

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

MATEUS MORAES DOMINGOS

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA OXIDAÇÃO DE
GORDURA E NA LIPOGÊNESE NO FÍGADO DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

**SÃO CARLOS
2011**

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA OXIDAÇÃO DE
GORDURA E NA LIPOGÊNESE NO FÍGADO DE RATAS
OVARIETOMIZADAS**

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

MATEUS MORAES DOMINGOS

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA OXIDAÇÃO DE
GORDURA E NA LIPOGÊNESE NO FÍGADO DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Fisiologia do Exercício.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez.

**SÃO CARLOS
2011**

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

D671et

Domingos, Mateus Moraes.

Efeitos do treinamento resistido sobre a expressão gênica de moléculas envolvidas na oxidação de gordura e na lipogênese no fígado de ratas ovariectomizadas / Mateus Moraes Domingos. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
63 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Fisiologia. 2. Esteatose hepática. 3. Lipídios. 4. Metabolismo. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Mateus Moraes Domingos

Dia 17/06/2011

Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez.....

Prof^a. Dr^a. Denise Vaz de Macedo.....

Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte.....

Dedico esta dissertação a todas as pessoas que compreendem a importância e a beleza da busca da compreensão de fatos e fenômenos, e em especial aos meus queridos pais, Donizetti Domingos e Maria de Fátima Domingos, e ao meu irmão, Daniel Moraes Domingos, que em um mundo repleto de lógica, mostraram-me o que é mais abstrato e mais verdadeiro em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão,

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

À minha namorada Viviani,

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

Ao meu orientador,

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

Ao professor Vilmar Baldissera, toda minha gratidão e admiração

Agradeço pela amizade, pelos ensinamentos, colaboração e apoio, que sem dúvidas foram determinantes para a realização deste trabalho.

À professora Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo,

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

Aos meus queridos amigos do laboratório de fisiologia do exercício os quais de alguma maneira contribuíram para a concretização deste trabalho.

Ao técnico do laboratório de fisiologia do exercício Cacau, também conhecido como Carlos, pelos seus ensinamentos e dedicação para a realização deste trabalho, sem esquecer os momentos agradáveis da hora do café, onde juntos ficamos por varias vezes.

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

RESUMO

A deficiência de estrógeno está associada à esteatose hepática (EH), por meio de alteração na expressão gênica de moléculas relacionadas à oxidação de gordura e à lipogênese. Tanto o treinamento resistido (TR), quanto o treinamento de endurance (TE) previne a EH em ratas ovariectomizadas (Ovx). No entanto, os eventos moleculares somente foram investigados em relação ao TE e não ao TR. **Objetivo:** investigar os efeitos da Ovx e do TR sobre a expressão gênica de moléculas relacionadas tanto a oxidação de gordura quanto a lipogênese no fígado de ratas. **Métodos:** Ratas Sprague-Dawley adultas foram divididas em 4 grupos (n = 6 por grupo): sham operado sedentário (Sham-Sed), Ovx sedentário (Ovx-Sed), sham operado TR (Sham-Tr) e Ovx-Tr. O protocolo de TR exigiu dos animais a escalada de uma escada vertical de 1,1 m com pesos atados as suas caudas. Cada sessão consistiu de 4-9 escaladas, com intervalo de 2 min entre as escaladas, realizado com frequência semanal de 3 vezes durante 10 semanas. A análise da expressão gênica foi realizada por PCR-RT pelo método $\Delta\Delta Ct$. **Resultados:** A Ovx diminuiu significativamente a expressão gênica das moléculas relacionadas à oxidação de gordura; carnitina palmitoil transferase I 53% e da hidroxiacil-CoA desidrogenase 27%, e aumentou das moléculas relacionadas com a lipogênese; proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis 106%, acetil-CoA carboxilase 72% e estearoil-CoA dessaturase-1 109%, as quais tiveram suas expressões restauradas com o TR, com exceção da ACC. **Conclusão:** Os resultados presentes sugerem que o TR pode ter importantes efeitos sobre a prevenção da EH em animais Ovx, possivelmente por meio da restauração da expressão gênica de moléculas relacionadas ao metabolismo lipídico hepático.

Palavras chaves: ovariectomia, treinamento resistido, esteatose hepática, oxidação de gordura, lipogênese.

ABSTRACT

Decreased levels of estrogen are associated with hepatic steatosis (HS), through changes in gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis. Both resistance training (RT) and endurance training (ET) prevents the HS in ovariectomized (Ovx) rats. However, the molecular events associated with this process were only investigated for ET but not for RT. **Aims:** Thus, the aim of this study was to investigate the effects of Ovx and RT on the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of rats. **Methods:** Sprague-Dawley adult female rats were grouped into four groups (n = 6 per group): sham-operated sedentary (Sham-Sed); Ovx sedentary (Ovx-Sed); sham-Rt and Ovx-Rt. A 10-week RT period, during which the animals climbed a 1.1-m vertical ladder with weights attached to their tails, was used. The sessions were performed three times a week, with 4-9 climbs and 8-12 dynamic movements per climb. Gene expression was analyzed by RT-PCR by the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method. **Results:** The estrogen deficiency associated with ovariectomy decreased the gene expression of molecules related to fat oxidation, carnitine palmitoyltransferase I (53%) and β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (27%), and increased of molecules related to lipogenesis, sterol regulatory element-binding protein-1c (106%), acetyl-CoA carboxylase (ACC) (72%) and stearoyl CoA desaturase-1 (109%), which had their expression restored to the RT, with the exception of the ACC. **Conclusions:** The present results indicate that the RT may have important effects on the prevention of HS in Ovx animals, possibly through the restoration in gene expression of molecules related to hepatic lipid metabolism.

Keywords: ovariectomy, resistance training, hepatic steatosis, fat oxidation, lipogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Proteínas que possuem sua transcrição gênica estimulada pelo PPAR- α	17
Figura 2 – Genes regulados pelo SREBP-2 e SREBP-1c.....	19
Figura 3 – Distúrbio na regulação do metabolismo lipídico levando à esteatose hepática em obesos.....	20
Figura 4 – Esquema de distribuição das ratas e desenho experimental.....	24
Figura 5 – Escada para treinamento resistido.....	27
Figura 6 – Organização da carga de carregamento por sessão de treino.....	28
Figura 7 – Desenho experimental.....	30
Figura 8 – Exemplo de um gel de agarose.....	33
Figura 9 – Exemplo de curva de Melt original representativa dos ciclos do PCR-RT.....	35
Figura 10 – Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT.....	36
Figura 11 – Imagem do gel dos produtos do PCR-RT.....	37
Figura 12 – Carga máxima dos grupos Sham-Tr e Ovx-Tr nas semanas 1, 5 e 10...40	
Figura 13 – Expressão dos genes lipogênicos.....	42
Figura 14 – Expressão dos genes relacionados à oxidação de gordura.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos primers usados para PCR-RT.....	35
Tabela 2 – Efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre parâmetros antropométricos.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC: Acetil-coenzima A carboxilase

AG: Ácido graxo

AMPK: Proteína quinase ativada por monofostato de adenosina

CPT-I: Carnitina palmitoil transferase-I

FAS: Ácido graxo sintase

FATP: Proteína transportadora de ácido graxo

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HAD: Hidroxiacil coenzima-A desidrogenase

LPL: Lipoproteína lipase

OVX: Ovariectomizadas

PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxicinase

PPARs: Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos

PPAR- α : Receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos

PPAR- $\beta\delta$: Receptor beta/delta ativado por proliferadores de peroxissomos

RNAm: Ácido ribonucléico mensageiro

RNAses: Ácidos ribonucleases

PPAR- γ : Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos

RNs: Receptores nucleares

RXR: Receptor do ácido retinóico

SCD-1: Estearoil coenzima A dessaturase

SREBPs: Proteínas ligadoras do elemento regulado por esteróis

TAG: Triacilglicerol

TR: Treinamento resistido

UCP-I: Proteína desacopladora-I

SUMÁRIO

1 Introdução.....	14
2 Hipóteses e objetivos.....	22
2.1 Hipóteses.....	22
2.2 Objetivos.....	22
3 Materiais e métodos.....	23
3.1 Animais e condições experimentais.....	23
3.2 Grupos experimentais.....	24
3.2.1 Grupos sedentários.....	24
3.2.2 Grupos treinamento resistido.....	25
3.3 Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia e da operação sham.....	25
3.4 Treinamento resistido.....	26
3.5 Controle da ingestão alimentar e massa corporal.....	29
3.6 Preparação do tecido.....	29
3.7 Desenho experimental.....	29
3.8 Quantificação da expressão gênica do PPAR- α , CPT-I, HAD, SREBP-1c, ACC, SCD-1 e GAPDH.....	30
3.8.1 Procedimentos gerais.....	30
3.8.2 Extração do RNA total.....	31
3.8.3 Quantificação do RNA total.....	32
3.8.4 Determinação da integridade do RNA.....	32
3.8.5 Transcrição reversa.....	33
3.8.6 Reação em cadeia da polimerase – tempo real (PCR-RT).....	34

3.8.7 Gel dos produtos do PCR-RT.....	37
3.9 Análise estatística.....	38
4. Resultados.....	39
5. Discussão.....	45
6. Conclusão.....	51
Referências bibliográficas.....	52
Anexo I.....	63

1. INTRODUÇÃO

O estrogênio é importante na manutenção da homeostase lipídica hepática, e suas funções como regulador do metabolismo lipídico foi destacado por diferentes modelos experimentais de deficiência de estrógeno (Heine et al. 2000; Paquette et al. 2008). Tanto ratas ovariectomizadas (OVX), quanto nocautes para aromatase e para o receptor de estrógeno alfa desenvolvem doença do fígado gorduroso não-alcoólico, a qual é caracterizada por um acúmulo de triacilglicerol (TAG) nos hepatócitos (esteatose hepática) (Lemieux et al. 2005), uma das mais freqüentes causas de anormalidade da função hepática (Angulo 2002; Browning and Horton 2004). Um recente estudo que incluiu mais de 800 mulheres com idade de 40-59 anos confirmou que o estado menopausal é realmente associado com o desenvolvimento da esteatose hepática (Volzke et al. 2007). Assim, se torna importante investigar intervenções que possam prevenir ou atenuar o acúmulo de lipídios nos hepatócitos, principalmente em condições de diminuída concentração plasmática de estrógenos.

Uma intervenção alternativa não farmacológica para neutralizar ou minimizar o acúmulo de gordura nos hepatócitos é o exercício físico (Leite et al. 2009). Foi demonstrado que o exercício físico previne o acúmulo de gordura no fígado de ratos, tanto alimentados com dieta padrão, quanto alimentados com dieta hiperlipídica (Gauthier et al. 2003; Gauthier et al. 2004). Especificamente em ratas OVX existem algumas evidências de que o treinamento resistido (TR) reduz o acúmulo de gordura nos hepatócitos (Corriveau et al. 2008; Leite et al. 2009; Pighon et al. 2009). No entanto, estes estudos não forneceram qualquer informação sobre os mecanismos

moleculares pelo qual o TR previne ou atenua o acúmulo de gordura nos hepatócitos de animais OVX.

O acúmulo de gordura no fígado de animais OVX parece ser iniciado por mudanças na expressão de genes que aumentam a síntese de lipídios ao mesmo tempo em que diminuem a expressão de genes envolvidos na oxidação lipídica (Paquette et al. 2008; Pighon et al. 2010). Quase todas as famílias dos fatores transcricionais contribuem para a regulação do metabolismo lipídico hepático, entretanto, somente algumas famílias demonstraram um claro papel predominante nesta regulação (Desvergne et al. 2004; Kohjima et al. 2007). Entre essas famílias de fatores transcricionais, destacam-se os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) e as proteínas ligadoras do elemento regulado por esteróis (SREBPs) (Desvergne et al. 2004; Kohjima et al. 2007).

Os PPARs são membros da super família dos receptores nucleares (RNs), sendo essencialmente reconhecido por sua função de sensor lipídico e regulador do metabolismo lipídico (Desvergne; Wahli 1999; Desvergne et al. 2004). Os RNs são fatores de transcrição ativados por ligantes, que atuam em processos fisiológicos através da regulação da expressão de genes-alvo, são proteínas solúveis localizadas no citoplasma ou no núcleo celular. Em humanos, a superfamília de RNs é composta por 48 membros, destacando-se entre eles os receptores de esteróides, do hormônio tireoideano, da vitamina D₃, do ácido retinóico (RXR) e os PPARs (Chawla et al., 2001). Uma importante função centra-se no RXR atuando como parceiro heterodimérico obrigatório para outros RNs, dentre eles, os PPARs (Pinaire; Reifel-Miller, 2007).

Entre as três isoformas identificadas do PPAR (PPAR- α , PPAR- $\beta\delta$ and PPAR- γ), a isoforma alfa é altamente expressa em tecidos com altas taxas de

oxidação de ácidos graxos, podendo ser ativado tanto por agonistas sintéticos, como os fibratos, ou por agonistas naturais, tais como, ácidos graxos ou eicosanóides (Minnich et al. 2001). Quando ativado, o PPAR α promove regulação ascendente de genes envolvidos tanto na captação e transporte celular de ácidos graxos, quanto da oxidação peroxissomal, mitocondrial e microssomal de ácidos graxos (Mandard et al. 2004). O gene que codifica a enzima carnitina palmitoiltransferase I (CPT I) esta entre os genes regulados pelo PPAR- α (Yu; Lu; Gulick, 1998; Brandt; Djouadi; Kelly, 1998, Minnich et al. 2001). A CPT I regula de maneira quantitativa e qualitativa o transporte de ácidos graxos do citoplasma para a matriz mitocondrial, pela formação da molécula Acil-Carnitina a partir das moléculas acil-CoA e carnitina, permitindo desta forma o transporte inicial de ácidos graxos pelas membranas mitocôndriais para a β -oxidação (Minnich et al. 2001). Além disso, o gene que codifica a enzima hidroxiacil-CoA desidrogenase (HAD) enzima limitante da β -oxidação também apresenta sua transcrição regulada pelo PPAR- α (Zhang, et al., 1992, Mandard et al. 2004). A enzima HAD cataliza a oxidação da hidroxiacil-CoA para formação do intermediário da β -oxidação Cetoacil-CoA.

Além dos genes que codificam a CPT I e a HAD, vários outros genes demonstraram possuir sua transcrição sob controle direto do PPAR α (figura 01), dentre eles, a enzima Acil-CoA Sintase (Schoonjans, et al., 1995) responsável pela conversão do ácido graxo num derivado da CoA, a Acil-CoA, a enzima Acil-CoA Oxidase (Dreyer, et al., 1992; Tugwood, et al., 1992; Varanasi, et al., 1998) enzima da β -oxidação Peroxissomal, a enzima Enoil-CoA Hidratase (Zhang, et al., 1992) enzima da β -oxidação Peroxissomal e mitocondrial responsável pela hidratação da Enoil-CoA com subsequente formação de Hidroxiacil-CoA, a proteína transportadora de ácido graxo (FATP) (Issemann, et al., 1992) responsável pelo transporte de AG

através da membrana celular, a enzima lipoproteína lipase (LPL) (Schoonjans, et al., 1996) cataliza a liberação de AG vinculados as lipoproteínas, a enzima 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA Sintetase (HMG-CoA Sintetase) (Rodriguez, et al., 1994) envolvida na síntese de corpos cetônicos, a enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) (Tontonoz, et al., 1995) enzima da via gliconeogênica, a proteína desaclopadora I (UCP-I) (Sears, et al., 1996) envolvida na termogênese, a ácido graxo translocase CD36 (FAT/CD36) (Talanian, et al., 2010) proteína transportadora de AG presente principalmente na membrana mitocondrial e a proteína de ligação a ácido graxo da membrana plasmática (FABPpm) (Talanian, et al., 2010) proteína de ligação/transportadora presente principalmente no sarcolema. Desse modo, o PPAR- α é altamente expresso em tecidos com altas taxas de captação, transporte e oxidação de AG, resultando em regulação ascendente de genes envolvidos na captação e transporte celular de AG, na oxidação mitocondrial e peroxissomal de AG e nas vias cetogênica e gliconeogênica (Mandard et al., 2004).

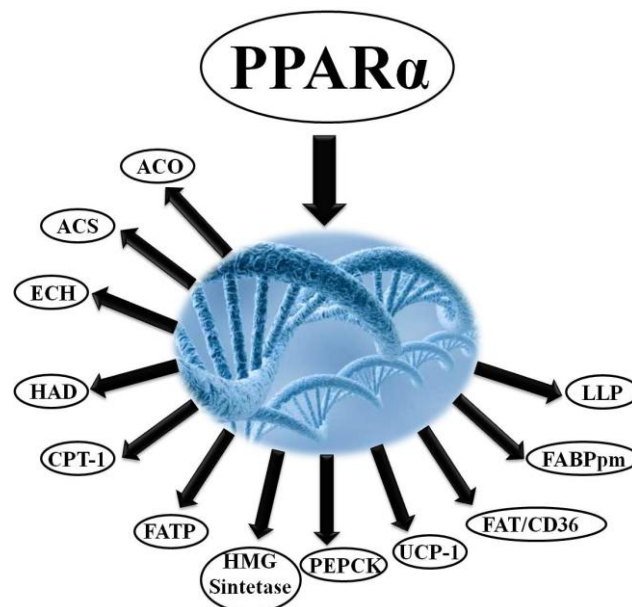


Figura 01. Proteínas que possuem sua transcrição gênica estimulada pelo PPAR- α . PPAR α : receptor ativado por proliferadores de peroxissomas alfa; ACO: acil-CoA oxidase; ACS: acil-CoA sintase; ECH: enoil-CoA hidratase; HAD: hidroxiacil-CoA

desidrogenase; CPT-I: carnitina palmitoil transferase-I; FATP: proteína transportadora de ácido graxo; HMG sintetase: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintetase; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxicinase; UCP-I: proteína desaclopadora-I; FAT/CD36: ácido graxo translocase/CD36; FABPpm: proteína de ligação a ácido graxo da membrana plasmática e LLP: lipoproteína lípase.

As SREBPs, inversamente, são um grupo de fatores transcricionais ligados a membrana que regulam diretamente a expressão de mais de 30 genes envolvidos na produção e captação de colesterol, ácidos graxos, TAG e fosfolipídios, bem como do cofator NADPH requerido para a síntese dessas moléculas (Horton 2002; Ferré; Foufelle 2007). Três membros da família da SREBP foram identificados em mamíferos; SREBP-1a, SREBP-1c e a SREBP-2 (Ferré; Foufelle 2007). SREBP-1c transcricionalmente ativa genes necessários para a lipogênese (genes envolvidos na síntese de AG) (figura 02). Entre os genes regulados pela SREBP-1c esta a enzima acetil-coenzima A carboxilase (ACC), a qual promove a carboxilação da acetil-coenzima A formando malonil-coenzima A, passo inicial da síntese dos ácidos graxos, e a enzima estearoil coenzima A dessaturase (SCD-1) que representa o ponto de controle central da homeostase lipídica (Sampath; Ntambi 2006). A SCD-1 cataliza a etapa limitante na biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados, os quais são necessários tanto para a síntese de TAG, quanto para a produção de lipoproteínas de muito baixa densidade (Cohen et al. 2002; Cohen et al. 2003). Adicionalmente, a SREBP-1a pode estimular todos os genes responsivos aos SREBPs e a SREBP-2 ativa principalmente genes envolvidos na síntese do colesterol (figura 02) (Brown; Goldstein, 1997).

No fígado, as três isoformas regulam a produção de lipídios para armazenagem ou para a exportação para o plasma como lipoproteínas ou para a bile como micelas (Horton et al., 2002).

As SREBPs são sintetizadas como proteínas precursoras, exigindo clivagem do domínio terminal NH₂, antes que a forma ativa possa interagir com o núcleo e funcionar como um fator de transcrição (Horton et al., 2002). Essa clivagem é realizada pela proteína de ativação/clivagem da SREBP (SCAP).

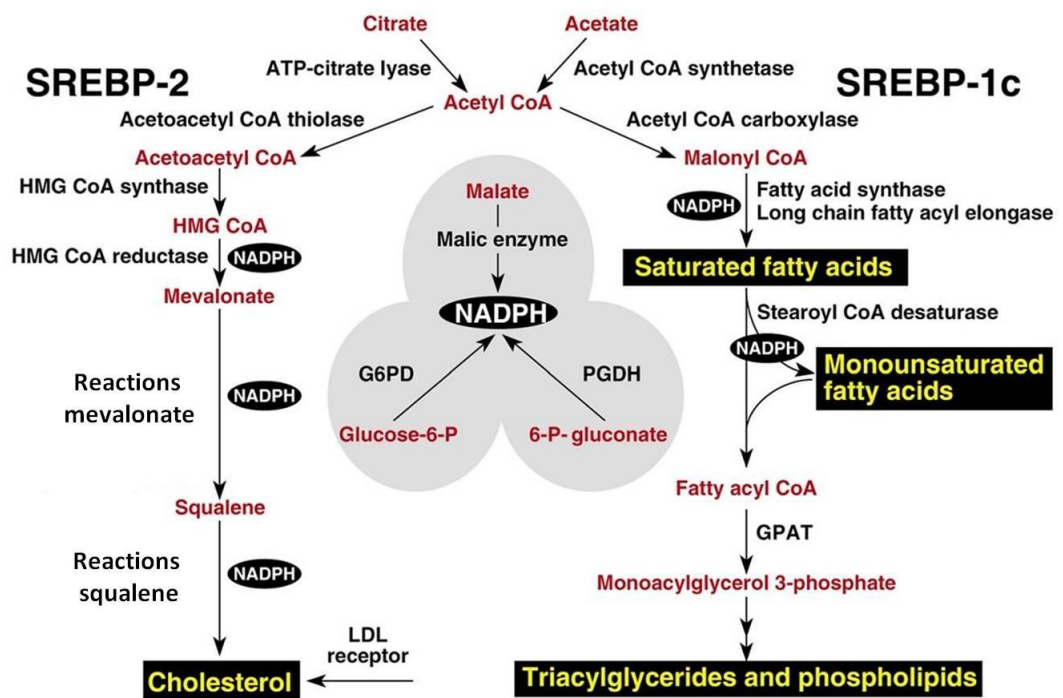


Figura 02. Genes regulados pelo SREBP-2 e SREBP-1c. O Diagrama mostra os principais intermediários metabólicos nas vias para a síntese de colesterol, ácidos graxos e triglicerídeos. In vivo, SREBP-2, preferencialmente, ativa os genes do metabolismo do colesterol, enquanto SREBP-1c preferencialmente ativa os genes do metabolismo de ácidos graxos e triglicerídeos. HMG: 3-hidroxi-3-metilglutaril; GPAT: Glicerol-3-fosfato aciltransferase; G6PD: Glicose-6-fosfato desidrogenase; PGDH: 6-fosfogliconato desidrogenase (Horton et al., 2002).

Mudanças na taxa de expressão do PPAR α , da SREBP-1c e de suas enzimas downstream contribui para o desequilíbrio da homeostase lipídica hepática, o qual pode conduzir ao desenvolvimento da esteatose hepática (Kohjima et al. 2007; Paquette et al. 2008; Pettinelli et al. 2009; Pighon et al. 2010). Neste sentido, hoje é assumido que o aumento na síntese de lipídio é o distúrbio primário na esteatose hepática, a qual é fortemente estimulada por moléculas lipogênicas chaves, tais como: SREBP-1c, ACC e SCD-1 (Cohen et al., 2002; Cohen et al., 2003; Kohjima et al., 2007).

Um recente estudo conduzido com pacientes obesos Pettinelli et al. (2009), concluíram que no fígado de obesos ocorre uma regulação ascendente na expressão do SREBP-1c e uma regulação descendente na expressão do PPAR α , o que resultou em uma aumentada relação SREBP-1c/PPAR α , condição que pode favorecer a lipogênese por aumentar a relação lipogênese/oxidação de AG e conduzir a esteatose hepática (figura 03). Adicionalmente, a regulação ascendente do SREBP-1c no fígado de pacientes obesos foi acompanhado de um aumento de 70% na expressão do RNAm do complexo enzimático ácido graxo síntase (FAS), enquanto que, a regulação descendente do PPAR α foi acompanhada de uma diminuição de 65% na expressão do RNAm da CPT-1. Desta maneira, elucidar intervenções que restaurem a expressão de genes envolvidos na homeostase lipídica hepática torna-se um importante objetivo de pesquisas.

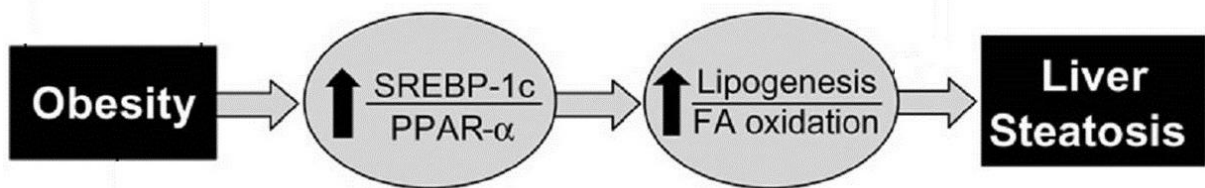


Figura 03. Distúrbio na regulação do metabolismo lipídico no fígado levando à esteatose hepática em obesos (Pettinelli et al., 2009).

Entre as intervenções do exercício físico, o TR tem-se mostrado eficiente em reduzir o acúmulo de gordura no fígado, tanto de animais OVX, quanto de animais intactos (Corriveau et al. 2008; Leite et al. 2009; Pighon et al. 2009). No entanto, o papel do TR sobre a expressão gênica de moléculas relacionadas à oxidação de gordura (PPAR α , CPT-I e HAD) e a lipogênese (SREBP-1c, ACC e SCD-1) no fígado de ratas OVX permanece desconhecido. Por esse motivo, é importante desenvolver experimentos para elucidar como o TR influencia a expressão gênica de moléculas relacionadas ao metabolismo lipídico hepático em ratas OVX, uma vez que, foi demonstrado em trabalhos recentes que o TR diminui o conteúdo de TAG no fígado de animais OVX, diminuindo assim, a incidência prematura para o desenvolvimento da esteatose hepática (Corriveau et al. 2008; Leite et al. 2009; Pighon et al. 2009).

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 Hipóteses

Tendo em conta os resultados de pesquisas supracitados, nossa hipótese inicial foi que tanto o TR quanto a OVX poderia alterar a expressão gênica das moléculas envolvidas com o metabolismo lipídico hepático, e que o TR em ratas OVX restaura a expressão gênica dessas moléculas.

2.2 Objetivos

Investigar os efeitos da OVX e do TR sobre a expressão gênica de moléculas relacionadas à lipogênese (SREBP-1c, ACC e SCD-1) no fígado de ratas.

Investigar os efeitos da OVX e do TR sobre a expressão gênica de moléculas relacionadas à oxidação de gordura (PPAR- α , CPT-I e HAD) no fígado de ratas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizadas 24 ratas Sprague-Dawley, adultas, obtidas do biotério da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araraquara, com massa corporal de chegada ao biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício de $218,34 \pm 2,49$ (média \pm erro padrão da média). Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (três 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 (01:00-13:00h: claro; 13:00-01:00h: escuro) e com oferta de água e dieta *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (número protocolo 008/2010) e conduzidos de acordo com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América (National Research Council's, 1996).

Todos os animais após chegada ao biotério do laboratório de fisiologia do exercício permaneceram por três semanas em condição de aclimatação ao biotério e ao ciclo invertido. Após este período, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram randomicamente distribuídos em quatro grupos experimentais (seis animais por grupo), a saber: 1) Sham operado sedentário (Sham-Sed); 2) Ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed); 3) Sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e 4) Ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). A figura 04 apresenta o esquema de distribuição das ratas e desenho experimental do estudo.

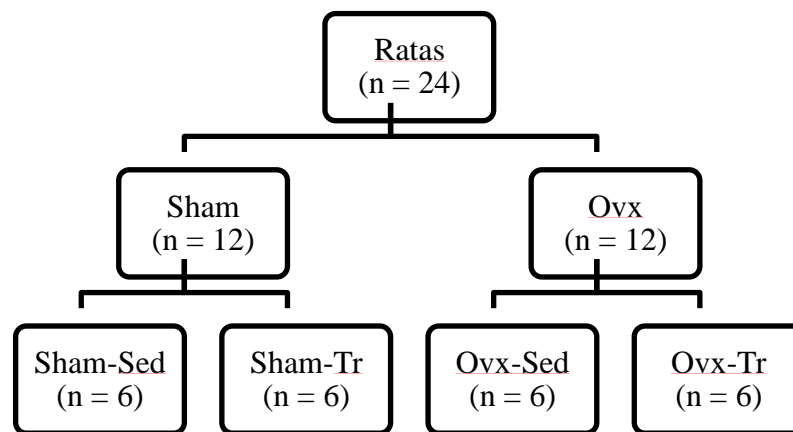


Figura 04. Esquema de distribuição das ratas e desenho experimental.

3.2.1 Grupos sedentários

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

3.2.2 Grupos treinamento resistido

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

3.3 Procedimentos Cirúrgicos da Ovariectomia e da operação sham

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

Inicialmente as ratas foram anestesiadas com uma mistura de Ketamina-Xilazina (61,5-7,6 mg/kg, intraperitoneal), tendo seus reflexos testados para dar início aos procedimentos da OVX. Durante todos os procedimentos da OVX as ratas foram mantidas sobre o efeito anestésico proporcionado pela Ketamina-Xilazina. Primeiramente, foi realizada uma pequena incisão bilateral de 1,0-1,5 cm através da pele e da camada muscular, entre a última costela e a coxa, em paralelo com a linha corporal do animal. A cavidade peritoneal foi aberta e feita uma ligadura abaixo da fimbria. Os ovários foram removidos e a incisão feita na pele e músculos suturados. Pelas próximas 72 horas após a OVX as ratas foram mantidas em caixas individuais, posteriormente a este período as ratas foram novamente agrupadas nas caixas coletivas referentes aos seus grupos, onde permaneceram até o fim do experimento. Foi respeitado um período de 21 dias de recuperação pós-cirurgia para dar início aos procedimentos do protocolo de treinamento resistido no grupo Ovx-Tr.

A sham operação foi realizada através dos mesmos procedimentos da OVX, exceto que não foi realizada a ligadura abaixo da fimbria e nem os ovários foram removidos, e sim apenas expostos e devolvidos ao local de origem. Vale ressaltar que todos os animais sham operados e ovariectomizados tiveram o mesmo tempo de exposição aos procedimentos cirúrgicos (92 dias) até a data do sacrifício.

3.4 Treinamento resistido

O protocolo de treinamento resistido em escada de Hornberger e Farrar (2004) foi utilizado e adaptado para as necessidades e execução desta pesquisa.

Inicialmente, as ratas foram adaptadas ao protocolo de treinamento resistido que exigia que os animais escalassem uma escada vertical (1,10 x 0,18 m, 2 cm de espaçamento entre os degraus da grade, inclinação de 80°) com pesos atados as suas caudas (figura 05). O tamanho da escada fazia com que os animais realizassem de 8 a 12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi atado à porção proximal da cauda com uma fita auto-adesiva. Com o aparato fixado a cauda as ratas eram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada. Caso necessário um estímulo com pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento. No topo da escada as ratas alcançavam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansavam durante 120 segundos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem estímulo de pinça na cauda. Foram realizadas três sessões de adaptação (familiarização) com intervalo de 48 horas entre as sessões.

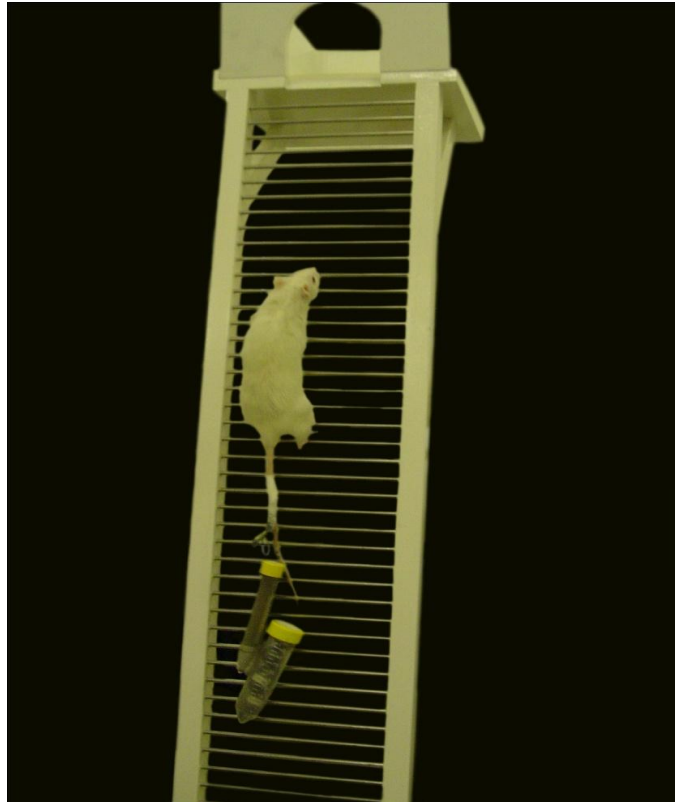


Figura 05. Escada para treinamento resistido.

Três dias após a última sessão de familiarização foi realizada a primeira sessão de treinamento que consistiu de 4 a 8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas. A escalada inicial consistiu em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal atado em sua cauda. Após completar o carregamento desta carga inicial com sucesso, um peso adicional de 30g era adicionado ao aparato. Este procedimento foi sucessivamente repetido com um número máximo de oito escaladas, até que se alcançasse uma sobrecarga que não permitia que a rata escalasse toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguia progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento (carga máxima) da rata para aquela

sessão de treinamento, carga a qual, foi utilizada para a elaboração da carga de carregamento utilizada na próxima sessão de treinamento.

As sessões de treinamento seguintes consistiram de quatro escalas na escada, com 65%, 85%, 95% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subseqüentes em um número máximo de cinco escaladas eram adicionados 30g em cada nova escalada, até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada (figura 06). O intervalo de recuperação entre as escaladas foi fixo de 2 minutos.

As sessões de treino foram realizadas três vezes por semana, todas as segundas, quartas e sextas-feiras durante dez semanas. O início das sessões de treino sempre ocorreu às 15 horas.

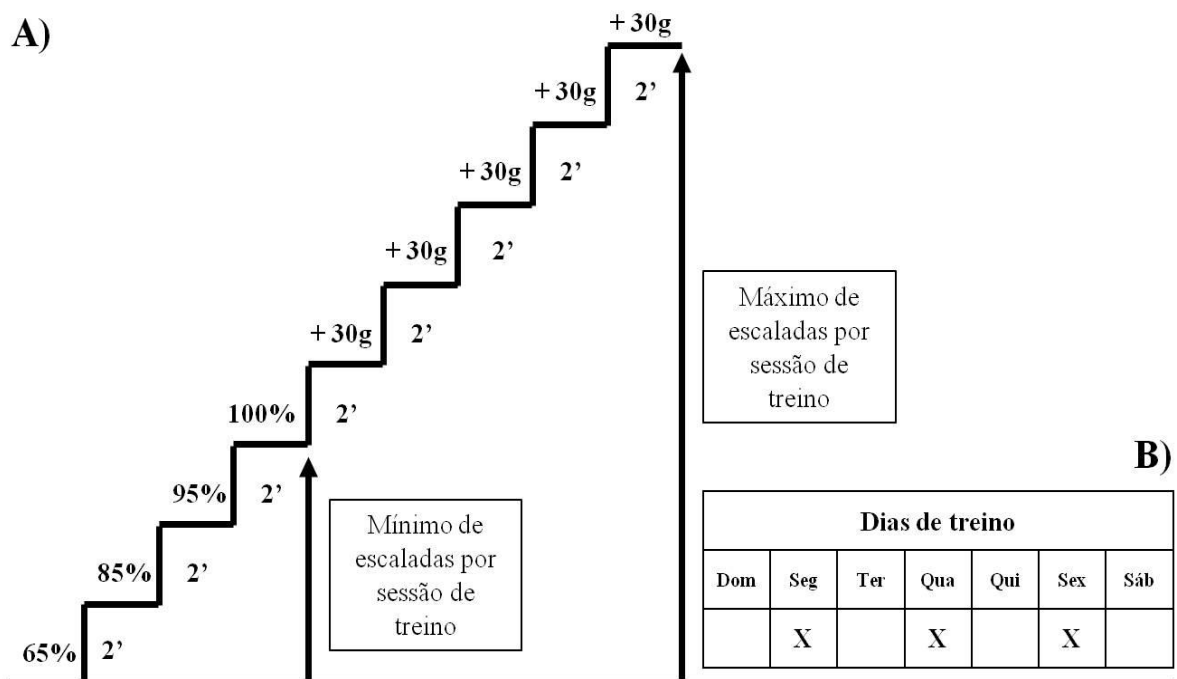


Figura 06. A) organização da carga de carregamento por sessão de treino. B) dias de treino.

3.5 Controle da ingestão alimentar e da massa corporal

A ingestão alimentar (gramas de ração consumida por gaiola) foi monitorada diariamente sempre no mesmo horário do dia, entre 17h00min e 17h30min e a massa corporal verificada três vezes na semana, todas as segundas, quartas e sextas-feiras sempre no mesmo horário entre 16h00min e 17h00min. Ambos os procedimentos foram realizados durante todo o período experimental.

3.6 Preparação do tecido

Os animais foram sacrificados por decapitação 48h após a última sessão de treinamento. O fígado foi imediatamente removido e três alíquotas do lobo mediano foram guardadas em tubos de criogenia, imediatamente congelados no nitrogênio líquido e armazenados no freezer a -80°C até o momento das análises.

3.7 Desenho experimental

A figura 07 apresenta um resumo do desenho experimental do estudo deste a chegada dos animais ao biotério do laboratório de fisiologia do exercício até o momento do sacrifício.

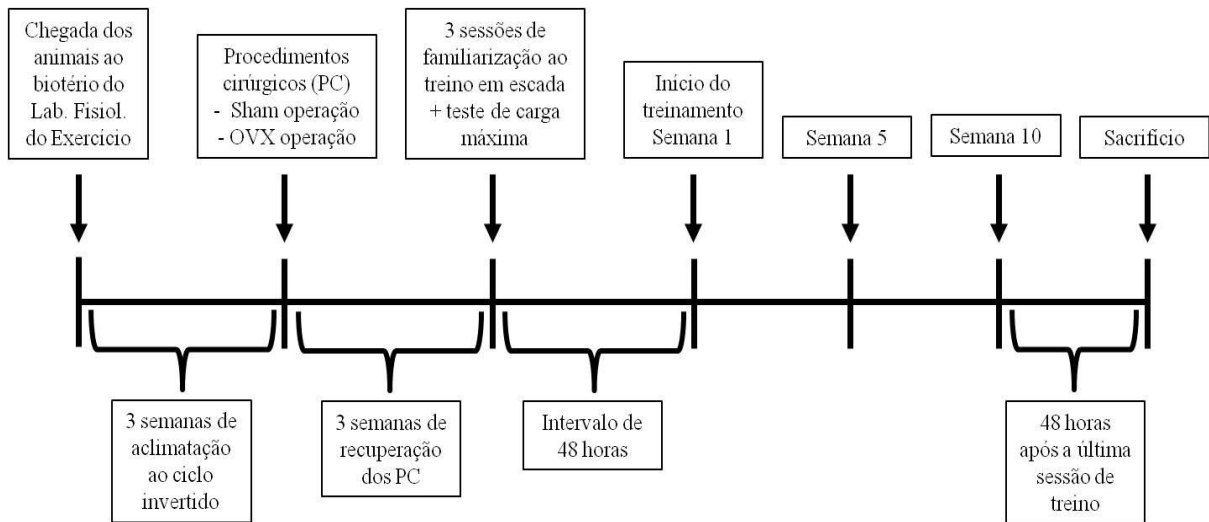


Figura 07. Desenho experimental

3.8 Quantificação da expressão gênica do PPAR- α , CPT-I, HAD, SREBP-1c, ACC, SCD-1 e GAPDH

A quantificação da expressão gênica do PPAR- α , CPT-I, HAD, SREBP-1c, ACC, SCD-1 e do GAPDH foi realizada pela quantificação do seu RNAm por Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real (PCR-RT). Esta análise foi realizada no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do DCF da UFSCar.

3.8.1 Procedimentos gerais

Para reduzir a presença de ácidos ribonucleases (RNAses), foram adotados os seguintes cuidados em todos os procedimentos: utilização de material esterilizado descartável; autoclavagem da vidraria, eppendorfs e ponteiras utilizadas; manipulação de amostras e materiais com luvas; utilização de água tratada com dietil-pirocarbonato (água DEPC, autoclavada).

3.8.2 Extração do RNA total

Para a análise da expressão gênica das proteínas PPAR- α , CPT-I, HAD, SREBP-1c, ACC, SCD-1 e do GAPDH o RNA total do fígado foi extraído com o reagente Trizol[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) de acordo com as especificações do fabricante. No dia da extração, 40-45mg de tecido era homogeneizado (*homogenizador Power Gen – Fisher Scientific 1000*) em 1 mL de Trizol segundo os seguintes protocolos:

Após a homogeneização as amostras permaneciam por 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionava-se 200 μ L de clorofórmio às amostras e agitava-se por 15 segundos no vortex. Logo após, as amostras permaneciam em temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugavam-se (*Eppendorf 5804R*) as amostras por 15 minutos, a 12000rpm, a 4°C. Seguindo a centrifugação transferia-se o sobrenadante (450 μ L) para um microtubo limpo. Eram adicionados 450 μ L de isopropanol e a amostra era agitada por inversão manual, permanecendo por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, a amostra era centrifugada por 10 minutos a 12000rpm (4°C) para formação do pellet. O sobrenadante era descartado com cuidado por inversão manual e ao pellet era acrescentado 1mL de etanol 75%. Após nova centrifugação, por 5 minutos a 7500rpm (4 ° C), novamente o sobrenadante era descartado com cuidado por inversão manual, e caso necessário o restante de etanol 75% era aspirado com auxílio de uma pipeta. Posteriormente, o microtubo contendo o pellet era colocado para secagem por 5-10 minutos em estufa a 37 ° C. Após esse tempo, acrescentava-se 30-60 μ L de água tratada com dietil pirocarbonato (água DEPC) 0,1%. As amostras eram então congeladas e armazenadas no freezer a -80°C até o momento das análises.

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

3.8.3 Quantificação do RNA total

As amostras de RNA total foram diluídas 100 vezes em água tratada com DEPC e foram realizadas as leituras em espectrofotômetro para determinação das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Foi utilizada a seguinte fórmula para determinar a concentração de RNA total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$):
concentração $\mu\text{g}/\mu\text{L} = (A_{260} \times 40 \times \text{diluição da amostra}) \times 1000^{-1}$.

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

3.8.4 Determinação da integridade do RNA

A integridade do RNA foi confirmada pela visualização em luz ultravioleta do padrão de eletroforese das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (figura 08).

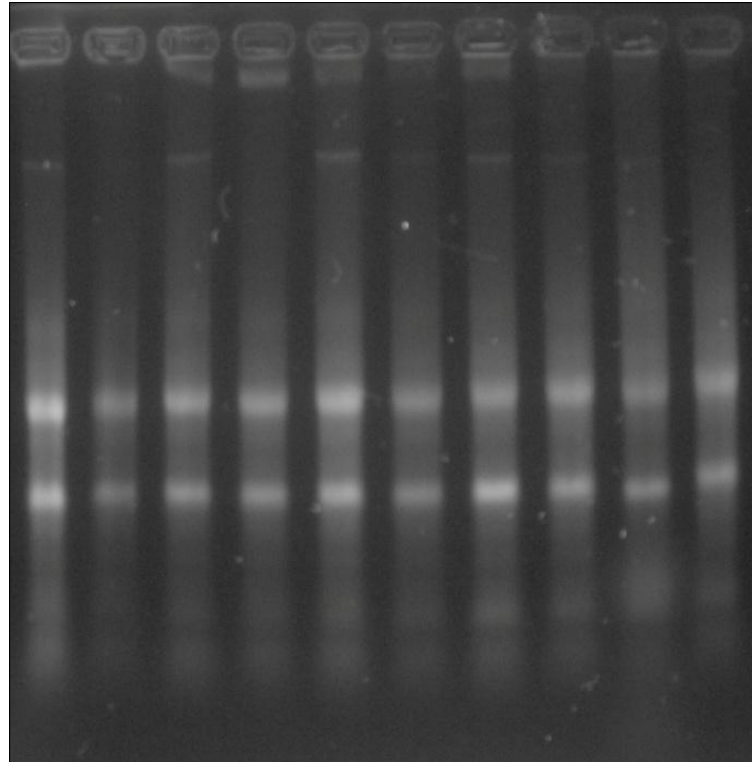


Figura 08. Exemplo de um gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio indicando a integridade do RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 28S e 18S.

3.8.5 Transcrição reversa

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

Logo após o tratamento com DNase, adicionava-se 0,5 µL do Primer Oligo (dT) 15 (*Promega Corporation, Madison, WI USA*) e a amostra permanecia em banho seco a 70°C por 5 minutos.

A seguir, adicionavam-se:

- 2,5 µL de M-MLV 5x tampão de reação (*Promega Corporation, Madison, WI USA*)

- 0,625 µL dATP 10mM

- 0,625 µL dCTP 10mM

- 0,625 µL dGTP 10mM

- 0,625 µL dTTP 10mM

- 0,5 µL M-MLV transcriptase reverse (TR)

As amostras em seguidas foram encubadas em banho seco a 37 °C por 60 minutos e, posteriormente estocadas a -80°C até o momento das análises.

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

Foram utilizados os seguintes reagentes para cada amostra de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) (40ng/µL), em duplicata.

- 9,5 µL de água livre de nuclease

- 1,25 µL primer forward

- 1,25 µL primer reverse

- 0,5 µL de cDNA

- 12,5 µL SYBR[®] Green (fermentas)

- Volume final 25 µL

As amostras foram processadas no Termociclador *Rotor-Gene, R 3000* (Robertt Research) e 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 Tm dos primers foram previamente padronizadas.

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

Tabela 1. Oligonucleotídeos primers usados para PCR-RT

Genes	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')	N. de acesso
SREBP-1c	TGCCCTAAGGGTCAAACCA	TGGCGGGCACTACTTAGGAA	L16995.1
ACC	ACAGAGATGGTGGCTGATGTC	GATCCCCATGGCAATCTG	NM_022193.1
SCD-1	TGCTGATGTGCTTCATCCTG	GGGAAACCAGGATATTCTCC	NM_009127.4
PPAR- α	TCGGAGGGCTCTGTGCATC	CATCTGTACTGGTGGGACA	NM_013196.1
CPT-1	ACGTTGGACGAATCGGAGC	AAAGCATCTTCCATGCAGCAG	NM_031559.2
HAD	GGCTGCATGAGCGAGGCGAT	TGGGATACCCGGCTCCCAGC	NM_057186.1
GAPDH	GATGCTGGTGTGAGTATGTCG	GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA	NM_017008.3

SREBP-1c, proteína-1c ligadora do elemento regulado por esteróis; ACC, acetil-Coenzima A carboxilase; SCD-1 estearoil coenzima A dessaturase-1; PPAR- α , receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomas; CPT-1, Carnitina palmitoil transferase-1; HAD, hidroxiaçil coenzima A desidrogenase; GAPDH gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de MELT (figura 09).

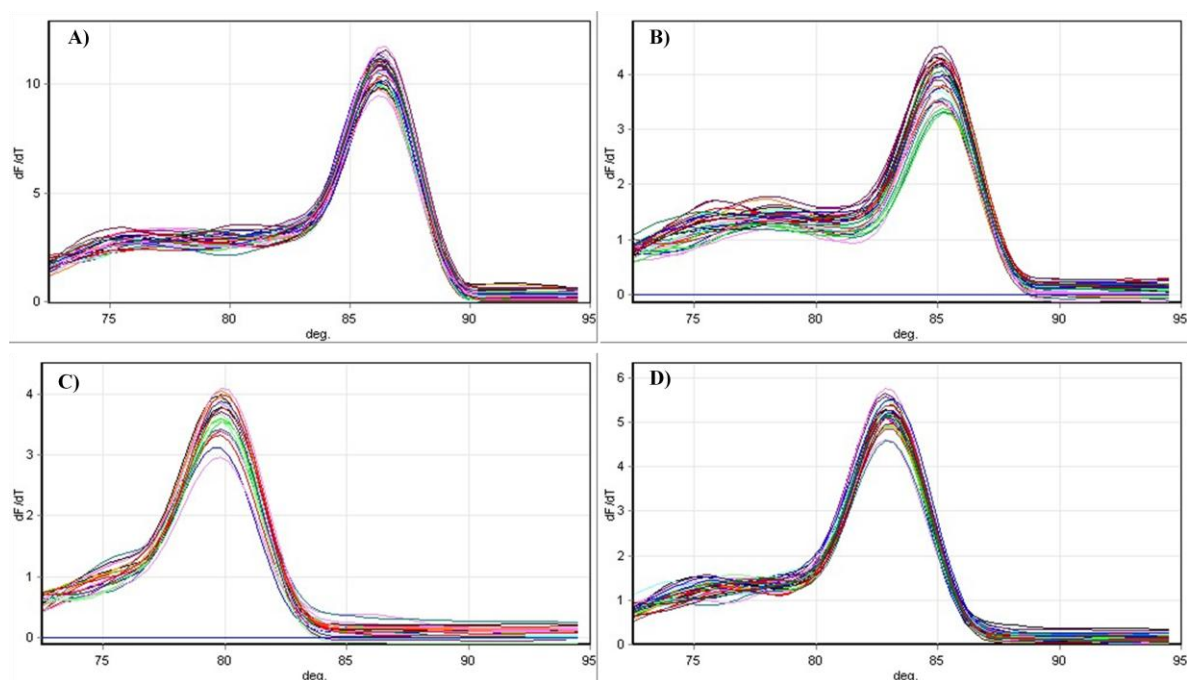


Figura 09. Exemplo de curva de MELT original representativa dos ciclos do PCR-RT. A) GAPDH, B) PPAR- α , C) ACC e D) HAD.

Os valores de threshold cycle (Ct) e as curvas de MELT foram obtidos pelo *Software Rotor Gene – 6*. O Ct é o ponto onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com o menor número de ciclos durante a fase exponencial da amplificação (figura 10).

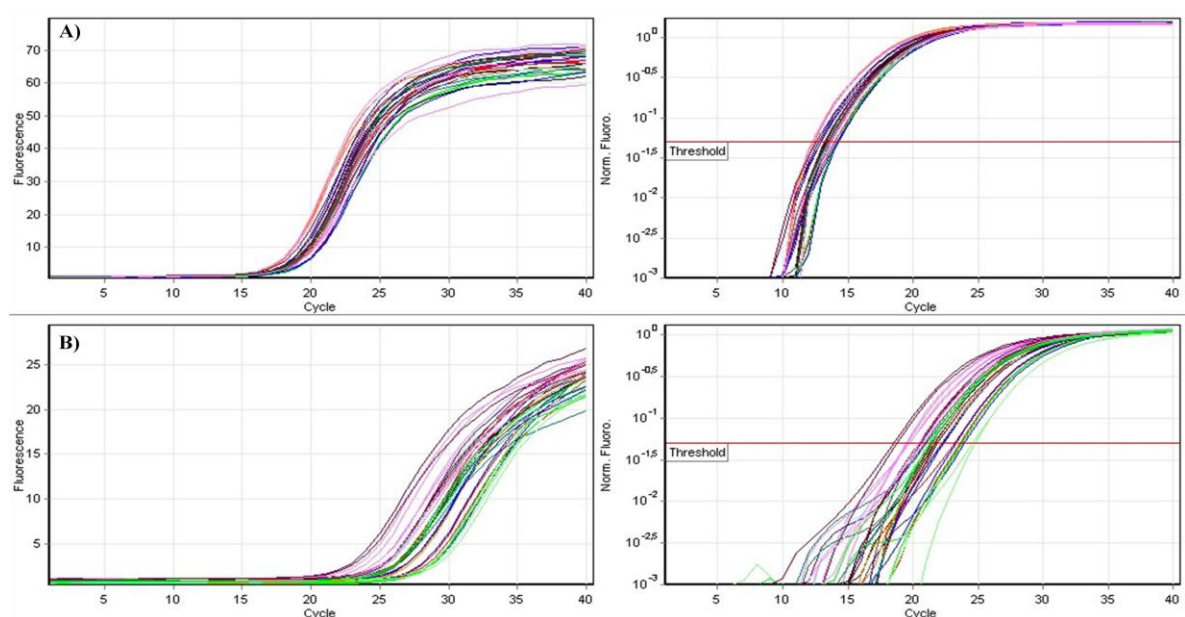


Figura 10. Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT. A) GAPDH e B) PPAR- α .

O nível de expressão comparativa de cada condição foi calculado pelo método de delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Depois de calculado a média dos Ct de cada gene foi realizado:

- 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 foram calculados por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Com os valores em UA foram realizados os testes estatísticos.

3.8.7 Gel dos produtos do PCR-RT

Na figura 11 é demonstrada uma imagem do gel dos produtos do PCR dos diferentes genes analisados na presente pesquisa.

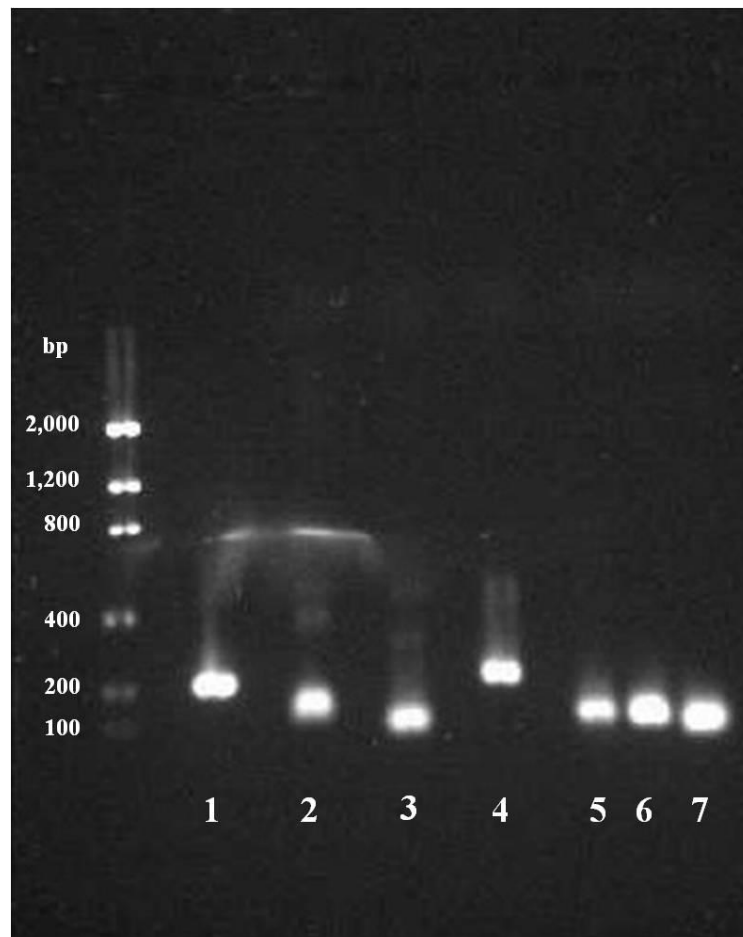


Figura 11. Imagem do gel dos produtos do PCR-RT. 1 = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (197 pares de bases). 2 = Proteína-1c ligadora do elemento regulado por esteróis (75 pares de bases). 3 = Acetil-CoA carboxilase (60 pares de bases). 4

= Esteroil-CoA dessaturase (201 pares de bases). 5 = Receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomas (88 pares de bases). 6 = Carnitina palmitoiltransferase 1 (93 pares de bases). 7 = Hidroxiacil-CoA desidrogenase (72 pares de bases).

3.9 Análise Estatística

Todos os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi iniciada com o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal, sendo utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de dois fatores, levando em consideração duas variáveis: ovariectomia x exercício resistido. O pós-teste de Fisher's foi aplicado no caso de alguma significância. Todas as informações foram processadas no pacote estatístico OringinPro 8® adotando-se um nível de significância de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

A ovariectomia resultou em maior massa corporal, ingestão alimentar diária e massa dos depósitos de gordura, urogenital, mesentérica e retroperitoneal ($p < 0,05$) quando comparado com as ratas sham-Sed (Tabela 2). Entretanto, a massa dos depósitos de gordura mesentérica e retroperitoneal foi menor (23% e 29%, respectivamente) nas ratas Ovx-Tr comparado com as ratas Ovx-Sed ($p < 0,05$). Adicionalmente, a ovariectomia resultou em menor peso do fêmur (15%; $p < 0,05$) e peso do útero (74%; $p < 0,05$) indicando os efeitos fisiológicos da ovariectomia (Tabela 2). No entanto, o grupo Sham-Tr apresentou o maior peso de fêmur (8%, 27% e 17%; $p < 0,05$) do que os grupos Sham-Sed, Ovx-Sed e Ovx-Tr, respectivamente. Quando comparado, o grupo Ovx-Tr apresentou maior peso do fêmur (9%; $p < 0,05$) do que o grupo Ovx-Sed. No resultado da soma dos pesos dos cinco músculos analisados não houve diferenças significativas entre os quatro grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre parâmetros antropométricos.

	Sham-Sed	Ovx-Sed	Sham-Tr	Ovx-Tr
Massa corporal (g)	337,11 ± 8,13	401,93 ± 4,60a	308,94 ± 5,17ab	370,38 ± 5,89abc
Ingestão alimentar (g/d)	20,58 ± 0,18	23,15 ± 0,18a	19,61 ± 0,14ab	21,44 ± 0,19abc
Gordura urogenital (g)	8,52 ± 0,89	11,03 ± 1,84a	6,40 ± 0,75b	9,12 ± 0,18
Gordura mesentérica (g)	4,28 ± 0,34	6,72 ± 0,81a	4,00 ± 0,47b	5,18 ± 0,27b
Gordura retroperitoneal (g)	3,26 ± 0,30	4,84 ± 0,45a	2,67 ± 0,34b	3,45 ± 0,07b
Músculos da pata (g/100 g MC)	0,93 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,94 ± 0,03b	0,89 ± 0,02
Peso do útero (g)	0,68 ± 0,02	0,18 ± 0,01a	0,64 ± 0,04b	0,15 ± 0,00ac
Peso do fêmur (g/100 g MC)	0,26 ± 0,00	0,22 ± 0,00a	0,28 ± 0,00ab	0,24 ± 0,00bc

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

a, significativamente diferente de Sham-Sed: ($p \leq 0,05$)

b, significativamente diferente de Ovx-Sed: ($p \leq 0,05$)

c, significativamente diferente de Sham-Tr ($p \leq 0,05$)

Para a carga máxima de carregamento durante as 10 semanas de treinamento, não houve nenhuma interação entre grupo e tempo, indicando que os grupos Sham-Tr e Ovx-Tr aumentaram a capacidade máxima de carregamento de maneira similar durante o treinamento (Figura 11). As cargas aumentaram após a semana 5 e semana 10 quando comparado com a semana 1, e após a semana 10 comparado com a semana 5 (Figura 11). Deste modo, não houve nenhuma diferença nas cargas máximas entre ambos os grupos treinados cronicamente no período de 10 semanas.

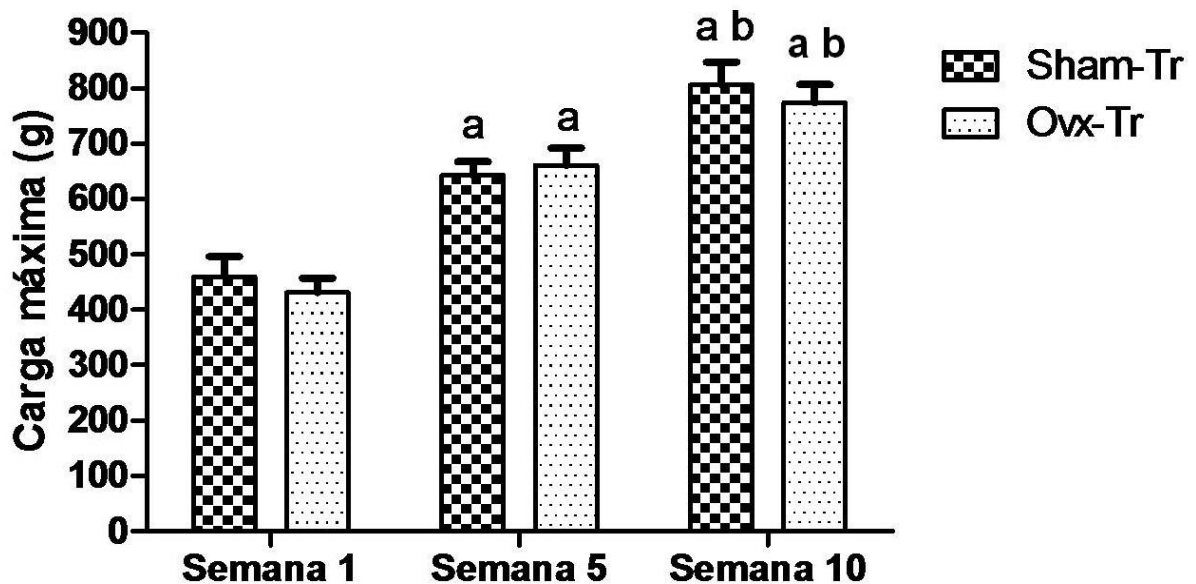


Figura 12. Carga máxima (g) dos grupos Sham-Tr e Ovx-Tr nas semanas 1, 5 e 10. Os valores são médias \pm erro padrão da média ($n = 6$ por grupo). a, significativamente diferente de semana 1; b, significativamente diferente de semana 5 ($p < 0,05$).

A análise do PCR-RT demonstrou maior ($p < 0,05$) expressão gênica do fator transcricional lipogênico SREBP-1c (106%; Figura 12A), bem como de seus alvos downstream, ACC (72%; Figura 12B), e SCD-1 (109%; Figura 12C), nas ratas Ovx-

Sed do que nas ratas Sham-Sed. No entanto, estas maiores expressões dos genes lipogênicos induzidos pela ovariectomia foram totalmente restauradas pelo treinamento resistido, com exceção da ACC. Vale ressaltar que ocorreu uma diminuição de 25% na expressão gênica da ACC no grupo Ovx-Tr quando comparado com o grupo Ovx-Sed, porém esta diminuição não foi estatisticamente significativa. Estes resultados indicam os potenciais benefícios do treinamento resistido como uma estratégia alternativa para controlar os efeitos deletérios da ovariectomia sobre a expressão gênica de moléculas lipogênicas.

Ademais, a expressão gênica da ACC e da SCD-1 foi maior (108% e 266%, respectivamente; Figura 12BC) nas ratas Ovx-Tr do que nas ratas Sham-Tr. Demonstrando que a ausência dos hormônios ovarianos exerce um papel predominante na expressão desses genes.

Quando comparado com o grupo Sham-Sed, o grupo Sham-Tr demonstrou uma diminuição significativa de 75% (Figura 12C) na expressão gênica da SCD-1 e, uma diminuição estatisticamente não significativa de 35% e 38% na expressão gênica da SREBP-1c e na ACC, respectivamente. Resultados que podem indicar os potenciais benefícios do treinamento resistido como uma estratégia alternativa para minimizar o acúmulo de gordura no fígado de animais intactos, o qual pode também, explicar parcialmente o menor conteúdo de lipídios no fígado de ratos treinados com esses tipo de treinamento.

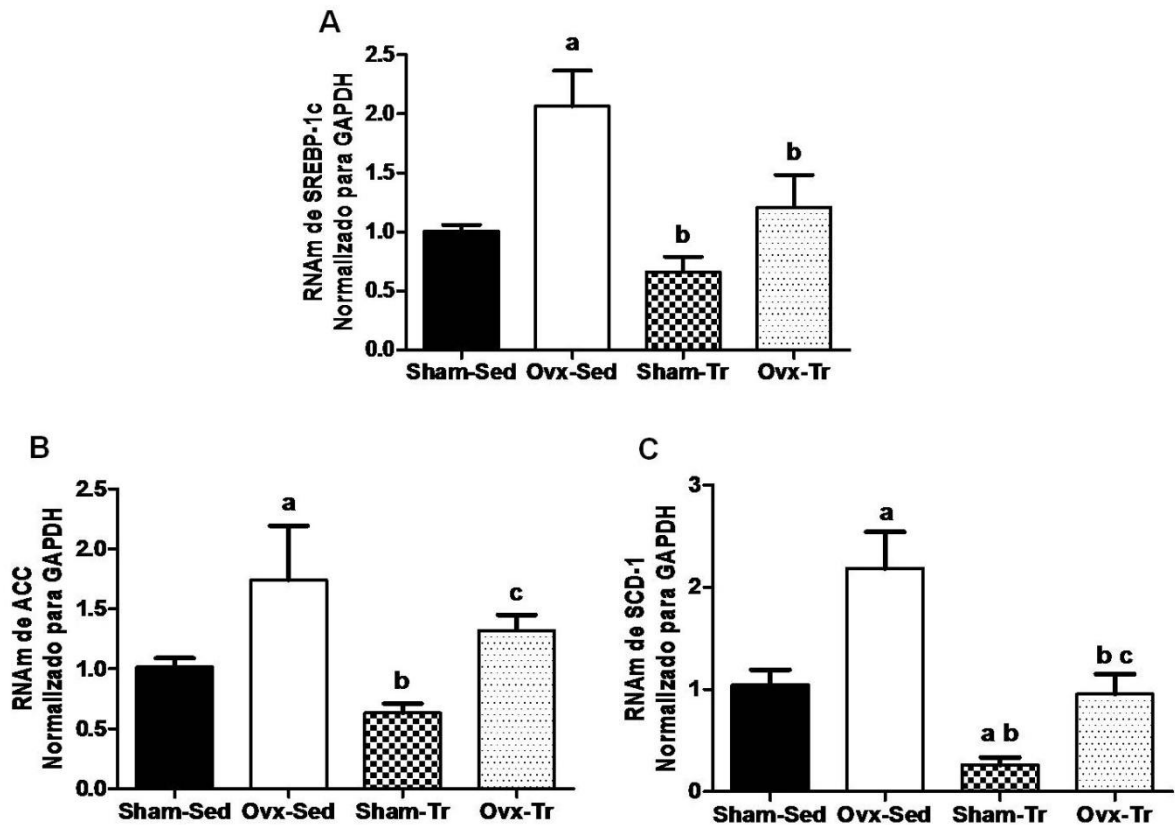


Figura 13. Expressão dos genes lipogênicos. (A) proteína-1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c); (B) acetil coenzima A carboxilase (ACC); (C) estearoil coenzima A dessaturase-1 (SCD-1) (C) nos grupos sham operado sedentário (Sham-Sed), ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed), sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). Valores são médias \pm erro padrão da média ($n = 6$ por grupo). a, significativamente diferente de Sham-Sed; b, significativamente diferente de Ovx-Sed; c, significativamente diferente de Sham-Tr ($p < 0,05$).

Os resultados do PCR-RT demonstraram menor ($p < 0,05$) expressão gênica das moléculas relacionadas à oxidação de gordura, CPT-I (53%; Figura 13B), e HAD (27%; Figura 13C) no grupo Ovx-Sed quando comparado com o grupo Sham-Sed. No entanto, estas menores expressões dos genes relacionados à oxidação de

gordura induzidos pela ovariectomia foram totalmente restauradas pelo treinamento resistido. Adicionalmente, a expressão gênica do PPAR- α não foi alterada pela ovariectomia. Esses resultados demonstram que a ovariectomia diminui a capacidade oxidativa do fígado, resultado que favorece o acúmulo de gordura hepática e, que este resultado pode ser revertido com o treinamento resistido.

Quando comparado com o grupo Sham-Sed, o grupo Sham-Tr demonstrou um aumento significativo na expressão gênica do PPAR- α (170%; Figura 13A) e, um aumento estatisticamente não significativo de 11% na expressão gênica da CPT-1. No entanto, quando comparado o grupo Sham-Tr com o grupo Ovx-Tr o grupo Sham-Tr apresentou maior expressão gênica (56%; Figura 13A) do PPAR- α .

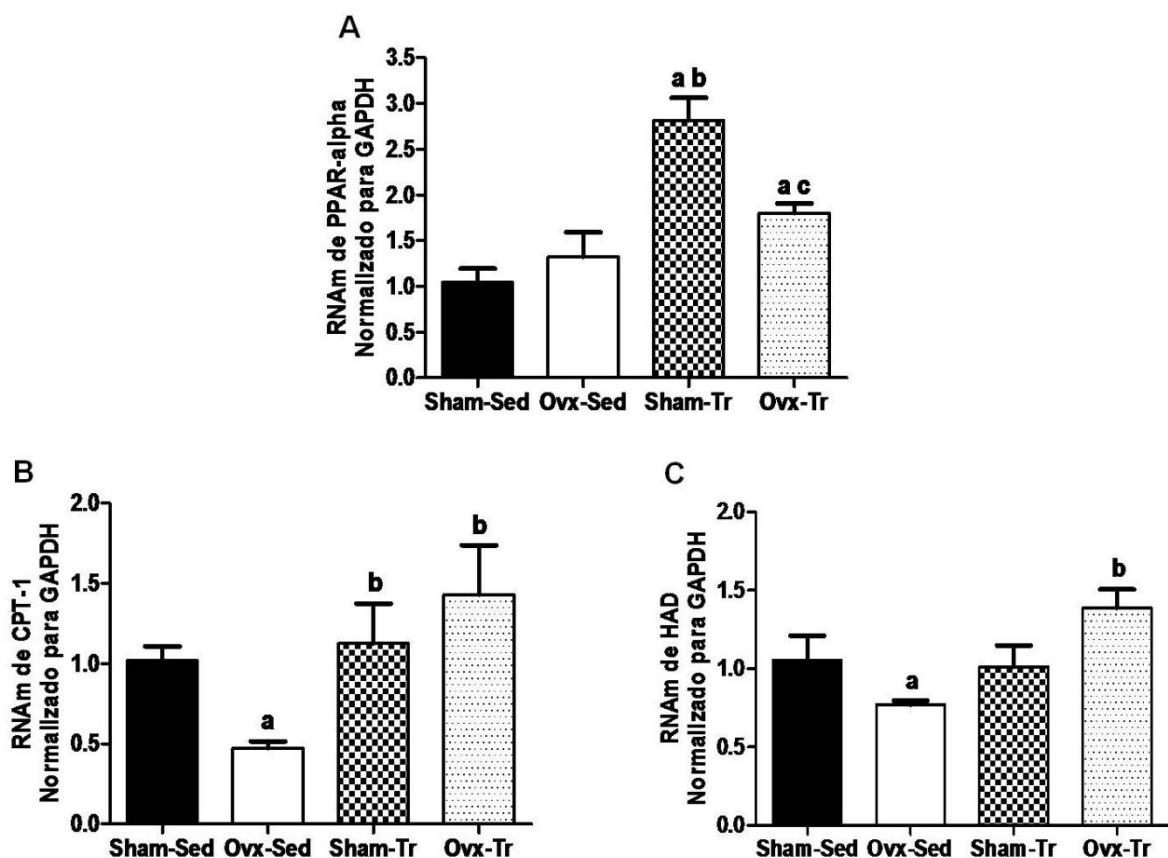


Figura 14. Expressão dos genes relacionados à oxidação de gordura. (A) receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR- α); (B) carnitina palmitoil

transferase-I (CPT-I); (C) hidroxilacil coenzima A desidrogenase (HAD) nos grupos sham operado sedentário (Sham-Sed), ovariectomizado sedentário (Ovx-Sed), sham operado treinamento resistido (Sham-Tr) e ovariectomizado treinamento resistido (Ovx-Tr). Valores são médias \pm erro padrão da média (n = 6 por grupo). a, significativamente diferente de Sham-Sed; b, significativamente diferente de Ovx-Sed; c, significativamente diferente de Sham-Tr ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A principal contribuição do presente estudo é o resultado original de que o treinamento resistido pode contrabalançar os distúrbios moleculares hepáticos induzidos pela ovariectomia, restaurando os níveis de expressão gênica tanto das moléculas relacionadas à lipogênese quanto das moléculas relacionadas à oxidação das gorduras. Estas respostas moleculares sugerem fortemente que o treinamento resistido diminui a lipogênese e estimula ao mesmo tempo a oxidação de gordura no fígado de ratas ovariectomizadas, e isto poderia ser um possível mecanismo pelo qual o TR diminui o acúmulo de gordura no fígado de ratas ovariectomizadas como relatado em estudos anteriores (Corriveau et al. 2008; Leite et al. 2009; Pighon et al. 2009). Esses estudos, entretanto, não forneceram qualquer informação molecular sobre a ação do TR na prevenção do acúmulo de gordura no fígado de animais ovariectomizados. Ademais, apesar de alguns resultados não serem estatisticamente significantes (SREBP-1c, ACC, CPT-1 e HAD) e outros sim (SCD-1 e PPAR- α) o treinamento resistido nas ratas intactas (grupo Sham-Tr) demonstrou uma tendência em diminuir a expressão dos genes relacionados à lipogênese e, a aumentar a expressão dos genes relacionados a oxidação de gordura. Resultados que podem suscitar novas abordagens em relação ao treinamento resistido e, em seu emprego como estratégia alternativa para atenuar os efeitos deletérios relacionados ao acúmulo de gordura no fígado.

Há fortes evidências de que o acúmulo de gordura no fígado de ratas ovariectomizadas está associado a uma aumentada ingestão alimentar decorrente da ovariectomia (Latour et al. 2001; Shinoda et al. 2002; Paquette et al. 2008), a um desequilíbrio entre os caminhos de captação, síntese e oxidação de lipídios

(Barsalani et al. 2008; Paquette et al. 2008; Paquette et al. 2009) e a uma diminuição da capacidade de oxidação de gordura no fígado desses animais (Paquette et al. 2008; Paquette et al. 2009). Entretanto, há também algumas evidências de que o treinamento resistido reduz ou atenua o acúmulo de gordura em ratas ovariectomizadas (Corriveau et al. 2008; Leite et al. 2009; Pighon et al. 2009). Nossa hipótese inicial foi confirmada, uma vez que a ovariectomia reduziu a expressão gênica de moléculas relacionadas à oxidação de gordura, tais como CPT-I (53%) e HAD (27%), e aumentou as de moléculas relacionadas à lipogênese, SREBP-1c (106%), ACC (72%) e SCD-1 (109%), as quais tiveram suas expressões restauradas com o treinamento resistido, com exceção da ACC. Embora tenha ocorrido uma diminuição de 25% na expressão gênica da ACC no grupo Ovx-Tr quando comparado com o grupo Ovx-Sed esta diminuição não foi estatisticamente significativa, provavelmente por causa do tamanho da amostra ou pelo fato da ACC ser uma enzima chave na lipogênese acreditamos que sua expressão tenha alterado de maneira significativa logo no início do TR, ou seja, nas primeiras semanas de treinamento. Com base nessas informações podemos afirmar que as vias do metabolismo lipídico hepático estão perturbadas na ausência de estrógenos, conduzindo ao acúmulo de gordura no fígado de animais ovariectomizados, o qual pode culminar em esteatose hepática. Por conseguinte, o acúmulo de gordura no fígado de animais ovariectomizados não pode ser totalmente atribuído a maior ingestão alimentar, efeito característico da ovariectomia.

Estudo de cinética de infiltração de lipídio no fígado de seres humanos indica que aproximadamente 26% no acúmulo de TAG hepático pode ser explicado pela síntese de lipídio (lipogênese) (Donnelly et al. 2005). Por isso, é assumido que o aumento na síntese de lipídio é o distúrbio primário na esteatose hepática, a qual é

fortemente estimulada por moléculas que regulam o acúmulo de gordura hepático, tais como: o fator de transcrição SREBP-1c e de sua enzima downstream ACC (Kohjima et al. 2007; Paquette et al. 2008; Pettinelli et al. 2009; Pighon et al. 2010). Da mesma forma, a SCD-1 é uma enzima downstream da SREBP-1c e que representa o ponto de controle central na homeostase lipídica, catalisando um passo limitante na biossíntese de ácido graxo monoinsaturado a partir de ácido graxo saturado, o qual é necessário para a síntese de TAG (Cohen et al. 2002; Cohen et al. 2003). Recentemente foi relatado que a ovariectomia aumenta a expressão gênica do fator transcricional lipogênico SREBP-1c (Paquette et al. 2008; Pighon et al. 2010), e de suas enzimas downstream ACC (Pighon et al. 2010), e SCD-1 (Paquette et al. 2008; Pighon et al. 2010), e que diminui a expressão gênica do PPAR- α (Paquette et al. 2008; Pighon et al. 2010), o qual é um importante fator transcricional envolvido na oxidação de ácido graxo. Os resultados do presente estudo complementam esses achados anteriores, demonstrando que a expressão gênica de outras moléculas relacionadas à oxidação de gordura, tais como CPT-I e HAD estão diminuídas em ratas ovariectomizadas.

Corriveau et al. (2008) and Pighon et al. (2009) demonstraram que o TR diminui os depósitos de gordura e reduz o acúmulo de gordura no fígado de ratas ovariectomizadas. Nesse sentido, há evidências crescentes de que o TR estimula a oxidação de lipídios no fígado devido à ativação da via da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) (Lavoie; Gauthier 2006; Corriveau et al. 2008). É conhecido atualmente que a SREBP-1c um dos principais fatores transcricionais lipogênicos é regulado negativamente pela AMPK (Zhou et al. 2001; Kohjima et al. 2008; Oikari et al. 2008), assim, é tentador especular que o treinamento resistido pode induzir a ativação da AMPK com uma subsequente

diminuição na expressão gênica de fatores transcricionais relacionados à lipogênese, concomitantemente com o aumento da oxidação de gordura no fígado e, conseqüentemente reduzir o conteúdo lipídico hepático e prevenir a esteatose hepática (Leite et al. 2009).

Yasari et al. (2010) constataram que o treinamento de endurance de 8 semanas resultou em uma redução importante de 80% na expressão gênica da SCD-1 no fígado de ratos, tanto alimentados com dieta padrão, quanto alimentados com dieta rica em gorduras, e que a quantificação protéica da SCD-1 por Western blot confirmou os resultados obtidos por PCR-RT. Os autores ressaltaram que a recente descoberta de redução da expressão do gene da SCD-1 no fígado com o treinamento de endurance indica que este é uma adaptação que pode estar associada ao exercício crônico, que é uma manipulação conhecida por favorecer a regulação do metabolismo lipídico.

Estudos com ratos nocautes para SCD-1 encontraram taxas reduzidas de síntese de AG e TAG mesmo na presença de dieta hiperlipídica ou dieta rica em carboidrato (Miyazaki et al., 2000; Miyazaki et al., 2001b). Isto é parcialmente devido à diminuição na maturação da proteína SREBP-1c (clivagem do domínio terminal NH₂) e na expressão dos genes alvos da SREBP-1c, tais como: FAS, ACC e ácido graxo alongase (Miyazaki et al., 2001a; Sampath et al., 2007). A expressão dos genes lipogênicos em ratos nocautes para SCD-1 são restaurados por meio de alimentação com alto teor de ácido graxo monoinsaturado, mas não com ácido graxo saturado (Ntambi et al., 2004; Sampath et al., 2007). Desta maneira, a ativação normal da SREBP-1c requer um nível adequado de ácido graxo monoinsaturado, seja derivado a partir da dieta ou da síntese endógena.

A SCD-1 atualmente vem ganhando notoriedade por meio de seus efeitos metabólicos e genéticos sobre o metabolismo lipídico, estudos com ratos nocautes para SCD-1 encontraram diminuição da expressão gênica da SREBP-1c, FAS, glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) e ACC, efeito genético que resultou em diminuição na taxa de lipogênese (efeito metabólico), ao mesmo tempo em que, aumentou o nível de expressão dos genes relacionados à oxidação de gordura; ACO e CPT-1 o que resultou em taxa aumentada de β -oxidação (Ntambi; Miyazaki, 2003; Dobrzyn; Ntambi 2004). A deficiência da SCD-1 também resultou em regulação descendente da expressão da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), o que proporcionou maior estado de fosforilação no resíduo tirosina do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1), aumentando dessa forma a sensibilidade tecidual aos efeitos metabólicos da insulina (Dobrzyn; Dobrzyn, 2006).

Em outro estudo, Pighon et al. (2010), concluíram que o treinamento com exercício de endurance reduz o acúmulo de gordura no fígado de ratas ovariectomizadas, possivelmente através da regulação das moléculas chaves envolvidas na lipogênese e na oxidação de lipídios. Os resultados de expressão gênica obtidos por PCR-RT demonstraram maior expressão gênica dos genes lipogênicos SREBP-1c (57%), SCD-1 (87%), da proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidrato (ChREBP) (63%) e da enzima ACC (68%) em ratas ovariectomizadas do que ratas sham operadas. No entanto, estas maiores expressões de genes lipogênicos induzidos pela ovariectomia foram totalmente restauradas tanto pela reposição com 17β -estradiol quanto pelo treinamento de endurance. Inversamente, a expressão gênica do fator transcricional envolvido na oxidação de lipídios o PPAR- α foi 31% menor nas ratas ovariectomizadas do que nas ratas sham operadas. Novamente, a perturbação na expressão gênica foi

restabelecida nos animais que receberam reposição com 17β -estradiol ou foram submetidos ao treinamento de endurance, confirmando relatos anteriores de que a reposição com 17β -estradiol e o treinamento de endurance evitam o acúmulo de lipídios no fígado de ratas ovariectomizadas (Paquette et al. 2008; Paquette et al. 2009; Pighon et al. 2011). Entretanto, o presente estudo mostra resultados originais de que as mudanças induzidas pela ovariectomia na expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico hepático podem ser restauradas por meio do treinamento resistido e não somente pelo treinamento de endurance.

6. Conclusão

Em resumo, o presente estudo demonstrou que o treinamento resistido restaura as alterações moleculares hepáticas induzidas pela ovariectomia sobre o metabolismo lipídico hepático, indicando claramente os benefícios potenciais do treinamento resistido como uma importante estratégia alternativa para o controle dos efeitos deletérios da ovariectomia sobre a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas com o metabolismo lipídico hepático. Portanto, concluímos que a deficiência de estrogênio proporcionado pela ovariectomia altera a expressão de genes que favorecem o desenvolvimento de um fenótipo esteatótico, e que as alterações nos níveis de expressão gênica podem ser restauradas pelo treinamento resistido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **N Engl J Med**, v. 346, p. 1221-1231, 2002.

BARSALANI, R.; PIGHON, A.; RABASA-LHORET, R.; YASARI, S.; LAVOIE, J. M. Liver of ovariectomized rats is resistant to resorption of lipids. **Physiol Behav**, v. 95, p. 216-221, 2008.

BRANDT, J. M.; DJOUADI, F.; KELLY, D. P. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor α . **J Biol Chem**, v. 273, p. 23786-23792, 1998.

BROWN, M.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v. 89, n. 3, p. 331-340, 1997.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest**, v. 114, p. 147-152, 2004.

CHAWLA, A.; REPA, J. J.; EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the x-files. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1866-1870, 2001.

COHEN, P.; MIYAZAKI, M.; SOCCI, N. D.; HAGGE-GREENBERG, A.; LIEDTKE, W.; SOUKAS, A. A.; SHARMA, R.; HUDGINS, L. C.; NTAMBI, J. M.; FRIEDMAN, J. M. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. **Science**, v. 297, n. 5579, p. 240-243, 2002.

COHEN, P.; NTAMBI, J. M.; FRIEDMAN, J. M. Stearoyl-CoA desaturase-1 and the metabolic syndrome. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord**, v. 3, n. 4, p. 271-280, 2003.

CORRIVEAU, P.; PAQUETTE, A.; BROCHU, M.; PRUD'HOMME, D.; RABASALHORET, R.; LAVOIE, J. M. Resistance training prevents liver fat accumulation in ovariectomized rats. **Maturitas**, v. 59, p. 259-267, 2008.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 5, p. 649-688, 1999.

DESVERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. **Mol Endocrinol**, v. 18, p. 1321-1332, 2004.

DOBRZYN, A.; NTAMBI, J. M. The role of stearoyl-CoA desaturase in body weight regulation. **Trends Cardiovasc Med**, v. 14, n. 2, p. 77-81, 2004.

DOBRZYN, A.; DOBRZYN, P. Stearoyl-CoA desaturase-A new player in skeletal muscle metabolism regulation. **J Physiol Pharmacol**, v. 57, n. 10, p. 31-42, 2006.

DONNELLY, K. L.; SMITH, C. I.; SCHWARZENBERG, S. J.; JESSURUN, J.; BOLDT, M. D.; PARKS, E. J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins with nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Invest**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005.

DREYER, C.; KREY, C.; KELLER, H.; GIVEL, F.; HELFTENBEIN, G.; WAHLI, W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**, v. 68, n. 5, p. 879-887, 1992.

FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. **Horm Res**, v. 68, p. 72-82, 2007.

GAUTHIER, M. S.; COUTURIER, K.; LATOUR, J. G.; LAVOIE, J. M. Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. **J Appl Physiol**, v. 94, p. 2127-2134, 2003.

GAUTHIER, M. S.; COUTURIER, K.; CHARBONNEAU, A.; LAVOIE, J. M. Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 28, p. 1064-1071, 2004.

HEINE, P. A.; TAYLOR, J. A.; IWAMOTO, G. A.; LUBAHN, D. B.; COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, p. 12729-12734, 2000.

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

HORTON, J.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin Invest**, v. 109, p. 1125-1131, 2002.

ISSEMAN, I.; PRINCE, R.; TUGWOOD, J.; GREEN, S. A role for fatty acid and liver fatty acid binding protein in peroxisome proliferation? **Biochem Soc Trans**, v. 20, p. 824-827, 1992.

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

KOHJIMA, M.; ENJOJI, M.; HIGUCHI, N.; KATO, M.; KOTOH, K.; YOSHIMOTO, T.; FUJINO, T.; YADA, M.; YADA, R.; HARADA, N.; TAKAYANAGI, R.; NAKAMUTA, M. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 20, p. 351-358, 2007.

LATOUR, M. G.; SHINODA, M.; LAVOIE, J. M. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperstrogonic rats. **J Appl Physiol**, v. 90, p. 235-241, 2001.

LAVOIE, J. M.; GAUTHIER, M. S. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 12, p. 1393-1409, 2006.

LEITE, R. D.; PRESTES, J.; BERNARDES, C. F.; SHIGUEMOTO, G. E.; PEREIRA, G. B.; DUARTE, J. O.; DOMINGOS, M. M.; BALDISSERA, V.; PEREZ, S. E. A. 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, p. 1079-1086, 2009.

LEMIEUX, C.; PHANEUF, D.; LABRIE, F.; GIGUÈRE, V.; RICHARD, D.; DESHAIES, Y. Estrogen receptor alpha-mediated adiposity-lowering and hypocholesterolemic actions of the selective estrogen receptor modulator acolbifene. **Int J Obes**, v. 29, p. 1236-1244, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MANDARD, S.; MULLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator receptor α target genes. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, p. 393-416, 2004.

MINNICH, A.; TIAN, N.; BYAN, L.; BILDER, G. A potent PPAR α agonist stimulates mitochondrial fatty acid β -oxidation in liver and skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, p. 270-279, 2001.

MIYAZAKI, M.; KIM, Y. C.; GRAY-KELLER, M. P.; ATTIE, A. D.; NTAMBI, J. M. The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. **J Biol Chem**, v. 275, n. 39, p. 30123-30128, 2000.

MIYAZAKI, M.; KIM, Y. C.; NTAMBI, J. M. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. **J Lipid Res**, v. 42, n. 7, p. 1018-1024, 2001a.

MIYAZAKI, M.; MAN, W. C.; NTAMBI, J. M. Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase 1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. **J Nutr**, v. 131, n. 9, p. 2260-2268, 2001b.

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

NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M. Recent insights into stearoyl-CoA desaturase 1. **Curr Opin Lipidol**, v. 14, n. 3, p. 255-261, 2003.

NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M.; DOBRZYN, A. Regulation of stearoyl-CoA desaturase expression. **Lipids**, v. 39, n. 11, p. 1061-1065, 2004.

OIKARI, S.; AHTIALANSAARI, T.; HEINONEN, M. V.; MAURIALA, T.; AURIOLA, S.; KIEHNE, K.; FOLSCH, U. R.; JANNE, J.; ALHONEN, L.; HERZIG, K. H. Downregulation of PPARs and SREBP by acyl-CoA-binding protein overexpression in transgenic rats. **Pflugers Arch**, v. 456, p. 369-377, 2008.

PAQUETTE, A.; WANG, D.; JANKOWSKI, M.; GUTKOWSKA, J.; LAVOIE, J. M. Effects of ovariectomy on PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. **Menopause**, v. 15, n. 6, p. 1169-1175, 2008.

PAQUETTE, A.; CHAPADOS, N. A.; BERGERON, R.; LAVOIE, J. M. Fatty acid oxidation is decreased in the liver of ovariectomized rats. **Horm Metab Res**, v. 41, p. 511-515, 2009.

PETTINELLI, P.; POZO, T. D.; ARAYA, J.; RODRIGO, R.; ARAYA, A. V.; SMOK, G.; CSENDES, A.; GUTIERREZ, L.; ROJAS, J.; KORN, O.; MALUENDA, F.; DIAZ, J. C.; RENCORET, G.; BRAGHETTO, I.; CASTILHO, J.; PONIACHIK, J.; VIDELA, L. A. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR- α ratio and steatosis in obese patients: Correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, p. 1080-1086, 2009.

PIGHON, A.; PAQUETTE, A.; BARSALANI, R.; CHAPADOS, N. A.; RABASALHORET, R.; YASARI, S.; PRUD'HOMME, D.; LAVOIE, J. M. Resistance training attenuates fat mass regain after weight loss in ovariectomized rats. **Maturitas**, v. 64, p. 52-57, 2009.

PIGHON, A.; BARSALANI, R.; YASARI, S.; PRUD'HOMME, D.; LAVOIE, J. M. Does exercise training prior to ovariectomy protect against liver and adipocyte fat accumulation in rats? **Climacteric**, v. 13, n. 3, p. 238-248, 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. 629-639, 2011.

PINAIRE, J. A.; REIFEL-MILLER, A. Therapeutic potential of retinoid X receptor modulators for the treatment of the metabolic syndrome. **PPAR Research**, v. 2007: 94156, 2007.

RODRIGUEZ, J. C.; GIL-GOMEZ, G.; HEGARDT, F. G.; HARO, D. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. **J Biol Chem**, v. 269, p. 18767-18772, 1994.

SAMPATH, H.; MIYAZAKI, M.; DOBRZYN, A.; NTAMBI, J. M. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. **J Biol Chem**, v. 282, n. 4, p. 2483-2493, 2007.

SCHOONJANS, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, H.; MAHFOUDI, A.; KREY, G.; WAHLI, W.; GRIMALDI, P.; STAELS B.; YAMAMOTO, T.; AUWERX, J. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a

peroxisome proliferator response element in the C promoter. **J Biol Chem**, v. 270, p.19269-19276, 1995.

SCHOONJANS, K.; PEINADO-ONSURBE, A. M.; HEYMAN, R. A.; BRIGGS, M.; DEEB, S.; STAELS, B.; AUWERX, J. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. **EMBO J**, v. 15, p. 5336-5348, 1996.

SEARS, I. B.; MACGINNITIE, M. A.; KOVACS, L. G.; GRAVES, R. A. Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 7, p. 3410-3419, 1996.

SHINODA, M.; LATOUR, M. G.; LAVOIE, J. M. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 26, p. 335-343, 2002.

TALANIAN, J. L.; HOLLOWAY, G. P.; SNOOK, L. A.; HEIGENHAUSER, G. J.; BONEN, A.; SPRIET, L. L. Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 299, n. 2, p. 180-188, 2010.

TONTONOZ, P.; HU, E.; DEVINE, J.; BEALE, E. G.; SPIEGELMAN, B. M. PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. **Mol Cell Biol**, v. 15, p. 351-357, 1995.

TUGWOOD, J. D.; ISSEMANN, I.; ANDERSON, R. G.; BUNDELL, K. R.; McPHEAT, W. L.; GREEN, S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5'flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. **EMBO J**, v.11, p. 433-439, 1992.

VARANASI, U.; CHU, R.; HUANG, Q.; CASTELLON, R.; YELDANDI, A. V.; REDDY, J. K. Additions and corrections to identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. **J Biol Chem**, v. 273, p. 30842-30849, 1998.

VOLZKE, H.; SCHWARZ, S.; BAUMEISTER, S. E.; WALLASCHOFSKI, H.; SCHWAHN, C.; GRABE, H. J. Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population. **Gut**, v. 56, p. 594-595, 2007.

YASARI, S.; PRUD'HOMME, D.; WANG, D.; JANKOWSKI, M.; LEVY, E.; GUTKOWSKA, J.; LAVOIE, J. M. Exercise training decreases hepatic SCD-1 gene expression and protein content in rats. **Mol Cell Biochem**, v. 335, p. 291-299, 2010.

YU, G. S.; LU, Y. C.; GULICK, T. Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase I β gene promoters by fatty acid enzyme substrate. **J Biol Chem**, v. 273, p. 32901-32909, 1998.

ZHANG, B. W.; MARCUS, S. L.; SAJJADI, F. G.; ALVARES, K.; REDDY, J. K.; SUBRAMANI, S.; RACHUBINSKI, R. A.; CAPONE, J. P. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the gene encoding rat

peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p. 7541-7545, 1992.

ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y.; CHEN, Y.; SHEN, X.; FENYK-MELODY, J.; WU, M.; VENTRE, J.; DOEBBER, T.; FUJII, N.; MUSI, N.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J.; MOLLER, D. E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **J Clin Invest**, v. 108, p. 1167-1674, 2001.

ANEXO I

Artigo aceito para publicação no periódico internacional “*European Journal of Applied Physiology*”

Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats

Mateus Moraes Domingos · Maria Fernanda Cury Rodrigues · Uliana Sbeguen Stotzer · Danilo Rodrigues Bertucci · Markus Vinicius Campos Souza · Diego Adorna Marine · Camila do Valle Gomes Gatto · Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo · Sérgio Eduardo de Andrade Perez

Received: 19 April 2011 / Accepted: 22 July 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Decreased levels of estrogen are associated with hepatic steatosis (HS), through changes in gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis. Both resistance training (RT) and endurance training (ET) prevent HS in ovariectomized (Ovx) rats. However, the molecular events associated with this process were only investigated for ET, but not for RT. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of Ovx and RT on the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of rats. Sprague–Dawley adult female rats were grouped into four ($n = 6$ per group): sham-operated sedentary (Sham-Sed); Ovx sedentary (Ovx-Sed); sham-Rt and Ovx-Rt. A 10-week RT period, during which the animals climbed a 1.1-m vertical ladder with weights attached to their tails, was used. The sessions were performed three times a week, with 4–9 climbs and 8–12 dynamic movements per climb. Gene expression was analyzed by RT-PCR by the $\Delta\Delta C_t$ method. The estrogen deficiency associated with ovariectomy decreased the gene expression of molecules related to fat oxidation, carnitine palmitoyltransferase I (53%) and β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (27%), and increased molecules related to lipogenesis, sterol regulatory element-binding protein-1c (106%), acetyl-CoA carboxylase (ACC) (72%) and stearoyl CoA desaturase-1 (109%). With the exception of ACC, the

ovariectomy-induced changes in the expression of these molecules were restored by RT. The present results indicate that RT has important effects on the prevention of HS in Ovx animals, through changes in gene expression of molecules related to hepatic lipid metabolism.

Keywords Ovariectomy · Resistance training · Hepatic steatosis · Fat oxidation · Lipogenesis

Introduction

Estrogens are important players in hepatic lipid homeostasis, and their role as lipid regulators has been highlighted by different models of estrogen deficiency (Heine et al. 2000; Paquette et al. 2008). Ovariectomized (OVX) rats, as well as aromatase, and estrogen receptor knockout mice develop nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), which is characterized by triglyceride accumulation in hepatocytes (hepatic steatosis) (Lemieux et al. 2005), one of the most frequent causes of abnormal liver function (Angulo 2002; Browning and Horton 2004). In a recent study that included over 800 women aged 40–59 years, it was confirmed that the menopausal status was indeed associated with hepatic steatosis (Volzke et al. 2007). Thus, it is important to investigate interventions that may prevent or attenuate the accumulation of lipids into liver with a decrease in plasma estrogens. An alternative to counteract liver fat accumulation with estrogen withdrawal might be through training. It was reported that exercise training prevented fat accumulation in the liver of high fat-fed rats (Gauthier et al. 2003; Gauthier et al. 2004). Specifically in OVX rats, there is some evidence that resistance training (RT) reduces liver fat accumulation (Corriveau et al. 2008; Leite et al. 2009; Pighon et al. 2009). These studies,

Communicated by Susan A. Ward.

M. M. Domingos (✉) · M. F. C. Rodrigues · U. S. Stotzer · D. R. Bertucci · M. V. C. Souza · D. A. Marine · C. V. G. Gatto · H. S. S. de Araújo · S. E. de Andrade Perez
Department of Physiological Sciences,
Federal University of São Carlos, Flauzino Marques St,
n. 67, ap: 14b, São Carlos, São Paulo 13562-002, Brazil
e-mail: mmoraesdomingos@gmail.com

however, did not provide any mechanistic information on the action of exercise training in preventing liver fat accumulation in OVX animals.

Hepatic fat accumulation seems to be triggered by changes in expression of genes that increase lipid synthesis and reduce lipid oxidation in the liver (Paquette et al. 2008; Pighon et al. 2011). Nearly all transcription factor families contribute to lipid regulation, but only a few of them have a clear predominant role (Desvergne et al. 2004; Kohjima et al. 2007). Among these transcription factors, peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) are instrumental in hepatic lipid regulation (Desvergne et al. 2004; Kohjima et al. 2007).

PPARs are members of the superfamily of nuclear receptors, essentially recognized by their role as lipid sensors and regulators of lipid metabolism (Desvergne and Wahli 1999; Desvergne et al. 2004). Among the three identified isotypes (PPAR α , PPAR $\beta\delta$ and PPAR γ), PPAR α is highly expressed in tissues with high rates of fatty acid (FA) oxidation. It is activated by synthetic agonists such as fibrates or by natural agonists such as FA or eicosanoids (Minnich et al. 2001). The physiological role of PPAR α lies on the mediation of metabolic responses to fasting. Upon activation, PPAR α up-regulates genes involved in cellular FA uptake and transport, as well as peroxisomal, mitochondrial and microsomal FA oxidation, ketogenesis and gluconeogenesis (Mandard et al. 2004). The carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I) is among the genes regulated by PPAR α , which catalyzes the transfer of FA from acyl-coenzyme A to carnitine, allowing the initial transport of fatty acids into mitochondria for β -oxidation (Minnich et al. 2001). Furthermore, the enzyme hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD), which is also regulated by PPAR α , catalyzes oxidation of hydroxyacyl-CoA to ketoacyl-CoA, and passes the hydrogen to NAD⁺ (Mandard et al. 2004).

SREBPs, conversely, are a group of membrane-bound transcription factors that regulate the expression of the genes involved in the production and uptake of cholesterol, fatty acids, triacylglycerol (TAG), phospholipids and low-density lipoprotein receptor (Horton 2002; Ferré and Fofelle 2007). Three members of the SREBP family have been described in mammals, SREBP-1a, -1c and -2 (Ferré and Fofelle 2007). SREBP-1c transcriptionally activates genes required for lipogenesis. Among the genes regulated by SREBP-1c is the acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC), which promotes the carboxylation of acetyl-coenzyme A to form malonyl-coenzyme A, and the enzyme stearoyl coenzyme A desaturase-1 (SCD-1) that appears to represent a pivotal control point in lipid homeostasis (Sampath and Ntambi 2006). SCD-1 catalyzes a rate-limiting step in the biosynthesis of monounsaturated fats, which are required for both TAG synthesis and very low-density lipoprotein production (Cohen et al. 2002, 2003).

Changes in the expression of PPAR α and SREBP-1c and their downstream enzyme contribute to hepatic steatosis, which highlights their significant role in hepatic lipid homeostasis (Kohjima et al. 2007; Paquette et al. 2008; Pettinelli et al. 2009; Pighon et al. 2011). Thus, to elucidate interventions that restore the expression of genes involved in hepatic fat accumulation becomes an important target of research.

Among exercise interventions, RT has been shown as being efficient in reducing liver fat accumulation (Corriveau et al. 2008; Leite et al. 2009; Pighon et al. 2009). Nevertheless, the role of RT over gene expression of molecules related to fat oxidation (PPAR α , CPT-I and HAD) and lipogenesis (SREBP-1c, ACC and SCD-1) in the liver in OVX rats remains unclear. Therefore, it is important to perform experiments to elucidate how resistance training influences gene expression of molecules related to hepatic lipid metabolism in OVX rats.

In view of the above-mentioned concerns, our hypothesis was that both the RT and ovarian hormones would alter gene expression of molecules related to hepatic lipid metabolism, and that RT in OVX would restore the gene expression of these molecules. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of OVX and RT over the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the rat liver.

Methods

Animals

Twenty-four female Sprague–Dawley rats from the breeding colony of the State University of Sao Paulo (UNESP, Araraquara, Brazil) with an initial weight of approximately 220 \pm 12 g were used. The animals had free access to water and chow and were kept in collective cages (three rats per cage) at a constant temperature of 22 \pm 2°C, and had a 12-h light/12-h dark cycle, with light from 1 a.m. to 1 p.m. All the animals were fed with commercial rodent chow. The food intake was monitored daily over the entire experimental period.

The research was approved by the Committee of Experimental Animals from the Federal University of São Carlos (Protocol no. 008/2010). All animal procedures were conducted in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council 1996).

Experimental groups

The rats were randomly distributed into four experimental groups (six animals per group): (i) sham-operated

sedentary (Sham-Sed), (ii) ovariectomized sedentary (Ovx-Sed), (iii) sham-operated resistance training (Sham-Rt) and ovariectomized resistance training (Ovx-Rt). The sedentary animals (Sham-Sed and Ovx-Sed) were kept in their cages over the whole experimental period without any type of exercise. The OVX animals (Ovx-Sed and Ovx-Rt) had their ovaries removed. The trained animals (Sham-Rt and Ovx-Rt) performed 10 weeks of resistance training. The training started at the same time for each group and is described below. The animals were killed 48 h after the last resistance exercise session.

Ovariectomy and sham operation

Ovariectomy and sham operations were performed when the rats reached 250 g of body mass, according to the technique described by Kalu (1991). For the surgery, rats were anesthetized with a mixture of ketamine–xylazine (61.5–7.6 mg/kg, intraperitoneally). The sham-operated rats underwent the surgical procedure, but did not have their ovaries removed. The OVX animals had their ovaries removed. All animals that underwent surgery procedures had 3 weeks of recovery. All animals had the same exposure time to the surgical procedures until the date of killing (92 days).

Resistance exercise training

During the 10 weeks of resistance training, climbing sessions were performed three times a week. Initially, the rats were adapted to the resistance training protocol, which required that the animals climbed a vertical ladder (1.1 × 0.18 m, 2 cm grid, 80° incline) with weights attached to their tails. The size of the ladder induced the animals to perform 8–12 movements per climb. The load apparatus was attached to the tail by wrapping the proximal portion of the tail with a self-adhesive foam strip. A Velcro strap was wrapped around the foam strip and fastened. With the load apparatus attached to the tail, each rat was placed at the bottom of the ladder and familiarized with climbing. If necessary, a stimulus with tweezers was applied to the animal's tail to initiate the movement. At the top of the ladder, the rats reached a housing chamber (20 × 20 × 20 cm), where they were allowed to rest for 120 s. This procedure was repeated until the rats would voluntarily climb the ladder for three consecutive times, without stimulus.

The first training session started 3 days after this familiarization. It consisted of four to eight ladder climbs while carrying progressively heavier loads. The initial climb consisted of carrying a load that was 75% of the animal's body mass. After this, a series of additional 30-g weights were added until the load did not allow the animals

to climb the entire length of the ladder. Failure was determined when the animal could not progress up the ladder after three successive stimuli on the tail with tweezers. The highest load successfully carried over the whole length of the ladder was considered as the rat's maximal carrying capacity for that training session.

The next training sessions consisted of four ladder climbs with 65, 85, 95 and 100% of the rat's previous maximal carrying capacity, determined in the previous session. During subsequent ladder climbs, an additional 30-g load was added until a new maximal carrying capacity was determined. The resistance training protocol was adapted from Hornberger and Farrar (2004), according to the needs of the current research.

Tissue sampling

Several organs and tissues were removed in the following order: liver, uterus, mesenteric, urogenital and retroperitoneal fat depots. Subsequently, five skeletal muscles of the right hind limb (soleus, plantaris, gastrocnemius, extensor digitorum longus and tibialis anterior) were rapidly removed and weighed. Finally, the right femur wet weight was obtained following a short boiling period in a 10% KOH solution to remove the surrounding tissue. The liver median lobe was processed to determine and quantify the messenger RNA (mRNA). All tissue samples were weighed, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at −80°C until further analysis.

Isolation of RNA and quantitative real-time (RT) polymerase chain reaction (PCR)

Total RNA was extracted from frozen liver tissue with the use of Trizol reagent (Invitrogen Corporation, California, USA) according to the manufacturer's specifications. The integrity and quality of the purified RNA were analyzed by formaldehyde denaturing agarose gel electrophoresis and measurement of the A_{260}/A_{280} ratio. To remove genomic DNA, total RNA (1 µg) from each sample was treated with deoxyribonuclease I (DNase I; Invitrogen Corporation, California, USA) under a standard protocol according to the manufacturer's specifications. Treated RNA was reverse transcribed into cDNA using M-MLV reverse transcriptase (Promega Corporation, Madison, WI, USA). For the quantitative RT-PCR procedure, 20 ng of cDNA and 0.5 µM of each primer were used in 25-µL volume system containing SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas). All the samples were analyzed in duplicate. The gene-specific primers were purchased from Invitrogen Life Technologies, Inc., and are listed in Table 1. The thermal cycling program was 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 94°C for 15 s, 57–61°C for 30 s, and 72°C for 60 s. Following PCR, the

Table 1 Oligonucleotide primers used for quantitative RT-PCR

Genes	Sense primer (5′–3′)	Antisense primer (5′–3′)	Accession no.
SREBP-1c	TGCCCTAAGGGTCAAACCA	TGGCGGGCACTACTTAGGAA	L16995.1
ACC	ACAGAGATGGTGGCTGATGTC	GATCCCCATGGCAATCTG	NM_022193.1
SCD-1	TGCTGATGTGCTTCATCCTG	GGGAAACCAGGATATTCTCC	NM_009127.4
PPAR- α	TCGGAGGGCTCTGTCATC	CATCTGTACTGGTGGGACA	NM_013196.1
CPT-1	ACGTTGGACGAATCGGAGC	AAAGCATCTTCCATGCAGCAG	NM_031559.2
HAD	GGCTGCATGAGCGAGGCGAT	TGGGATACCCGGCTCCCAGC	NM_057186.1
GAPDH	GATGCTGGTGTGAGTATGTCC	GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA	NM_017008.3

SREBP-1c sterol regulatory element-binding protein-1c, *ACC* acetyl-CoA carboxylase, *SCD-1* stearoyl CoA desaturase-1, *PPAR- α* peroxisome proliferator-activated receptor- α , *CPT-1* carnitine palmitoyltransferase I, *HAD* hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, *GAPDH* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

melting curve was completed to ensure that only one PCR product was amplified per reaction.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an endogenous control. The relative expression of the quantitative RT-PCR products was determined by the $\Delta\Delta Ct$ method. This method calculates the relative expression using the equation: fold induction = $2^{-[\Delta\Delta Ct]}$, where Ct = the threshold cycle, i.e., the cycle number at which the sample's relative fluorescence increases to more than the background fluorescence, and $\Delta\Delta Ct$ = [Ct gene of interest (unknown sample) – Ct GAPDH (unknown sample)] – [Ct gene of interest (calibrator sample) – Ct GAPDH (calibrator sample)].

Statistical analysis

All data were presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Initially, the statistical analysis was done both by Kolmogorov–Smirnov normality test and homoscedasticity. A two-way analysis of variance (ANOVA) test was used to compare the variables resistance training with ovariectomy. Fisher's post hoc test was used in the event of a significant ($P \leq 0.05$) ratio.

Results

Ovariectomy in rats resulted in higher body weight ($P < 0.05$), daily food intake, and urogenital, mesenteric and retroperitoneal fat depot weights ($P < 0.05$) when compared with sham-operated rats (Table 2). However, mesenteric and retroperitoneal fat depot weights were lower (23 and 29%, respectively) in Ovx-Rt than in Ovx-Sed rats. Furthermore, OVX resulted in lower femur (15%; $P < 0.05$) and uterus weights (74%; $P < 0.05$), indicating the physiologic effects of ovariectomy (Table 2). Nevertheless, Sham-Rt group presented higher femur weight (8, 27, and 17%; $P < 0.05$) than Sham-Sed, Ovx-Sed and Ovx-Rt groups, respectively. When compared, Ovx-Rt group presented higher femur weight (9%; $P < 0.05$) than the Ovx-Sed group. There was no difference in the sum of the weights of the five muscles between the four groups.

For the maximal workload during the 10-week training, there was no interaction between group and time, indicating that the Sham-Rt and Ovx-Rt groups increased their maximal carrying load capacity by the same amount during the training (Fig. 1). The workloads increased after weeks 5 and 10 (compared with week 1), and after week 10

Table 2 Effects of ovariectomy and resistance training on anthropometric parameters

	Sham-Sed	Ovx-Sed	Sham-Rt	Ovx-Rt
Body weight (g)	337.11 \pm 8.13	401.93 \pm 4.60 ^a	308.94 \pm 5.17 ^{a,b}	370.38 \pm 5.89 ^{a,b,c}
Food intake (g/d)	20.58 \pm 0.18	23.15 \pm 0.18 ^a	19.61 \pm 0.14 ^{a,b}	21.44 \pm 0.19 ^{a,b,c}
Urogenital fat weight (g)	8.52 \pm 0.89	11.03 \pm 1.84 ^a	6.40 \pm 0.75 ^b	9.12 \pm 0.18
Mesenteric fat weight (g)	4.28 \pm 0.34	6.72 \pm 0.81 ^a	4.00 \pm 0.47 ^b	5.18 \pm 0.27 ^b
Retroperitoneal fat weight (g)	3.26 \pm 0.30	4.84 \pm 0.45 ^a	2.67 \pm 0.34 ^b	3.45 \pm 0.07 ^b
Leg muscles weight (g/100 g BW)	0.93 \pm 0.01	0.86 \pm 0.02	0.94 \pm 0.03 ^b	0.89 \pm 0.02
Uterus weight (g)	0.68 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01 ^a	0.64 \pm 0.04 ^b	0.15 \pm 0.00 ^{a,c}
Femur weight (g/100 g BW)	0.264 \pm 0.004	0.223 \pm 0.006 ^a	0.285 \pm 0.008 ^{a,b}	0.244 \pm 0.006 ^{b,c}

Values are mean \pm standard error of the mean; $n = 6$ rats per group. BW indicates body weight

^a significantly different from Sham-Sed ($p \leq 0.05$)

^b significantly different from Ovx-Sed ($p \leq 0.05$)

^c significantly different from Sham-Rt ($p \leq 0.05$)

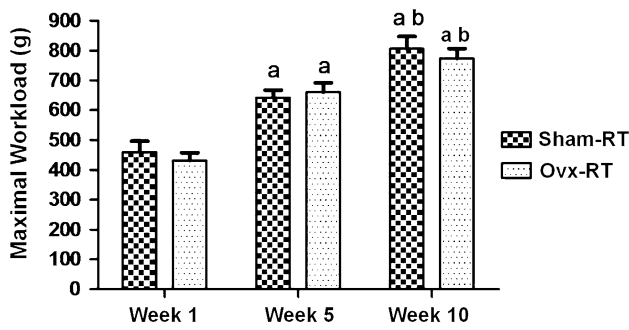


Fig. 1 The sham-operated resistance training (Sham-Rt) and ovariectomized resistance training (Ovx-Rt) groups' maximal workload at weeks 1, 5 and 10. Values are presented as mean ± SEM; $p \leq 0.05$ ($n = 6$ each group). *a* statistically significant difference compared with week 1, *b* statistically significant difference between weeks 5 and 10

(compared with week 5) (Fig. 1). Nevertheless, there was no difference in maximal load between the two chronically resistance trained groups within the 10-week period.

RT-PCR analysis showed higher ($P < 0.05$) gene expression of hepatic lipogenic transcription factor SREBP-1c (106%; Fig. 2a), as well as of its downstream targets, ACC (72%; Fig. 2b) and SCD-1 (109%; Fig. 2c), in Ovx-Sed than in Sham-Sed rats. These Ovx-induced higher lipogenic gene expressions were totally prevented by resistance training, with the exception of the ACC. However, gene expression of ACC and SCD-1 was higher (108 and 266%, respectively; Fig. 2b, c) in Ovx-Rt than in Sham-Rt rats. Sham-Rt group showed a decrease (75%; Fig. 2c) in SCD-1 gene expression than Sham-Sed group, indicating the potential benefits of resistance training as an alternative strategy to control the effects of ovariectomy on SCD-1 gene expression.

Results from RT-PCR showed lower ($P < 0.05$) gene expression of molecules related to fat oxidation, CPT-I (53%; Fig. 3b), and HAD (27%; Fig. 3c), in Ovx-Sed than in Sham-Sed rats. These Ovx-induced lower gene expressions molecules related to fat oxidation were totally prevented by resistance training. Gene expression of PPAR α was not altered by OVX. Nevertheless, resistance training increased the gene expression of PPAR α (170%; Fig. 3a), but the hepatic oxidative transcription PPAR α mRNA was higher (56%; Fig. 3a) in Sham-Rt than in Ovx-Rt rats.

Discussion

The main finding of the study was that estrogen deficiency associated with ovariectomy decreased the gene expression of molecules related to fat oxidation, CPT-I (53%) and HAD (27%), and increased the molecules related to lipogenesis, SREBP-1c (106%), ACC (72%) and SCD-1

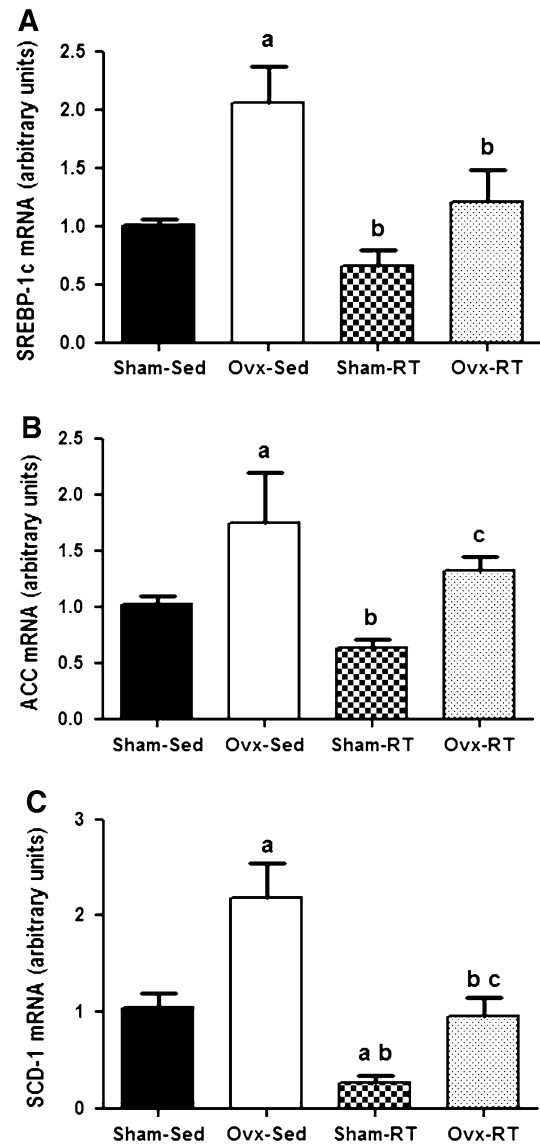


Fig. 2 mRNA expression of hepatic sterol-regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) (a), acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC) (b), and stearyl CoA desaturase 1 (SCD-1) (c) in sham-operated sedentary (Sham-Sed), ovariectomized sedentary (Ovx-Sed), sham-operated resistance training (Sham-Rt) and ovariectomized resistance training (Ovx-Rt) groups. Values are presented as mean ± SEM; $p \leq 0.05$ ($n = 6$ each group). *a* statistically significant difference compared with Sham-Sed, *b* compared with Ovx-Sed, *c* compared with Sham-Rt

(109%). Moreover, the respective reduced and increased expression of these genes was restored with resistance training, with the exception of the ACC. Although there was a 25% decrease in gene expression of ACC in the OVX-Rt group compared to the OVX-Sed group, this decrease was not statistically significant, perhaps because of the sample size or the size of the group OVX-Sed standard error of mean. Despite not being significant, we believe that this result has a clinical significance, which

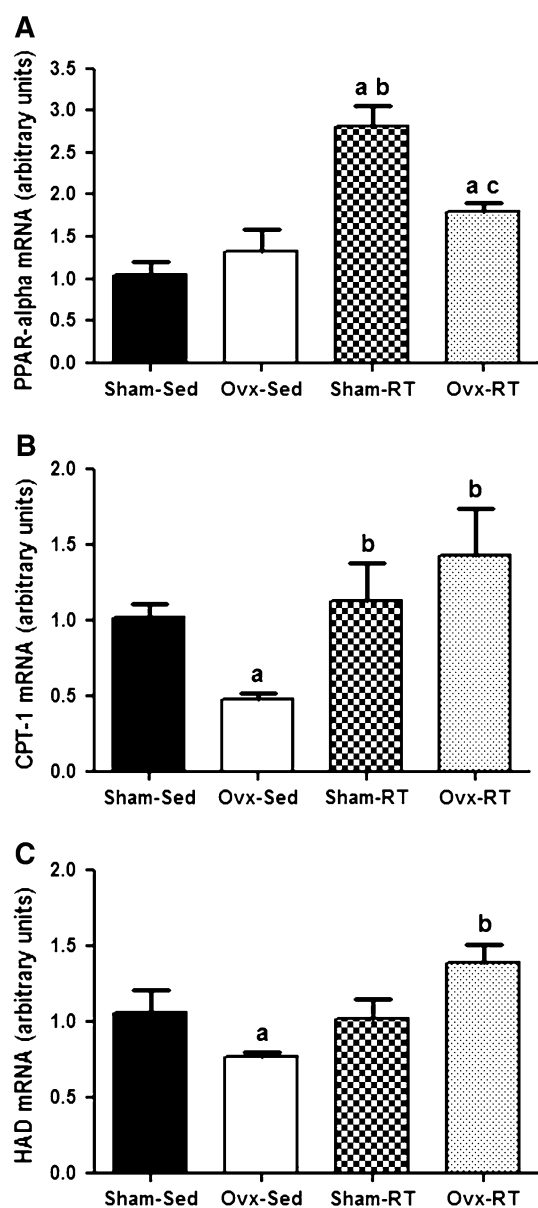


Fig. 3 mRNA expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR- α) (a), carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I) (b), hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD) (c) in sham-operated sedentary (Sham-Sed), ovariectomized sedentary (Ovx-Sed), sham-operated resistance training (Sham-Rt) and ovariectomized resistance training (Ovx-Rt) groups. Values are presented by means \pm SEM; $p \leq 0.05$ ($n = 6$ each group). *a* statistically significant difference compared with Sham-Sed, *b* compared with Ovx-Sed, *c* compared with Sham-Rt

shows the benefits of resistance training. Thus, our initial hypothesis was confirmed.

There is strong evidence that liver fat accumulation in ovariectomized rats is associated with increased food intake (Latour et al. 2001; Shinoda et al. 2002; Paquette et al. 2008), imbalance among pathways of liver uptake, synthesis and oxidation (Barsalani et al. 2008; Paquette

et al. 2008, 2009), as well as decreased liver fatty acid oxidation (Paquette et al. 2008, 2009). However, there is also evidence that resistance training reduces hepatic fat (Corriveau et al. 2008; Leite et al. 2009; Pighon et al. 2009). Based on the results of our study, pathways of lipid metabolism are disturbed in the absence of estrogens, leading to fat accumulation in the liver of Ovx rats. Consequently, Ovx-induced hepatic fat accumulation cannot be totally attributed to the increased food intake (Pighon et al. 2011).

Kinetic studies in human subjects indicate that approximately 26% of hepatic triacylglycerol accumulation can be accounted for by de novo lipogenesis (Donnelly et al. 2005). Therefore, it has been assumed that the enhancement of de novo lipid synthesis is a primary disorder in hepatic steatosis that is tightly stimulated by molecules that regulate hepatic fat accumulation, such as the transcription factor SREBP-1c and the ACC downstream enzyme (Kohjima et al. 2007; Paquette et al. 2008; Pettinelli et al. 2009; Pighon et al. 2011). Likewise, SCD-1 is an enzyme that represents a pivotal control point in lipid homeostasis by catalyzing a rate-limiting step in the biosynthesis of saturated-derived monounsaturated fats, which are required for triacylglycerol synthesis (Cohen et al. 2002, 2003). Recently, it was reported that ovariectomy increased SREBP-1c (Paquette et al. 2008; Pighon et al. 2011), ACC (Pighon et al. 2011) and SCD-1 (Paquette et al. 2008; Pighon et al. 2011) and decreased PPAR α (Paquette et al. 2008; Pighon et al. 2011), which is an important transcription factor involved in fatty acid oxidation. The present results complement these previous findings by showing that the gene expression of molecules related to fatty acid oxidation, such as CPT-I and HAD, is decreased in ovariectomized rats.

However, the main contribution and original finding of our study is that resistance training counteracted these hepatic molecular disturbances by canceling the increase in lipogenic molecules, such as SREBP-1c, and SCD-1, and decreasing the molecules related to fat oxidation such as CPT-I and HAD transcripts in ovariectomized rats. These molecular responses strongly suggest that resistance training depresses lipogenesis in the liver of ovariectomized rats and can be a possible mechanism that contributes to the decrease in liver fat accumulation, as reported previously (Corriveau et al. 2008; Leite et al. 2009; Pighon et al. 2009). These studies, however, did not provide any mechanistic information on the action of resistance training in preventing liver fat accumulation in OVX animals.

Corriveau et al. (2008) and Pighon et al. (2009) found that resistance training attenuated adipose tissue and fat accumulation in the liver after a food restriction period in ovariectomized rats. In this sense, there is growing evidence that resistance training stimulates lipid oxidation in

the liver due to the activation of the AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway (Lavoie and Gauthier 2006; Corriveau et al. 2008) and downregulation of lipogenic enzymes by hepatic gene expression. A major regulator of fatty acids synthesis is SREBP-1c (Kohjima et al. 2008), a positive regulator of the expression of genes encoding lipogenic enzymes including ACC, SCD-1 and fatty acid synthase (Shimano 2001; Sampath and Ntambi 2006). It is known that SREBP-1c is negatively regulated by AMPK (Zhou et al. 2001; Kohjima et al. 2008; Oikari et al. 2008). Thus, it is tempting to speculate that resistance training could induce AMPK activation with a decrease in the expression of transcription factors related to lipogenesis, improving liver fat oxidation and consequently reducing liver lipid content (Leite et al. 2009).

Yasari et al. (2010) found that endurance training resulted in an important decrease (~80%) in hepatic SCD-1 mRNA levels, in both standard diet and high-fat diet-fed rats. Protein quantification by Western blot analysis confirmed the results obtained by RT-PCR for SCD-1. The authors emphasize that the recent finding of a reduction in SCD-1 gene expression in liver with exercise training indicates that this effect is an adaptation that may be associated with chronic exercise, which is manipulation of the natural environment known to favor the proper regulation of lipid metabolism.

In another study, Pighon et al. (2011) concluded that exercise training reduces fat accumulation in the liver of ovariectomized rats possibly through regulation of key molecules involved in lipogenesis and lipid oxidation. RT-PCR analysis showed higher gene expression of hepatic lipogenic transcription factors SREBP-1c (57%), SCD-1 (87%), and carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) (63%), as well as ACC (68%) mRNA levels, in Ovx than in Sham rats. These Ovx-induced higher lipogenic gene expressions were totally prevented either by E2 (17 β -estradiol) replacement or by endurance training. Conversely, the hepatic oxidative transcription factor PPAR- α mRNA was lower (31%) in Ovx than in Sham rats. Again, lower PPAR- α mRNA levels were reestablished in OvxE2 animals and OvxTr rats, confirming previous reports that 17 β -estradiol supplementation and endurance exercise training prevent the accretion of lipids in the liver of Ovx rats (Paquette et al. 2008, 2009; Pighon et al. 2010). The present study showed that the changes induced by ovariectomy in the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism may be counterbalanced through resistance training.

In summary, the present study is the first to demonstrate that resistance training counteracts the molecular hepatic disturbances induced by ovariectomy on hepatic lipid metabolism, clearly indicating the potential benefits of resistance training as an important alternative strategy to

control the effects of menopause and ovariectomy on the expression of genes which encode enzymes involved in hepatic lipid metabolism. Therefore, we conclude that estrogen deficiency associated with ovariectomy changes the expression of genes that favor the development of a steatotic phenotype, which can be counteracted through resistance training. We suggest further studies with 17 β -estradiol replacement to confirm these positive effects of resistance training on the expression of these genes.

Acknowledgments The authors thank Mr. José Carlos Lopes for the technical assistance in the laboratory. Financial support was provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and by the Exercise Physiology Laboratory of the Federal University of São Carlos (São Carlos, Brazil).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Angulo P (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346:1221–1231
- Barsalani R, Pighon A, Rabasa-Lhoret R, Yasari S, Lavoie JM (2008) Liver of ovariectomized rats is resistant to resorption of lipids. *Physiol Behav* 95:216–221
- Browning JD, Horton JD (2004) Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114:147–152
- Cohen P, Miyazaki M, Socoli ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM (2002) Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 297:240–243
- Cohen P, Ntambi JM, Friedman JM (2003) Stearoyl-CoA desaturase-1 and the metabolic syndrome. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3:271–280
- Corriveau P, Paquette A, Brochu M, Prud'Homme D, Rabasa-Lhoret R, Lavoie JM (2008) Resistance training prevents liver fat accumulation in ovariectomized rats. *Maturitas* 59:259–267
- Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649–688
- Desvergne B, Michalik L, Wahli W (2004) Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol* 18:1321–1332
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ (2005) Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115:1343–1351
- Ferré P, Fougère F (2007) SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res* 68:72–82
- Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, Lavoie JM (2003) Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol* 94:2127–2134
- Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A, Lavoie JM (2004) Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:1064–1071
- Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS (2000) Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12729–12734

- Hornberger TA Jr, Farrar RP (2004) Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol* 29:16–31
- Horton JD (2002) Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* 30:1091–1095
- Kalu DN (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15:175–192
- Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, Yada M, Yada R, Harada N, Takayanagi R, Nakamura M (2007) Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 20:351–358
- Kohjima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, Yada M, Yada R, Harada N, Enjoji M, Takayanagi R, Nakamura M (2008) SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 21:507–511
- Lavoie JM, Gauthier MS (2006) Regulation of fat metabolism in the liver: link to nonalcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol Life Sci* 63(12):1393–1409
- Latour MG, Shinoda M, Lavoie JM (2001) Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *J Appl Physiol* 90:235–241
- Leite RD, Prestes J, Bernardes CF, Shiguemoto GE, Pereira GB, Duarte JO, Domingos MM, Baldissera V, Perez SEA (2009) Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Appl Physiol Nutr Metab* 34:1079–1086
- Lemieux C, Phaneuf D, Labrie F, Giguère V, Richard D, Deshaies Y (2005) Estrogen receptor alpha-mediated adiposity-lowering and hypocholesterolemic actions of the selective estrogen receptor modulator acobifene. *Int J Obes* 29:1236–1244
- Mandard S, Muller M, Kersten S (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci* 61:393–416
- Minnich A, Tian N, Byan L, Bilder G (2001) A potent PPAR α agonist stimulates mitochondrial fatty acid β -oxidation in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:270–279
- National Research Council (1996) Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, DC, 140 p
- Oikari S, Ahtialansaari T, Heinonen MV, Mauriala T, Auriola S, Kiehne K, Folsch UR, Janne J, Alhonen L, Herzig KH (2008) Downregulation of PPARs and SREBP by acyl-CoA-binding protein overexpression in transgenic rats. *Pflugers Arch* 456:369–377
- Paquette A, Wang D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM (2008) Effects of ovariectomy on PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. *Menopause* 15:1169–1175
- Paquette A, Chapados NA, Bergeron R, Lavoie J (2009) Fatty acid oxidation is decreased in the liver of ovariectomized rats. *Horm Metab Res* 41:511–515
- Pettinelli P, Pozo TD, Araya J, Rodrigo R, Araya AV, Smok G, Csendes A, Gutierrez L, Rojas J, Korn O, Maluenda F, Diaz JC, Rencoret G, Braghetto I, Castilho J, Poniachik J, Videla LA (2009) Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR- α ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochim Biophys Acta* 1792:1080–1086
- Pighon A, Paquette A, Barsalani R, Chapados NA, Rabasa-Lhoret R, Yasari S, Prud'Homme D, Lavoie JM (2009) Resistance training attenuates fat mass regain after weight loss in ovariectomized rats. *Maturitas* 64:52–57
- Pighon A, Barsalani R, Yasari S, Prud'homme D, Lavoie JM (2010) Does exercise training prior to ovariectomy protect against liver and adipocyte fat accumulation in rats? *Climacteric* 13:238–248
- Pighon A, Gutkowska J, Jankowski M, Rabasa-Lhoret R, Lavoie JM (2011) Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver. *Metabolism* 60(5):629–639
- Sampath H, Ntambi JM (2006) Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha: independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9:84–88
- Shimano H (2001) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res* 40:439–452
- Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM (2002) Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:335–343
- Volzke H, Schwarz S, Baumeister SE, Wallaschofski H, Schwahn C, Grabe HJ, Kohlmann T, John U, Doren M (2007) Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population. *Gut* 56:594–595
- Yasari S, Prud'homme D, Wang D, Jankowski M, Levy E, Gutkowska J, Lavoie JM (2010) Exercise training decreases hepatic SCD-1 gene expression and protein content in rats. *Mol Cell Biochem* 335:291–299
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167–1674