



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA DO EXERCÍCIO

EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO E DA OVARIECTOMIA SOBRE
MARCADORES DE BIOGÊNESE MITOCONDRIAL E CAPACIDADE OXIDATIVA
DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS.

Marina Rodrigues Barbosa

São Carlos - SP, 2015

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO E DA OVARIECTOMIA SOBRE
MARCADORES DE BIOGÊNESE MITOCONDRIAL E CAPACIDADE OXIDATIVA
DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA DO EXERCÍCIO

EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO E DA OVARECTOMIA SOBRE
MARCADORES DE BIOGÊNESE MITOCONDRIAL E CAPACIDADE OXIDATIVA
DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS.

Marina Rodrigues Barbosa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas de Associação Ampla entre a Universidade Federal de São Carlos e a Universidade Estadual Paulista-Araraquara do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Fisiologia do Exercício.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez

São Carlos - SP, 2015.

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

B238et Barbosa, Marina Rodrigues.
Efeitos do treinamento resistido e da ovariectomia sobre
marcadores de biogênese mitocondrial e capacidade
oxidativa do músculo esquelético de ratas / Marina
Rodrigues Barbosa. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
91 f.

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

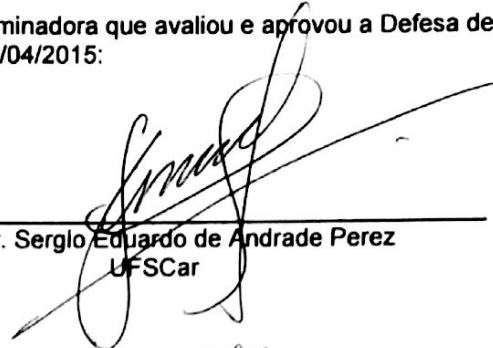
1. Fisiologia. 2. Biogênese mitocondrial. 3. Ovariectomia.
4. Treinamento resistido. 5. Estrógenos. 6. Músculo
esquelético. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

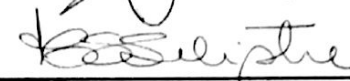


Folha de Aprovação

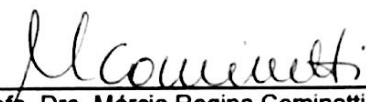
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Marina Rodrigues Barbosa, realizada em 10/04/2015:




Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez
UFSCar



Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo
UFSCar



Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar



Profa. Dra. Ellen Cristini de Freitas
USP



Profa. Dra. Fulvia de Barros Machado Gobatto
UNICAMP

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a todas as pessoas que compreendem a importância e a beleza da busca pelo entendimento de fatos e fenômenos, e em especial aos meus queridos pais, João Haroldo e Rosa, aos meus irmãos Fabiana e Guilherme e ao meu marido Raphael, que em um mundo repleto de lógica, mostraram-me o que é mais abstrato e mais verdadeiro em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo dom maior da vida, e por ter me dado saúde, perseverança, amigos e por ter guiado meus passos até aqui!

Aos meus pais e irmãos, nos quais sempre me espelhei, Rosa, João Haroldo, Guilherme e Fabiana, e também pelo incentivo incansável da busca por objetivos intelectuais e honestos. Agradeço também pelo GRANDE AMOR, carinho, zelo, compreensão, amizade..., enfim, por TUDO.

Ao meu esposo e companheiro, Raphael, pelo incentivo, companheirismo e pela compreensão de todos os momentos que tive que me ausentar para a realização deste trabalho. Obrigada pela possibilidade de compartilhar as alegrias, conquistas e desabafos.

Ao meu orientador, Prof. Sérgio Eduardo de Andrade Perez, agradeço pela amizade, orientação e incentivo intelectual. Sua grande experiência científica e de vida foi especialmente valiosa na minha jornada acadêmica. Obrigada pela confiança em mim depositada!

Ao professor e amigo Gilberto Eiji Shiguemoto, toda minha gratidão e admiração, agradeço pela amizade, pelos ensinamentos, colaboração e apoio, que sem dúvidas foram determinantes para a realização deste trabalho.

À Profa. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, por ter aberto as portas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, e pelos seus ensinamentos e colaboração com este trabalho.

Aos demais professores do programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas, pela contribuição em minha formação.

Agradeço a toda equipe de amigos do Laboratório de Fisiologia do Exercício os quais de maneira fundamental contribuíram para a concretização deste trabalho, sem esquecer os momentos agradáveis da hora do café, onde juntos ficamos por várias vezes. Agradeço pela convivência, pelos ensinamentos, pela participação, por serem mais que uma equipe amiga, mas Amigos que trabalharam em equipe e que tive o prazer e o privilégio de trabalhar junto: Fabiano, Luciane, Gustavo, Natália, Cristiane, Luisa, Anderson, Daiana, Gabi, Guilherme, Danilo (Salsicha), Markus, Mateus, Ciça, Marina Zambon, Maria Fernanda, Tatiane, Anderson, Fernanda, Jeferson.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior - CAPES pela bolsa de estudo a mim fornecida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP nº processo: 2011/21607-5 como fomentadora do Projeto.

Se o desafio era enorme, as motivações foram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de angústia e sofrimento em uma estrada larga, margeada de flores, frutos e frondosas árvores! A base foi a busca de saberes, representada por um “feixe de possíveis”.

Agradeço a todos pela paciência, companheirismo e pelos ensinamentos.

MUITÍSSIMO GRATA A TODOS!!!

RESUMO

BARBOSA, M. R. Efeitos do treinamento resistido e da ovariectomia sobre marcadores de biogênese mitocondrial e capacidade oxidativa do músculo esquelético de ratas, 2015. 92 f. Tese de Doutorado. Laboratório de Fisiologia do Exercício, Departamento de Ciências Fisiológicas - DCF, Centro de Ciências biológicas e da Saúde - CCBS, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

Introdução: A diminuição da produção regular do estrógeno que ocorre na menopausa é tipicamente seguida pelo aumento de várias alterações deletérias no sistema musculoesquelético. A menopausa é mimetizada experimentalmente por uma técnica chamada ovariectomia. A ovariectomia produz aumento da massa corporal total, alterações na composição corporal e no perfil lipídico, redução da musculatura esquelética (sarcopenia) e da massa mineral óssea (osteopenia). As mitocôndrias desempenham papel crucial em uma miríade de processos celulares que incluem fosforilação oxidativa, vias de biossíntese e programação da morte celular. Alteração dos marcadores de biogênese mitocondrial em ratas ovariectomizadas, bem como os efeitos do treinamento resistido e reposição de estrógeno não são totalmente conhecidas. **Objetivos:** Investigar os efeitos da ovariectomia, do treinamento resistido e da reposição de estrógeno sobre a biogênese mitocondrial e capacidade oxidativa do músculo esquelético de ratas. **Materiais e Métodos:** A reposição de estrógeno foi realizada com cápsula Silastic. O treinamento resistido consistiu de 12 semanas em que os animais subiram uma escada com pesos atados às suas caudas. A expressão gênica foi analisada por RT-PCR e o conteúdo de proteína por Western Blotting. **Resultados:** A deficiência de estrogênio, associada à ovariectomia, reduziu a expressão gênica de marcadores de biogênese mitocondriais, tais como PGC-1 α (~ 73%), NRF-1 (~ 44%), TFAM (~ 53%) ($p < 0,05$) e o conteúdo de proteína relacionada à capacidade oxidativa, como AMPK, CREB e AKT quando comparado com grupo Sham-Sed. O treinamento resistido aumentou esses marcadores, tais como PGC-1 α (~ 59%) e TFAM (~ 48%) em relação ao grupo Ovx-Sed. **Conclusões:** O presente estudo mostrou que a remoção dos ovários afeta fatores de transcrição que regulam a biogênese mitocondrial no músculo esquelético. De acordo com os nossos resultados e evidências da literatura, os níveis de estradiol e de exercício parecem desempenhar um papel importante na proteção da disfunção mitocondrial no músculo esquelético de ratas.

Palavras-chave: Biogênese mitocondrial, ovariectomia, treinamento resistido, reposição de estrógeno, músculo esquelético e ratas.

ABSTRACT

BARBOSA, M. R. Effects of resistance training and ovariectomy on mitochondrial biogenesis and oxidative capacity markers of skeletal muscle of rats, 2015. 89 p. Exercise Physiology Laboratory, Physiological Sciences Department, Biological and Health Sciences Center, Federal University of Sao Carlos - UFSCar.

Introduction: The decrease of regulate the estrogen production that occurs at menopause is typically followed by increase of several deleterious changes in the skeletal muscle system. Menopause is mimicked experimentally by a technique called ovariectomy. The ovariectomy produces increased total body mass, changes in body composition and lipid profile, reduction in skeletal muscle (sarcopenia) and bone mineral mass (osteopenia). Mitochondria play a crucial role in a myriad of cellular processes including oxidative phosphorylation, biosynthetic pathways and programming of cell death. Alteration of mitochondrial biogenesis markers in ovariectomized rats and the effects of resistance training (RT) and estrogen replacement (RE) are unclear. **Purpose:** This study aimed to investigate the effects of Ovariectomy (Ovx), RT and ER on markers of mitochondrial biogenesis and protein expression related to oxidative capacity in the rat gastrocnemius pool. **Methods:** ER was performed using Silastic[®] capsules. During the 12-week RT, the animals climbed a ladder with weights attached to their tails. RT began simultaneously for all experimental groups. Gene expression was analysed by RT-PCR, and protein content was determined by western blotting. **Results:** The estrogen deficiency associated with Ovx decreased the gene expression of the mitochondrial biogenesis markers PGC-1 α (~73%), NRF-1 (~44%), and TFAM (~53%) ($p < 0.05$) and decreased the protein expression of phosphorylated AMPK, CREB and AKT, which are related to oxidative capacity, compared to the Sham-Sed group. RT increased PGC-1 α (~59%) and TFAM (~48%) expression compared to the Ovx-Sed group. The combination of RT and ER was superior to the Ovx-Sed and Ovx-RT treatments regarding the gastrocnemius muscle. **Conclusions:** This study showed that ovaries removal affects transcription factors that regulate mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. According to our results and evidence from the literature, and estradiol levels of exercise appear to play an important role in the protection of mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of rats.

Keywords: mitochondrial biogenesis; ovariectomy; resistance training; estrogen replacement; skeletal muscle; rats.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

- Akt:** proteína quinase B;
- AMPK:** AMP- proteína quinase ativada;
- ATP:** Adenosina Trifosfato;
- CMC:** Carga Máxima de Carregamento;
- COX:** citocromo c oxidase;
- CREB:** *cAMP Responsive Element Binding Protein*;
- DEPC:** pirocarbonato de dietila ou dicarbonato de dietila;
- dNTP:** Desoxirribonucleotídeos Fosfatados;
- E2:** 17 β -estradiol;
- ELISA:** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*;
- GAPDH:** *glyceralde1:4hyde3-phosphate dehydrogenase*;
- MANOVA:** Multivariate Analysis of Variance;
- MAPK:** *Mitogen-Activated protein kinase*;
- MOPS:** *4-Morpholinepropanesulfonic acid*;
- mtDNA:** DNA mitochondrial;
- NaCl:** cloreto de sódio;
- NFkB:** fator nuclear kB;
- NRF1:** Nuclear Respiratory Factors 1;
- NRF2:** Nuclear Respiratory Factors 2;
- Ovx:** ovariectomia;
- p38:** *mitogen-activated protein kinase*;
- p-Akt:** proteína quinase B fosforilada;
- p-Akt:** proteína quinase B fosforilada;
- p-AMPK:** AMP-proteína quinase ativada fosforilada;
- PBS:** tampão fosfato salina;
- p-CREB:** *cAMP response element-binding protein phosphorylated*;
- PDH:** piruvato desidrogenase;
- PGC-1 α :** *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*;
- PMSF:** Fenilmetilsulfonilfluoreto;
- q.s.p:** quantidade suficiente para;
- RE:** Reposição de Estrógeno;
- RNA_m:** RNA mensageiro;

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real;

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida para eletroforese com dodecilsulfato de sódio;

Sed: Sedentário;

Sham: Sham operado;

t-Akt: proteína quinase B total;

t-AMPK: AMP-proteína quinase ativada total;

t-CREB: cAMP response element-binding protein total;

TFAM: Fator de transcrição mitocondrial A;

TR: Treinamento Resistido;

TRH: Terapia de reposição Hormonal;

VO_{2máx.}: consumo máximo de oxigênio.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01. Representação esquemática das hipóteses do presente trabalho.

FIGURA02. Organograma dos grupos experimentais.

FIGURA03. Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia.

FIGURA04. Instrumentos utilizados para o treinamento resistido.

FIGURA 05. Apresentação esquemática das cargas de carregamentos por sessão de treino.

FIGURA06. Aparatos utilizados na confecção da cápsula Silastic[®] utilizada na Reposição de Estrógeno.

FIGURA 07. Delineamento experimental: linha do tempo dos procedimentos realizados.

FIGURA 08. Exemplo de um gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio indicando a integridade do RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 28S e 18S.

FIGURA 09. Exemplo de curva de MELT original representativa dos ciclos do PCR-RT. (A) GAPDH, (B) PGC-1 α , (C) NRF-1 e (D) TFAM.

FIGURA10. Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT (A) GAPDH e (B) PGC-1 α .

FIGURA 11. Foto dos úteros retirados após a eutanásia.

FIGURA 12. Capacidade Máxima de Carregamento.

FIGURA 13. Níveis de 17 β -estradiol no soro determinados por ELISA.

FIGURA 14. Marcadores de biogênese mitocondrial: níveis de RNAm de PGC-1 α (A), NRF-1 (B) e TFAM (C) no pool de músculo esquelético (*gastrocnemius*) relativo aos níveis de RNAm do GAPDH.

FIGURA 15. Conteúdo de Proteína do músculo *gastrocnemius*: Akt, CREB e AMPK.

FIGURA 16. Alvos moleculares do Treinamento Resistido que podem estar associados à melhora da biogênese e metabolismo mitocondrial no músculo esquelético de ratas ovariectomizadas.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequências de nucleotídeos dos *primers* dos genes de interesse utilizadas para análise de RT-PCR.

TABELA 2. Ingestão alimentar, massa corporal, relação entre soma da massa muscular (*gastrocnemius*, *plantaris* e *soleus*) e massa corporal total massa do útero e fêmur dos grupos experimentais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	16
1.1. Papel do Estrógeno sobre as Mitocôndrias	17
1.2. Sarcopenia, Ovariectomia e Menopausa: papel das mitocôndrias	19
1.3. Efeitos protetores do exercício físico em mulheres menopausadas e ratas ovariectomizadas	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. HIPÓTESES	25
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivos Específicos	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1. Animais e condições experimentais	27
5.2. Grupos Experimentais	27
5.3. Procedimentos Cirúrgicos: Ovariectomia (Ovx) e Sham	28
5.4. Treinamento Resistido (TR)	30
5.4.1 Protocolo de TR	30
5.4.2. Familiarização ao protocolo do TR	30
5.4.3 Determinação da Carga Máxima de Carregamento (CMC)	31
5.4.4 Protocolo de TR de 12 semanas	32
5.5. Reposição de Estrógeno (RE)	33
5.5.1. Confeção da cápsula Silastic®	33
5.5.2. Implantação da cápsula	34
5.6. Controle da ingestão alimentar e da massa corporal	34
5.7. Eutanásia dos animais, retirada e coleta dos tecidos	35
5.8. Análises Biomoleculares Realizadas	36
5.8.1 Expressão Gênica (RNAm)	36
5.8.2. Homogeneização da amostra para expressão gênica	36
5.8.3. Extração do RNA	37
5.8.4. Quantificação do RNA	37
5.8.5. Análise da integridade do RNA total	37
5.8.5.1 Tratamento com DNase:	38

5.8.5.2. Reação de transcrição reversa (RT):	38
5.8.5.3. Construção dos primers:	39
5.8.5.4. PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR):.....	39
5.8.6. Determinação da concentração de proteínas totais:	42
5.8.7. Western Blotting: análise do conteúdo proteico	42
5.8.7.1. Homogeneização da amostra para Western Blotting:.....	42
5.8.7.2. Tratamento das amostras e separação das proteínas por eletroforese: 42	
5.8.7.3 Incubação com anticorpo primário e secundário:.....	43
5.8.7.4. Revelação e densitometria das bandas:	43
5.8.8. Determinação por ELISA dos níveis de 17 β -estradiol no soro.....	43
5.9. Análises estatísticas	44
6. RESULTADOS.....	44
6.1. Análise da massa corporal total, da soma da massa muscular (<i>soleus, plantaris e gastrocnemius</i>), da massa do fêmur e útero e da ingestão alimentar.....	44
6.2. Capacidade Máxima de Carregamento do Treinamento Resistido	46
6.3. Níveis de 17 β -estradiol no soro	47
6.4. Expressão gênica dos marcadores de biogênese mitocondrial.....	48
6.5. Conteúdo proteico da Akt, AMPK e CREB	50
7. DISCUSSÃO.....	52
8. CONCLUSÕES	57
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	58
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO A - ARTIGO SUBMETIDO	67
ANEXO B – STATUS DA SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	89
ANEXO C - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	91

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A menopausa é a fase da senescência reprodutiva feminina caracterizada pela depleção dos folículos ovarianos e cessação da menstruação, iniciando-se por volta de 51 anos de idade (ROCCA *et al.*, 2012). Constitui-se no marco mais importante na saúde da mulher, fenômeno que envolve várias mudanças fisiológicas, principalmente hormonais, incluindo o aumento na produção do hormônio folículo estimulante pela hipófise, redução hepática da globulina ligadora de hormônios sexuais, perda da produção de hormônios ovarianos como estradiol, bem como redução da circulação de andrógenos (POLOTSKY, POLOTSKY, 2010).

A depleção dos hormônios esteroides sexuais é uma importante e fisiológica consequência do envelhecimento natural, entretanto, esse evento pode potencializar o aumento da vulnerabilidade às doenças em tecidos hormônio-responsivos como o cérebro, músculo, ossos e sistema cardiovascular (LOBO *et al.*, 2014). Em mulheres pós-menopáusicas ocorre aumento da prevalência de todos os componentes individuais da síndrome metabólica em mulheres menopáusicas (ALEXANDER, CLEARFIELD, 2006), bem como osteoporose, câncer de mama e doenças cerebrovasculares também são distúrbios comuns relacionados, estando associados a altos índices de morbidade e mortalidade nesta população (ATSMA *et al.*, 2006; DOSI *et al.*, 2014). A menopausa em mulheres é um fator de risco importante para as doenças cardiovasculares porque impacta negativamente sobre diversos aspectos, como redução da tolerância à glicose, alteração no perfil lipídico, aumento da pressão arterial, disfunção endotelial e inflamação vascular (ROSANO *et al.*, 2007).

No intuito de compreender os mecanismos envolvidos nas modificações fisiológicas associadas ao período pós-menopausa e estabelecer estratégias para prevenir e reverter

essas alterações, a menopausa é mimetizada experimentalmente por uma técnica chamada ovariectomia (THOMPSON *et al.*, 1995), que consisti na retirada bilateral do ovários. Esta técnica permite estudar os efeitos da redução dos estrógenos e possíveis intervenções sobre os vários tecidos, como muscular esquelético, cardíaco e renal de ratas ovariectomizadas (BRINTON, 2012). A ovariectomia em roedores produz aumento da massa corporal total, alterações na composição corporal e no perfil lipídico, maior deposição de gordura em diversos tecidos (músculo, fígado, coração), redução da musculatura esquelética (sarcopenia) e da massa mineral óssea (osteopenia), e aumento de marcadores inflamatórios (LEITE *et al.*, 2009; SHIGUEMOTO *et al.*, 2012).

Neste contexto apresentado, como as mitocôndrias apresentam papel central na integração de uma grande variedade de sinais dentro da célula, como modulação do suprimento energético, da sinalização das espécies reativas de oxigênio e das vias intrínsecas de apoptose (HEPPLE, 2014). As alterações na biogênese e função e mitocondrial podem constituir-se um foco central dessas novas abordagens, pois, as alterações mitocondriais relacionadas à idade tornam susceptíveis a danos vários eventos fisiológicos celulares, contribuindo para o desenvolvimento de doenças usuais relacionadas ao envelhecimento e/ou menopausa (DAI *et al.*, 2012; SEO *et al.*, 2010). Desse modo, falhas no metabolismo mitocondrial podem estar associadas à disfunção e morte celular por causas diversas incluindo doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e neurodegenerativas (VERCESI *et al.*, 2006), bem como na desregulação da plasticidade das células musculares, que leva à sarcopenia (MARZETTI *et al.*, 2013).

1.1.Papel do Estrógeno sobre as Mitocôndrias

O estrógeno é uma molécula de sinalização sistêmica que regula e coordena múltiplas funções em órgãos, células e genes. O estrógeno utiliza um repertório de receptores e vias de sinalização para ativar e regular as respostas moleculares e genômicas

necessárias para a sobrevivência celular. Durante a vida reprodutiva da mulher o principal estrógeno circulante é 17β -estradiol (E2), forma mais potente. Em humanos, o estrógeno é produzido pelos ovários e glândulas adrenais e, na circulação, atua na maior parte dos órgãos e tecidos, incluindo cérebro, sistema cardiovascular (coração e vasos sanguíneos), imunológico, reprodutivo, muscular e ósseo (KUIPER *et al.*, 1997).

Os receptores de estrógeno podem ser receptores nucleares (ERs) ou de membranas (mERs). Existem duas isoformas clássicas de ERs, o ER α (ESR1) e ER β (ESR2), que diferem em função e localização (MENASCE *et al.*, 1993). A sinalização clássica do estrógeno ocorre resultante da translocação do ER para o núcleo, onde se liga ao elemento de resposta do estrógeno para regular a expressão gênica. Vários trabalhos recentes estabelecem a presença de receptores de estrógeno na mitocôndria, sendo o mais abundante o ER β (MITTERLING *et al.*, 2010; IRWIN *et al.*, 2012).

Um número substancial de vias de sinalização é regulado pelo estrógeno e convertem sobre as mitocôndrias (NILSEN *et al.*, 2006). Há evidências na literatura de que a ativação dos fatores nucleares respiratórios (NRFs) e fator de transcrição mitocondrial (TFAM) modulam os efeitos do E2 sobre as mitocôndrias. Os NRF1 e NRF2 são os principais codificadores dos fatores de transcrição de proteínas mitocondriais, como TFAM e proteínas que desempenham um papel crucial na replicação, transcrição e tradução do mtDNA (CHEN *et al.*, 2009).

Recentemente, Ding *et al.* (2013) demonstraram que células neurais de animais ovariectomizados utilizam de forma reduzida a glicose, o que pode ser atribuído ao menor conteúdo proteico dos transportadores de glicose, da hexoquinase, inativação do complexo da piruvato desidrogenase (PDH) e redução significativa da função bioenergética das mitocôndrias. Outros trabalhos com cérebro mostraram que o tratamento com E2 aumenta a expressão do Complexo I (IRWIN *et al.*, 2012) e do complexo IV (COX) (NILSEN *et*

al., 2007). A capacidade respiratória máxima das mitocôndrias em neurônios e células da glia também foi aumentada com E2 (YAO *et al.*, 2012). Dados experimentais apontam que o E2 aumenta de forma significativa a expressão gênica do NRF e conteúdo proteico do complexo IV e da ATP sintase em células cardíacas de ratos (HSIEH *et al.*, 2005). Claramente, a localização dos receptores de estrógeno, nuclear ou mitocondrial, sugere regulação coordenada da expressão dos genes nucleares e respostas mitocondriais ao estradiol (VASCONSUELO *et al.*, 2013).

1.2. Sarcopenia, Ovariectomia e Menopausa: papel das mitocôndrias.

O termo utilizado mundialmente para descrever a perda natural da massa muscular relacionada ao envelhecimento e à redução do estrógeno é conhecido como “*sarcopenia*” (MESSIER *et al.*, 2011), termo proposto por Irwin Rosenberg em 1988 que incluía diminuição da massa muscular e função (ROSENBERG, 1997). Há uma redução por volta de 0,6% da massa muscular por ano após a menopausa (ROLLAND *et al.*, 2007). A sarcopenia está associada a fatores genéticos, doenças neurodegenerativas, distúrbios hormonais, doenças autoimunes, desnutrição, lesões físicas e inatividade (TAN *et al.*, 2011; GARATACHEA, LUCÍA, 2013).

Estudos têm demonstrado que a sarcopenia pode ser consequente aos danos oxidativos (HOFER *et al.*, 2008; MARZETTI *et al.*, 2010) associados à disfunção mitocondrial (HIONA, LEEUWENBURGH, 2008). A alteração da função mitocondrial pode gerar defeito na sinalização apoptótica dos miócitos, evidenciado pelo aumento na ocorrência do DNA fragmentado no músculo (LABERGE *et al.*, 2013). Neste contexto, vale ressaltar que as mitocôndrias, além de seu papel no metabolismo energético, também são fundamentais na regulação da apoptose e, portanto, integridade celular (IVANOVA, YANKOVA, 2013). A ação predominante dos hormônios sexuais na mitocôndria é anti-

apoptótica (VASCONSUELO *et al.*, 2011) por evitarem a fragmentação do DNA e desorganização do citoesqueleto (PRONSATO *et al.*, 2012).

Outra importante ligação entre mitocôndria e sarcopenia é o *Peroxisome Proliferator Activated Receptor c Coactivator 1 α* (PGC-1 α), uma marcador de biogênese mitocondrial, considerado um fator protetor à sarcopenia (WENZ *et al.*, 2009). Brault *et al.* (2010) mostraram que a superexpressão de PGC-1 α inibe a degradação de proteínas via redução da ativação do sistema proteossomal e lisossomal. A perda de massa muscular pode ser resultado de um aumento da degradação e diminuição da síntese proteica muscular, que por sua vez reflete a ativação de duas vias principais, a ubiquina-proteossomal e o sistema autofágico-lisossômico (SCHIAFFINO *et al.*, 2013).

Os fatores que contribuem para a perda de força e massa muscular na menopausa e/ou envelhecimento não se limitam somente aos aspectos mitocondriais e elevação de estresse oxidativo, pois também ocorre declínio na produção de hormônios, diminuição na ingestão de nutrientes essenciais e nos níveis de atividade física (TAN *et al.*, 2011).

A Terapia de Reposição Hormonal é uma intervenção farmacológica para o tratamento dos efeitos deletérios da menopausa e vem sendo utilizada nos últimos 40 anos, reduzindo em 35 – 50% a incidência de doenças cardíacas (HERRINGTON *et al.*, 2000; BARTON, 2013). Em estudo experimental, o tratamento de reposição hormonal, utilizando 17-beta-estradiol, se mostrou efetivo atenuando a hipertensão e obesidade, porém, acentuou fibrose ventricular e disfunção diastólica em ratas sedentárias obesas (MURASE *et al.*, 2012). Entretanto, há trabalhos correlacionando essa intervenção com o aumento na incidência de alguns tipos de cânceres (mama e útero), doenças vasculares e hipertensão (OLSON *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). Estudos sugerem ainda que a melhor atitude para mulheres na menopausa é modificar seu estilo de vida por meio do emagrecimento, da prática de atividade física e de hábitos alimentares saudáveis (MATTAR *et al.*, 2008).

Diante destes dados, é notória a importância de pesquisar intervenções não farmacológicas, que contribuam eficazmente para a saúde da crescente população de mulheres na menopausa.

1.3.Efeitos protetores do exercício físico em mulheres menopausadas e ratas ovariectomizadas

Tem havido um grande interesse sobre o potencial do exercício como intervenção na prevenção, retardo ou reversão das alterações mitocondriais e metabólicas. O trabalho pioneiro de Holloszy (1967) iniciou a discussão sobre as adaptações bioquímicas e mitocondriais do músculo esquelético frente ao exercício. Desde então, o exercício físico, baseado em proposta aeróbia, tem sido utilizado como estratégia efetiva para melhorar a capacidade oxidativa mitocondrial do músculo esquelético de sujeitos jovens (SILVA *et al.*, 2009) bem como a função mitocondrial de sujeitos idosos (BROSKEY *et al.*, 2014). Alguns trabalhos apontam que idosos praticantes de exercício físico possuem maior conteúdo mitocondrial, atividade de enzimas oxidativas (MENSHIKOVA *et al.*, 2006), taxas de síntese proteica muscular (BALAGOPAL *et al.*, 2001), transcrição de genes mitocondriais (SHORT *et al.*, 2003), e número de cópias de mtDNA (MENSHIKOVA *et al.*, 2006).

O treinamento aeróbio induz aumento da transcrição de genes nucleares e mitocondriais que codificam proteínas mitocondriais, mtDNA e expressão gênica do PGC-1 α e do TFAM (LANZA, NAIR, 2009), marcadores moleculares de aumento da atividade mitocondrial muscular. Chow *et al.* (2007) demonstraram, em modelo animal, que oito semanas de treinamento aeróbio em esteira a 80% do $VO_{2m\acute{a}x.}$, produz aumento da atividade de enzimas mitocondriais (citrato sintase e citocromo c oxidase (COX)), maior eficiência da fosforilação oxidativa (síntese de ATP) e do consumo de O_2 , fatores que indicam aumento da função mitocondrial muscular.

A atividade física regular tem sido prescrita como recurso terapêutico para atenuar o progresso do envelhecimento, mantendo principalmente a biogênese mitocondrial (SAFDAR *et al.*, 2011). Como a biogênese mitocondrial é um processo multifatorial muito complexo, que envolve proteínas nucleares e mitocondriais, a ativação da expressão gênica e/ou proteica desses fatores relacionados à biogênese mitocondrial dependente do envelhecimento e do exercício físico devem ser melhor investigados, de modo a proporcionar uma adequada avaliação do papel pré e pós traducional desses fatores (BORI *et al.*, 2012).

Outra modalidade de exercício físico, o Treinamento Resistido (TR) produz efeitos benéficos em particular nos fatores de risco cardiovascular em mulheres pós-menopáusicas (GELECEK *et al.*, 2012). Trabalho realizado com mulheres pós-menopáusicas, demonstrou que o TR foi capaz de aumentar a força muscular, fato que reforça a efetividade desta intervenção na prevenção da perda muscular deste período (MADDALOZZO, SNOW, 2000). Também no modelo de ovariectomia, estudo de Leite *et al.* (2009) observou que o TR promove redução no conteúdo de gordura no fígado e nos depósitos de gordura corporal (mesentérico e retroperitoneal), além de melhorar o perfil lipídico, fatores de risco importantes nas doenças cardiovasculares. Em outros tecidos, recentemente Shiguemoto *et al.* (2012) demonstraram que 12 semanas de TR foi eficiente em reverter os efeitos deletérios causados pela ovariectomia no tecido ósseo. Trabalho realizado com mulheres pós-menopáusicas, demonstrou que o TR de alta intensidade é capaz de aumentar a densidade mineral óssea e força muscular, fato que reforça a efetividade desta intervenção na prevenção da perda da massa óssea e muscular que ocorre com a menopausa (MADDALOZZO, SNOW, 2000).

No exercício, as adaptações das fibras musculares ao *endurance* vs. treinamento resistido é mediada por diferentes padrões de expressão gênica. O treinamento de força

resulta em aumentos intermitentes de cálcio sarcoplasmático, o que promove a transcrição dos genes na fibra do tipo IIb, responsivas a hipertrofia (CHIN *et al.*, 1998). A elevação do cálcio sarcoplasmático altera o estado de fosforilação de fatores de transcrição e coativadores (BERCHTOLD, BRINKMEIER, MUNTENER, 2000) importantes, como o *cAMP Responsive Element Binding Protein* (CREB). Isso resulta em expressão alterada de genes regulados pelo exercício muscular, especialmente o PGC-1 α (PUIGSERVER *et al.*, 2003). Assim, a expressão do PGC-1 α é rapidamente induzida após uma única sessão de exercício resistido *in vivo*. Quando a atividade física é interrompida, os níveis de RNAm do PGC-1 α retornam aos níveis pré-exercício (PILEGAARD, SALTIN, NEUFER, 2003).

Em sessões agudas de exercício, a expressão aumentada de PGC-1 α é mecanismo modulado pela diminuição do fluxo de ATP no músculo esquelético (HOOD *et al.*, 2006). A interação multifacetada de PGC-1 α com a AMPK (*5'adenosine monophosphate-activated protein kinase*) desempenha papel importante neste processo (JAGER *et al.*, 2007). Em contraste, PGC-1 α é encontrado em níveis elevados no músculo esquelético submetido ao exercício crônico, mesmo entre as séries individuais de exercício, quando comparado com músculo não treinado (RUSSELL *et al.*, 2003). Isso reflete as adaptações do músculo esquelético a curto e longo prazo ao exercício resistido. Assim, algumas alterações na plasticidade muscular induzidas pelo exercício crônico são correlacionadas ao aumento da expressão de PGC-1 α , como aumento da capacidade oxidativa (RUSSELL *et al.*, 2003). Wang *et al.* (2011) demonstraram em humanos que o exercício resistido realizado após exercício de *endurance* amplifica a resposta adaptativa de sinalização para a biogênese mitocondrial quando comparado com treinamento de *endurance* de modo único, sugerindo que o treinamento concorrente pode ser benéfico para a melhora da capacidade oxidativa muscular. De maneira geral, os efeitos benéficos da atividade física na fisiologia do músculo esquelético são mediados pelo PGC-1 α (LIN, HANDSCHIN, SPIEGELMAN,

2005), estes efeitos podem interagir com a via de sinalização mediada por mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Wang *et al.* 2011).

Entretanto, ainda não está bem descrito na literatura os possíveis efeitos do TR sobre os marcadores de biogênese e capacidade oxidativa mitocondrial do músculo esquelético no modelo de ovariectomia. Uma vez que as alterações metabólicas na redução da concentração do estrogênio são semelhantes às alterações ocorridas em doenças crônicas como obesidade, diabetes tipo 2 e doenças coronarianas, se faz necessário elucidar os mecanismos moleculares pelos quais o exercício resistido contribui para a redução da sarcopenia, ganho de musculatura esquelética e capacidade oxidativa no modelo de ratas ovariectomizadas.

2.JUSTIFICATIVA

O modelo experimental que foi utilizado nesse trabalho foi o modelo de ovariectomia em ratas maduras jovens. Os efeitos da redução do estrogênio, que ocorre com a ovariectomia, sobre as modificações de biogênese e capacidade mitocondrial do músculo esquelético e suas associações com o processo de sarcopenia ainda não estão totalmente esclarecidos, a luz da literatura atual. Evidência demonstrou que a ovariectomia pode interferir na bioenergética mitocondrial do músculo esquelético após oito semanas (CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Dentro deste contexto, nosso propósito foi aprofundar os estudos prévios, concentrando nossa investigação sobre as alterações do tecido muscular causada por períodos maiores de ovariectomia que se relacionam com disfunções mitocondriais. Bem como, os efeitos positivos do protocolo de 12 semanas de treinamento resistido sobre os marcadores de biogênese e capacidade oxidativa mitocondrial.

3. HIPÓTESES

A redução de estrógeno, associada à ovariectomia, reduz marcadores de biogênese mitocondrial de ratas.

O exercício resistido é eficaz na reversão dos efeitos deletérios da ovariectomia sobre os marcadores de biogênese mitocondrial de ratas ovariectomizadas.

A Reposição de Estrógeno é menos eficaz do que o Treinamento Resistido na reversão dos efeitos deletérios da ovariectomia sobre os marcadores de biogênese mitocondrial de ratas ovariectomizadas.

A associação do Treinamento Resistido com Terapia de Reposição Hormonal é eficaz na reversão dos efeitos deletérios da ovariectomia sobre os marcadores de biogênese mitocondrial de ratas ovariectomizadas.

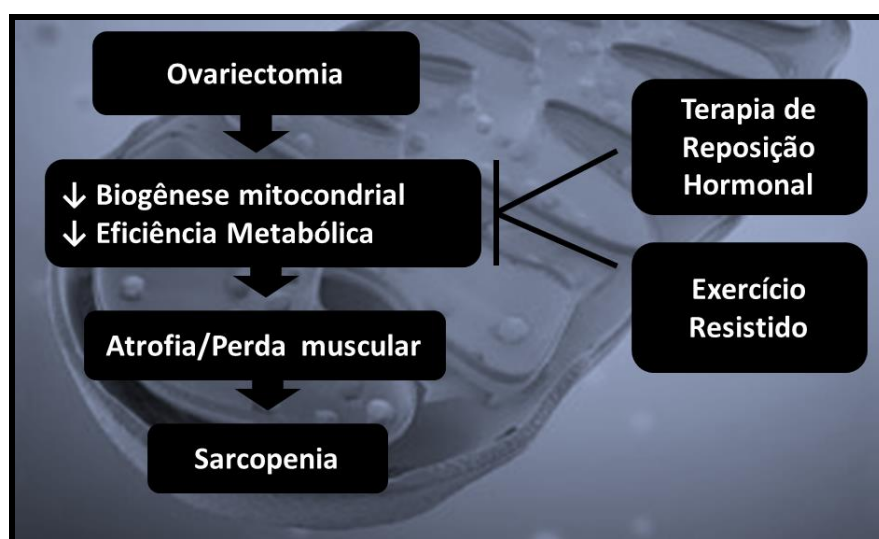


FIGURA 01. Representação esquemática das hipóteses do presente trabalho.

4. OBJETIVOS

Investigar os efeitos da ovariectomia, do treinamento resistido e da reposição de estrógeno sobre a biogênese mitocondrial e capacidade oxidativa do músculo esquelético de ratas.

4.1. Objetivos Específicos

Investigar os efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre a expressão gênica de moléculas relacionadas à biogênese mitocondrial [PGC1- α , TFAM e NRF1] do músculo esquelético de ratas ovariectomizadas.

Investigar os efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre a expressão protéica de moléculas relacionadas à capacidade oxidativa [Akt, p-Akt, AMPK total, p-AMPK (Thr172), CREB, p-CREB] no músculo esquelético de ratas ovariectomizadas.

Investigar os efeitos da Reposição de Estrógeno e sua associação com o treinamento resistido sobre os marcadores de biogênese mitocondrial.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais e condições experimentais

Foram utilizadas 60 ratas (*Rattus norvegicus albinus* - Holtzman), adultas, obtidas do biotério da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araraquara. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro ratas por gaiola) no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício, do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), sob condições constantes de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade e iluminação em ciclo invertido, 12 horas claro e 12 horas escuro (luz das 20 às 8h horas) e com oferta de água e dieta *ad libitum*.

Os animais chegaram ao laboratório com, aproximadamente, nove semanas de vida, foram mantidos por cinco semanas em aclimação ao ciclo invertido e ganho de massa corporal, após este período foram separados em seis grupos experimentais.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Protocolo número 005/2013) (**ANEXO 3**) e conduzidos de acordo com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América (National Research Council's, 1996).

5.2. Grupos Experimentais

Os animais foram randomicamente distribuídos em seis grupos experimentais (**Figura 02**), a saber:

- 1) Sham operado Sedentário (Sham-Sed);
- 2) Sham operado Treinamento Resistido (Sham-TR);
- 3) Ovariectomizado Sedentário (Ovx-Sed);
- 4) Ovariectomizado Treinamento Resistido (Ovx-TR);

5) Ovariectomizado sedentário e Reposição de Estrógeno (Ovx-Sed-ER);

6) Ovariectomizado Treinamento Resistido e Reposição de Estrógeno (Ovx-TR-ER);

Os animais sedentários (Sham-Sed, Ovx-Sed e Ovx-Sed-ER) foram mantidos nas suas caixas por todo o período experimental pós-cirúrgico (12 semanas) sem nenhum tipo de exercício ou atividade física, apenas o deslocamento dentro da gaiola.

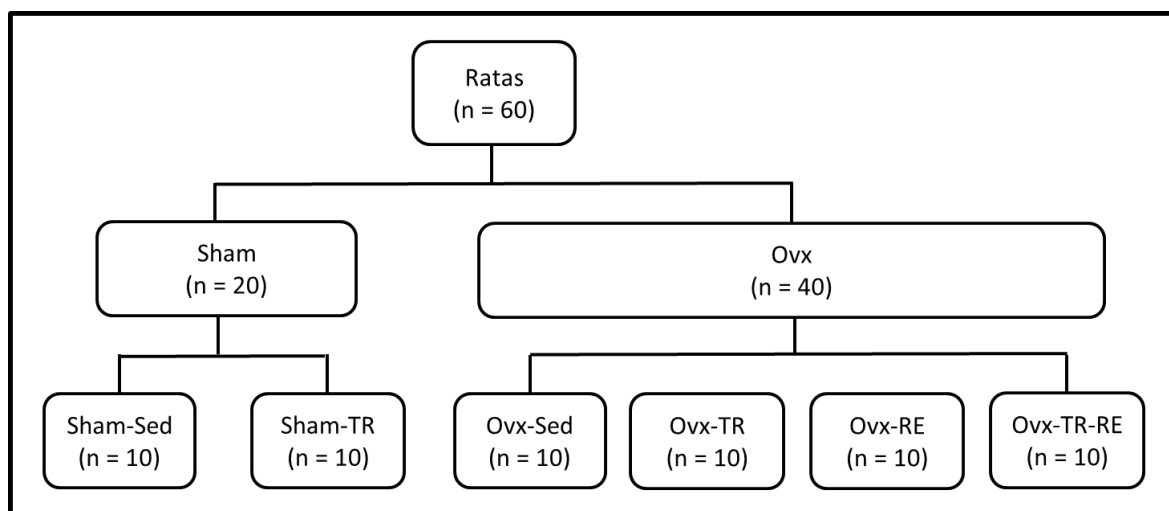


FIGURA 02. Organograma dos grupos experimentais. Ovx: ovariectomizado; Sham: operado intacto; Sed: sedentário; TR: treinamento resistido; RE: reposição de estrógeno.

5.3.Procedimentos Cirúrgicos: Ovariectomia (Ovx) e Sham

Ao atingirem 13 semanas de vida, aproximadamente com 250 ± 12 g, as ratas foram submetidas aos procedimentos cirúrgicos. Os procedimentos cirúrgicos (Ovx e Sham) foram realizados de acordo com a técnica descrita por Kalu (1991). Primeiramente, foi realizada uma pequena incisão bilateral (1,0-1,5cm) através da pele e da camada muscular com uso de tesoura e pinça, ± 1 cm abaixo da última costela, perpendicular ao corpo do animal (**Figura 03**).

Para a cirurgia Ovx, a cavidade peritoneal foi aberta, os ovários foram externalizados e logo abaixo da fimbria foi realizada uma ligadura com linha de algodão.

Os ovários foram removidos, a incisão na musculatura e pele foi suturada com linha de seda. O período total de Ovx foi de 14 semanas (**Figura 03**).

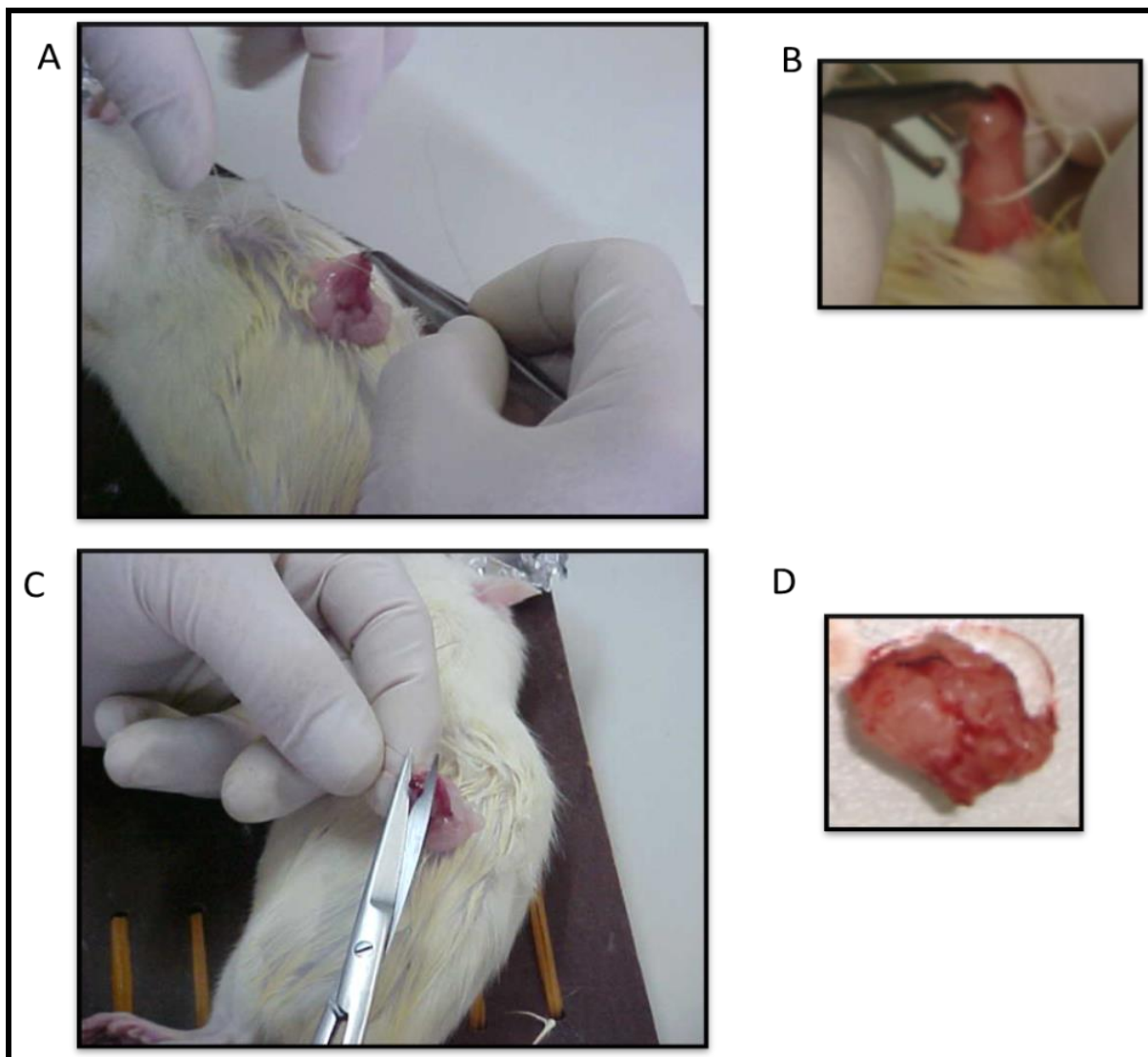


FIGURA 03. Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia. (A) Incisão lateral e exposição dos ovários. (B) Ligadura da fimbria abaixo do ovário. (C) Corte e retirada do ovário. (D) Ovário retirado.

A cirurgia sham foi realizada por meio dos mesmos procedimentos da Ovx, com exceção da ligadura e retirada dos ovários. Os ovários foram externalizados à cavidade abdominal e devolvidos ao local de origem.

Durante todos os procedimentos cirúrgicos as ratas foram mantidas sob efeito anestésico com uma mistura de Ketamina-Xilazina (61,5-7,6 mg/kg, intraperitoneal). Logo após os procedimentos cirúrgicos foram administrados analgésico (Cloridrato de Tramadol

[20mg/Kg]) e antibiótico por via subcutânea a fim de melhorar a recuperação. Os procedimentos cirúrgicos e de anestésicos foram acompanhados pelo Médico Veterinário Thiago Francisco de Moraes CRMV – SP 24016.

Foi respeitado um período de uma semana de recuperação pós-cirurgia para dar início aos procedimentos do protocolo de treinamento resistido. Todos os animais tiveram o mesmo tempo de exposição até o sacrifício.

5.4. Treinamento Resistido (TR)

5.4.1 Protocolo de TR:

O protocolo de TR foi realizado conforme descrito por Prestes *et al.* (2009) e adaptado conforme as necessidades do presente trabalho. Foi utilizada a escada, instrumento descrito e adaptado de Hornberger Jr e Farrar (2004) (**Figura 04**).

5.4.2. Familiarização ao protocolo do TR:

Inicialmente, as ratas foram adaptadas ao protocolo de TR (familiarização) conforme descrito por Prestes *et al.* (2009). A familiarização ao protocolo foi realizada por meio de três sessões, nas quais os animais escalaram uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2 cm, inclinação de 80°) apenas com o aparato de carga preso às suas caudas. Tubos de polipropileno do tipo Falcon de 50 mL e chumbos para pesca de diferentes tamanhos e massas foram utilizados como aparato de carga e cargas, respectivamente (**Figura 04**). 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 subiam a mesma, sendo familiarizados com a mesma. Quando necessário, um estímulo com pinça foi aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento de escalada. No topo da escada

as ratas alcançaram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram por 2 minutos. Este procedimento foi repetido até que os animais consigam voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem a necessidade de estímulo.

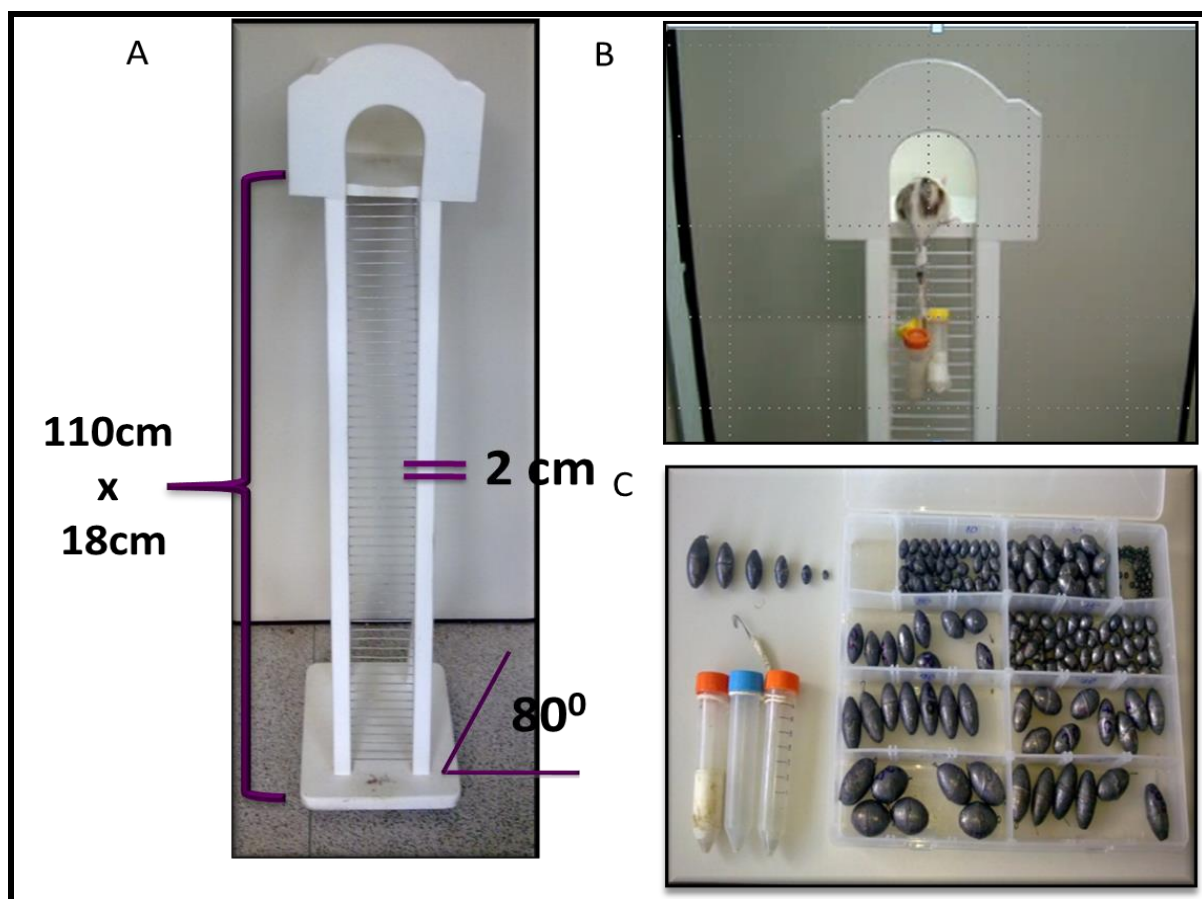


FIGURA 04. Instrumentos utilizados para o treinamento resistido. (A) Escada utilizada com 57 degraus. (B) Topo da escada e animal com pesos atados à cauda. (C) Pesos utilizados como cargas.

5.4.3 Determinação da Carga Máxima de Carregamento (CMC):

Após 72h da última sessão de familiarização, foi realizada a sessão de determinação da CMC, considerada a primeira sessão de treinamento. Nesta sessão, os animais escalaram de 4-9 vezes a escada com cargas progressivamente mais pesadas. A primeira escalada consistiu em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal. Após 2 minutos de recuperação, a segunda escalada foi realizada com a adição de peso de 30 g. Este acréscimo de carga (+30 g) foi repetido consecutivamente em cada escalada até uma

carga com a qual a rata não conseguisse escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguir progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A CMC foi definida como a carga mais pesada que o animal conseguisse carregar na última subida completa da escada e foi definida a cada nova sessão de TR.

5.4.4 Protocolo de TR de 12 semanas:

O TR foi realizado durante 12 semanas com sessões de treino no intervalo de 72 horas, sem dias da semana definidos, totalizando 27 sessões. As sessões de treinamento consistiram de, no mínimo, quatro escaladas com cargas progressivamente mais pesadas de 50%, 75%, 90% e 100% da CMC determinada na sessão anterior. Após atingir 100% da CMC, foi adicionado 30 g a cada escalada subsequentes até, no máximo, cinco escaladas. Essa carga foi anotada e definida como a nova CMC. Dessa forma, o número máximo de escaladas foi de nove (**Figura 05**).

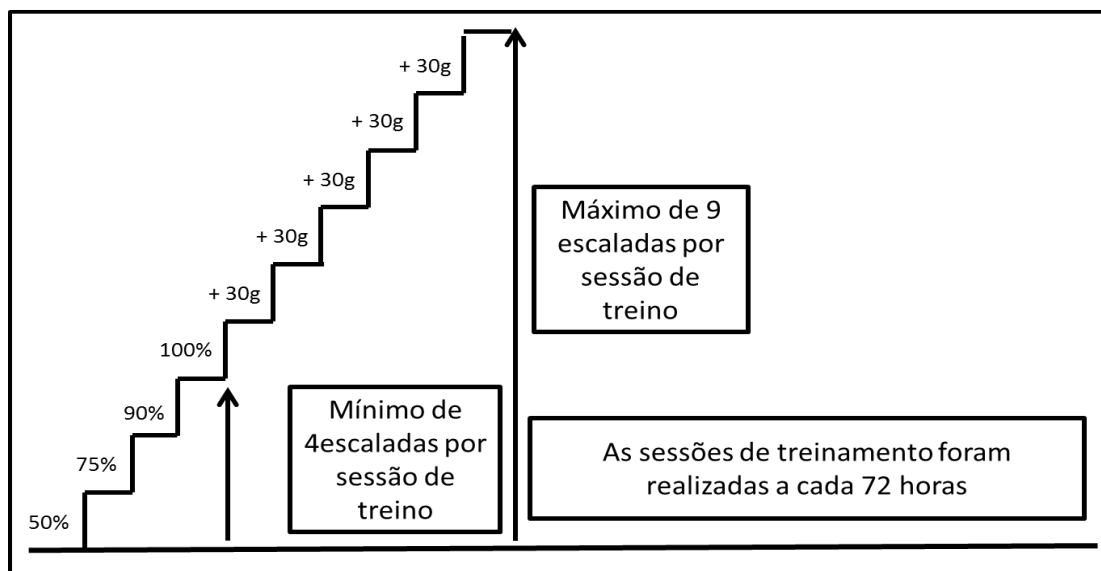


FIGURA 05. Apresentação esquemática das cargas de carregamentos por sessão de treino.

5.5. Reposição de Estrógeno (RE)

Os animais dos grupos (Ovx-Sed-RE e Ovx-RT-RE) receberam a reposição de 17β -estradiol por implante subcutâneo de cápsulas Silastic[®] com uma solução de 180 μg de 17β -estradiol/ml de óleo de girassol. As cápsulas Silastic[®] são segmentos de tubo hospitalar de Silicone cortados em comprimento de 30 mm; diâmetro interno de 1,02 mm e externo de 2,16 mm) (*Dow Corning, VWR International, Buffalo Grove, IL, EUA*), vedados com cola Silastic[®].

A RE foi iniciada uma semana após a cirurgia e o reimplante das cápsulas Silastic[®] foi realizado após seis semanas do início da RE. A metodologia utilizada na RE está descrita conforme Strom *et al.* (2008). Este grupo de pesquisa mostrou que a cápsula Silastic[®] proporciona manutenção dos níveis séricos fisiológicos de hormônios por semanas (~21 dias) quando comparado com as técnicas de *pellet* e injeção intraperitoneal.

5.5.1. Confeção da cápsula Silastic[®]:

Os tubos Silastic[®] foram medidos e cortados com o auxílio de uma régua. A solução do hormônio foi preparada com o 17β -estradiol (código: E8875, 250 mg *Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*) em óleo de girassol. Foram pipetado 10 μL dessa solução com hormônio em cada cápsula Silastic[®], portanto, cada animal recebeu 1,8 μg de 17β -estradiol. As cápsulas foram vedadas nas duas extremidades com cola de Silicone da marca Silastic[®], o que resulta em uma coluna de óleo- 17β -estradiol. Após a vedação das cápsulas, as mesmas foram armazenadas por 24 horas para secagem da cola. Após a secagem, foram mantidas em solução fisiológica salina esterilizada (NaCl 0,9%) por no mínimo 2 horas (**Figura 06**).

5.5.2. Implantação da cápsula:

A implantação da cápsula foi realizada por meio de uma incisão no dorso do animal (10 mm) das ratas sob efeito anestésico (Ketamina-Xilazina: 61,5-7,6 mg/kg, intraperitoneal) e com o auxílio de uma pinça. O pescoço foi escolhido por causa da sua abundância de pele solta e para minimizar o risco de tensão mecânica sobre a cápsula.

Após a inserção da cápsula no subcutâneo, foi realizada a sutura. A recuperação pós-cirúrgica foi realizada com Cloridrato de Tramadol (20 mg/Kg) e antibiótico por via subcutânea logo após o procedimento cirúrgico.

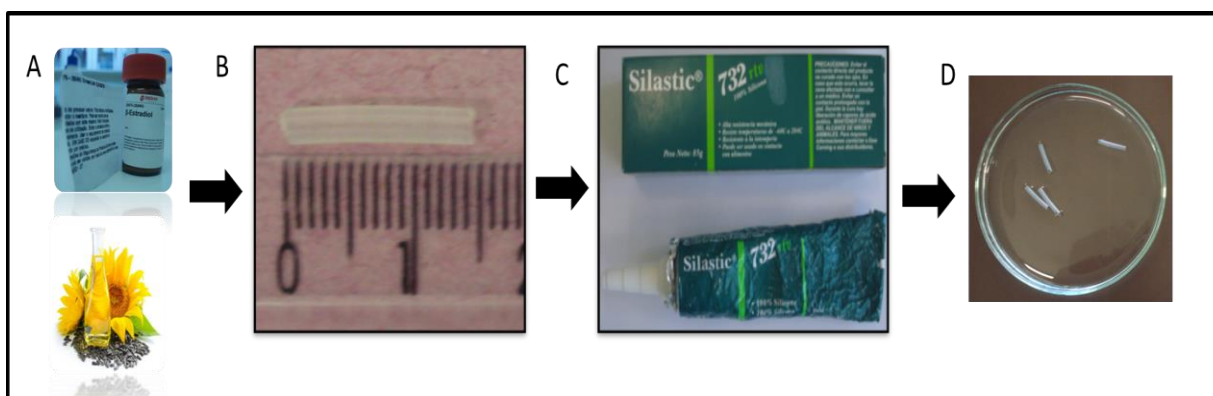


FIGURA 06. Aparatos utilizados na confecção da cápsula Silastic[®] utilizada na Reposição de Estrógeno.

5.6. Controle da ingestão alimentar e da massa corporal

A ingestão alimentar (gramas de ração consumida por gaiola) foi monitorada com balança semi-analítica (Gehaka, Brasil) diariamente sempre no mesmo horário do dia e a massa corporal verificada três vezes na semana, todas as segundas, quartas e sextas-feiras sempre no mesmo horário. Ambos os procedimentos serão realizados durante todo o período experimental. O controle da ingestão alimentar foi realizado com o objetivo de verificar a mesma em relação às possíveis diferenças entre os grupos experimentais.

5.7. Eutanásia dos animais, retirada e coleta dos tecidos

Ao término do período experimental, os animais foram eutanasiados por decapitação sob efeito de anestésico leve após 48h da última sessão de TR para minimizar eventuais efeitos da última sessão de TR sobre as medidas alvo. Animais sedentários também foram eutanasiados no mesmo período, por volta de 28 semanas de vida.

O útero, os três músculos esqueléticos do membro direito traseiro (*soleus*, *gastrocnemius e plantaris*) e fêmur foram rapidamente removidos e pesados. A massa total do músculo foi estimada pela soma das massas dos músculos *soleus*, *gastrocnemius e plantaris*. O *gastrocnemius*, depois de pesado, foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até análise posterior. A análise do conteúdo proteico e a expressão dos genes foram realizadas utilizando o músculo *gastrocnemius* total, obtida a partir de uma secção transversal, sem a separação da porção de branco e vermelho. Finalmente, o peso úmido do fêmur direito foi obtido após um período curto de ebulição em uma solução de KOH a 10% para remover o tecido circundante.

O delineamento experimental foi realizado conforme o esquema apontado na **Figura 07**.

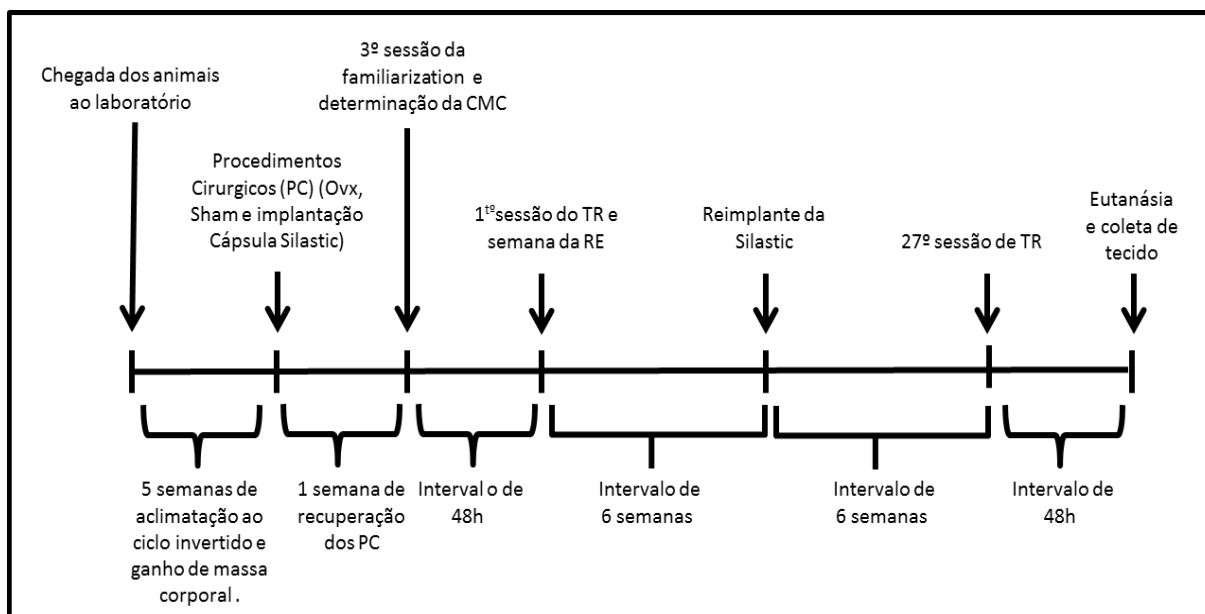


FIGURA 07. Delineamento experimental: linha do tempo dos procedimentos realizados. CMC: Carga Máxima de Carregamento; Ovx: ovariectomia; Sham: animal controle; PC: Procedimentos cirúrgicos; TR; Treinamento resistido; RE: Reposição de Estrógeno.

5.8. Análises Biomoleculares Realizadas:

5.8.1 Expressão Gênica (RNA_m):

A extração do RNA foi realizada com um agente desnaturante forte, fenol e guanidina isotiocianato, que efetua a lise celular e inativação das RNAses, possibilitando a integridade da molécula de RNA. O produto comercial utilizado foi o TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

5.8.2. Homogeneização da amostra para expressão gênica:

Inicialmente, foram realizados cortes com tecido congelado no gelo, foram pesadas porções equivalentes a 100 mg e adicionadas em tubo de ensaio de vidro com TRIzol[®] (1 mL/100 mg do tecido). A homogeneização mecânica foi realizada com homogeneizador de tecidos (Polytron - Fisher Scientific) (vel.6 por 60 seg. aproximadamente). O homogenato foi recuperado em micro tubo do tipo *eppendorf*.

5.8.3. Extração do RNA:

O homogenato em TRIzol[®] foi acrescentado de clorofórmio (200 µL/1mL de TRIzol[®] adicionado) e foi realizada uma agitação vigorosa. O clorofórmio separa as fases aquosas e lipídicas, pois dissolve lipídeos, permitindo a separação dos componentes hidro e lipofílicos. A mistura foi centrifugada (12000 rpm; 4°C; 15 minutos) A fase aquosa, na qual os ácidos nucleicos estão diluídos, correspondente a 60% do volume total, foi transferida a outro tubo e nela adicionado o isopropanol (500 µL), para precipitação do RNA que está em solução. Após a adição do Isopropanol, foi realizada uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas (12000 rpm; 4°C; 10 minutos), o sobrenadante foi desprezado por inversão. O *pellet* formado que contém o RNA foi lavado com etanol a 75% e centrifugado (7000 rpm; 4°C; 5 minutos). O sobrenadante foi desprezado novamente e o *pellet* foi secado a temperatura ambiente. Após secagem, a ressuspensão do RNA foi feita em água DEPC (10µL) e mantido em gelo.

5.8.4. Quantificação do RNA:

Logo após a extração, foi realizada a quantificação por espectrofotometria (NanoDrop 2000 – *Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*), onde 1 µl de cada amostra foi analisado. As medidas de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, cuja relação 260/280 ($\geq 1,8$) fornece uma estimativa da pureza do ácido nucleico (SAMBROOK *et al.*, 1989).

5.8.5. Análise da integridade do RNA total:

Com o intuito de verificar a integridade das amostras de RNA extraído realizou-se uma eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,5% (p/v), (1,2 g de agarose; 8,0 ml de tampão de corrida 10x, composto de MOPS 20 mM pH 7.0, acetato de sódio 50 mM e

EDTA 5 mM; 65 ml de água tratada com DEPC; 6,4 ml de formaldeído), por 40 minutos a 77 V constante, revelado com brometo de etídio. O gel foi exposto a uma luz ultravioleta em transiluminador por sistema de fotodocumentação. O RNA estoque foi armazenado a -80°C. A integridade do RNA foi confirmada pela visualização em luz ultravioleta do padrão de eletroforese das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal (**Figura 08**).

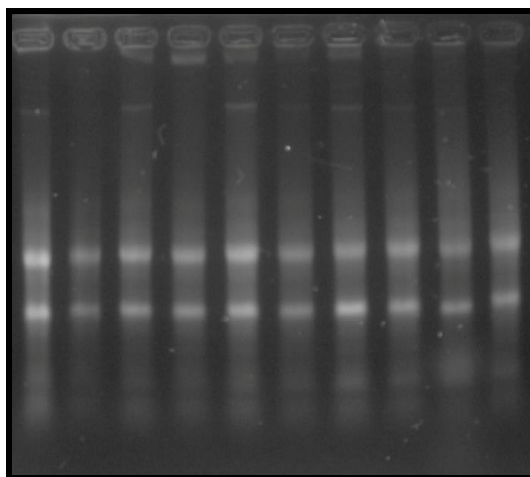


FIGURA 08. Exemplo de um gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio indicando a integridade do RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 28S e 18S.

5.8.5.1 Tratamento com DNase:

As amostras foram tratadas com DNase I (Kit Invitrogen) pra evitar contaminação de DNA genômico nas análises posteriores. Para tal tratamento foram adicionados em um tubo de 0,5mL: 1 µg de RNA; 1 µL de tampão de reação de DNase I (10x); 1 µL de DNase I 1U/µL e água tratada com DEPC q.s.p. 10 µL. Incubou-se a mistura por 15 minutos A temperatura ambiente e posteriormente inativou-se a DNase por meio da adição de 1 µL de EDTA 25mM e aquecimento por 10 minutos a 65°C.

5.8.5.2. Reação de transcrição reversa (RT):

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1 µg de RNA total extraído. Foi utilizado para a síntese do cDNA a seguinte mistura de reagentes: tampão (5X) (4 µL), MgCl₂ (2,4 µL), dNTP (500 µM) (1 µL) em H₂O-DEPC e enzima

transcriptase reversa (1 μ L). Esta mistura foi incubada (5 minutos) a 25°C para permitir a hibridização dos oligonucleotídeos randômicos ao RNA, seguida de aquecimento a 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C para posterior realização da reação de polimerização em cadeia (PCR) em tempo real.

5.8.5.3. Construção dos primers:

Foram utilizados *primers* apropriados para cada gene. Os *primers* para PGC-1 α , TFAM e NRF-1 foram desenhados utilizando os dados da plataforma *Pubmed*, e da Bio-Rad. As seqüências e número de localização no *Pubmed* estão apontados na **Tabela 01**.

TABELA 01. Sequências de nucleotídeos dos *primers* dos genes de interesse utilizadas para análise de RT-PCR.

Genes	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Número de acesso na Plataforma <i>Pubmed</i>
PGC-1α	GGCCCGCTACAGTGAGTGTT	ATTGCTCCGGCCCTTTCTT	NM_176075.2
NRF-1	GGGAAAGAAAGCTGCAAGCC	TGGTCCGTAATGCTTGGGTC	NM_001100708.1
TFAM	CAAGACTGTGCGTGCATCTG	TTCACAAACCCGCACGAAAC	NM_031326.1
GAPDH	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG	GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA	NM_017008.3

PGC-1 α : *Peroxisome proliferative activated receptor-gamma co-activator 1-alpha*; NRF-1: fatores nucleares respiratórios - 1; TFAM: fator de transcrição mitocondrial A; GAPDH: *glyceraldet1:4hyde3-phosphate dehydrogenase*.

5.8.5.4. PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR):

A expressão dos genes de interesse foi quantificada por quantitativo RT-PCR, utilizando o aparelho CFX96 *touch*TM sistema de detecção em tempo real e C1000TM *Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, Pennsylvania, USA) e o reagente SYBR Green (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) como marcador fluorescente. As reações foram realizadas em 15 μ L de uma mistura contendo 1 μ L do cDNA da amostra, 0,5 μ L de cada *primer* (sense e anti-sense), 5,5 μ L de água DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato, isenta de Rnase) e 7,5 μ L do *mix* SYBR Green PCR Master (dNTP, tampão de reação, Taq DNA polimerase e SYBER Green I) (Abgene Life Sciences, Epsom, KT, Inglaterra). Os ciclos consistiram de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de

amplificação a 94° C por 15 segundos; temperatura de anelamento (Tm) 57-61° C por 30 segundos e 72° C por 60 segundos. As condições de temperatura e concentração dos *primers* para a PCR em tempo real foram previamente estabelecidas para cada um dos genes de interesse. Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de MELT (**Figura 09**). Os valores de *threshold cycle* (Ct) são os pontos onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com o menor número de ciclos durante a fase exponencial da amplificação (**Figura 10**).

A expressão relativa de RNAm de cada condição foi determinada pelo método de delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), após normalização pela GAPDH e calculada a média dos Ct de cada gene foi realizado, conforme segue abaixo:

- Delta Ct (ΔCt) = Ct GAPDH – Ct do gene alvo, seguindo:
- Cálculo da média S: Média do ΔCt , seguindo:
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{média S}$

Os $\Delta\Delta Ct$ dos grupos Sham-Sed, OVX-Sed, Sham-TR e OVX-TR foram calculados em relação ao Sham-Sed. O valor em unidades arbitrárias (UA) da expressão dos genes alvos foi calculado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Com os valores em UA foram realizados os testes estatísticos.

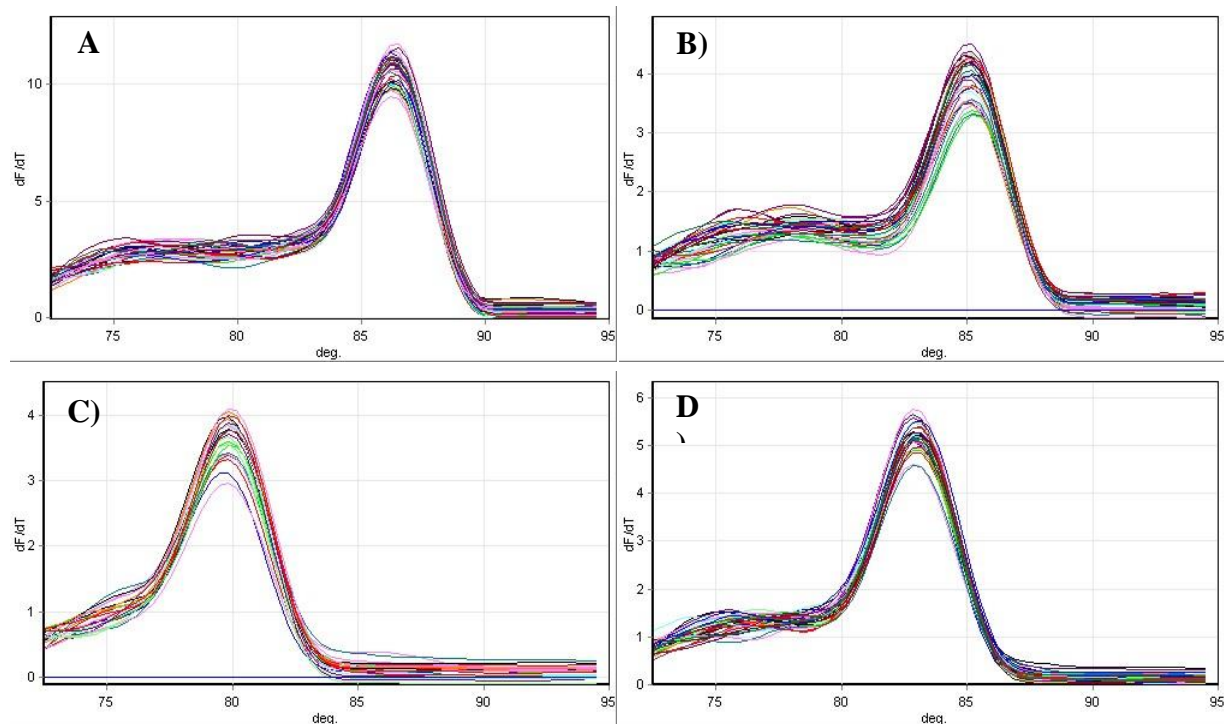


FIGURA 09. Exemplo de curva de MELT original representativa dos ciclos do PCR-RT. (A) GAPDH, (B) PGC-1 α , (C) NRF-1 e (D) TFAM.

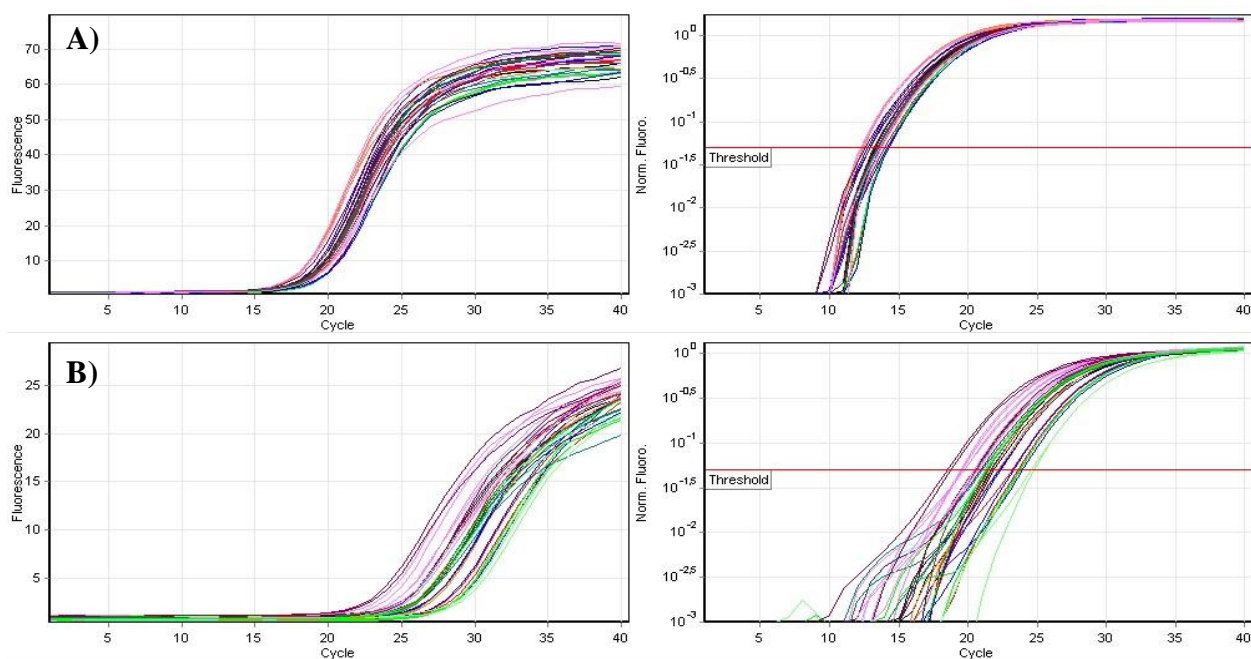


FIGURA 10. Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT (A) GAPDH e (B) PGC-1 α .

5.8.6. Determinação da concentração de proteínas totais:

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

5.8.7. Western Blotting: análise do conteúdo proteico

5.8.7.1. Homogeneização da amostra para Western Blotting:

Inicialmente, os seguimentos do músculo *gastrocnemius* foram homogeneizados mecanicamente com o *Kinematica™ Polytron™* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*) em tampão de imunoprecipitação contendo inibidores de proteases (aprotinina 0,01 mg/mL; PMSF 2 mM) e inibidores de fosfatase (ortovanadato de sódio, 100 mM; pirofosfato de sódio, 10 mM; Fluoreto de sódio, 10 mM), em gelo. Foi realizada a centrifugação (2 minutos, 100 rpm; 4°C) com o tubo de ensaio para baixar a espuma e possibilitar a recuperação da amostra para um micro tubo do tipo *ependorf*.

5.8.7.2. Tratamento das amostras e separação das proteínas por eletroforese:

As alíquotas do lisado de células foram ressuspensas em tampão de amostra Laemmli (1:4) e as proteínas (35-45 µg) fracionadas por SDS-PAGE (12%). As proteínas fracionadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM) e tensão de 100V. A transferência foi realizada no sistema semi-seco utilizando o *Trans-Blot® Turbo™* (*Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, Pennsylvania, USA*). A transferência foi avaliada por coloração com Ponceau-S. A membrana foi bloqueada a temperatura ambiente por 30

minutos em tampão PBS-T (PBS 1×, Tween-20 0,25%) contendo Albumina (4%) ou leite desnatado (5%).

5.8.7.3 Incubação com anticorpo primário e secundário:

As membranas foram incubadas overnight (4°C) com diluições adequadas dos respectivos anticorpos primários, conforme segue: anti-p-AMPK (Thr172) (#2531), t-AMPK (#2603), p-Akt (Ser473) (#4058), t-Akt (#4685), p-CREB (Ser133) (#9198), t-CREB (#9197) and β -actin (#4970) (*Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA*). A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (1 h) conjugado com peroxidase, em PBS-T e albumina (4%). Após o bloqueio, a incubação com anticorpo primário e secundário, foram realizadas três lavagens de 5 minutos com PBS-T.

5.8.7.4. Revelação e densitometria das bandas:

A ligação do anticorpo foi detectada pelo kit de quimiluminescência (kit de ECL) (*Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate - PIERCE, IL, EUA*), conforme descrito pelo fabricante. As membranas foram digitalizadas por sistema de fotodocumentação (Epson expressão 1600) e as densitometrias das bandas de proteína determinada por intensidade de pixel utilizando o *software Scion Imagem* (Scion Corporation®, MD, EUA). A β -actina foi utilizada como controle interno.

5.8.8. Determinação por ELISA dos níveis de 17 β -estradiol no soro

O sangue foi coletado após a eutanásia dos animais e o soro foi separado por meio de centrifugação (20 minutos, 13.000 rpm, 4 ° C). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C. A dosagem do 17 β -estradiol foi realizada por ELISA por meio de Kit comercial de acordo com as especificações dos fabricantes (ADI-900-174, *Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, EUA*). A sensibilidade do ensaio foi de 10 pg/mL. Todas as

amostras foram testadas em duplicada. A quantificação foi dada em relação à curva padrão com a utilização do modelo de regressão não linear de quatro parâmetros logística (4PL). Análise comumente utilizada em ensaios biológicos ou imunoenaios, como ELISA.

5.9. Análises estatísticas

Todos os dados foram expressos como média \pm Desvio Padrão da Média (DPM). Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e o teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). A análise Multivariada de Variância (MANOVA) foi utilizado para comparar as variáveis RT, ER e Ovx. Foi aplicado o *post hoc* de Fisher para comparações múltiplas. O limite ou significância estatística foi de $p < 0,05$. O software utilizado em todos os testes estatísticos foi o Statistica[®] 7.0.

6.RESULTADOS

6.1. Análise da massa corporal total, da soma da massa muscular (*soleus*, *plantaris* e *gastrocnemius*), da massa do fêmur e útero e da ingestão alimentar.

Os animais ovariectomizadas e sedentários (grupo Ovx-Sed) mostraram reduzida massa uterina (redução de 83%) (**Figura 11**) e relação entre massa muscular/ massa corporal (9%). Em adição, o mesmo grupo experimental apresentou aumento da massa corporal total (23%) e da ingestão alimentar (10,9%) quando comparado com o grupo intacto sedentário (Sham-Sed) ($p \leq 0,05$). Além disso, o grupo Ovx-Sed apresentou redução de 11% na massa do fêmur em relação ao grupo Sham-Sed ($p \leq 0,05$). A reposição do estrógeno no grupo Ovx-Sed (Ovx-Sed-RE) provocou redução de massa corporal (12%), aumento da massa do fêmur (13%) e do útero (481%), quando comparado com o Ovx-Sed sem reposição ($p \leq 0,05$). Por outro lado, o TR no grupo Ovx reduziu massa corporal total

(8%) em comparação com Ovx-Sed, e aumentou a relação entre soma da massa muscular/massa corporal, em comparação com Ovx-Sed e Ovx-Sed-ER (**Tabela 02**).

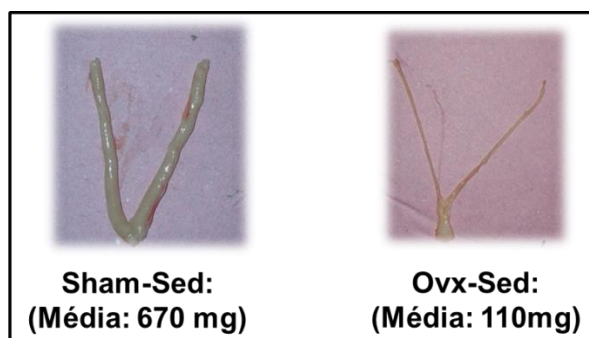


FIGURA 11. Foto dos úteros retirados após a eutanásia; comparação entre animais ovariectomizados e intactos. Sham-Sed: Sham operado Sedentário; Ovx-Sed: Ovariectomizado Sedentário.

TABELA 02. Ingestão alimentar, massa corporal, relação entre soma da massa muscular (*gastrocnemius*, *plantaris* e *soleus*) e massa corporal total massa do útero e fêmur dos grupos experimentais.

	Sham-Sed	Sham-TR	Ovx-Sed	Ovx-TR	Ovx-Sed-RE	Ovx-TR-RE
Massa corporal (g)	301,85 ± 6,56	320,42 ± 8,77	372,10 ± 15,08 ^a	350,40 ± 10,44 ^{b,c}	328,94 ± 7,57 ^{a,c,d}	317,66 ± 8,12 ^{c,d}
Ingestão alimentar (g/d)	21,05 ± 0,50	22,78 ± 0,98	23,39 ± 1,2 ^a	23,25 ± 0,64 ^a	22,28 ± 0,84	22,58 ± 0,75
Massa muscular/MC (g/100 g MC)	0,69 ± 0,02	0,67 ± 0,01	0,63 ± 0,01 ^a	0,65 ± 0,02	0,60 ± 0,02 ^{a,b,d}	0,68 ± 0,02 ^{c,e}
Massa do útero (g)	0,67 ± 0,07	0,63 ± 0,05	0,11 ± 0,00 ^{a,b}	0,09 ± 0,0 ^{a,b}	0,64 ± 0,05 ^{c,d}	0,62 ± 0,03 ^{c,d}
Massa do fêmur/MC (g/100 g MC)	0,26 ± 0,005	0,29 ± 0,004 ^a	0,23 ± 0,006 ^{a,b}	0,25 ± 0,010	0,26 ± 0,007 ^c	0,27 ± 0,01 ^{c,d}

Os dados estão apresentados como Média ± Desvio Padrão da Média (n = 10). MC: Massa Corporal. ^ap≤0,05 comparado com Sham-Sed; ^bp≤0,05 comparado com Sham-TR; ^cp≤0,05 comparado com Ovx-Sed; ^dp≤0,05 comparado com Ovx-TR; ^ep≤0,05 comparado com Ovx-Sed-RE.

6.2. Capacidade Máxima de Carregamento do Treinamento Resistido

A carga máxima de carregamento durante as 12 semanas de treinamento resistido aumentou nos grupos treinados (Sham-TR, Ovx-TR e Ovx-TR-RE) na mesma proporção.

Este resultado indica a eficiência do TR adotado (**Figura 12**).

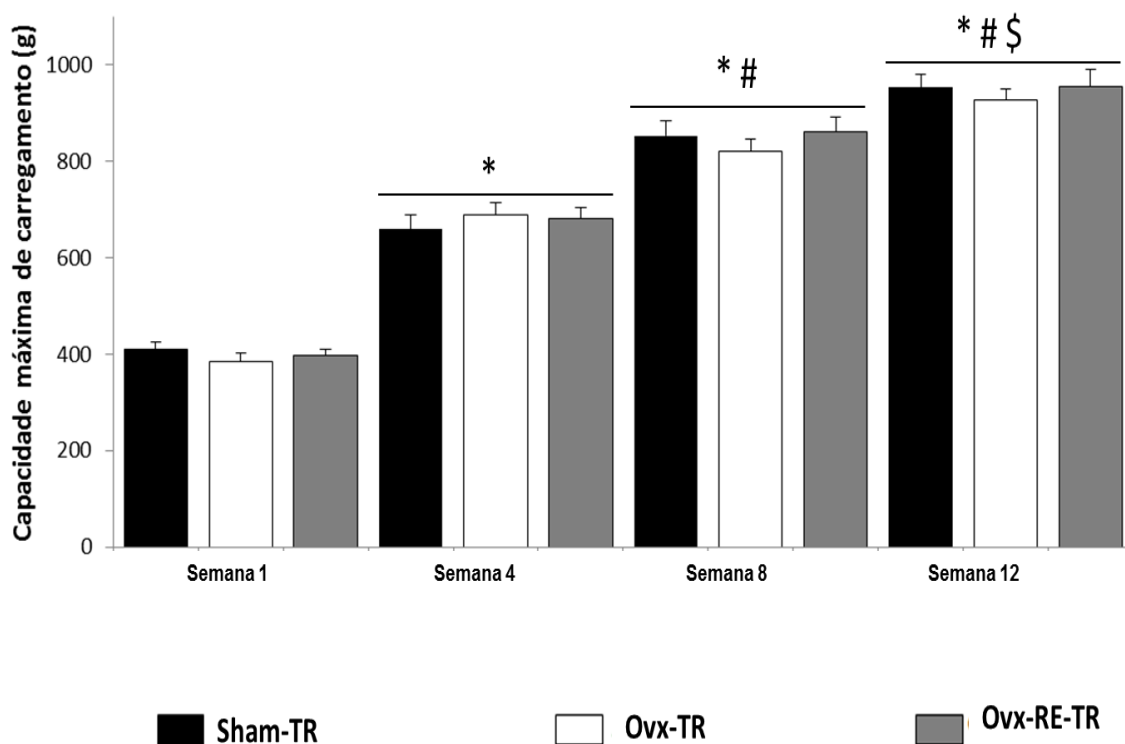


FIGURA 12. Capacidade Máxima de Carregamento, Valores apresentados em Média e Desvio Padrão da Média (n = 11 por grupo), *p<0,05 quando comparado com o respectivo grupo na semana 1; #p<0,05 quando comparado com o respectivo grupo na semana 4; \$p<0,05 quando comparado com o respectivo grupo na semana 8.

6.3. Níveis de 17 β -estradiol no soro

Nos grupos ovariectomizadas (Ovx-Sed: 14,91 \pm 1,66 pg/mL; Ovx-TR:14,84 \pm 0,79 pg/mL) os níveis séricos de 17 β -estradiol foram significativamente menores do que nos grupos intactos (Sham-Sed: 34,05 \pm 0,27 pg/mL; Sham-RT: 34,13 \pm 0,27 pg/mL). No mesmo sentido, os níveis séricos de 17 β -estradiol em grupos com ER (Ovx-Sed-RE: 42,25 \pm 1,66 pg/mL; Ovx-TR-RE: 41,00 \pm 1,36 pg/mL) mostraram um aumento significativo quando comparado com os animais sem este tratamento (Ovx-Sed e Ovx-TR) (**Figura 13**).

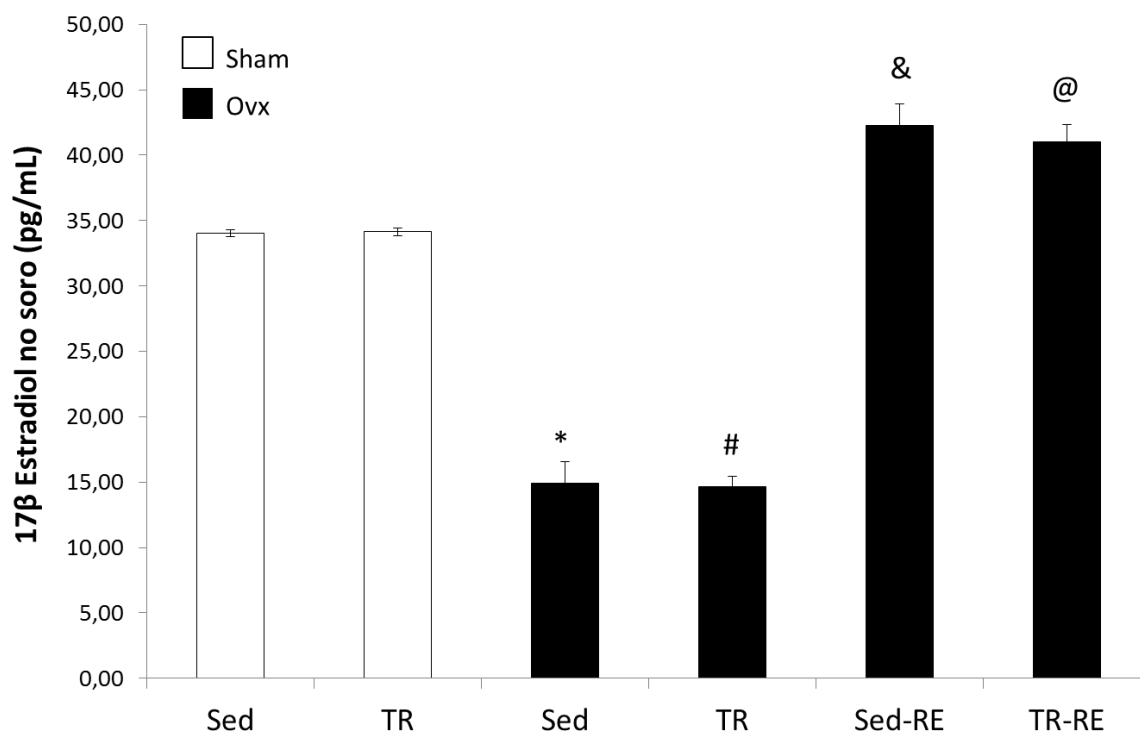


FIGURA 13. Níveis de 17 β -estradiol no soro determinados por ELISA, * p <0,05 comparado com Sham-Sed; # p <0,05 comparado com Sham-TR; & p <0,05 comparado com Ovx-Sed; @ p <0,05 comparado com Ovx-TR (n=5).

6.4. Expressão gênica dos marcadores de biogênese mitocondrial

A ovariectomia (grupo Ovx-Sed) produziu redução significativa da expressão gênica dos marcadores de biogênese mitocondrial no músculo gastrocnêmio quando comparado ao grupo Sham-Sed. Os níveis de RNAm de PGC-1 α , NRF-1 e TFAM foram 73,7%, 44,8% e 53,6% menores, respectivamente, em comparação com os animais Sham-Sed ($p \leq 0,05$). As análises de RT-PCR mostraram que 12 semanas de treinamento resistido provocou aumento significativo na expressão gênica do PGC-1 α (59,7%) (**Figura 14A**) e TFAM (48,4%) (**Figure 14C**) em relação ao grupo Ovx-Sed ($p \leq 0,05$).

Além disso, a associação do treinamento resistido e reposição de estrógeno (Ovx-TR-RE) aumentou a expressão gênica de todos os genes estudados em comparação com os demais grupos Ovx. Os animais Ovx-TR-ER apresentaram níveis de RNAm DE PGC-1 α (79,4%) superiores em relação ao Ovx-Sed e 48% em relação ao Ovx-TR ($p \leq 0,05$) (**Figura 14A**). Em relação aos níveis de RNAm do NRF-1 o aumento foi de 82,4% e 65,7%, respectivamente ($p \leq 0,05$) (**Figure 14B**). Já em relação aos níveis de RNAm do TFAM do grupo Ovx-TR-RE foi 69,2% maior do que o grupo Ovx-Sed e 60,8% do que o grupo Ovx-RT ($p \leq 0,05$) (**Figura 14C**).

Figura 14 (A)

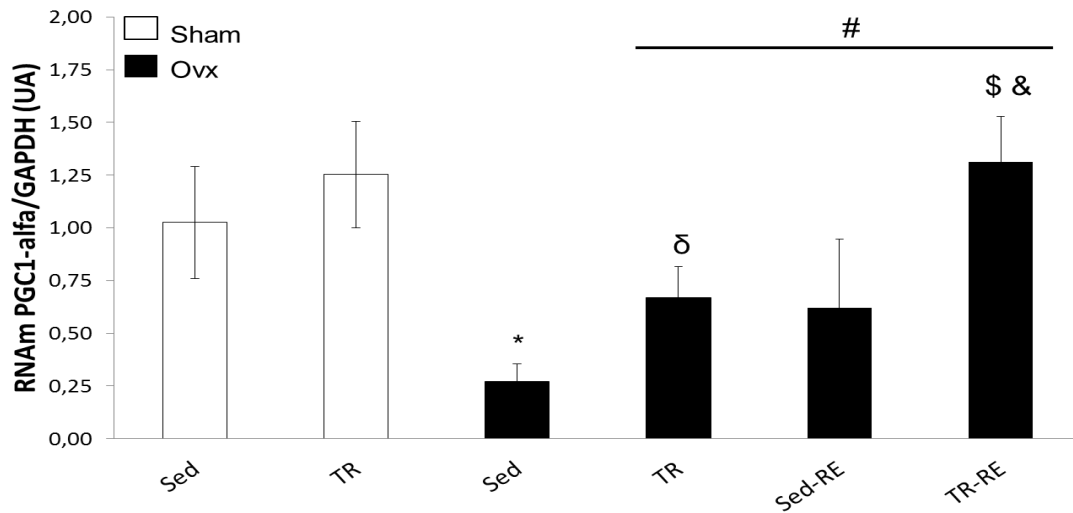


Figura 14 (B)

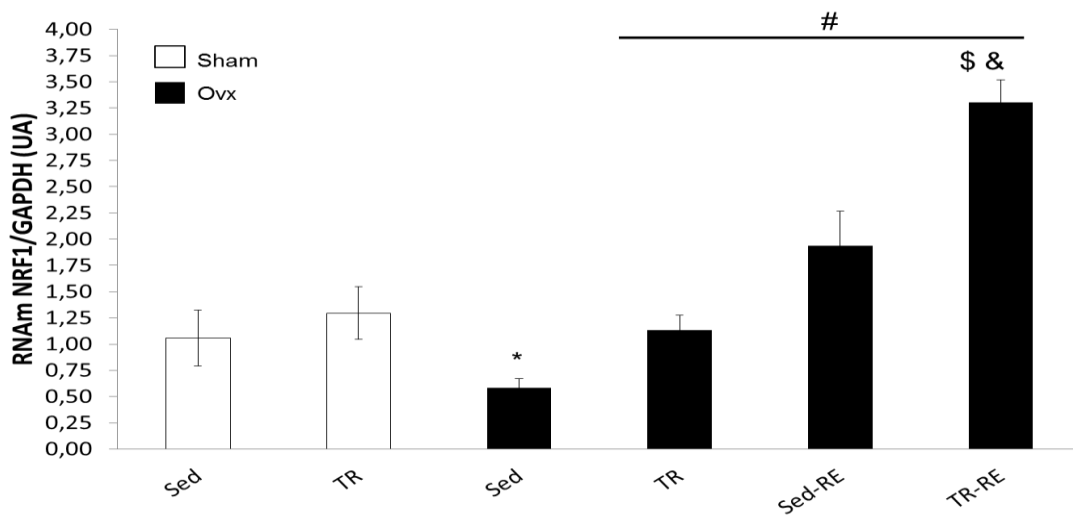


Figura 14 (C)

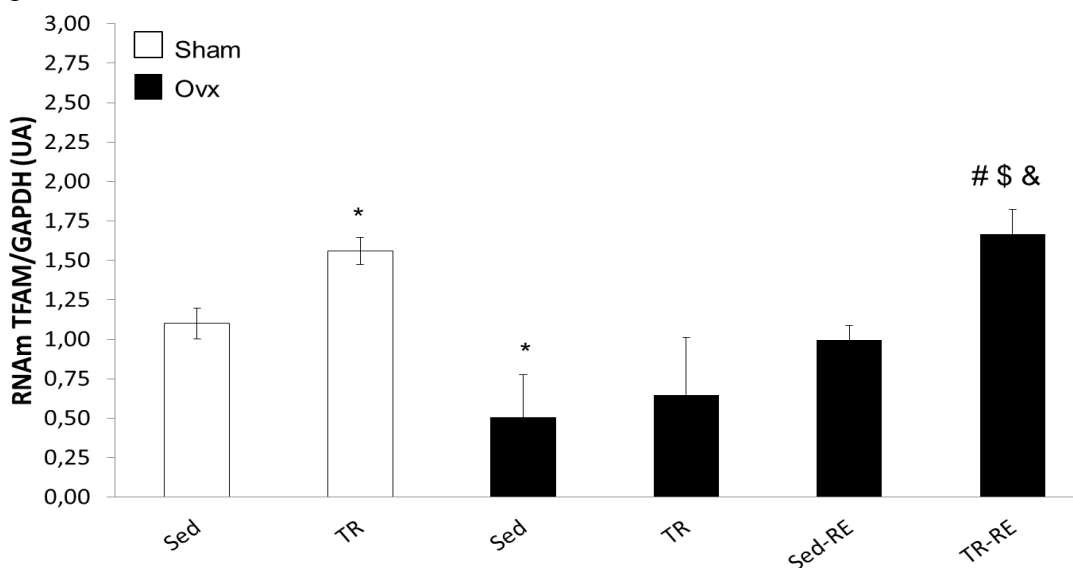


FIGURA 14. Marcadores de biogênese mitocondrial: níveis de RNAm de PGC-1 α (A), NRF-1 (B) e TFAM (C) no pool de músculo esquelético (*gastrocnemius*) relativo ao níveis de RNAm do GAPDH. * $p \leq 0,05$ comparado ao Sham-Sed; # $p \leq 0,05$ comparado ao Ovx-Sed; \$ $p \leq 0,05$ comparado ao Ovx-TR; & $p \leq 0,05$

comparado ao Ovx-RE; [@]p≤0,05 comparado ao Ovx-RE-TR; ^δp≤0,05 comparado ao Sham-TR (n=9). Sham: Sham operado; Ovx: ovariectomizado; Sed: Sedentário; RE: Reposição de Estrógeno; TR: Treinamento Resistido. PGC-1alfa: *Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1-alpha*; NRF-1: Fator respiratório nuclear -1; TFAM: fator transcricional mitocondrial A.

6.5. Conteúdo proteico da Akt, AMPK e CREB

A ovariectomia (grupo Ovx-Sed) produziu uma redução significativa do conteúdo de proteína da forma fosforilada da AMPK, CREB e Akt quando comparado com o grupo Sham-Sed. O TR produziu um aumento significativo da expressão da proteína p-AMPK/AMPK (**Figure 15A**), p-Akt/Akt (**Figure 15B**) e p-CREB/CREB (**Figure 15C**), quando comparado ao grupo OVX-Sed. A reposição de estrógeno por si só (Ovx-Sed-RE) produziu um aumento significativo no conteúdo proteico das proteínas estudadas. No entanto, quando a reposição de estrógeno foi combinada com o treinamento resistido (grupo Ovx-TR-RE) houve um aumento adicional comparativamente aos animais Ovx-Sed e Ovx-TR ($p \leq 0,05$) (**Figura 15**).

Figura 15 (A)

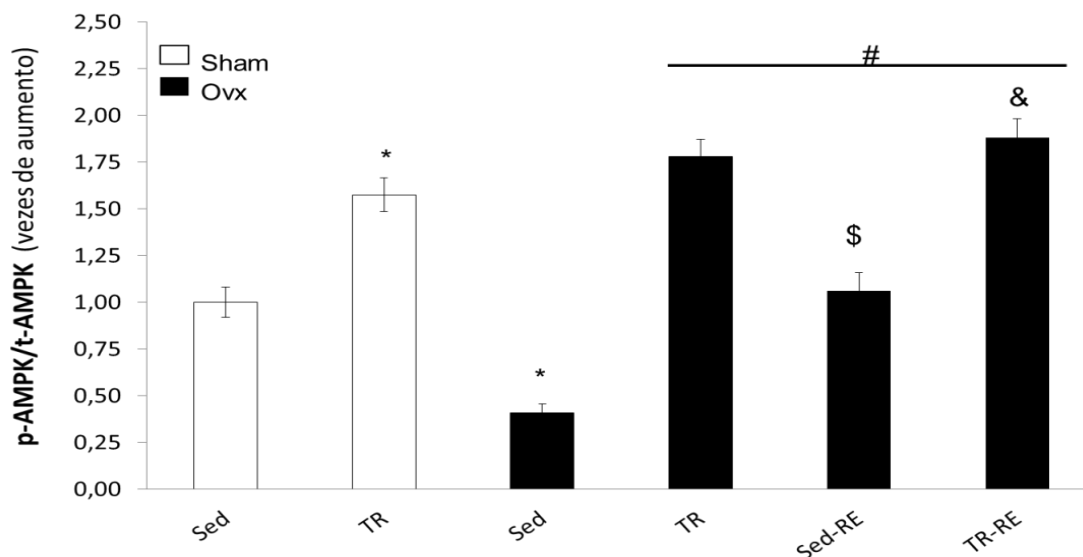


FIGURA 15. Conteúdo de Proteína do músculo *gastrocnemius*: Akt, CREB e AMPK. (A) Conteúdo relativo de p-AMPK/t-AMPK determinado por Western blotting; (B) Conteúdo relativo de p-Akt/t-Akt determinada por Western blotting; (C) Conteúdo relativo de p-CREB/t-CREB determinado por Western blotting; (D) Bandas referentes aos níveis de Akt, CREB, AMPK fosforilado e β -actina determinados por Western blotting. * $p \leq 0,05$ comparado ao Sham-Sed; # $p \leq 0,05$ comparado ao Ovx-Sed; § $p \leq 0,05$ comparado ao Ovx-TR; & $p \leq 0,05$ comparado ao Ovx-Sed-RE. β -actina foi utilizada como controle interno (n=6). Sham: Sham operado; Ovx: ovariectomizado; Sed: Sedentário; RE: Reposição de Estrógeno; TR: Treinamento Resistido; p-AMPK: AMP-proteína quinase ativada fosforilada; t-AMPK: AMP-proteína quinase ativada total; p-Akt: proteína quinase B fosforilada; t-Akt: proteína quinase B total; p-CREB: *cAMP response element-binding protein phosphorylated*; t-CREB: *cAMP response element-binding protein total*.

7. DISCUSSÃO

A saúde geral e o bem estar das mulheres menopausadas tornaram-se um problema de saúde pública mundial, pois aproximadamente 40% das mulheres neste período procuram assistência médica para tratamento dos sintomas (NEDROW *et al.*, 2006; POOMALAR *et al.*, 2013). No período de transição entre a menopausa e o período pós-menopausa ocorre queda acentuada nos níveis de estrógeno plasmáticos que pode afetar vários sistemas (LOBO *et al.*, 2014), incluindo o músculo esquelético. No presente estudo o procedimento cirúrgico foi eficiente em simular uma menopausa experimental (BRINTON, 2012), como demonstrado pelos níveis séricos de 17β -estradiol e a massa do útero, que foram fortemente reduzidos após a ovariectomia. Resultados similares também foram encontrados em outros estudos com diferentes períodos de ovariectomia (NIGRO *et al.*, 2014; ZIERAU *et al.*, 2014).

Corroborando com estudo prévio do nosso laboratório (DOMINGOS *et al.*, 2012) o presente estudo mostrou maior ganho de massa corporal em ratas ovariectomizadas após a castração em relação ao animais Sham. Este aumento da massa corporal pode ser causado pela hiperfágia de ratas Ovx (PANTALEÃO *et al.*, 2010), embora este aumento tenha ocorrido somente nos grupos Ovx sem reposição de estrógeno. Classicamente, a reposição de estrógeno (PALMER, GRAY, 1986) e o treinamento resistido evitam o ganho de massa corporal (PRESTES *et al.*, 2009; PIGHON *et al.*, 2011), como mostrado neste trabalho.

Outro resultado interessante foi a redução da massa muscular (sarcopenia), demonstrada pela soma da massa dos músculos, semelhante à encontrada em outro estudo que analisou este parâmetro (BROWN *et al.*, 2012). Essa redução pode indicar um processo de declínio celular e molecular do músculo esquelético.

O principal objetivo do estudo foi analisar a influência da ovariectomia e treinamento resistido em marcadores da biogênese mitocondrial (PGC-1 α , NRF1, TFAM) e do metabolismo oxidativo (AMPK, Akt e CREB) no músculo esquelético. Nossa hipótese inicial foi confirmada, no sentido em que houve redução desses marcadores nos animais ovariectomizados sedentários (grupo OVX-Sed).

As mitocôndrias do tecido muscular experimentam rápidas e características mudanças como consequência de modificações na utilização da musculatura e fatores ambientais (HOPPELER, FLUCK 2003). Diminuição do conteúdo e da capacidade funcional das mitocôndrias é comumente associado à fisiopatologia muscular implicados no desenvolvimento de miopatia mitocondrial (KANG, JI 2012). As mitocôndrias do músculo esquelético são organelas dinâmicas que desempenham um papel importante em diversos aspectos da biologia celular, incluindo a produção de ATP, a regulação da homeostase do cálcio intracelular, o equilíbrio antioxidante oxidativo e apoptose (HANDSCHIN, SPIEGELMAN 2008). Os mecanismos de biogênese mitocondrial subjacentes aos tecidos são variados, de forma independente do tecido, o PGC-1 α atua como um regulador principal por modular aproximadamente 20% dos genes celulares (CORTON *et al.*, 2004). A ativação coordenada de genes tais como: PGC1- α , TFAM e NRF-1, regula a expressão de proteínas mitocondriais (SCARPULLA 2011). Neste sentido, um achado importante do nosso estudo foi que após 14 semanas de ovariectomia, a expressão gênica (PGC-1 α ~73%; NRF-1 ~44%; TFAM ~53%) e o teor de proteínas (p-

AMPK ~ 59%; p-AKT ~ 77%; p-CREB ~ 82%) relacionadas à biogênese e capacidade oxidativa mitocondrial foram reduzidos no músculo esquelético.

Além disso, o treinamento resistido anulou completamente ou parcialmente a redução dos marcadores mencionados acima nos grupos Ovx-TR e Ovx-TR-RE. No entanto, nos animais do grupo Sham-TR, o protocolo de treinamento resistido apenas aumentou os marcadores de metabolismo oxidativo. Embora seja bem estabelecido que o exercício físico aumente a biogênese mitocondrial no músculo esquelético, não é claro na literatura os efeitos do exercício resistido nesses parâmetros de ratas ovariectomizadas. Este é um estudo pioneiro na investigação dos efeitos de 12 semanas de treinamento resistido intenso do aumento da expressão proteica e gênica de biogênese mitocondrial do músculo esquelético, incluindo PGC1- α , FNI-1, TFAM, p-AMPK e p-CREB.

Estudo realizado por Gigli e Bussmann (2001) mostrou que mitocôndrias isoladas de músculo *gastrocnemius* de ratas apresentaram redução na capacidade respiratória após uma sessão aguda de corrida exaustiva (90 minutos, 21 m/minuto), o que sugere que este tipo de exercício é prejudicial para a função mitocondrial em animais ovariectomizados. Outro estudo que utilizou um protocolo de corrida moderada por quatro semanas mostrou que não houve reversão na diminuição na geração de energia e homeostase (creatina quinase e piruvato quinase) causada pela ovariectomia (SIEBERT *et al.*, 2014).

O remodelamento da *network* mitocondrial desempenha um papel central na plasticidade do músculo esquelético, em resposta ao treinamento. Os ajustes do músculo esquelético induzidos pelo exercício, que dependem do padrão e da intensidade da contração, são altamente específicos e dependem do tipo de exercício, bem como da frequência, duração e intensidade (BO *et al.*, 2010). Uma única sessão prolongada e incremental de corrida em esteira afeta a biogênese mitocondrial do músculo esquelético de ratos (DING *et al.*, 2010). Mais especificamente, o treinamento de *endurance* induz

adaptações do músculo esquelético que exigem a coordenação de diversos eventos celulares. As mudanças mais importantes ocorrem no nível da biogênese mitocondrial (CAFFIN *et al.*, 2013). Alguns estudos realizados com homens mostraram que diferentes protocolos de exercício aumentam a ativação de PGC-1 α no músculo esquelético em relação aos sedentários. Calvo *et al.* (2008) mostrou que uma única sessão corrida promoveu ativação PGC-1 α em camundongos. Corroborando com esses dados, Terada *et al.*, (2002) submeteram ratos a um protocolo prolongado de natação de baixa intensidade, e Wright *et al.*, (2007) utilizaram um protocolo de natação para ratos de 6 horas; ambos os estudos demonstraram os mesmos efeitos, aumento da expressão das proteínas mitocondriais e melhora do desempenho no exercício. Efeitos similares em relação aos marcadores de capacidade oxidativa foram observados no presente estudo no grupo Sham-TR, o qual avaliou os efeitos de um protocolo de treinamento resistido crônico.

O exercício provoca um aumento intermitente do cálcio sarcoplasmático, o qual muda o estado de fosforilação de fatores de transcrição e co-ativadores importantes, incluindo a CREB (BERCHTOLD *et al.*, 2000), resultando assim no aumento da expressão de proteínas, como PGC-1 α (PUIGSERVER, SPIEGELMAN, 2003). O aumento da expressão PGC-1 α durante uma sessão aguda de exercício físico pode ser modulado pela diminuição do fluxo de ATP no músculo esquelético (HOOD *et al.*, 2006). O aumento da relação de AMP/ATP e ativação da AMPK no músculo são provocados por proliferação mitocondrial (HOOD *et al.*, 2006). A interação multifacetada entre PGC-1 α e AMPK desempenha um papel chave neste processo (JAGER *et al.*, 2007).

De acordo com Taaffe (2006), estratégias terapêuticas para a sarcopenia, tais como exercício de *endurance*, resultam no aumento da capacidade mitocondrial do músculo esquelético, o que sugere que a disfunção mitocondrial desempenha um papel crítico na perda de massa muscular. A ativação da função mitocondrial foi demonstrado no presente

trabalho, com base na expressão aumentada da forma fosforilada da AMPK e CREB no grupo Ovx-TR, em comparação com o grupo Ovx-Sed. Estes dados proporcionam uma base biológica para o conceito de que o exercício pode ser utilizado para prevenir e / ou tratar a sarcopenia, que é caracterizada por disfunção mitocondrial.

Foi possível constatar efeitos benéficos na associação entre treinamento resistido e reposição de estrógeno (Ovx-TR-RE). Um estudo realizado com ratas ovariectomizadas utilizou um protocolo de quatro semanas de corrida e reposição de estrógeno e mostrou mudanças significativas na massa muscular total e capacidade contrátil, quando comparado com o grupo controle (BROWN *et al.*, 2012). No entanto, os animais ovariectomizados treinados sem reposição de estrógeno tiveram redução da recuperação muscular, comparado com os animais com reposição (BROWN *et al.*, 2012).

A reposição de estrógeno tem sido estudada como um tratamento para os efeitos deletérios da menopausa. A reposição de estrógeno melhora eficazmente o perfil lipídico e reduz os sintomas da menopausa e da osteoporose, doenças cardiovasculares e dos parâmetros do diabetes (SANTEN *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2014). Os mecanismos pelos quais a expressão de marcadores de biogênese mitocondrial é regulada pelo estrógeno não são bem esclarecidos. Estudos prévios demonstraram que o envolvimento do estrógeno com metabolismo mitocondrial pode ser devido a presença de receptores de estrogênio nas mitocôndrias de cérebro (BRINTON, 2008) e de músculo esquelético (BALTGALVIS *et al.*, 2010).

8. CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a redução de estrógeno, associada à ovariectomia, reduz fatores de transcrição que regulam a biogênese mitocondrial no músculo esquelético. O declínio da biogênese mitocondrial pode estar associado à diminuição na bioenergética do músculo esquelético. O exercício resistido por si só foi eficaz na reversão dos efeitos deletérios da ovariectomia sobre os marcadores de biogênese mitocondrial de ratas ovariectomizadas. Bem como, sua associação com a Reposição de Estrógeno produziu um aumento significativo desses marcadores.

De acordo com os nossos resultados e evidências da literatura, os níveis de estradiol e de exercício parecem desempenhar um papel importante na proteção da disfunção mitocondrial no músculo esquelético de ratas. A **Figura 16** aponta os possíveis alvos moleculares do Treinamento Resistido que podem estar associados à melhora da biogênese e metabolismo mitocondrial no músculo esquelético de ratas ovariectomizadas.

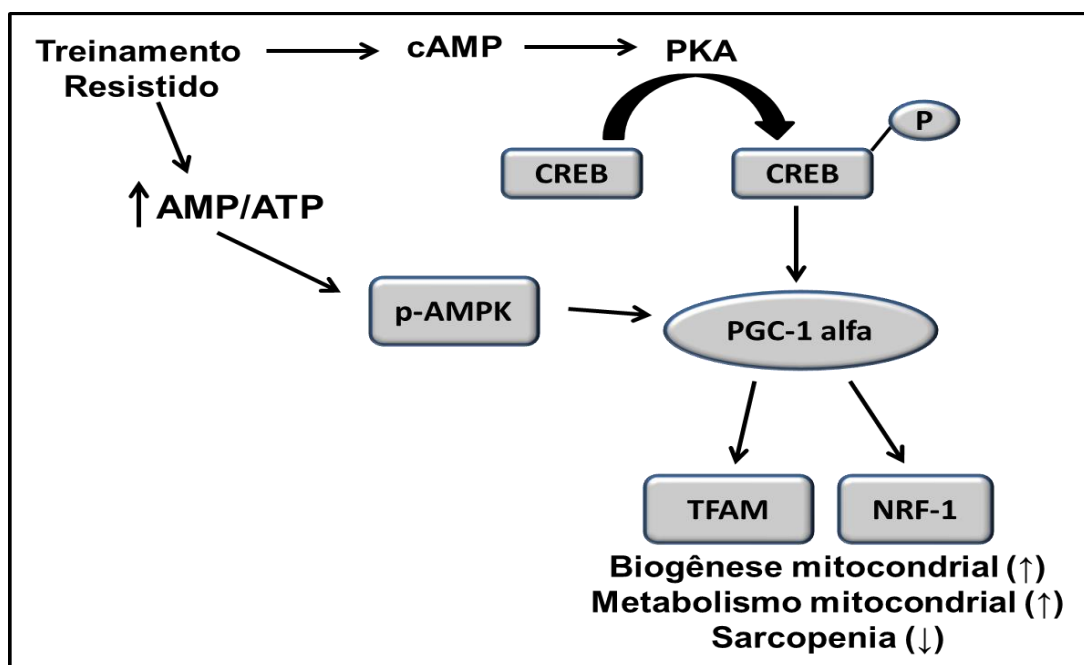


FIGURA 16. Alvos moleculares do Treinamento Resistido que podem estar associados à melhora da biogênese e metabolismo mitocondrial no músculo esquelético de ratas ovariectomizadas.

9. PERSPECTIVAS

O treinamento resistido realizado no presente estudo melhorou os marcadores de biogênese mitocondrial no músculo esquelético de ratas ovariectomizadas. É importante notar que a redução do teor mitocondrial está associada à fisiopatologia muscular (Kang, Ji, 2012), como a sarcopenia, que está associada com o período da pós-menopausa (Leite *et al.*, 2009). O exercício é uma estratégia terapêutica não farmacológica à sarcopenia que resulta no aumento da capacidade mitocondrial muscular (Taaffe, 2006) sugerindo que a disfunção mitocondrial pode ter papel chave na perda de massa muscular.

O treinamento resistido, aplicado a ratas ovariectomizadas deve ser realizado o mais cedo possível, a fim de prevenir ou regredir alterações mitocondriais que possam contribuir ao processo de perda de massa muscular.

Mais pesquisas devem ser realizadas a fim de elucidar os possíveis mecanismos pelos quais as mudanças que ocorrem em função da redução ou ausência de estrógeno, bem como potenciais alvos terapêuticos para a disfunção mitocondrial nesta condição.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, J.; CLEARFIELD, M. Cardiovascular disease after menopause: a growing epidemic. *Minerva Ginecol*, v.58, n.1, p.35-40, 2006.
- AT SMA, F.; BAR TELINK, M.L.; GROBBEE, D.E.; VAN DER SCHOU, W.Y.T. Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis. *Menopause*, 13:265-279, 2006.
- BALAGOPAL, P.; SCHIMKE, J.C.; ADES, P.; ADEY, D.; NAIR, K.S. Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.280, p.203–208, 2001.
- BAL TGALVIS, K.A.; GREISING, S.M.; WARREN, G.L.; LOWE, D.A. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS One*, v.5, n.4, p.10164, 2010.
- BARTON, M. Cholesterol and atherosclerosis: modulation by estrogen. *Curr Opin Lipidol*. v.24, n.3, p.214-220, 2013.
- BERCHTOLD, M.W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev*, v. 80, n. 3, p. 1215-65, 2000.
- BO, H.; ZHANG, Y. JI, L.L. Redefining the role of mitochondria in exercise: a dynamic remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, v.1201, p.121–128, 2010.
- BORI, Z.; ZHAO, Z.; KOLTAI, E.; FATOUROS, I.G.; JAMURTAS, A.Z.; DOUROUDOS, I.I.; TERZIS, G.; CHATZINIKOLAOU, A.; SOVATZIDIS, A.; DRAGANIDIS, D.; BOLDOGH, I.; RADAK, Z. The effects of aging, physical training, and a single bout of exercise on mitochondrial protein expression in human skeletal muscle. *Exp. Gerontology*, v.47, n.6, p.417-424, 2012.
- BRAULT, J.J.; JESPERSEN, J.G.; GOLDBERG, A.L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *J Biological Chem*. v.285, n.25, p.19460–19471, 2010.
- BRINTON, R.D. Minireview: Translational Animal Models of Human Menopause: Challenges and Emerging Opportunities. *Endocrinology*, v.153, n.8, p.3571–3578, 2012.
- BRINTON, R.D. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. *Trends in Neurosciences*, v.31, n.10, p.529–537, 2008.
- BROSKEY, N.T.; GREGGIO, C.; BOSS, A.; BOUTANT, M.; DWYER, A.; SCHLUETER, L.; HANS, D.; GREMION, G.; KREIS, R.; BOESCH, C.; AMATI, C.C.F. Skeletal muscle mitochondria in the elderly: effects of physical fitness and exercise training. *J Clin Endocrinol Metab*. v. 99, n.5, p.1852-1861, 2014.

- BROWN, M.; FERREIRA, JA, FOLEY, AM, HEMMANN, KM. A rehabilitation exercise program to remediate skeletal muscle atrophy in an estrogen-deficient organism may be ineffective. *Eur J Appl Physiol.* v.112, n.1, p.91–104, 2012.
- CAFFIN, F.; PIQUEREAU, J.; NOVOTOVA, M.; DAVID, D.J.; GARNIER, A.; FORTIN, D.; ALAVI, M.V.; VEKSLER, V.; VENTURA-CLAPIER, R.; JOUBERT, F. Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice. *J Physiol.*, v.591, n.23, p.6017–6037, 2013.
- CALVO, J.A.; DANIELS, T.G.; WANG, X.; PAUL, A.; LIN, J.; SPIEGELMAN, B.M.; STEVENSON, S.C.; RANGWALA, S.M. Muscle-specific expression of PPAR γ coactivator-1 α improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J Appl Physiol.*, v.104, n.5, p.1304–1312, 2008.
- CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE, J.P.A.; SALVADOR, I.C.; MARTINS, E.; JARDIM-MESSEDER, D.; WERNECK-DE-CASTRO, J.P.S.; GALINA, A.; CARVALHO, D.P. Role of Estrogen on Skeletal Muscle Mitochondrial Function in Ovariectomized Rats: A Time Course Study in Different Fiber Types. *J Appl Physiol.*, v.116, n.7, p.779-789, 2014.
- CHEN, J.Q.; CAMMARATA, P.R.; BAINES, C.P.; YAGER, J.D. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim. Biophys Acta.*, v.1793, 1540–1570, 2009.
- CHIN, E.R.; OLSON, E.N. ; RICHARDSON, J.A. ; YANG, Q.; HUMPHRIES, C.; SHELTON, J. M.; WU, H.; ZHU, W.; BASSEL-DUBY, R.; WILLIAMS, R.S. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* v.12, n.16, p.2499-2509, 1998.
- CHOW, L.S.; GREENLUND, L.J.; ASMANN, Y.W.; SHORT, K.R.; MCCRADY, S.K.; LEVINE, J.A.; NAIR, K.S. Impact of endurance training on murine spontaneous activity, muscle mitochondrial DNA abundance, gene transcripts, and function. *J Appl Physiol.*, v.102, p.1078–1089, 2007.
- CORTON, J.C.; APTE, U.; ANDERSON SP, LIMAYE P, YOON L, LATENDRESSE J, DUNN C, EVERITT JI, VOSS, K.A.; SWANSON, C.; KIMBROUGH, C.; WONG, J.S.; GILL, S.S.; CHANDRARATNA, R.A.; KWAK, M.K.; KENSLER, T.W.; STULNIG, T.M.; STEFFENSEN, K.R.; GUSTAFSSON, J.A.; MEHENDALE, H.M. Mimetics of caloric restriction include agonists of lipid-activated nuclear receptors. *J Biol Chem.*, v.279, n.44, p.46204–46212, 2004
- DAI, D.; RABINOVITCH, P.S., UNGVARI, Z. Mitochondria and Cardiovascular Aging. *Circ Res*, v.110, p.1109-1124, 2012.
- DING, H.; JIANG, N.; LIU, H.; LIU, X.; LIU, D.; ZHAO, F.; WEN, L.; LIU, S.; JI, L.L.; ZHANG, Y. Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. *Acta Bioch. Bioph.*, v.1800, n.3, p.250–256, 2010.
- DOMINGOS, M.M. ; RODRIGUES, M.F. ; STOTZER, U.S. ; BERTUCCI, D.R. ; SOUZA, M.V. ; MARINE, D.A. ; GATTO, C.D. ; DE ARAUJO, H.S.; DE ANDRADE PEREZ, S.E.

- Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. *Eur J Appl Physiol*, v.112, n.4, p.1437-1444, 2012.
- DOSI, R.; BHATT, N.; SHAH, P.; PATELL, P. Cardiovascular Disease and Menopause. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v.8, n.2, p.62-64, 2014.
- GARATACHEA, N.; LUCÍA, A. Genes and the ageing muscle: a review on genetic association studies. *Age*, v. 35, n.1, p.207-233, 2013.
- GELECEK, N.; ILÇIN, N.; SUBAŞI, S.S.; ACAR, S.; DEMIR, N.; ORMEN, M. The effects of resistance training on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women: a randomized-controlled trial. *Health Care Women Int.*, v.33, n.12, p.1072-1085, 2012.
- GIGLI, I.; BUSSMANN, L.E. Exercise and ovarian steroid hormones Their effects on mitochondrial respiration. *Life Sciences.*, v.68, n.13, p.1505–1514, 2001.
- HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B.M. The role of exercise and PGC1- α in inflammation and chronic disease. *Nature* v.454, n.7203, p.463–469, 2008.
- HEPPEL, RT. Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle. *Front in Aging Neurosc*, v.6, p.1-12, 2014.
- HERRINGTON, D.M.; REBOUSSIN, D.M.; BROSNIHAN, K.B.; SHARP, P.C.; SHUMAKER, S.A.; SNYDER, T.E. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary artery atherosclerosis. *New England J Med.* v.343, p.522-529, 2000.
- HIONA, A.; LEEUWENBURGH, C. The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Exp Gerontol* v.43, p.24–33, 2008.
- HOFER, T.; MARZETTI, E.; XU, J.; SEO, A.Y.; GULEC, S.; KNUTSON, M.D.; LEEUWENBURGH, C.; DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E. Increased iron content and RNA oxidative damage in skeletal muscle with aging and disuse atrophy. *Exp Gerontol* v.43, p.563–570, 2008.
- HOLLOSZY, J;O. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem*, v.242, p.2278-2282, 1967.
- HOOD, D.A.; IRRCHER, I.; LJUBICIC, V.; JOSEPH, A.M. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol*, v. 209, n.12, p.2265-75, 2006.
- HOPPELER, H.; FLUCK, M. Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exer.* v.35, n.1, p.95–104, 2003.
- 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, n.1, p.16-31, 2004.
- HSIEH, Y.C.; YANG, S.; CHOUDHRY, M.A.; YU, H.P.; BLAND, K.I.; CHAUDRY, I.H. PGC-1 upregulation via estrogen receptors: a common mechanism of salutary effects of

- estrogen and flutamide on heart function after trauma hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* v.289, p.2665–2672, 2005.
- IRWIN, R.W.; YAO, J.T.O.; HAMILTON, R.T.; CADENAS, E.; BRINTON, R.D. Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. *Journal of Neuroendocrinology* v.24, p.236–248, 2012.
- IVANOVA, D.G.; YANKOVA, T.M. The free radical theory of aging in search of a strategy for increasing life span. *Folia med.* v.55, n.1, p:33-41, 2013.
- JAGER, S.; HANDSCHIN, C.; ST-PIERRE, J.; SPIEGELMAN, B.M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.104, n.29, p.12017-22, 2007.
- KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.*, v.15, n.3, p.175-191, 1991.
- KANG, C.; JI, L.L. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann NY Acad Sci.*, v.1271, p.110–117, 2012.
- KUIPER, G.G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.*, v.138, p.863–870, 1997.
- LABERGE, R.M.; ADLER, D.; DEMARIA, M.; MECHTOUF, N.; TEACHENOR, R.; CARDIN, G.B.; DESPREZ, P.Y.; CAMPISI, J.; RODIER, F. Mitochondrial DNA damage induces apoptosis in senescent cells. *Cell Death Dis.*, v.18, n.4, p.727, 2013.
- LANZA, I.R.; NAIR, K.S. Muscle mitochondrial changes with aging and exercise. *Am J Clin Nutr* v.89, p.467–471, 2009.
- LEITE, R.D.; PRESTES, J.; BERNARDES, C.F. ; SHIGUEMOTO, G.E. ; PEREIRA, G.B.; DUARTE, J.O.; DOMINGOS, M.M.; BALDISSERA, V.; DE ANDRADE PEREZ, S.E. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Appl Physiol Nutr Metab*, v.34, n.6, p.1079-86, 2009.
- LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B.M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*, v.1, n.6, p.361-70, 2005.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods*, v.25, p.402-408, 2001.
- LOBO, R.A.; DAVIS, S.R.; DE VILLIERS, T.J.; GOMPEL, A.; HENDERSON, V.W.; HODIS, H.N.; LUMSDEN, M.A.; MACK, W.J.; SHAPIRO, S.; BABER, R.J. Prevention of diseases after menopause. *Climacteric.*, v.17, n.5, p.540-556, 2014.
- MADDALOZZO, G.F.; SNOW, C.M. High intensity resistance training: effects on bone in older men and women. *Calcif Tissue Int*, v.66, n.6, p.399-404, 2000.

- MARZETTI, E.; CALVANI, R.; CESARI, M.; BUFORD, T.W.; LORENZI, M.; BEHNKE, B.J.; LEEUWENBURGH, C. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem & Cell Biol*, v.45, p.2288-2301, 2013.
- MARZETTI, E.; HWANG, J.C.; LEES, H.A.; WOHLGEMUTH, S.E.; DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E.; CARTER, C.S.; BERNABEI, R.; LEEUWENBURGH, C. Mitochondrial death effectors: relevance to Sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochim Biophys Acta.*, v.1800, p.235–244, 2010.
- MATTAR, C.N.; HARHARAH, L.; SU, L.L.; AGARWAL, A.A.; WONG, P.C.; CHOOLANI, M. Menopause, hormone therapy and cardiovascular and cerebrovascular disease. *Ann Acad Med Singapore*, v.37, n.1, p. 54-62, 2008.
- MENASCE, L.P.; WHITE, G.R.; HARRISON, C.J.; BOYLE, J.M. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post- FISH banding technique. *Genomics.*, v.17, p.263–265, 1993.
- MENSHIKOVA, E.V.; RITOV, V.B.; FAIRFULL, L.; FERRELL, R.E.; KELLEY, D.E.; GOODPASTER, B.H. Effects of exercise on mitochondrial content and function in aging human skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* v.61, p.534–540, 2006.
- MESSIER, V.; RABASA-LHORET, R.; BARBAT-ARTIGAS, S.; ELISHAA, B.; KARELIS, A.D.; AUBERTIN-LEHEUDREC, M. Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones. *Maturitas* v.68, p.331–336, 2011.
- MITTERLING, K.L.; SPENCER, J.L.; DZIEDZIC, N.; SHENOY, S.; MCCARTHY, K.; WATERS, E.M.; MCEWEN, B.S.; MILNER, T.A. Cellular and subcellular localization of estrogen and progesterin receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus. *J Comparative Neurology*, v.518, p.2729- 2743, 2010.
- MURASE, T.; HATTORI, T.; OHTAKE, M.; NAKASHIMA, C.T.M.; MUROHARA, T.; NAGATA, K. Effects of Estrogen on Cardiovascular Injury in Ovariectomized Female DahlS.Z-Leprfa Rats as a New Animal Model of Metabolic Syndrome. *Am Heart Ass. Hypertension*, v.59, p.694-704, 2012.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C.; National Academy Press, 1996, 140pp.
- NEDROW, A.; MILLER, J.; WALKER, M.; NYGREN, P.; HUFFMAN, L. H.; NELSON, H.D. Complementary and alternative therapies for the management of menopause-related symptoms: a systematic evidence review. *Arch Intern Med*, v.166, n.14, p.1453-65, 2006.
- NIGRO, M.; SANTOS, A.T.; BARTHEM, C.S.; LOUZADA, R.A.; FORTUNATO, R.S.; KETZER, L.A.; CARVALHO, D.P.; DE MEIS, L. A change in liver metabolism but not in brown adipose tissue thermogenesis is an early event in ovariectomy-induced obesity in rats. *Endocrinology*, v.155, n.8, p.2881-2891, 2014.
- NILSEN, J.; CHEN, S.; IRWIN, R.W.; IWAMOTO, S.; BRINTON, R.D. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neuroscience*, v.7, p.74, 2006.

- NILSEN, J.; IRWIN, R.W.; GALLAHER, T.K.; BRINTON, R.D. Estradiol in vivo regulation of brain mitochondrial proteome. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, v.27, p.14069–14077, 2007.
- OLSON, S.H.; BANDERA, E.V.; ORLOW, I. Variants in estrogen biosynthesis genes, sex steroid hormone levels, and endometrial cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, v.165, n.3, p.235-45, 2007.
- PALMER, K.; GRAY, J. Central vs. peripheral effects of estrogen on food intake and lipoprotein lipase activity in ovariectomized rats. *Physiol & Behav*, v.37, n.1, p.187-189, 1986.
- PANTALEÃO, T.U.; MOUSOVICH, F.; ROSENTHAL, D.; PADRÓN, A.S.; CARVALHO, D.P.; DA COSTA VM. Effect of serum estradiol and leptin levels on thyroid function, food intake and body weight gain in female Wistar rats. *Steroids*, v.75, n.10, p.638-642, 2010.
- PIGHON, A.; GUTKOWSKA, J.; JANKOWSKI, M.; RABASA-LHORET, R.; LAVOIE, J.M. Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver. *Metabolism*, v.60, n.5, p.629-39, 2011.
- PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P.D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J Physiol*, v.546, n.3, p. 851-858, 2003.
- POLOTSKY, H.N.; POLOTSKY, A.J. Metabolic implications of menopause. *Seminars in reproductive medicine*, v.28, p.426-434, 2010.
- POOMALAR, G.K.; AROUNASSALAME, B. The quality of life during and after menopause among rural women. *J Clin Diagn Res*, v.7, n.1, p.135–139, 2013.
- PRESTES, J.; DE CASSIA MARQUETI, R.; SHIGUEMOTO, G.E.; LEITE, R.D.; PEREIRA, G.B. ; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. ; BALDISSERA, V.; DE ANDRADE PEREZ, S.E. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*, v.34, n.4, p.700-706, 2009.
- PRONSATO, L.; BOLAND, R.; MILANESI, L. Testosterone exerts antiapoptotic effects against H₂O₂ in C2C12 skeletal muscle cells through the apoptotic intrinsic pathway. *J Endocrinol* v.212, p.371–381, 2012.
- PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.*, v.24, n.1, p.78–90, 2003.
- ROCCA, W.A.; GROSSARDT, B.R.; MILLER, V.M.; SHUSTER, L.T.; BROWN, R.D. Premature menopause or early menopause and risk of ischemic stroke. *Menopause*, v.19, p.272–277, 2012.
- ROLLAND, Y.M.; PERRY, H.M.; PATRICK, P.; BANKS, W.A.; MORLEY, J.E. Loss of appendicular muscle mass and loss of muscle strength in young postmenopausal women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* v.62, p.330–335, 2007.

- ROSANO, G.M.C.; VITALE, C.; MARAZZI, G.; VOLTERRANI, M. Menopause and cardiovascular disease: the evidence. *Climateric* v.10, p.19-24, 2007.
- ROSENBERG, I.H. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutrition*, v.127, p.990S–991S, 1997.
- RUSSELL, A. P. ; FEILCHENFELDT, J. ; SCHREIBER, S. ; PRAZ, M. ; CRETENAND, A. ; GOBELET, C. ; MEIER, C. A. ; BELL, D. R. ; KRALLI, A. ; GIACOBINO, J. P.; DERIAZ, O. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes*, v.52, n.12, p.2874-81, 2003.
- SAFDAR, A.; BOURGEOIS, J.M.; OGBORN, D.I.; LITTLE, J.P.; HETTINGA, B.P.; AKHTAR, M.; THOMPSON, J.E.; MELOV, S.; MOCELLIN, N.J.; KUJOTH, G.C.; PROLLA, T.A.; TARNOPOLSKY, M.A. Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. *PNAS*, v.108, p.4135-4140, 2011.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning; a laboratory manual. 2a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTEN, R.J.; ALLRED, D.C.; ARDOIN, S.P.; ARCHER, D.F.; BOYD, N.; BRAUNSTEIN, G.D.; BURGER, H.G.; COLDITZ, G.A.; DAVIS, S.R.; GAMBACCIANI, M.; GOWER, B.A.; HENDERSON, V.W.; JARJOUR, W.N.; KARAS, R.H.; KLEEREKOPER, M.; LOBO, R.A.; MANSON, J.E.; MARSDEN, J.; MARTIN, K.A.; MARTIN, L.; PINKERTON, J.V.; RUBINOW, D.R.; TEEDE, H.; THIBOUTOT, D.M.; UTIAN, W.H. Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement. *J Clin Endocrinol Metab*, v.95, p.1-66, 2010.
- SCARPULLA, R.C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta.*, v.1813, n.7, p.1269-1278, 2011.
- SCHIAFFINO, S.; DYAR, K.; CICILIOT, S.; BLAAUW, B.; SANDRI, M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal*, v.280, n.17, p.4294-4314, 2013.
- SEO, A.Y.; JOSEPH, A.M.; DUTTA, D.; HWANG, J.C.; ARIS, J.P.; LEEUWENBURGH, C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Science*, v.123, p.2533-2542, 2010.
- SHIGUEMOTO, G.E.; PRESTES, J.; LEITE, R.D.; PEREIRA, G.B.; PONTES, C.L. ; D'AVILA, F.V.; BOTERO, J.P.; BALDISSERA, V.; NONAKA, K.O.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; PEREZ, S.E. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. *Scand J Med Sci Sports*, v.22, n.5, p.:607-617, 2012.
- SHORT, K.R.; VITTONI, J.L.; BIGELOW, M.L.; PROCTOR, D.N.; RIZZA, R.A.; COENEN-SCHIMKE, J.M.; NAIR, K.S: Impact of aerobic exercise training on age-related

- changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes* v.52, p.1888–1896, 2003.
- SIEBERT, C.; KOLLING, J.; SCHERER, E.B.; SCHMITZ, F.; DA CUNHA, M.J.; MACKEDANZ, V.; DE ANDRADE, R.B.; WANNMACHER, C.M.; WYSE, A.T. Effect of physical exercise on changes in activities of creatine kinase, cytochrome c oxidase and ATP levels caused by ovariectomy. *Metab Brain Dis.*, v.29, n.3, p.825-835, 2014.
- SILVA, L.A.; PINHO, C.A.; SCARABELOT, K.S.; FRAGA, D.B.; VOLPATO, A.M.; BOECK, C.R.; DE SOUZA, C.T.; STRECK, E.L.; PINHO, R.A. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.*, v.105, p.861–867, 2009.
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. *Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. Anal. Biochem*, v.150, p.76-85, 1985.
- STROM, J.O.; THEODORSSON, E.; THEODORSSON, A. Order of magnitude differences between methods for maintaining physiological 17 β -estradiol concentrations in ovariectomized rats. *Scand J Clin Lab Invest*, v.68, n.8, p.814-822, 2008.
- TAAFFE, D.R. Sarcopenia - Exercise as a treatment strategy. *Aust Fam Physician*, v.35, n.3, p.130–134, 2006.
- TAN, L.J.; LIU, S.L.; LEI, S.F.; PAPASIAN, C.J.; DENG, H.W. Molecular genetic studies of gene identification for sarcopenia. *Human Genetics* v.131, n.1, p.1–31, 2011.
- TERADA, S.; GOTO, M.; KATO, M.; KAWANAKA, K.; SHIMOKAWA, T.; TABATA, I. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, v.296, n.2, p.350–354, 2002.
- THOMPSON, D.D.; SIMMONS, H.A.; PIRIE, C.M.; KE, H.Z. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*, v.17, p.125-133, 1995.
- VASCONSUELO, A.; MILANESI, L.; BOLAND, R. Actions of 17-estradiol and testosterone in the mitochondria and their implications in aging. *Ageing Research Reviews*, v.12, p.907–917, 2013
- VASCONSUELO, A.; PRONSATO, L.; RONDA, A.C.; BOLAND, R.; MILANESI, L. Role of 17beta-estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids*, v.12, p.1223–1231, 2011.
- VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A.J.; OLIVEIRA, H.C.; CASTILHO, R.F. Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. *Front Biosci*, v.11, p.2554-2564, 2006.
- WANG, L.; MASCHER, H.; PSILANDER, N.; BLOMSTRAND, E.; SAHLIN, K. Resistance exercise enhances the molecular signaling of mitochondrial biogenesis induced by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.111, n.5, p.1335-1344. 2011.
- WENZ, T.; ROSSI, S.G.; ROTUNDO, R.L.; SPIEGELMAN, B.M.; MORAES, C.T. Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease

during aging. *Proceedings National Academy of Sciences of the USA*, v.106, p.20405–20410, 2009.

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

XU, Y.; LIN, J.; WANG, S.; XIONG, J.; ZHU, Q. Combined estrogen replacement therapy on metabolic control in postmenopausal women with diabetes mellitus. *Kaohsiung J Med. Sciences*, v.30, n.7, p.350-361, 2014.

YAO, J.; IRWIN, R.; CHEN, S.; HAMILTON, R.; CADENAS, E.; BRINTON, R.D. Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial beta-amyloid. *Neurobiology of Aging*, v.33, p.1507–1521, 2012.

ZHANG, S.M.; MANSON, J.E.; REXRODE, K.M.; COOK, N.R.; BURING, J.E.; LEE, I.M. Use of oral conjugated estrogen alone and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol*, v.165, n.5, p. 524-9, 2007.

ZIERAU, O.; ZHENG, K.Y.; PAPKE, A.; DONG, T.T.; TSIM, K.W.; VOLLMER, G. Functions of Danggui Buxue Tang, a Chinese Herbal Decoction Containing Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix, in Uterus and Liver are Both Estrogen Receptor-Dependent and Independent. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 438531, 2014.

ANEXO A - ARTIGO SUBMETIDO

Resistance Training and Estradiol Replacement increase Mitochondrial Biogenesis Markers in Skeletal Muscle of Ovariectomized Rats.

Barbosa MR¹; Shiguemoto GE¹; Tomaz LM¹; Ferreira FC¹; Cury Rodrigues MFC¹; Domingos MM¹; Souza MVC¹; Canevazzi GHR¹; Santanielo N¹; Selistre-de-Araujo HS²; Perez, SEA¹.

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

2 - Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology - Department of Physiological Sciences - Federal University of São Carlos, São Carlos / SP, Brazil.

Running Head title: Ovariectomy, Resistance Training and Mitochondrial Biogenesis.

Keywords: mitochondrial biogenesis; ovariectomy; resistance training; estrogen replacement; skeletal muscle; rats.

Total number of words in paper: 3793;

Total number of references: 50;

Subject Area: Muscle physiology;

Table of Contents: Muscle;

Corresponding author: Marina Rodrigues Barbosa

E-mail: marinarbarbosa@yahoo.com.br

Physical Address: Visconde de Inhaúma, 1061. Zip code: 14010-100 – Ribeirão Pretos - SP, Brazil. Phone number: +55 (16) 991336902.

Abstract

Estrogen reduction is associated with a decline in skeletal muscle mitochondrial biogenesis. The molecular events associated with improvements in markers of mitochondrial biogenesis after Resistance Training (RT) and Estradiol Replacement (ER) are unknown. Purpose: This study aimed to investigate the effects of Ovariectomy (Ovx), RT and ER on markers of mitochondrial biogenesis and protein expression related to oxidative capacity in the rat gastrocnemius pool. Methods: ER was performed using Silastic[®] capsules. During the 12-week RT, the animals climbed a ladder with weights attached to their tails. RT began simultaneously for all

experimental groups. Gene expression was analysed by RT-PCR, and protein content was determined by western blotting. Results: The estrogen deficiency associated with Ovx decreased the gene expression of the mitochondrial biogenesis markers PGC-1 α (~73%), NRF-1 (~44%), and TFAM (~53%) ($p < 0.05$) and decreased the protein expression of phosphorylated AMPK, CREB and AKT, which are related to oxidative capacity, compared to the Sham-Sed group. RT increased PGC-1 α (~59%) and TFAM (~48%) expression compared to the Ovx-Sed group. The combination of RT and ER was superior to the Ovx-Sed and Ovx-RT treatments regarding the gastrocnemius muscle. Conclusions: Estrogen deficiency altered the expression of genes and proteins that favour the development of a mitochondrial dysfunction phenotype, which was improved with RT and was partially improved by ER.

Keywords: mitochondrial biogenesis; ovariectomy; resistance training; estrogen replacement; skeletal muscle; rats.

Introduction

Estrogen (E2) reduction is associated with an increased risk of several metabolic abnormalities (Nedrow et al. 2006). The use of ovariectomy (Ovx), i.e., the removal of the ovaries, as a model of human menopause is extensive (Brinton 2012) because data derived from this model have formed much of our fundamental

understanding of E2 action in every organ system in the body (Pighon et al. 2011; Domingos et al. 2012).

Ovx in rodents increases total body mass and body mass adiposity, at least in part due to higher energy intake, reduces skeletal muscle (sarcopenia) and bone mineral mass (osteopenia), and increases the levels of inflammatory markers (Leite et al. 2009; Shiguemoto et al. 2012), suggesting that changes in energy metabolism might occur in E2-deficient animals (Rogers et al. 2009). Metabolic alterations in response to ovariectomy are well documented and occur within three weeks; however, adaptive responses continue throughout multiple systems over a long period of time (Brinton 2012).

Some studies have emphasized the role of E2 in the regulation of mitochondrial bioenergetics (Mitterling et al. 2010; Irwin et al. 2012), and numerous signalling pathways that are regulated by E2 affect mitochondria (Mannella and Brinton, 2006). There is evidence in the literature that the activation of Nuclear Respiratory Factors (NRFs) and Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) modulate the effects of E2 on the mitochondria. NRF1 and NRF2 are the primary regulators of mitochondrial transcription factors, such as TFAM, and of proteins that play crucial roles in the replication, transcription and translation of mtDNA (Chen et al. 2009). Experimental data have revealed the ability of E2 to increase NRF gene expression and increase the protein expression of complex IV and ATP synthase in rat heart cells (Hsieh et al. 2005).

The key stimulus for mitochondrial synthesis is peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α (PGC1- α), a co-activator for transcription factors and nuclear receptors that regulate the expression of mitochondrial proteins, such as NRF-1 and TFAM (Puigserver and Spiegelman 2003). Exercise increases

mitochondrial synthesis in skeletal muscle. However, it is unclear how each type of exercise affects this process. Resistance Training (RT), also known as strength training, results in skeletal muscle hypertrophy without major changes in muscle biochemical composition. Endurance exercise increases aerobic metabolism due to increased mitochondria content without muscle hypertrophy; this adaptation enables subjects to exercise for long periods (Holloszy 2008).

The upstream signalling events involved in the activation of PGC1- α in muscle after exercise are not well known, and several possibilities have been studied. Recently, the MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), AMPK (AMP-Activated Protein Kinase) and p38 pathways have been implicated in the regulation of PGC1- α expression in skeletal muscle (Akimoto et al. 2005). Brault et al. (2010) showed that overexpressing PGC1- α inhibits protein degradation, thereby reducing the activation of the proteosomal and lysosomal systems. Skeletal muscle-specific PGC1- α knockout mice experience early contraction-induced fatigue and exhibit an intolerance to exercise (Leone et al. 2005). Thus, the beneficial effects of exercise on skeletal muscle function are mediated by PGC1- α (Lin et al. 2005).

The role of RT and its association with Estradiol Replacement (ER) on the expression of genes related to mitochondrial biogenesis (PGC1- α , NRF-1 and TFAM) and of proteins related to oxidative capacity (CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein), AMPK and Akt (Protein Kinase B)) in the skeletal muscle of ovariectomized rats have not been well established.

Thus, the primary purpose of the present study was to investigate the effects of Ovx, RT and ER on markers of mitochondrial biogenesis and oxidative capacity in rat skeletal muscle.

Methods

Animals

We used sixty female rats (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman) with an initial body mass of 250 ± 12 g. The animals had free access to water and food, and the animals were housed in collective cages (4 rats/cage) at a constant temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ with 12-h light/dark cycles (light from 8 a.m. to 8 p.m.). All the animals were fed commercial rodent chow. Food intake was monitored daily over the entire experimental period.

After arrival at the Laboratory of Exercise Physiology – UFSCar, all the animals were acclimated to the animal house and to the light/dark cycles for three weeks. After this period, the animals were divided into six groups.

This research was approved by the Committee of Experimental Animals at the Federal University of São Carlos (Protocol 005/2013). All the animal procedures were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council 1996).

Experimental groups

The rats were randomized into six experimental groups (ten animals per group):

- I. Sham-operated Sedentary (Sham-Sed);
- II. Ovariectomized Sedentary (Ovx-Sed);
- III. Sham-operated Resistance Training (Sham-RT);
- IV. Ovariectomized Resistance Training (Ovx-RT);
- V. Ovariectomized Sedentary Estrogen Replacement (Ovx-Sed-ER);
- VI. Ovariectomized Resistance Training Estrogen Replacement (Ovx-RT-ER).

The sedentary animals (Sham-Sed, Ovx-Sed and Ovx-Sed-ER) remained in their cages throughout the experimental period without any type of exercise.

surgical procedures: Ovariectomy and Sham operations

Ovariectomy and sham operations were performed when the rats reached thirteen weeks old (body weight, 250 g) according to the technique described by Kalu (1991). The Sham rats underwent the surgical procedure but did not have their ovaries removed. All the animals that underwent a surgical procedure had one week of recovery. All the animals had the same exposure time to the surgical procedures until the date of sacrifice. For all the surgical procedures, the rats were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (61.5 and 7.6mg/kg, respectively; intraperitoneally). The total Ovx period was 14 weeks.

Resistance Training Protocol

The RT protocol lasted 12 weeks and was adapted from Hornberger Jr and Farrar (2004) according to the needs of the current study. The RT lasted for 12 weeks and occurred at 72 h intervals for a total of 27 sessions. Initially, the rats were familiarized with the RT protocol as described by Prestes et al. (2009). The first training session began three days after this familiarization. This training session consisted of 4-8 stair climbs while transporting progressively heavier loads. The initial rise involved carrying a load that was 75% of the body mass of the animal. Thereafter, 30 g was added until the load impeded the ability of the animals to climb to the top of the ladder. Failure was determined when the animal could not progress up the ladder after three successive stimuli to the tail with tweezers. The maximum load carried successfully throughout the length of the ladder was considered to be the maximum load capacity for the training session.

The next training sessions consisted of 4 steps with 50, 75, 90, and 100% increases in the maximum workload. During subsequent ladder climbs, an additional load of 30 g was added, and the animals were given 5 attempts to climb until a new

maximum workload was established. The RT began simultaneously for all the experimental groups.

Estradiol Replacement (ER)

The animals in the ER groups (Ovx-Sed-ER and Ovx-RT-ER) received a subcutaneously implanted Silastic[®] capsule containing 180 µg of 17β-estradiol/mL in sunflower oil. The Silastic[®] capsules were made from 30-mm segments of Silastic[®] tubing (inner/outer diameter: 1.575/3.175 mm). The Silastic[®] tubing was cut into 15-mm pieces, and silicone glue was used to seal the Silastic[®] tubing, resulting in a column of oil and 17β-estradiol. An incision was made in the loose skin in the rat dorsal region (10 mm), and the Silastic[®] capsule was gently inserted using forceps. The incision was subsequently closed using a suture. Silastic[®] capsules were re-implanted after 6 weeks of ER. According to Strom et al. (2008), conveniently manufactured Silastic[®] capsules are superior to pellets and injections in terms of reliably producing long-term 17β-estradiol concentrations within the physiological range.

Euthanasia and Tissue Sampling

Animals were euthanized by decapitation 48 h after the last training session to minimize any potentially confounding effects of the last bout of exercise on the outcome measures. Sedentary animals were also euthanized at the same time point.

The uterus, three skeletal muscles of the right hind limb (soleus, gastrocnemius and plantaris) and the femur were rapidly removed and weighed. The total muscle mass was estimated based on the sum of the mass of the three removed muscles. The gastrocnemius was weighed, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis. Analyses of protein content and gene expression were performed on a cross section of the gastrocnemius with no

separation of the white and red portions. The right femur wet weight was obtained after a short boil in a 10% KOH solution to remove the surrounding tissue. The timeline for all procedures is described in Figure 1.

Analysis of mRNA Expression

Total RNA was isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) according to manufacturer's specifications. The integrity and quality of the purified RNA were analysed by formaldehyde denaturing agarose gel electrophoresis and the A_{260}/A_{280} ratio. RNA was reverse transcribed into cDNA using a cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA). For the quantitative RT-PCR procedure, 0.625 μ L of cDNA and 0.5 μ L of each primer were mixed in a 15 μ L volume containing EVA Green PCR Master Mix (6.25 μ L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Quantitative PCR was performed using a CFX96[™] Real-Time System and a C1000[™] THERMAL Cycler (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, Pennsylvania, USA). Relative mRNA expression was calculated after normalization to GAPDH using the $\Delta\Delta C_t$ method. Primers for PGC1- α , TFAM and NRF-1 were designed as described in Table 1.

Western Blotting Analysis

Gastrocnemius extracts (25-30 μ g of protein) were separated by 12% SDS-PAGE, and the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked in albumin (4%) and then incubated overnight at 4°C with appropriate dilutions of primary antibodies against p-AMPK (Thr172) (#2531), t-AMPK (#2603), p-Akt (Ser473) (#4058), t-Akt (#4685), p-CREB (Ser133) (#9198), t-CREB (#9197) and β -actin (#4970) (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA). After TBST washes (3 \times 5 min), the membranes were incubated with the appropriate secondary antibody conjugated to HRP for 120 min at

room temperature. Antibody binding was detected using Enhanced Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate as described by the manufacturer. The blots were scanned (Epson Expression 1600), and the densitometry of the protein bands was determined based on pixel intensity using Scion Image (Scion Corporation[®], Frederick, Maryland USA). β -actin was used as an internal control.

Circulating Estradiol Levels

Blood was collected after euthanasia, and the serum was separated and centrifuged (20 min, 13,000 rpm, 4°C); the supernatant was collected and stored at -20°C. An ELISA was used to measure 17 β -estradiol levels in the serum according to the manufacturers' specifications (ADI-900-174, Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, USA). The sensitivity of the assay was 10 pg/mL. All the samples were assayed in duplicate. Standards were graphed and fit using a 4-parameter logistic curve fit.

Statistical Analysis

All the data are presented as the mean \pm standard deviation of the mean (\pm SDM). Initially, the statistical analysis was performed using both the Kolmogorov-Smirnov normality test and homoscedasticity. A Multivariate Analysis of Variance (MANOVA) test was used to compare the variables RT, ER and Ovx. Fisher's post hoc test was used. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. The statistical analyses were performed using STATISTICA[®] 7.0.

Results

Body, muscle (soleus, plantaris and gastrocnemius), femur and uterus mass as well as food intake analysis.

The Ovx-Sed group had a lower uterus mass (83%) and a lower ratio of muscle mass/body mass (9%). In addition, the Ovx-Sed group had increased body

mass (23%) and a higher daily food intake (10.9%) compared to the Sham-Sed group ($p \leq 0.05$). The Ovx-Sed group exhibited an 11% reduction in femur mass compared to the Sham-Sed group ($p \leq 0.05$). ER in the Ovx-Sed group reduced body mass (12%) and increased the femur mass (13%) and the uterus mass (481%) compared to the Ovx-Sed group without ER ($p \leq 0.05$). RT in the Ovx group reduced the total body mass (8%) compared to the Ovx-Sed group and increased the ratio of muscle mass/body mass compared to the Ovx-Sed and Ovx-Sed-ER groups (Table 2).

Maximum Workload of Resistance Training.

The maximum workload during the 12 week RT increased in the trained groups (Sham-RT, Ovx-RT and Ovx-RT-ER) by the same proportion. This result emphasized the efficiency of the utilized RT.

Estradiol (E2) Serum levels.

E2 serum levels were significantly lower in the ovariectomized groups (Ovx-Sed and Ovx-RT) than in the ovary-intact groups (Sham-Sed and Sham-RT). Furthermore, the E2 serum levels were significantly higher in the groups with ER (Ovx-Sed-ER and Ovx-RT-ER) compared to those without ER (Ovx-Sed and Ovx-RT) (Table 2).

Mitochondrial biogenesis gene expression.

Ovariectomy (Ovx-Sed group) significantly reduced the gene expression of mitochondrial biogenesis markers in the gastrocnemius muscle compared to the Sham-Sed group. The mRNA levels of PGC1- α , NRF-1 and TFAM in the Ovx-Sed group were 73.7%, 44.8% and 53.6% lower, respectively, than those in the Sham-Sed group ($p \leq 0.05$). RT-PCR analysis revealed that 12 weeks of RT significantly

increased the gene expression of PGC1- α (59.7%) (Figure 2A) and TFAM (48.4%) (Figure 2C) compared to the Ovx-Sed group ($p \leq 0.05$).

Furthermore, the combination of RT and ER (Ovx-RT-ER) increased the expression of all the studied genes compared to the other Ovx groups. PGC1- α mRNA levels were higher in the Ovx-RT-ER group than in the Ovx-Sed (79.4%) and Ovx-RT (48%) groups ($p \leq 0.05$) (Figure 2A); similarly, NRF-1 mRNA levels were higher in the Ovx-RT-ER group than in the Ovx-Sed (82.4%) or Ovx-RT (65.7%) groups ($p \leq 0.05$) (Figure 2B). TFAM mRNA levels in the Ovx-RT-ER group were higher than those in the Ovx-Sed (69.2%) and Ovx-RT (60.8%) groups ($p \leq 0.05$) (Figure 2C).

Protein Expression of Akt, AMPK and CREB.

Ovariectomy (Ovx-Sed group) significantly reduced the protein content of the phosphorylated forms of AMPK, CREB and AKT compared to the Sham-Sed group. RT significantly increased the protein expression of p-AMPK/AMPK (Figure 3A), p-Akt/Akt (Figure 3B) and p-CREB/CREB (Figure 3C) compared to the Ovx-Sed group.

ER (Ovx-Sed-ER) significantly increased protein expression. However, when ER was combined with RT (Ovx-RT-ER group), an additional increase was observed in the expression of all the studied proteins compared to the Ovx-Sed and Ovx-RT groups ($p \leq 0.05$) (Figure 3).

Discussion

The health of menopausal women and their general welfare have become worldwide public health problems (Poomalar et al. 2013). In the transition period between menopause and the post-menopausal state, hormonal changes occur as serum oestrogen levels sharply decrease; these changes can affect multiple systems (Lobo et al. 2014), including skeletal muscle. The Ovx surgical procedure efficiently

simulated experimental menopause (Brinton, 2012) as demonstrated by the serum 17β -estradiol levels and the uterus mass, which were both markedly reduced after ovariectomy (Table 2); similar results have been reported in other studies with different periods of ovariectomy (Nigro et al. 2014; Zierau et al. 2014).

In agreement with a previous study from our laboratory (Domingos et al. 2012), the present study showed a higher body mass gain in Ovx rats than in Sham rats. This increased body mass could be caused by the hyperphagic state of Ovx rats (Pantaleão et al. 2010), although this increase occurred in Ovx groups without ER. Classically, ER (Palmer and Grey 1986) and RT prevent body mass gain (Prestes et al. 2009; Pighon et al. 2011), as shown herein (Table 2).

Another interesting result was the reduction in muscle mass (sarcopenia), which was similar to that previously published in another study (Brown et al. 2012). This reduction may indicate a decline in the cellular and molecular processes within skeletal muscle.

The main purpose of this study was to analyse the influence of Ovx and RT on markers involved in mitochondrial biogenesis (PGC1- α , NRF1, and TFAM) and oxidative metabolism (AMPK, Akt and CREB) in skeletal muscle. Our hypothesis was confirmed by the decreases in these markers that occurred in the Ovx-Sed group.

Mitochondria in skeletal muscle tissue experience rapid and characteristic changes as a consequence of modifications in muscle use and environmental conditions (Hoppeler and Fluck 2003). Decreased mitochondria content and functional capacity are common muscle pathophysiological traits implicated in the development of mitochondrial myopathy (Kang and Ji 2012). Skeletal muscle mitochondria are dynamic organelles that play a major role in diverse aspects of cell biology, including ATP production, the regulation of intracellular calcium

homeostasis, oxidative–antioxidant balance, and apoptosis (Handschin and Spiegelman 2008). The mechanisms underlying mitochondrial biogenesis vary between tissues, but regardless, PGC1- α serves as a master regulator by modulating approximately 20% of cellular genes (Corton et al. 2004). Activation of genes such as PGC1- α , TFAM and NRF-1 co-ordinately regulate mitochondrial protein expression (Scarpulla 2011). In this sense, an important finding of our study was that 14 weeks after Ovx, the gene expression (PGC1- α ~73%; NRF-1 ~44%; and TFAM ~53%) and protein content (p-AMPK ~59%; p-AKT ~77%; and p-CREB ~82%) of markers of mitochondrial biogenesis and oxidative capacity were reduced in gastrocnemius muscle.

Moreover, exercise training completely or partially abolished the decreases in the markers mentioned above in the Ovx-RT and Ovx-RT-ER groups. However, in the Sham-RT group, the RT protocol only increased markers of oxidative metabolism (Figures 2 and 3). Although it is well established that exercise training generally increases skeletal muscle mitochondrial biogenesis and mitochondrial function, there has been no research focus on the effects of resistance training on markers of mitochondrial biogenesis in Ovx rats. This is the first study to find that 12 weeks of intense RT increased the expression of markers of skeletal muscle mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism, including PGC1- α , NRF-1, TFAM, p-AMPK and p-CREB.

A study by Gigli and Bussmann (2001) showed that isolated mitochondria from gastrocnemius muscle from ovariectomized rats had reduced respiratory capacity after an acute exhaustive running session (90 min, 21 m/min), suggesting that this type of exercise is deleterious to mitochondrial function in ovariectomized animals. Another study that utilized a moderate running protocol over 4 weeks showed that

this protocol did not reverse the decrease in energy generation and homeostasis (Creatine Kinase and Pyruvate Kinase) caused by ovariectomy (Siebert et al. 2014).

Mitochondrial network remodelling plays a central role in the plasticity of skeletal muscle in response to training. Exercise-induced skeletal muscle adjustments, which depend on the pattern and the intensity of the exercise-induced muscle contraction, are highly specific and dependent on the type of exercise as well as the exercise frequency, intensity and duration (Bo et al. 2010). A single bout of prolonged and incremental treadmill running affects the mitochondrial bioenergetics of male rat skeletal muscle (Ding et al. 2010). More specifically, endurance training induces adaptations of the skeletal muscle that require the coordination of various cellular events. The most important changes occur at the level of mitochondrial biogenesis (Caffin et al. 2013).

Some studies performed with males showed that different exercise protocols increase the activation of PGC1- α in skeletal muscle compared to sedentary behaviour. Calvo et al. (2008) showed that a single bout of running exercise promoted PGC1- α activation in mice. To corroborate these data, Terada et al. (2002) subjected rats to a low-intensity prolonged swimming protocol, and Wright et al. (2007) utilized a 6-h swimming protocol for rats; both studies demonstrated the same effects and associated them with increased mitochondrial protein expression and improvements in exercise performance. Similar effects regarding markers of oxidative capacity were observed in the present study in the Sham-RT group.

Exercise causes an intermittent increase in sarcoplasmic calcium, which changes the phosphorylation state of transcription factors and important co-activators, including CREB (Berchtold et al. 2000), thereby resulting in the increased expression of proteins such as PGC1- α (Puigserver and Spiegelman 2003). The

increased PGC1- α expression during an acute bout of exercise could be modulated by decreasing the flow of ATP in skeletal muscle (Hood et al. 2006). The increased AMP/ATP ratio and the activation of AMPK in muscle is elicited by mitochondrial proliferation (Hood et al. 2006). The multifaceted interaction between PGC1- α and AMPK plays an important role in this process (Jager et al. 2007).

According to Taaffe (2006), therapeutic strategies for sarcopenia, such as endurance exercise, result in increased mitochondrial capacity in muscle, suggesting that mitochondrial dysfunction plays a critical role in the loss of mass muscle. The activation of mitochondrial function was demonstrated in the present work based on the expression of phosphorylated AMPK and CREB in the Ovx-RT group compared to the Ovx-Sed group. These data provide a biological basis for the concept that exercise strategies could be used to prevent and/or treat sarcopenia, which is characterized by mitochondrial dysfunction.

There were further improvements when RT was combined with oestrogen replacement (Ovx-RT-ER). A study performed with ovariectomized rats utilized a 4-week protocol of hindlimb unweighting, and ER elicited significant changes in total muscle mass and contractile tension compared to control. However, trained ovariectomized animals showed a lack of muscle mass recovery, whereas supplemental estrogen appeared to improve this recovery (Brown et al. 2012).

Estrogen replacement has been studied as a treatment for the deleterious effects of menopause. ER effectively improves the lipid profile and menopausal symptoms and reduces osteoporosis, cardiovascular disease and diabetes parameters (Santen et al. 2010; Xu et al. 2014). The mechanisms by which the protein expression of mitochondrial biogenesis markers is regulated by estrogen are not obvious. Previous studies have demonstrated E2 involvement in mitochondrial

regulation and the presence of mitochondrial oestrogen receptors in the brain (Brinton 2008) and the skeletal muscle (Baltgalvis et al. 2010).

The present study showed that removing ovarian hormones affected transcription factors that regulate mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. The decline in mitochondrial biogenesis may be associated with decreased skeletal muscle bioenergetics. According to our results and the literature, estradiol levels and exercise appear to play important roles in protecting against the mitochondrial dysfunction that occurs in the skeletal muscle of ovariectomized rats.

Table 1. Sense and antisense sequences of the primers used for real time RT-PCR.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Accession no.
PGC1- α	GGCCCGCTACAGTGAGTGTT	ATTGCTCCGGCCCTTTCTT	NM_031347.1
NRF-1	GGGAAAGAAAGCTGCAAGCC	TGGTCCGTAATGCTTGGGTC	NM_001100708.1
TFAM	CAAGACTGTGCGTGCATCTG	TTCACAAACCCGCACGAAAC	NM_031326.1
GAPDH	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG	GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA	NM_017008.3

PGC1- α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-alpha; NRF-1: nuclear respiratory factor-1; TFAM: mitochondrial transcription factor A; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Table 2. Food intake, body mass, ratio of muscle mass (gastrocnemius, plantaris and soleus) to total mass, and uterus and femur mass in the experimental groups.

	Sham-Sed	Sham-RT	Ovx-Sed	Ovx-RT	Ovx-Sed-ER	Ovx-RT-ER
Body Mass (g)	301.85 \pm 6.56	320.42 \pm 8.77	372.10 \pm 15.08 ^a	350.40 \pm 10.44 ^{b c}	328.94 \pm 7.57 ^{a c d}	317.66 \pm 8.12 ^{c d}
Food intake (g/d)	21.05 \pm 0.50	22.78 \pm 0.98	23.39 \pm 1.2 ^a	23.25 \pm 0.64 ^a	22.28 \pm 0.84	22.58 \pm 0.75
Muscle mass/BM (g/100 g BM)	0.69 \pm 0.02	0.67 \pm 0.01	0.63 \pm 0.01 ^a	0.65 \pm 0.02	0.60 \pm 0.02 ^{a b d}	0.68 \pm 0.02 ^{c e}
Uterus mass (g)	0.67 \pm 0.07	0.63 \pm 0.05	0.11 \pm 0.00 ^{a b}	0.09 \pm 0.0 ^{a b}	0.64 \pm 0.05 ^{c d}	0.62 \pm 0.03 ^{c d}
Femur mass/BM (g/100 g BM)	0.26 \pm 0.005	0.29 \pm 0.004 ^a	0.23 \pm 0.006 ^{a b}	0.25 \pm 0.010	0.26 \pm 0.007 ^c	0.27 \pm 0.01 ^{c d}
Serum Estradiol (pg/mL)	34.05 \pm 0.27	34.13 \pm 0.27	14.91 \pm 1.66 ^{a b}	14.84 \pm 0.79	42.25 \pm 1.66 ^c	41.00 \pm 1.36 ^{c d}

The data are presented as the mean \pm SDM (n=10). BM: Body Mass. ^ap \leq 0.05 compared to Sham-Sed; ^bp \leq 0.05 compared to Sham-RT; ^cp \leq 0.05 compared to Ovx-Sed; ^dp \leq 0.05 compared to Ovx-RT; ^ep \leq 0.05 compared to Ovx-Sed-ER.

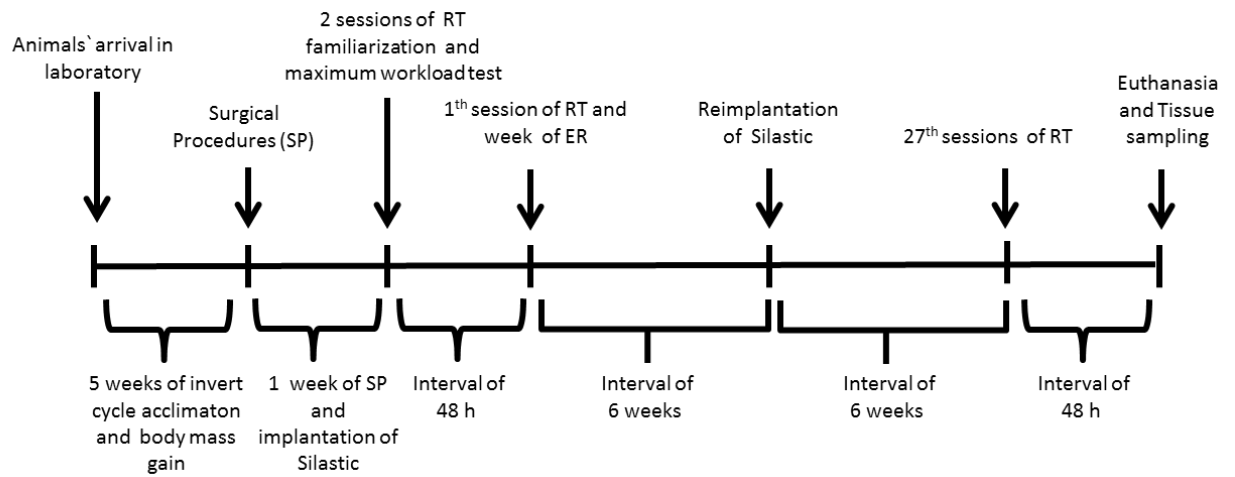


Figure 1. Timeline of experimental procedures. RT: Resistance Training; ER: Estradiol Replacement.

Figure 2 (A)

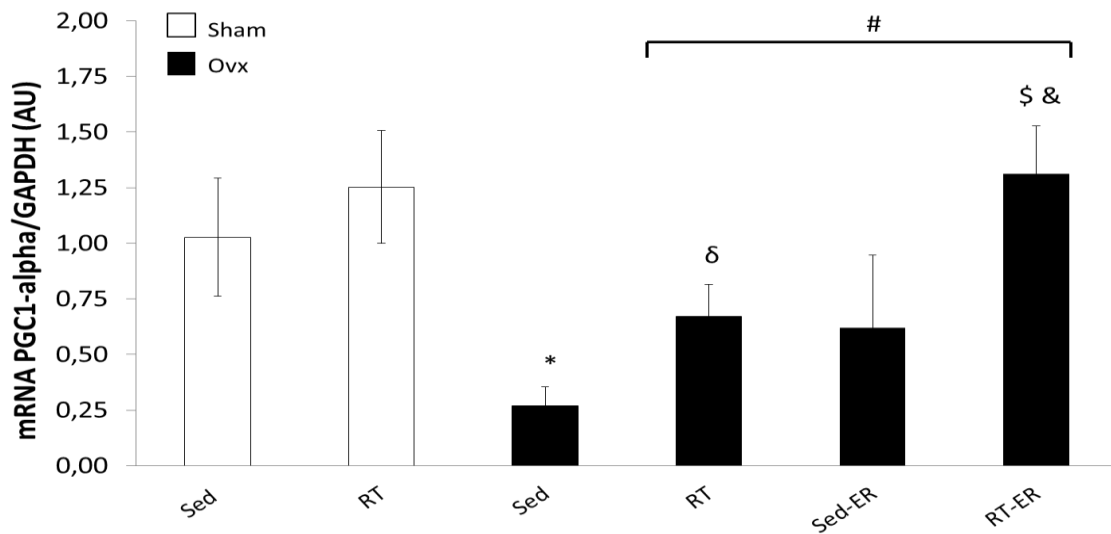


Figure 2 (B)

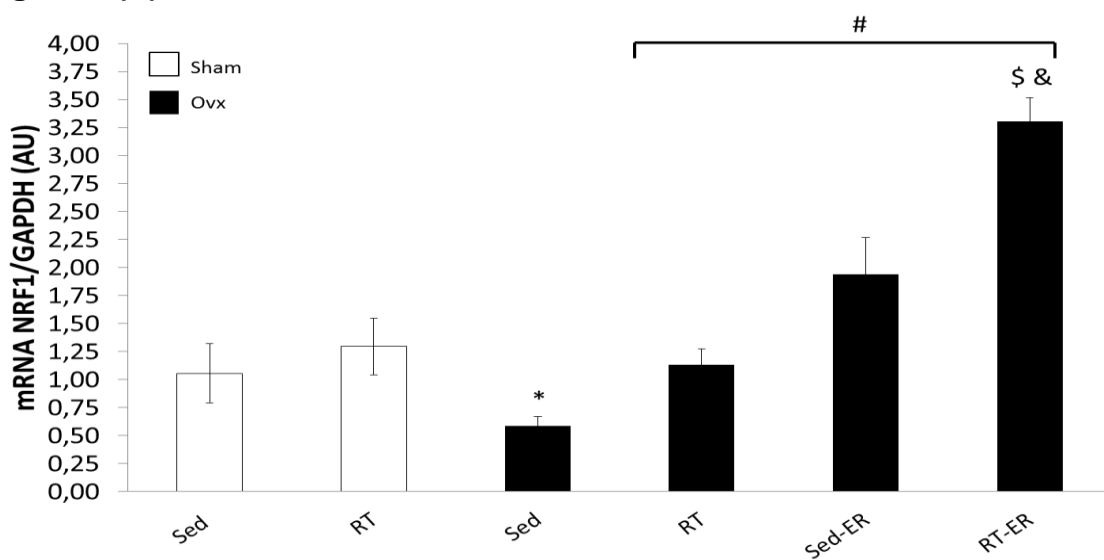


Figure 2 (C)

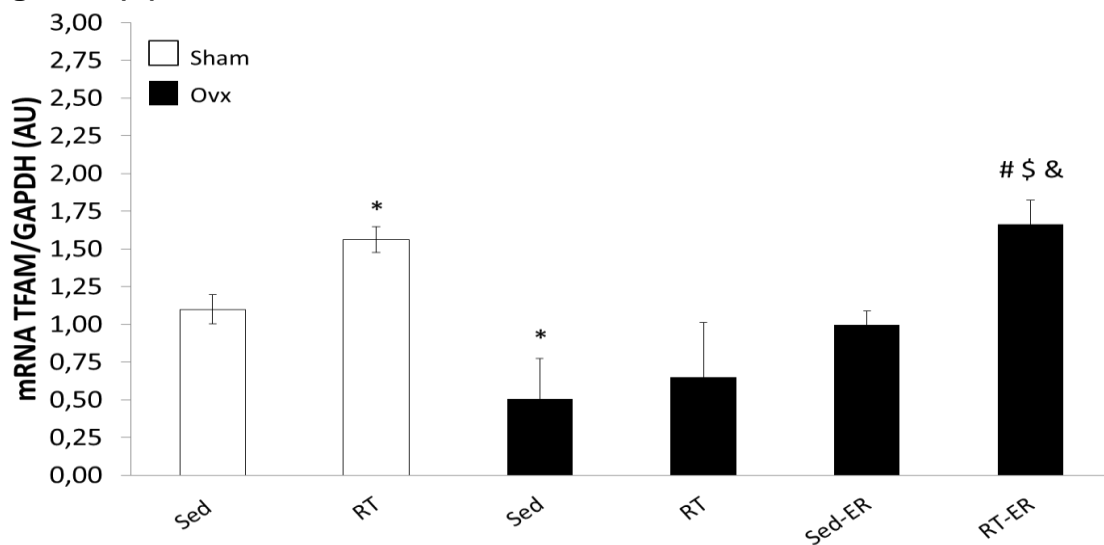


Figure 2. Markers of Mitochondrial Biogenesis: mRNA levels of PGC1-alpha (A), NRF-1 (B) and TFAM (C) in skeletal muscle (gastrocnemius) relative to GAPDH mRNA expression. * $p \leq 0.05$ compared to Sham-Sed; # $p \leq 0.05$ compared to Ovx-Sed; \$ $p \leq 0.05$ compared to Ovx-RT; & $p \leq 0.05$ compared to Ovx-ER; @ $p \leq 0.05$ compared to Ovx-ER-RT; and $\bar{o}p \leq 0.05$ compared to Sham-TR (n=9). Sham: Sham-operated; Ovx: ovariectomized; Sed: Sedentary; ER: Estradiol Replacement; RT: Resistance Training. PGC1-alpha: Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1-alpha; NRF-1: Nuclear respiratory factor-1; TFAM: Mitochondrial transcription factor A.

Figure 3

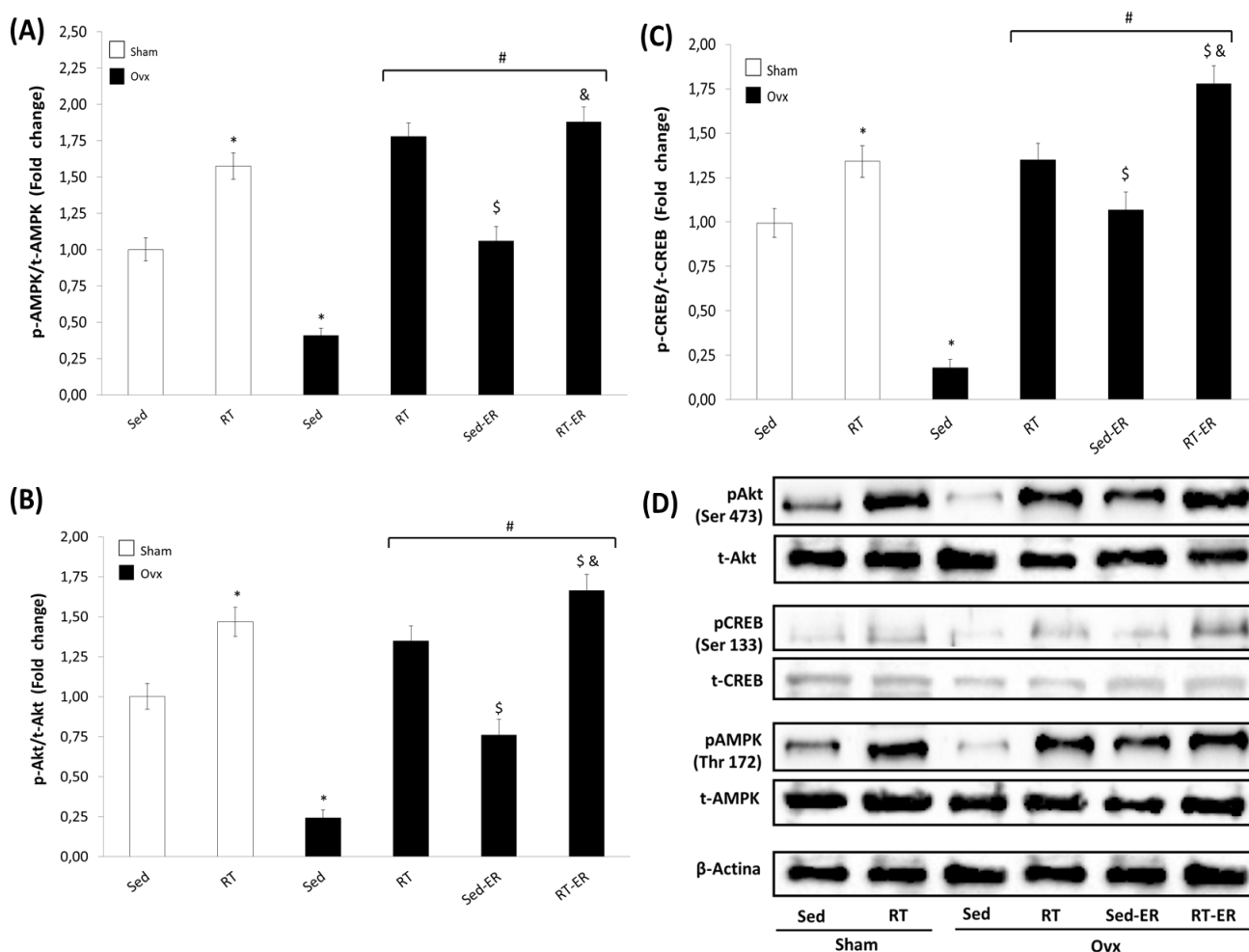


Figure 3. Akt, CREB and AMPK protein expression in gastrocnemius muscle. (A) The relative expression of AMPK as determined by western blotting. (B) The relative expression of Akt as determined by western blotting. (C) The relative expression of CREB as determined by western blotting. (D) Levels of total and phosphorylated Akt, CREB, and AMPK as well as of β -actin as determined by western blotting. * $p \leq 0.05$ compared to Sham-Sed; # $p \leq 0.05$ compared to Ovx-Sed; \$ $p \leq 0.05$ compared to Ovx-RT; and & $p \leq 0.05$ compared to Ovx-Sed-ER. β -actin was used as the internal control (n=6). Sham: Sham-operated; Sed: Sedentary; Ovx: Ovariectomized; ER: Estradiol Replacement; RT: Resistance Training; p-AMPK: phosphorylated 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase; t-AMPK: total 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase; p-Akt: phosphorylated protein kinase B; t-Akt: total protein kinase B; p-CREB: phosphorylated cAMP response element-binding protein; t-CREB: total cAMP response element-binding protein.

ANEXO B – STATUS DA SUBMISSÃO DO ARTIGO

09/03/2015

EP-RP-2015-085214



Manuscript Home Registration and system navigation Information for Authors Journal Policies

Peer review process and guidelines Tips Contact Us Logout

Manuscript #	EP-RP-2015-085214
Current Revision #	0
Submission Date	09-Mar-2015 12:03
Current Stage	Under Review
Title	Ovariectomy, Resistance Training and Estradiol Replacement Modify Mitochondrial Biogenesis Markers in Rat Skeletal Muscle
Running Title	Ovariectomy, Resistance Training and Mitochondrial Biogenesis
Manuscript Type	Research Paper
Special Issue	N/A
Author Cover Letter (optional)	<p>Dr. Paul McLoughlin Editor-in-Chief of the Experimental Physiology,</p> <p>I have been submitting to Experimental Physiology (original article) "Ovariectomy, Resistance Training and Estradiol Replacement Modify Mitochondrial Biogenesis Markers in Rat Skeletal Muscle." In the quality of corresponding author I affirm that none of the material in the manuscript is included in another manuscript, has been published previously, or is currently under consideration for publication elsewhere.</p> <p>According to the suggestion in the anterior submission of the editorial board I sending my manuscript reviewed by professional scientific translation service</p> <p>I affirm too that ethical guidelines were followed by us in this performing study on animals; that each author have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content of this paper and approve of the final version of the manuscript; and that, if requested, the authors will provide the data or will cooperate fully in obtaining and providing the data on which the manuscript was based for examination by the editors or the assignees.</p> <p>I affirm that all authors declare that they agree with the content and co-authorship of this work. In additional, they declare no conflict of interest in this work.</p> <p>Full name and complete contact information for each co-author in order: Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto; email: gileiji@gmail.com; Luciane Magri Tomaz; email: lu_magri@hotmail.com; Fabiano Candido Ferreira; email: facanfe1974@terra.com.br;</p>

<http://ep.msubmit.net/cgi-bin/main.plx?e=A2JT4E1A2DKD1F5A8tdWWZofWuGcOhRy9VQBRQ3AZ>

14


09/03/2015

EP-RP-2015-085214

Corresponding Author	<p>Maria Fernanda Cury Rodrigues; email: mafe_cury@hotmail.com; Mateus Moraes Domingos; email: mmoraesdomingos@gmail.com; Markus Vinicius Campos Souza; email: markusviniciuscampos@gmail.com; Gustavo Henrique Rigo Canevazzi; email: guhrc@hotmail.com; Natalia Santanielo; email: nataliasantanielo@gmail.com; Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo; email: hsaraujo@ufscar.br; Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez; email: seaperez@ufscar.br.</p> <p>I am looking forward to receiving your considerations, Sincerely yours, Dra. Marina Rodrigues Barbosa</p>
Contributing Authors	<p>Dr. Marina Rodrigues Barbosa (Federal University of Sao Carlos) Dr. Marina Rodrigues Barbosa (corr-auth) , Prof. Gilberto Eiji Shiguemoto , Dr. Luciane Magri Tomaz , Dr. Fabiano Candido Ferreira , Maria Fernanda Cury Rodrigues , Mateus Moraes Domingos , Markus Vinicius Campos Souza , Gustavo Henrique Rigo Canevazzi , Natalia Santanielo , Prof. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo , Prof. Sérgio Eduardo Andrade Perez</p>
Abstract	<p>Estrogen reduction is associated with a decline in skeletal muscle mitochondrial biogenesis. The molecular events associated with improvements in markers of mitochondrial biogenesis after Resistance Training (RT) and Estradiol Replacement (ER) are unknown. Purpose: This study aimed to investigate the effects of Ovariectomy (Ovx), RT and ER on markers of mitochondrial biogenesis and protein expression related to oxidative capacity in the rat gastrocnemius pool. Methods: ER was performed using Silastic® capsules. During the 12-week RT, the animals climbed a ladder with weights attached to their tails. RT began simultaneously for all experimental groups. Gene expression was analysed by RT-PCR, and protein content was determined by western blotting. Results: The estrogen deficiency associated with Ovx decreased the gene expression of the mitochondrial biogenesis markers PGC-1α (-73%), NRF-1 (-44%), and TFAM (-53%) (p<0.05) and decreased the protein expression of phosphorylated AMPK, CREB and AKT, which are related to oxidative capacity, compared to the Sham-Sed group. RT increased PGC-1α (-59%) and TFAM (-48%) expression compared to the Ovx-Sed group. The combination of RT and ER was superior to the Ovx-Sed and Ovx-RT treatments regarding the gastrocnemius muscle. Conclusions: Estrogen deficiency altered the expression of genes and proteins that favour the development of a mitochondrial dysfunction phenotype, which was improved with RT and was partially improved by ER.</p>
New Findings	<p>Ovariectomy is associated with sarcopenia and reduction of mitochondrial biogenesis markers, the effects of resistance exercise in these parameters have not been previously explored in skeletal muscle. Estrogen deficiency alters expression of genes and proteins that favor the development of a mitochondrial dysfunction phenotype, which can be improved with RT and partially by ER.</p>
Editor	Not Assigned
Suggested Referees List by Author	Claudio Gobatto (Universidade Estadual de Campinas) , Guilherme Pereira (Universidade Federal do Maranhão), Richard Leite (Universidade Federal do Maranhão)
Author Referee Suggestions to Exclude	N/A
Key Words	mitochondrial biogenesis, ovariectomy, resistance training, estrogen replacement, skeletal muscle,

<http://ep.msubmit.net/cgi-bin/main.plx?e=A2JT4E1A2DKD1F5A8tdWWZofWuGcOhRy9VQBRQ3AZ>

24

	
Primary Table of Contents	
Secondary Table of Contents (optional)	
Competing Interest	No competing interest declared
Funding Sources	Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo - FAPESP; Marina Rodrigues Barbosa 2011/21607-5; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior; Marina Rodrigues Barbosa Doctorated grant
Research Governance	Article Word Count
	How many words are in the Article (including references)?: 3793
Word Count	Reference Count
	How many references are there in the article?: 50
Dual Publication	No
Manuscript Items	

1. Merged File containing manuscript text and 3 Figure files. (last updated: 03/09/2015 12:00:27) [PDF \(965KB\)](#)
 - a. Article File 1 (last updated: 03/09/2015 11:58:10) [PDF \(467KB\)](#) [Source File \(PDF\) 800KB](#)
 - b. Figure 1 (last updated: 03/09/2015 11:59:18) [PDF \(66KB\)](#) [Source File \(PDF\) 98KB](#)
Timeline of experimental procedures. RT: Resistance Training; ER: Estradiol Replacement.
 - c. Figure 2 (last updated: 03/09/2015 12:00:12) [PDF \(151KB\)](#) [Source File \(PDF\) 231KB](#)
Figure 2. Markers of Mitochondrial Biogenesis: mRNA levels of PGC1- α (A), NRF-1 (B) and TFAM (C) in skeletal muscle (gastrocnemius) relative to GAPDH mRNA expression. * $p \leq 0.05$ compared to Sham-Sed; # $p \leq 0.05$ compared to Ovx-Sed; \$ $p \leq 0.05$ compared to Ovx-RT; & $p \leq 0.05$ compared to Ovx-ER; @ $p \leq 0.05$ compared to Ovx-ER-RT; and & $p \leq 0.05$ compared to Sham-TR (n=9). Sham: Sham operated; Ovx: ovariectomized; Sed: Sedentary; ER: Estradiol Replacement; RT: Resistance Training; PGC1- α : Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α ; NRF-1: Nuclear respiratory factor-1; TFAM: Mitochondrial transcription factor A.
 - d. Figure 3 (last updated: 03/09/2015 12:00:12) [PDF \(242KB\)](#) [Source File \(PDF\) 406KB](#)
Figure 3. Akt, CREB and AMPK protein expression in gastrocnemius muscle. (A) The relative expression of AMPK as determined by western blotting. (B) The relative expression of Akt as determined by western blotting. (C) The relative expression of CREB as determined by western blotting. (D) Levels of total and phosphorylated Akt, CREB, and AMPK as well as of β -actin as determined by western blotting. * $p \leq 0.05$ compared to Sham-Sed; # $p \leq 0.05$ compared to Ovx-Sed; \$ $p \leq 0.05$ compared to Ovx-RT; and & $p \leq 0.05$ compared to Ovx-Sed-ER. β -actin was used as the internal control (n=6). Sham: Sham operated; Sed: Sedentary; Ovx: Ovariectomized; ER: Estradiol Replacement; RT: Resistance Training; p-AMPK: phosphorylated 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase; t-AMPK: total 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase; p-Akt: phosphorylated protein kinase B; t-Akt: total protein kinase B; p-CREB: phosphorylated cAMP response element binding protein; t-CREB: total cAMP response element binding protein.
2. Supporting Information for review process only (Overlapping articles/Articles in press) File "Cover Letter" (last updated: 03/09/2015

<http://ep.msubmit.net/cgi-bin/main.plx?el=A2JT4E1A2DKD1F5A9h3WWZcFwuGcOhRy9VQBRQ3AZ>

34

	Barbosa Doctorated grant
Research Governance	Article Word Count
	How many words are in the Article (including references)?: 3793
Word Count	Reference Count
	How many references are there in the article?: 50
Dual Publication	No
Manuscript Items	
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Merged File containing manuscript text and 3 Figure files. (last updated: 03/09/2015 12:00:27) PDF (965KB) <ol style="list-style-type: none"> a. Article File 1 (last updated: 03/09/2015 11:58:10) PDF (467KB) Source File (PDF) 800KB b. Figure 1 (last updated: 03/09/2015 11:59:18) PDF (66KB) Source File (PDF) 98KB Timeline of experimental procedures. RT: Resistance Training; ER: Estradiol Replacement. c. Figure 2 (last updated: 03/09/2015 12:00:12) PDF (151KB) Source File (PDF) 231KB Figure 2. Markers of Mitochondrial Biogenesis: mRNA levels of PGC1-α (A), NRF-1 (B) and TFAM (C) in skeletal muscle (gastrocnemius) relative to GAPDH mRNA expression. *$p \leq 0.05$ compared to Sham-Sed; #$p \leq 0.05$ compared to Ovx-Sed; \$$p \leq 0.05$ compared to Ovx-RT; &$p \leq 0.05$ compared to Ovx-ER; @$p \leq 0.05$ compared to Ovx-ER-RT; and &$p \leq 0.05$ compared to Sham-TR (n=9). Sham: Sham operated; Ovx: ovariectomized; Sed: Sedentary; ER: Estradiol Replacement; RT: Resistance Training; PGC1-α: Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α; NRF-1: Nuclear respiratory factor-1; TFAM: Mitochondrial transcription factor A. d. Figure 3 (last updated: 03/09/2015 12:00:12) PDF (242KB) Source File (PDF) 406KB Figure 3. Akt, CREB and AMPK protein expression in gastrocnemius muscle. (A) The relative expression of AMPK as determined by western blotting. (B) The relative expression of Akt as determined by western blotting. (C) The relative expression of CREB as determined by western blotting. (D) Levels of total and phosphorylated Akt, CREB, and AMPK as well as of β-actin as determined by western blotting. *$p \leq 0.05$ compared to Sham-Sed; #$p \leq 0.05$ compared to Ovx-Sed; \$$p \leq 0.05$ compared to Ovx-RT; and &$p \leq 0.05$ compared to Ovx-Sed-ER. β-actin was used as the internal control (n=6). Sham: Sham operated; Sed: Sedentary; Ovx: Ovariectomized; ER: Estradiol Replacement; RT: Resistance Training; p-AMPK: phosphorylated 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase; t-AMPK: total 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase; p-Akt: phosphorylated protein kinase B; t-Akt: total protein kinase B; p-CREB: phosphorylated cAMP response element binding protein; t-CREB: total cAMP response element binding protein. 2. Supporting Information for review process only (Overlapping articles/Articles in press) File "Cover Letter" (last updated: 03/09/2015

<http://ep.msubmit.net/cgi-bin/main.plx?el=A2JT4E1A2DKD1F5A9h3WWZcFwuGcOhRy9VQBRQ3AZ>

34

ANEXO C - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luis, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais
nº 005/2013

Protocolo nº. 005/13

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado *"Estudo dos efeitos do treinamento resistido na sinalização molecular e remodelamento tecidual em ratas ovariectomizadas"* submetido pelo pesquisador Sergio Eduardo de Andrade Perez.

São Carlos, 21 de fevereiro de 2013.

Prof. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais