic statistically significant differences were observed for IL-15.

Leptin plasma levels exhibited a decrease 24 hours after the first resistance exercise as compared with basal levels. However, after 48 hours these levels increased as compared with 24 hours after in the evaluation before training. Both, basal and 48 hours values were chronically decreased as compared with basal and 48 hours after 16 weeks of training, respectively (figure 5). There was a significant decrease in resistin levels after 24 and 48 hours compared with basal levels and after 24 hours compared with immediately after in the evaluation before training. Resistin also exhibited a

chronic decrease in basal and immediately after levels as compared with the same periods of evaluation before training (figure 6).

### **Discussion**

The main findings of the present study were the increased maximal strength in both, lower and upper body, chronic decreased plasma levels of IL-6, leptin and resistin, with minor or no alterations in IL-15 and TNF- $\alpha$  after 16 weeks of resistance training. Until the moment, this is the first study to investigate these important inflammatory markers together in elderly women after resistance training. Thus, our initial hypothesis has been confirmed, since reduced levels of plasma inflammation markers were observed, along with increase in muscle force.

Barry & Carson (2004) commented that older adults undertake resistance training programs to combat the substantial declines in muscular strength and power with the view to improving or maintaining functional capabilities. In the present study there was a significant increase in upper and lower body maximal dynamic strength in elderly women submitted to 16 weeks of periodized resistance training with loads between 6-14RM.

According to Starkweather (2007) several biochemical markers of inflammation have been used in recent physical activity intervention studies. For example, IL-6 and TNF- $\alpha$  are proinflammatory cytokines defined as soluble mediators that are released from various cells (macrophage/monocyte lineage). In particular, IL-6 is a multifunctional cytokine that plays pleiotropic roles in immune regulation, inflammation and its overproduction is associated with aging cardiovascular disease, osteoporosis, rheumatoid arthritis, type II diabetes, and Alzheimer's disease (Kiecolt-Glaser et al., 2003). Elevated IL-6 levels are also associated with frailty, functional

capacity decline, decreased muscle strength, and may be used as a predictor of future disability in older adults (Cohen et al., 1997; Ferrucci et al., 2001).

Plasma IL-6 increases during acute exercise in proportion to intensity, duration, and level of fitness. IL-6 has been suggested as an important factor for the process of muscle repair and cell turnover, as well as for some of the beneficial health effects of exercise (Maggio et al., 2006). In contrast to these acute effects, chronically exercised individuals tend to have lower levels of IL-6 and other inflammatory markers (Elosua et al., 2005). For instance, older men and women between 60-90 years old submitted to 30 minutes of walking, five times per week at 60% of their heart rate for 10 weeks exhibited significant decrease in serum IL-6, and improvements in stress state, mood, and several quality of life indices (Starkweather, 2007). A study with 3,075 adults aged 70 to 79 found that individuals who reported higher levels of physical activity had significantly lower levels of IL-6 (Colbert et al., 2004). Literature shows support for either exercise-induced reductions (Castaneda et al., 2004) or unchanged levels (White, Castellano & McCoy, 2006) of plasma/serum inflammatory cytokines.

However, the studies that investigated the effects of resistance training in elderly are sparse and showed contrasting results. Bautmans et al. (2005) found a trend for a decrease in concentrations of circulating IL-6 after six weeks of periodized resistance training in elderly individuals. There were no significant alterations in circulating IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 or IL-6 after 12 weeks of progressive resistance training in elderly subjects (Kapasi et al., 2003). Differently, in the present study there was a significant chronic decrease in IL-6 plasma levels after 16 weeks of resistance training. It is possible that a longer time (>12 weeks) could be necessary to bring out chronic alterations in plasma IL-6. There was no chronic effect of 16 weeks of resistance training on plasma TNF- $\alpha$ , consistent with the above mentioned studies.

IL-15 was initially identified as a T-cell growth factor and shares many properties and functions with IL-2 (Giri et al., 1995). Besides IL-15 immune functions, this cytokine serves as a growth factor, which is highly expressed in skeletal muscle resulting in tissue hypertrophy (Nielsen & Pedersen, 2007). An *in vivo* study indicate that systemic administration of IL-15 in muscle wasting rats with cancer cachexia decreases muscle protein degradation, preserving lean body mass (Carbo et al., 2000). Ostrowski et al. (1998) found no alterations in plasma IL-15 (measured up to 6 hours after exercise) in response to 2.5h of treadmill running at 75% of  $VO_2$ max. After 10 weeks of resistance training 3sessions/week with loads set at 80% of 1RM there was an acute increase immediately after exercise but not chronic in plasma IL-15 in young individuals (Riechman et al., 2004). In the present study, we found an increase in IL-15 plasma levels 48h after the first resistance exercise session compared with baseline values. Similarly to the above mentioned studies, no chronic effect of training was observed. It is possible that this cytokine is involved in acute muscle repair and growth after resistance training sessions, acting more locally than presenting chronic plasma alterations.

Leptin is a hormone/cytokine released from adipose tissue, which may have an effect on appetite. Circulating leptin levels increase with weight gain and decrease with weight loss (Fatouros et al., 2005). With regard to the immune system, leptin typically exerts proinflammatory effects on the organism. There is evidence that leptin may trigger the growing of several cancer cells, including pancreatic, ovarian, prostate cells, pulmonary carcinomas and gastric cells (Tilg & Moschen 2006). Leptin signals directly to  $OBR_b$  receptors on the surface of macrophages membrane, inducing the synthesis of proinflammatory cytokines as  $TNF-\alpha$ , IL-6 and IL-12 (Tilg & Moschen 2006).

Exercise alters the homeostasis of energy balance, sympathoadrenal discharge, as well as hormonal and metabolic responses, which may influence leptin levels at rest or during exercise. Some previous studies examined the effects of acute, but not chronic, exercise on plasma leptin levels. For example, type 2 diabetic individuals exhibited a significant 30% reduction in resting leptin levels 24 h after a single bout of resistance exercise, with no chronic training effect after six weeks (Kanaley et al., 2001). Leptin exhibited a delayed reduction 9-13 hours in the systemic circulation after an acute resistance-exercise protocol for the main muscle groups with loads between 70-85% of 1RM (Nindl et al., 2002). The acute alterations resulting from different resistance exercise intensities on plasma leptin levels, maximal strength (4 sets of five repetitions at 88% of 1RM with 3 min of rest between sets), muscular hypertrophy (4 sets of 10 repetitions at 75% of 1RM with 2 min of rest between sets), and strength endurance (4 sets of 15 repetitions at 60% of 1RM with 1 min of rest between sets) were tested in young individuals; the results showed a significant decrease in leptin 30 minutes after exercise, with no difference between the protocols (Zafeiridis et al., 2003). Similarly, in the present study leptin decreased 24 hours after the first acute resistance exercise session and returned to pre-exercise values after 48 hours in older post-menopausal women.

However, there is lack of information available regarding the chronic effects of resistance training on leptin older adults. Fatouros et al. (2005) tested the effect of different resistance exercise intensities in overweight inactive elderly subjects, low intensity (45-50% of 1RM), moderate intensity (60-65% of 1RM) and high intensity (80-85% of 1RM). The training protocol was performed three times per week for 24 weeks, all groups presented significant chronic decrease in leptin plasma levels, with greater reductions for the high intensity group. After 24 weeks of detraining leptin

values increased again. In our study, it was observed a significant chronic decrease in serum leptin after 16 weeks of resistance training. Possible explanation for leptin decline induced by resistance exercise is due to elevated glucose uptake by peripheral tissues in the presence of lactate, induced acidosis, augmented sympathoadrenal discharge and energy expenditure, glycogen depletion, and glycolysis inhibition (Fatouros et al., 2005).

Another inflammatory biomarker and risk factor of atherosclerotic cardiovascular disease is resistin (Reilly et al., 2005). Jamurtas et al. (2006) showed no acute alteration of resistin plasma levels up to 48h after a 45 minutes cycle ergometer exercise bout at 65% of the  $VO_2$ max in middle aged overweight males. Another study did not find chronic alterations in resistin levels after 14 weeks of aerobic training that consisted of supervised walking program 3 to 4 times per week for 60 minutes at 65% to 70%  $VO_2$  peak in diabetic post-menopausal women (Giannopoulou et al., 2005). On the other hand, older diabetic individuals submitted to 16 weeks of aerobic exercise training with four 45-60 minutes sessions per week at 50-85% of the  $VO_2$ max exhibited a significant chronic decrease in resistin levels (Kadoglou et al., 2007). A recent study found a significant decrease in resistin levels after 8 weeks of supervised aerobic training in overweight adolescents (Jones et al., 2009). The present study is the first that examined the effects of acute and chronic resistance training on resistin plasma levels in older post-menopausal women. The results pointed to a decrease after 24 and 48h after the acute exercise session compared with baseline values and significant reductions after 16 weeks of training compared to baseline and immediately after values. It is possible that resistin is affected by the type and intensity of exercise, aerobic versus resistance training, duration of the study and population analyzed.

In summary, the present study brings up important clinical effects of periodized resistance exercise training on muscle force and inflammatory biomarkers in postmenopausal elderly women. 16 weeks of resistance training induces increase in upper and lower body muscle force, chronic decline in IL-6, leptin and resistin serum levels with minor or no effects on IL-15 and TNF- $\alpha$ . These results outline the importance of resistance exercise as a non pharmacological tool in the treatment of aging associated inflammation.

### References

- Barry, B.K., & Carson, R.G. (2004). The Consequences of Resistance Training for Movement Control in Older Adults. *Journal of Gerontology: Biological Science Medical Sciences*, 59, 730-754.
- Bautmans, I., Njemini, R., Vasseur, S., Chabert, H., Moens, L., Demanet, C., et al. (2005). Biochemical changes in response to intensive resistance exercise training in the elderly. *Gerontology*, 51, 253-65.
- Brown, L.E., & Weir, JP. (2001). Procedures Recommendation I: Accurate Assessment of Muscular Strength and Power. *Journal of Exercise Physiology Online*, 4, 1-21.
- Carbo, N., Lopez-Soriano, J., Costelli, P., Busquets, S., Alvarez, B., Baccino, F.M., et al. (2000). Interleucin-15 antagonizes muscle proyein waste in tumor-bearing rats. *British Journal of Cancer*, 83, 526-531.
- Castaneda, C., Gordon, P.L., Parker, R.C., Uhlin, K.L., Roubenoff, R., & Levey, A.S. (2004). Resistance training to reduce the malnutrition-inflammation complex syndrome of chronic kidney disease. *American Kidney Disease*, 43, 607-616.
- Cohen, H.J., Pieper, C.F., Harris, T.B., Rao, K.M., & Currie, M.S. (1997). The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling



- elderly. *Journal of Gerontology: Biological Sciences Medical Sciences*, 52, 201-208.
- Colbert, L.H., Visser, M., Simonsick, E.M., Tracy, R.P., Newman, A.B., Kritchevsky, S.B., et al. (2004). Physical activity, exercise, and inflammatory markers in older adults: Findings from the Health, Aging, and Body Composition Study. *Journal of American Geriatric Society*, 52, 1098-1104.
- Elosua, R., Bartali, B., Ordovas, J.M., Corsi, A.M., Lauretani, F., & Ferrucci, L. (2005). InCHIANTI Investigators: Association between physical activity, physical performance, and inflammatory biomarkers in an elderly population: the InCHIANTI study. *Journal of Gerontology: Biological Sciences Medical Sciences*, 60, 760-767.
- Fatouros, I.G., Tournis, S., Leontsini, D., Jamurtas, A.Z., Sxina, M., Thomakos, P., et al. (2005). Leptin and Adiponectin Responses in Overweight Inactive Elderly following Resistance Training and Detraining Are Intensity Related. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90, 5970-5977.
- Ferguson, M.A., White, L.J., McCoy, S., Kim, H.W., Petty, T., & Wilsey, J. (2004). Plasma adiponectin response to acute exercise in healthy subjects. *European Journal of Applied Physiology*, 91, 324-329.
- Ferrucci, L., Penninx, B.W.J., Volpato, S., Harris, T.B., Bandeen-Roche, K., Balfour, J., et al. (2002). Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. *Journal of American Geriatric Society*, 50, 1947-1954.
- Giannopoulou, I., Fernhall, B., Carhart, R., Weinstock, R.S., Baynard, T., Figueroa, A., et al. (2005). Effects of diet and/or exercise on the adipocytokine and inflammatory

- cytokine levels of postmenopausal women with type 2 diabetes. *Metabolism*, 54, 866-875.
- Giri, J.G., Anderson, D.M., Kumaki, S., Park, L.S., Grabstein, K.H., & Cosman, D. (1995). IL-15, a novel T-cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *Journal of Leukocyte Biology*, 57, 763–766.
- Greiwe, J.S., Cheng, B.O., Rubin, D.C., Yarasheski, K.E., & Semenkovich, C.F. (2001). Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor  $\alpha$  in frail elderly humans. *FASEB Journal*, 15, 475-482.
- Jamurtas, A.Z., Theocharis, V., Koukoulis, G., Stakias, N., Fatouros, I.G., Kouretas, D., et al. (2006). The effects of acute exercise on serum adiponectin and resistin levels and their relation to insulin sensitivity in overweight males. *European Journal of Applied Physiology*, 97, 122-126.
- Jones, T.E., Basilio, J.L., Brophy, P.M., McCammon, M.R., & Hickner, R.C. (2009). Long-term Exercise Training in Overweight Adolescents Improves Plasma Peptide YY and Resistin. *Obesity*, 26, in press.
- Kadoglou, N.P., Perrea, D., Iliadis, F., Angelopoulou, N., Liapis, C., & Alevizos, M. (2007). Exercise Reduces Resistin and Inflammatory Cytokines in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 30, 719–721.
- Kanaley, J.A., Fenicchia, L.M., Miller, C.S., Ploutz-Snyder, L.L., Weinstock, R.S., Carhart, R., et al. (2001). Resting leptin responses to acute and chronic resistance training in type 2 diabetic men and women. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 25, 1474-80.
- Kapasi, Z.F., Ouslander, J.G., Schnelle, J.F., Kutner, M., & Fahey, J.L. (2003). Effects of an exercise intervention on immunologic parameters in frail elderly nursing

- home residents. *Journal of Gerontology: Biological Sciences Medical Sciences*, 58, 636–643.
- Kiecolt-Glaser, J.K., Preacher, K.J., MacCallum, R.C., Atkinson, C., Malarkey, W.B., & Glaser, R. (2003). Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 9090-9095.
- Maggio, M., Guralnik, J.M., Longo, D.L., & Ferrucci L. (2006). Interleukin-6 in Aging and Chronic Disease: A Magnificent Pathway. *Journal of Gerontology: Biological Sciences Medical Sciences*, 61, 575–584.
- Nedrow, A., Miller, J., Walker, M., Nygren, P., Huffmann, L.H., & Nelson. H.D. (2006). Complementary and Alternative Therapies for the Management of Menopause-Related Symptoms. *Archives of Internal Medicine*, 166, 1453-1465.
- Nielsen, A.R., & Pedersen, B.K. (2007). The biological roles of exercise-induced cytokines: IL-6, IL-8, and IL-15. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*, 32, 833-839.
- Nindl, B.C., Kraemer, W.J., Arciero, P.J., Samatallee, N., Leone, C.D., Mayo, M.F., et al. (2002). Leptin concentrations experience a delayed reduction after resistance exercise in men. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 34, 608-613.
- Olson, S.H., Bandera, E.V., & Orlow, I. (2007). Variants in Estrogen Biosynthesis Genes, Sex Steroid Hormone Levels, and Endometrial Cancer: A Huge Review. *American Journal of Epidemiology*, 165, 235–245.
- Ostrowski, K., Hermann, C., Bangash, A., Schjerling, P., Nielsen, J.N., & Pedersen, B.K. (1998). A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *Journal Physiology*, 513, 889-894.

- Pfeilschifter, J., Ködtiz, R., Pffhol, M., & Schatz, H. (2002). Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocrine Reviews*, 23, 90-119.
- Prestes, J., De Lima, C., Frollini, A.B., Donatto, F.F., & Conte, M. (2009). Comparison of linear and reverse linear periodization effects on maximal strength and body composition. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 23, 266-274.
- Reilly, M.P., Lehrke, M., Wolfe, M.L., Rohatgi, A., Lazar, M.A., & Rader, D.J. (2005). Resistin Is an Inflammatory Marker of Atherosclerosis in Humans. *Circulation*, 111, 932–939.
- Riechman, S.E., Balasekaran, G., Roth, S.M., & Ferrell, R.E. (2004). Association of interleukin-15 protein and interleukin-15 receptor genetic variation with resistance exercise training responses. *Journal of Applied Physiology*, 97, 2214–2219.
- Starkweather, A. (2007). The Effects of Exercise on Perceived Stress and IL-6 Levels Among Older Adults. *Biological Research for Nursing*, 8, 186–194.
- Stewart, L.K., Flynn, M.G., Campbell, W.W., Craig, B.A., Robinson, J.P., Timmerman, K.L., et al. (2007). The Influence of Exercise Training on Inflammatory Cytokines and C-Reactive Protein. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 39, 1714-1719.
- Tilg, H., & Moschen, R.A. (2006). Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature*, 6, 772-783.
- White, L.J., Castellano, V., & McCoy, S.C. (2006). Cytokine responses to resistance training in people with multiple sclerosis. *Journal of Sports Sciences*, 24, 911-914.

Yeh, S.S., Wu, S., Levine, D.M., Parker, T.S., Olson JS, Stevens, M.R., et al. (2001).

The correlation of cytokine levels with body weight after megestrol acetate treatment in geriatric patients. *Journal of Gerontology: Medical Sciences*, 56, 48-54.

Zafeiridis, A., Smilios, I., Considine, R.V., & Tokmakidis, S.P. (2003). Serum leptin

responses after acute resistance exercise protocols. *Journal of Applied Physiology*, 94, 591–597.

Zhang, S.M., Manson, J.E., Rexrode, K.M., Cook, N.R., Buring, J.E, & Lee, I. (2007).

Use of Oral Conjugated Estrogen Alone and Risk of Breast Cancer. *American Journal of Epidemiology*, 165, 524–529.

Table 1. Dynamic maximal strength tests (1RM) before and after 16 weeks of training.

<b>Maximal strength test (1RM)</b>	<b>Evaluation before training</b>	<b>Evaluation after 16 weeks</b>
Barbell bench press (kg)	31.83 ± 0.80	38.34 ± 1.15*
Leg press 45° (kg)	172.21 ± 5.57	225.17 ± 7.06*
Standing arm curl (kg)	20.76 ± 0.45	22.75 ± 0.51*

Results are presented as means ± standard error of the mean (SEM). \*Statistically significant difference as compared with the evaluation before training, (n= 35),  $p \leq 0.05$ .

Figure 1. Resistance training program.

Sets x repetitions	Rest interval between sets and exercises
<b>3 x 12-14 RM</b>	<b>1 minute</b>
<b>3 x 10-12 RM</b>	<b>1 minute and 20 seconds</b>
<b>3 x 8-10 RM</b>	<b>1 minute and 40 seconds</b>
<b>3 x 6-8 RM</b>	<b>2 minutes</b>

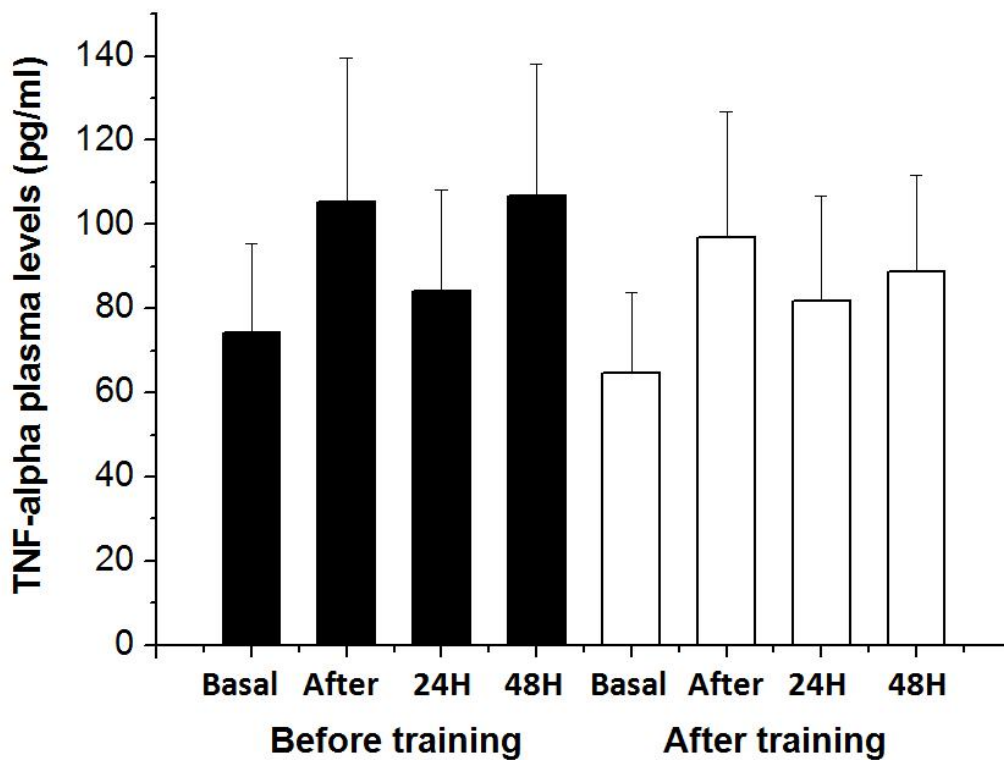


Figure 2. Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) plasma levels (pg/ml). The values are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $n= 35$ ),  $p \leq 0.05$ . TNF- $\alpha$  was evaluated at baseline (basal), immediately after (After), 24 hours (24H) and 48 hours (48H) after the first resistance exercise session (black bars), and after 16 weeks of training (white bars).



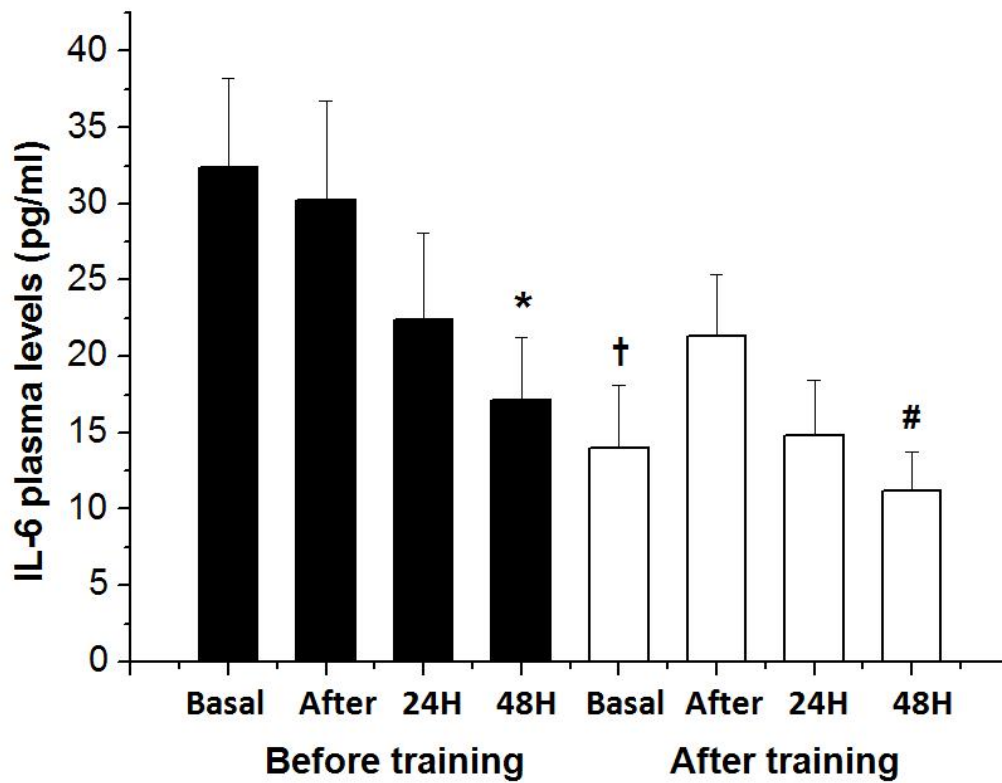


Figure 3. Interleukin-6 (IL-6) plasma levels (pg/ml). The values are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $n=35$ ),  $p \leq 0.05$ . IL-6 was evaluated at baseline (basal), immediately after (After), 24 hours (24H) and 48 hours (48H) after the first resistance exercise session (black bars), and after 16 weeks of training (white bars). \*Statistically significant difference as compared with basal levels. #Statistically significant difference as compared with immediately after. †Statistically significant difference as compared with the same period of evaluation before training.

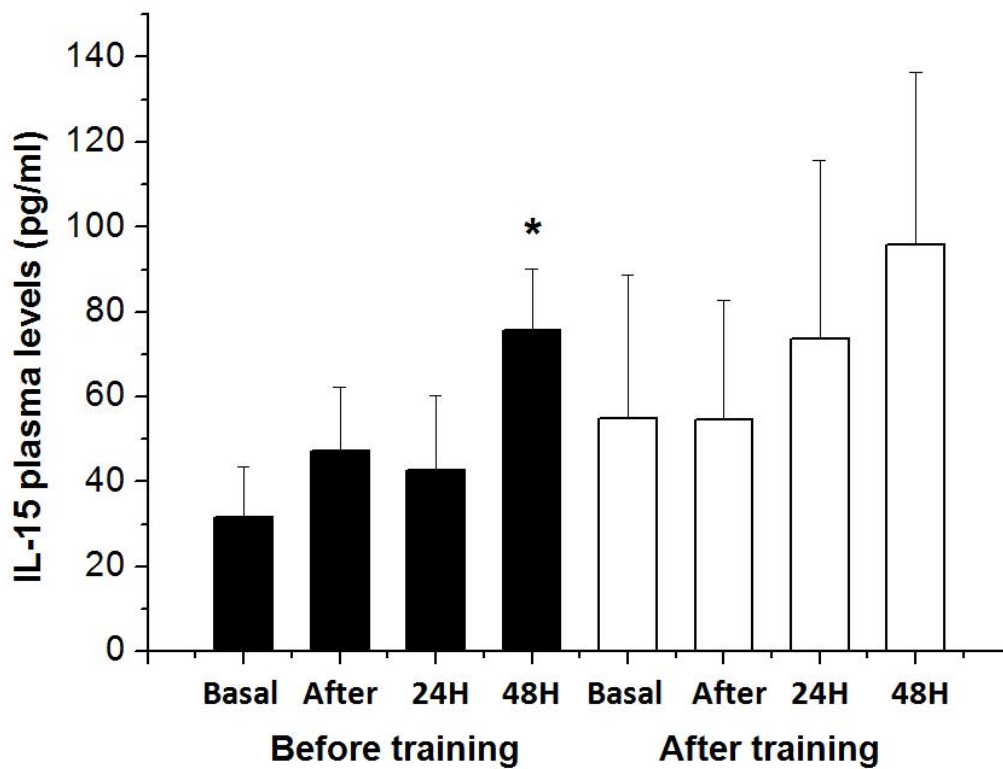


Figure 4. Interleukin-15 (IL-15) plasma levels (pg/ml). The values are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $n= 35$ ),  $p \leq 0.05$ . IL-15 was evaluated at baseline (basal), immediately after (After), 24 hours (24H) and 48 hours (48H) after the first resistance exercise session (black bars), and after 16 weeks of training (white bars).

\*Statistically significant difference as compared with basal levels.

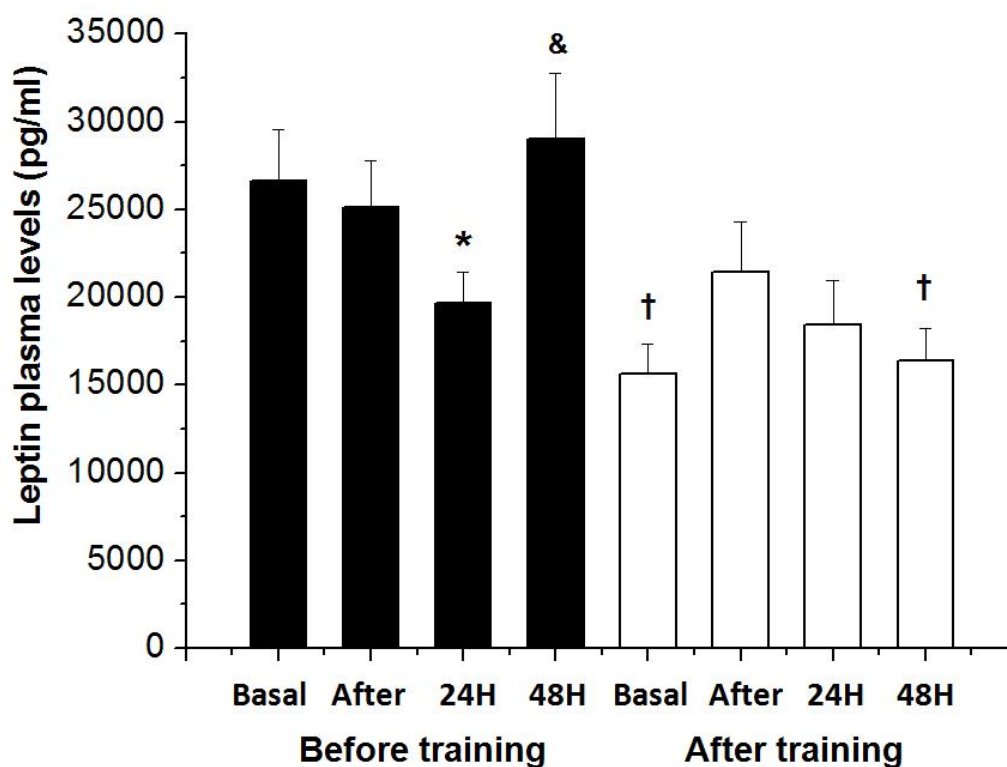


Figure 5. Leptin plasma levels (pg/ml). The values are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $n=35$ ),  $p \leq 0.05$ . Leptin was evaluated at baseline (basal), immediately after (After), 24 hours (24H) and 48 hours (48H) after the first resistance exercise session (black bars), and after 16 weeks of training (white bars). \*Statistically significant difference as compared with basal levels. &Statistically significant difference as compared with 24 hours after. †Statistically significant difference as compared with the same period of evaluation before training.

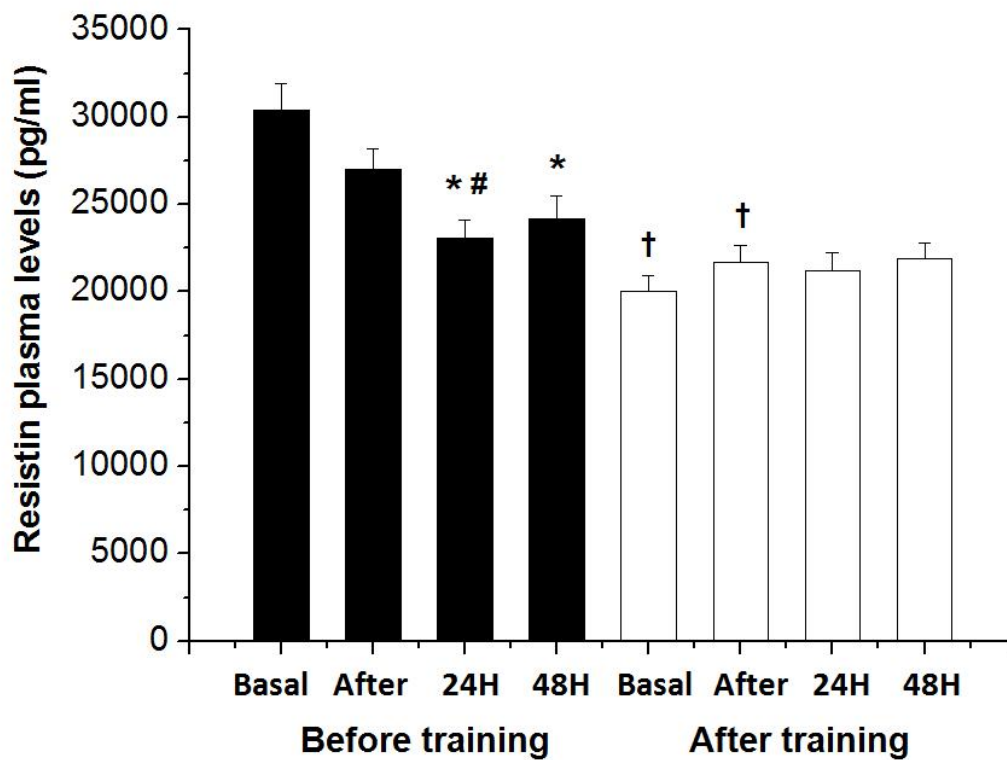


Figure 6. Resistin plasma levels (pg/ml). The values are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $n=35$ ),  $p \leq 0.05$ . Resistin was evaluated at baseline (basal), immediately after (After), 24 hours (24H) and 48 hours (48H) after the first resistance exercise session (black bars), and after 16 weeks of training (white bars). \*Statistically significant difference as compared with basal levels. #Statistically significant difference as compared with immediately after. †Statistically significant difference as compared with the same period of evaluation before training.