

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

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO NO FÍGADO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

São Carlos

2011

MARIA FERNANDA CURY RODRIGUES

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO 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 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**

R696et

Rodrigues, Maria Fernanda Cury.

Efeitos do treinamento resistido sobre o estresse oxidativo no fígado de ratas ovariectomizadas / Maria Fernanda Cury Rodrigues. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

75 f.

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

1. Fisiologia. 2. Ovariectomia. 3. Treinamento resistido. 4. Estresse oxidativo. 5. Esteatose hepática. 6. Antioxidantes.
I. Título.

CDD: 612 (20^a)

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

Folha de Aprovação

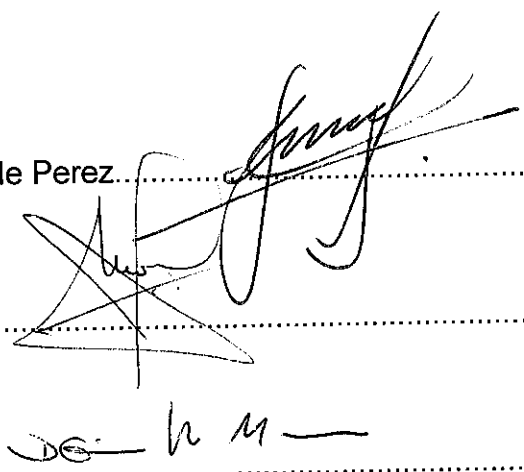
Dissertação de Mestrado de Maria Fernanda Cury Rodrigues

Dia 16/09/2011

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

Prof. Dr. Gilberto Moraes.....

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

The image shows three handwritten signatures in black ink. The top signature is for Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez, the middle one is for Prof. Dr. Gilberto Moraes, and the bottom one is for Prof. Dr. Denise Vaz de Macedo. Each signature is written over a horizontal dotted line.

Dedico esta dissertação a todas as pessoas que contribuíram ou participaram direta ou indiretamente desta etapa da minha vida tão importante e enriquecedora. Em especial à minha família e amigos que fizeram com que tudo valesse a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Sérgio Eduardo de Andrade Perez, pela amizade, orientação e apoios constantes, determinantes para a consolidação deste trabalho.

Ao Professor Vilmar Baldissera por ter compartilhado todo o seu conhecimento que foi fundamental para minha maturidade e formação profissional.

À Professora Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, que sempre me estendeu a mão e proporcionou a oportunidade de trabalhar em um excelente laboratório sob a sua orientação.

Aos Professores Alceu Jordão e Rafael Deminice que me abriram as portas do Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. Agradeço pela amizade, apoio e paciência. A experiência e orientação de ambos com certeza foi fundamental para a realização deste trabalho.

À técnica do Laboratório da USP Paula Payão que colaborou para a realização das análises.

Aos meus companheiros de projeto e amigos Mateus Moraes Domingos, Uliana Sbeguen Stotzer, Danilo Bertucci, Markus Campos, Camila do Valle, Yone Sato, Renata Cury, Juliano Prado e Nuno Souza que muito contribuíram para a concretização deste trabalho.

Aos amigos Luciane Magri, Guilherme Borges Pereira, Júlio César, Josiane Duarte, Monike Garlipp, Grace Dourado, Vivian Arakelian, Anderson Lino que me fizeram companhia nas constantes viagens a Ribeirão Preto.

Às amigas Carmen Lúcia Pontes e Patrícia Bueno que sempre com muita disposição e competência me ajudaram a elucidar questões importantes.

Ao amigo Juca, pela orientação, amizade e apoio.

Ao técnico do laboratório conhecido por Cacau que sempre com muita segurança e experiência ajudou em todos os procedimentos do projeto.

À amiga e secretária do Laboratório da UFSCar Márcia Vidotti que colaborou na resolução de problemas emergenciais sempre com muita competência.

A todos os meus amigos do Laboratório de Fisiologia do Exercício da UFSCar, pessoas especiais que com uma conversa, uma brincadeira ou um conselho me ajudaram a percorrer esta fase de minha vida com leveza e alegria.

À minha querida mãe Loren Cury Rodrigues que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me dando forças.

Às minhas irmãs pela compreensão e amizade.

À Tia Vinha, uma pessoa muito especial e contagiante que sempre alegrou meus dias e às vezes noites de estudo.

Ao sábio Professor Zuin, que me abriu portas as quais me levaram a trilhar a carreira acadêmica que tanto me alegra e satisfaz.

Ao meu pai Dário Renato Rodrigues, um exemplo de força e coragem que tanto me ensinou a lutar sempre com perseverança pelos meus objetivos.

Obrigada!!!

“Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo. Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo. Não viva de fotografias amareladas... Continue, quando todos esperam que desistas. Não deixe que enferruje o ferro que existe em você. Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você. Quando não conseguir correr através dos anos, trote. Quando não conseguir trotar, caminhe. Quando não conseguir caminhar, use uma bengala. Mas nunca se detenha.”

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

A deficiência de estrogênio está associada ao aumento do estresse oxidativo (EO), que por sua vez, está envolvido na fisiopatologia de doenças como a esteatose hepática (EH). O treinamento resistido (TR) pode diminuir o dano oxidativo ao promover uma regulação ascendente no sistema de defesa antioxidante. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do TR em marcadores do EO no fígado de ratas ovariectomizadas (Ovx). Ratas Sprague-Dawley adultas foram divididas em 4 grupos (n = 8 por grupo): sham operado sedentário (Sham-Sed), Ovx sedentário (Ovx-Sed), Sham-Tr e Ovx-Tr. Durante o período de 10 semanas, os animais escalaram uma escada vertical de 1,1 m com pesos atados em suas caudas. As sessões foram realizadas três vezes na semana, com 4-9 escaladas por sessão de treino. O EO foi avaliado por meio dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atividade enzimática da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), peroxidação lipídica (PL), concentração de vitamina E e expressão gênica da glutathiona peroxidase (GSH-Px). A deficiência de estrogênio associada à Ovx diminuiu a relação (GSH/GSSG) (28%), concentração de vitamina E (44,7%), expressão gênica da GSH-Px (49%). Por sua vez, o TR induziu mudanças negativas no balanço antioxidativo/oxidativo hepático como evidenciado pelo aumento dos níveis de TBARS (30%), bem como diminuição da razão GSH/GSSG (19%) e concentração de vitamina E (35%). Estes dados indicaram que o treinamento resistido adotado não reverteu o dano oxidativo hepático causado pela OVx, e além disso, aumentou o estresse oxidativo hepático.

Palavras-chave: Ovariectomia. Treinamento resistido. Estresse oxidativo. Esteatose hepática.

ABSTRACT

Estrogen deficiency is associated with increased oxidative stress (OS), which in turn is involved in the physiopathology of diseases such as fatty liver disease (NAFLD). Resistance training (RT) may reduce the oxidative damage by promoting an up-regulation in the antioxidant defence system. Therefore, this study aimed to assess the effects of RT on OS markers in the liver of ovariectomized rats (Ovx). Adult Sprague-Dawley rats were divided into four groups (n = 8 per group): sham-operated sedentary (Sham-Sed), ovariectomized sedentary (Sed-Ovx), sham-operated resistance training (Sham-Rt) and ovariectomized resistance training (Ovx-Rt). During a 10-week RT period, the animals climbed a 1.1 m vertical ladder with weights attached to their tails; the sessions were performed three times a week, with 4-9 climbs and 8-12 dynamic movements per climb. The OS was measured by levels of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), the enzymatic activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), the lipid peroxidation (LP), the concentration of vitamin E and gene expression of glutathione peroxidase (GSH-Px). The estrogen deficiency associated with Ovx decreased in the GSH/GSSG ratio (28%), vitamin E concentration (45%), and gene expression of GSH-Px (49%). Moreover, the training induced negative changes in the hepatic anti-oxidative/oxidative balance, as evidenced by the increased TBARS levels (30%), as well as decreased GSH/GSSG ratio (19%) and vitamin E concentration (35%). These data indicate that the RT program adopted did not reverse the hepatic oxidative damage caused by Ovx; indeed, it increased hepatic OS.

Keywords: Estrogen. Resistance exercise. Oxidative damage. Hepatic steatosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - O estrogênio protege contra o dano oxidativo causado por EROS por meio da regulação de genes antioxidantes	21
Figura 02 - As quatro classes de marcadores do estresse oxidativo em tecidos	24
Figura 03 - Respostas celulares a EROS.....	28
Figura 04 - Sistema de defesa antioxidante	32
Figura 05 - Esquema de distribuição das ratas e desenho experimental	38
Figura 06 - Escada para treinamento resistido.....	40
Figura 07 - Determinação da carga máxima de carregamento	41
Figura 08 - Organização da carga de carregamento por sessão de treino	42
Figura 09 - Desenho experimental do estudo desde a chegada dos animais ao biotério do laboratório até o momento do sacrifício.....	43
Figura 10 - 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	48
Figura 11 - Exemplo de curva de MELT original representativa dos ciclos do PCR-RT. A) GSH-Px.....	50
Figura 12 - Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT. A) GSH-Px.....	51
Figura 13 - Carga máxima (g) dos grupos Sham-Tr e Ovx-Tr nas semanas 1, 5 e 10	54
Figura 14 - Medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ..	55
Figura 15 - Concentração de glutathiona reduzida (GSH)	56
Figura 16 - Concentração de dissulfeto de glutathiona (GSSG)	57
Figura 17 - Relação GSH/GSSG.....	58
Figura 18 - Concentração hepática de vitamina E.....	59

Figura 19 - Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	60
Figura 20 - Medida da atividade enzimática da catalase (CAT).....	60
Figura 21 - Expressão gênica da GSH-Px	61

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Oligonucleotídeos primers usados para PCR-RT	50
Tabela 2 - Efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre parâmetros métricos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

8 OH-dG: 8-hidroxi-2' deoxiguanosina

CAT: Catalase

CuZn-SOD: Superóxido Dismutase dependente de cobre-zinco

EH: Esteatose Hepática não Alcoólica

EHNA: Esteato - hepatite não alcoólica

EO: Estresse Oxidativo

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio

FCH: Fator de Crescimento do Hepatócito

FOX: Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos pelo método férrico - *xilenol orange*

GSH: Glutathiona Reduzida

GSH-Px: Glutathiona Peroxidase

GSH-Rd: Glutathiona Redutase

GSSG: Dissulfeto de Glutathiona

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

ROO•: Radical Peroxil

PL: Lipoperoxidação

MDA: Malondialdeído

MnSOD: Superóxido Dismutase dependente de Manganês

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida

OVX: Ovariectomizadas

PC: Proteínas Carboniladas

PL: Peroxidação Lipídica

PUFFA: Ácido Graxos Poliinsaturados

RL: Radical Livre

RM: Uma Repetição Máxima

RNA_m: Ácido ribonucléico mensageiro

ROOH: Hidroperóxido Orgânicos

SOD: Superóxido Dismutase

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TR: Treinamento resistido

TRH: Terapia de Reposição Hormonal

Vit E: Vitamina E

VitC: Vitamina C

XDH: Xantina desidrogenase

XO: Xantina oxidase

SUMÁRIO

1 Introdução	19
1.1 Estrogênio como antioxidante	19
1.2 O papel do estrogênio no fígado e a relação com o EO.....	21
1.3 Estresse oxidativo	23
1.4 Espécies reativas de oxigênio (EROs)	25
1.5 Efeitos biológicos das EROs	26
1.5.1 Efeitos positivos	26
1.5.2 Efeitos negativos	27
1.6 Sistema de defesa antioxidante	28
1.6.1 Antioxidantes enzimáticos	29
1.6.2 Antioxidantes não enzimáticos	30
1.7 Treinamento resistido, ovariectomia e estresse oxidativo no fígado	32
2 Objetivo	35
2.1 Objetivos	35
3 Materiais e Métodos	37
3.1 Animais e condições experimentais	37
3.2 Grupos experimentais	37
3.3 Ovariectomia e operação sham.....	38
3.4 Treinamento resistido.....	39
3.5 Controle da ingestão alimentar e da massa corporal	42
3.6 Resumo do desenho experimental.....	43
3.7 Eutanásia e preparo das amostras do tecido hepático.....	43
3.8 Atividade enzimática da catalase (CAT).....	43

3.8.1 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)	44
3.9 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS).....	44
4 Determinação dos níveis de glutathione	45
4.1 Concentração de vitamina E hepática	45
4.2 Proteínas totais.....	46
4.3 Quantificação da expressão gênica da GSH-Px.....	46
4.3.1 Procedimentos gerais	46
4.3.2 Extração do RNA total	46
4.3.3 Quantificação do RNA total.....	47
4.3.4 Determinação da integridade do RNA	48
4.3.5 Transcrição reversa	48
4.3.6 Reação em cadeia da polimerase – tempo real (PCR-RT).....	49
4.4 Análise estatística	51
5 Resultados.....	53
6 Discussão	63
Referências.....	69

1 Introdução

1.1 Estrogênio como antioxidante

A ovariectomia (Ovx) em ratas (modelo utilizado para mimetizar a menopausa em mulheres) está associada a um declínio natural do estrogênio que promove alterações metabólicas importantes como redistribuição de gordura subcutânea para a área visceral, aumento do risco de doença cardiovascular, diminuição da densidade mineral óssea, massa muscular e força, ocasionando uma diminuição na qualidade de vida (BROWN, 2008; KRAMER, P.; KRAMER, S.; GUAN, 2004; MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; TURGEON, 2006). Com o início da menopausa é também esperado um aumento do estresse oxidativo (EO) caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes (SIGNORELLI et al., 2006).

Neste contexto, estudos mostram os níveis dos marcadores de EO mais elevados e a capacidade antioxidante diminuída, em mulheres na menopausa que não fazem uso de terapia de reposição hormonal (TRH) quando comparadas a mulheres na pré-menopausa (BAEZA et al., 2010; SIGNORELLI et al., 2006). Uma das explicações para este aumento do EO nestas mulheres está relacionada com o ganho de massa corporal e aumento da inflamação (WING et al., 1991). Outra hipótese direciona-se para o papel que o estrogênio desempenha contra o EO, por atuar como antioxidante que depende não só da sua natureza hidrofílica e lipofílica, mas da sua estrutura hidrofenólica, que pode doar átomos de hidrogênio para uma molécula instável, como o radical peroxil (LOOH), tornando-o um radical menos lesivo, terminando assim com a reação em cadeia da lipoperoxidação (LPO). Assim, o estrogênio age como neutralizador de radical livre (RL). Este papel é uma atividade antioxidante *per se*, ou seja, do próprio hormônio (SIGNORELLI et al., 2006; VIÑA et al., 2003).

Topcuoglu et al. (2009) demonstraram um extenso dano protéico oxidativo em um modelo de deficiência de estrogênio. Entretanto, a suplementação de uma combinação de várias combinações de estrogênio-progestina aliviou parcialmente estas anormalidades e restaurou a homeostase redox de proteínas após a Ovx,

sugerindo que o estrogênio desempenha um importante papel no sistema de defesa antioxidante no plasma, fígado e cérebro. Massafra et al. (1997) verificaram que os aumentos dos picos de estrogênios ao longo do ciclo menstrual, aumentaram a atividade da GSH-Px eritrocitária, o que não ocorre no período em que há baixa concentração do hormônio

O estrogênio, além de agir como antioxidante direto, pode também ativar receptores, modular neurotransmissores e aumentar a síntese de mediadores vasoativos derivados do endotélio. Borrás et al. (2005) testaram o efeito do estradiol e do *tamoxifen*, um antagonista do receptor de estrogênio nos níveis de H_2O_2 , em uma linhagem de células tumorais mamárias (MCF-7) e observaram que o estradiol causa uma diminuição significativa nos níveis de H_2O_2 , enquanto o *tamoxifen* bloqueia este efeito. Além disso, estes efeitos benéficos do estrogênio parecem estar relacionados ao aumento da expressão de enzimas antioxidantes (Viña et al., 2003) como a superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) e glutatona peroxidase (GSH-Px) (Figura 1). Isto se dá por meio da interação do hormônio com o receptor de membrana, ativação da *quinase ativada por mitógeno* (MAP quinase) e ativação do NF-kappa β (BORRÁS et al., 2005; GOMEZ-CABRERA; DOMENECH; VINA, 2008).

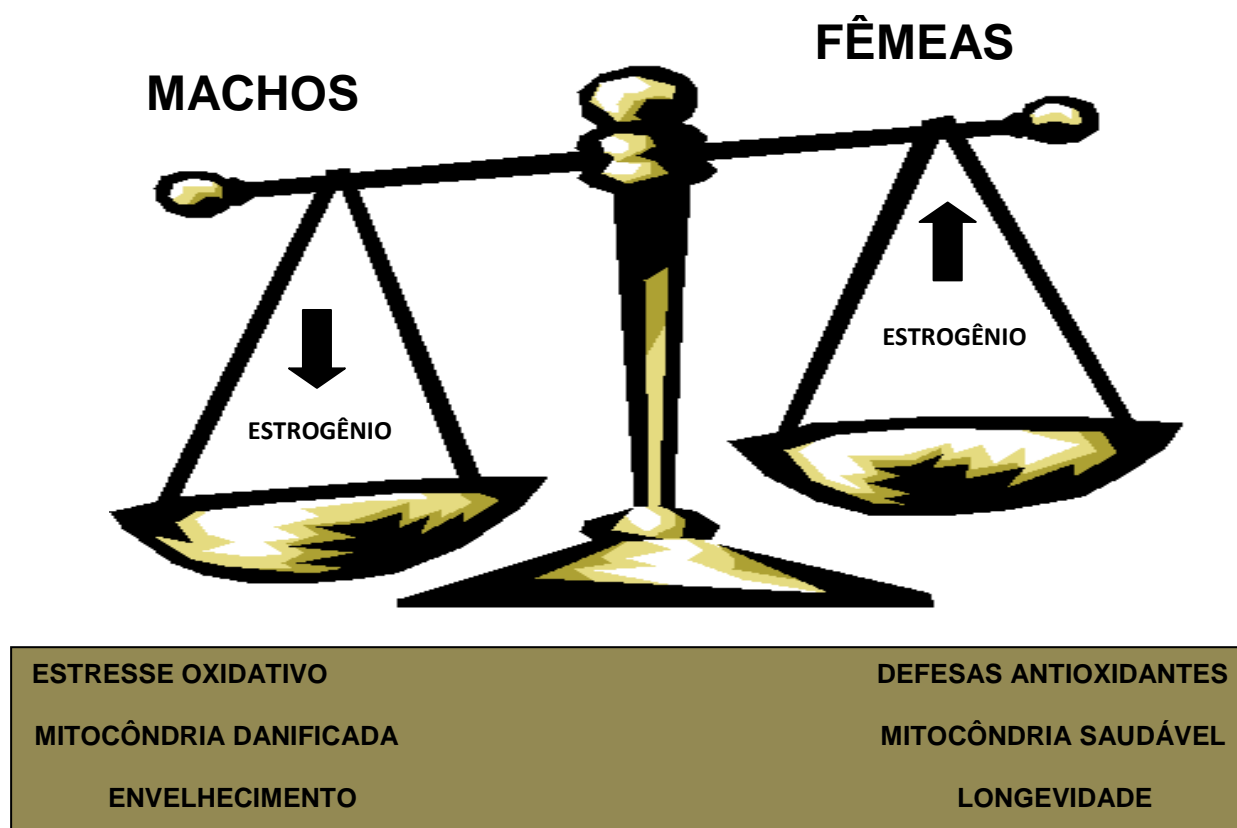


Figura 01 - O estrogênio protege contra o dano oxidativo causado por EROS por meio da regulação de genes antioxidantes

Fonte: Adaptado de Viña et al. (2003)

1.2 O papel do estrogênio no fígado e a relação com o EO

O fígado é um grande grupamento celular quimicamente ativo que realiza uma miríade de funções metabólicas, dentre elas a detoxificação e excreção na bile de diversas drogas e hormônios (ALISON, 2004). Possui uma taxa mitótica alta que confere a este tecido uma extraordinária capacidade de se restaurar após uma significativa perda de tecido hepático. O controle dessa rápida regeneração é atribuído em parte ao *fator de crescimento dos hepatócitos (FCH)* que parece estar envolvido na divisão e crescimento das células hepáticas (BLACK, 2004).

Já está bem estabelecido que a diminuição dos hormônios ovarianos, em particular do estrogênio, promove inúmeras alterações metabólicas importantes no fígado, tais como acúmulo de gordura, diminuição da oxidação de ácidos graxos, aumento do LDL-c e diminuição do colesterol total e HDL (DOMINGOS et al., 2012., LEITE et al., 2009; WALSH et al., 1991).

Yasuda et al. (1999) , em um modelo de EH, verificaram uma resposta fibrótica mais pronunciada no fígado de machos do que de fêmeas e o tratamento

com estradiol resultou na supressão da fibrose hepática de maneira dose-dependente pela diminuição do conteúdo de colágeno e ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) de pró-colágeno tipo I e III, indicando um papel benéfico do estradiol no fígado. Corroborando com estes achados, Nguyen et al. (2001) demonstraram uma possível participação do estrogênio na fisiopatologia da EHNA, pela constatação de que mulheres portadoras de câncer de mama que receberam tratamento com *tamoxifen*, tiveram aumento na prevalência de acúmulo de gordura intra abdominal, da EH e EHNA.

Estudos recentes, baseados em populações, têm demonstrado aumento na prevalência de doenças hepáticas tais como a esteatose hepática não alcoólica (EH) em homens e também em mulheres pós-menopáusicas (GUTIERREZ-GROBE et al., 2010). A EH é uma condição crônica caracterizada por acúmulo de gordura no parênquima hepático, acometendo indivíduos que não possuem histórico de ingestão excessiva de álcool. O espectro desta doença varia de esteatose simples para esteato - hepatite não alcoólica (EHNA), fibrose, cirrose e eventualmente carcinoma hepático (GUTIERREZ-GROBE et al., 2010; KOEK; LIEDORP; BAST, 2011).

No fígado estão presentes proteínas e enzimas com grande capacidade antioxidante, e tem sido proposto que o EO induzido pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) está relacionado com a fisiopatologia da EH e EHNA (ALBANO et al., 2005; GUTIERREZ-GROBE et al., 2010; KOEK; LIEDORP; BAST, 2011) (Figura 2).

As consequências do EO são peroxidação lipídica (PL) nas membranas celulares, proteínas e DNA dos hepatócitos, ativação das células estelares levando à fibrose, inflamação crônica e apoptose (KOEK; LIEDORP; BAST, 2011), ao mesmo tempo em que a capacidade antioxidante total enzimática e não enzimática não é capaz de mitigar estes efeitos (KOEK; LIEDORP; BAST, 2011; OMOYA et al., 2001). O estrogênio é um potente antioxidante endógeno envolvido na diminuição da PL e da fibrose hepática em modelos animais e possivelmente esse é um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da prevalência de EH em mulheres pós-menopáusicas (OMOYA et al., 2001).

1.3 Estresse oxidativo

O termo estresse oxidativo foi definido pela primeira vez em 1985, como sendo um distúrbio no balanço pró – oxidante – antioxidante a favor do primeiro (SIES; CADENAS, 1985). Embora esta definição tenha sido amplamente utilizada durante duas décadas, a definição de EO pode futuramente sofrer modificações, devido à complexidade do estado redox. Além disso, argumenta-se nos últimos anos a importância de verificar os detalhes moleculares que estão envolvidos nesta condição (JONES, 2006).

Em geral, marcadores confiáveis do EO devem obedecer a algumas características como serem quimicamente detectáveis, terem uma meia vida relativamente longa, não terem interferências de outros processos celulares como (ciclo celular e metabolismo energético) e por fim serem passíveis de sofrerem modificações, aumentos e diminuições durante períodos de EO (HALLIWEL, 1994; JONES, 2006) (Figura 3). Sendo assim, o EO nos sistemas biológicos pode ser identificado por meio de quatro categorias de marcadores principais que possuem as qualidades necessárias para que ocorra a detecção desta condição.

A primeira categoria de biomarcadores envolve a detecção de oxidantes. O método possui limitações pelo fato dos radicais possuírem uma meia vida muito curta e serem altamente reativos. Para tanto, geralmente são utilizadas sondas fluorescentes ou armadilhas de *spins* que mensuram a produção oxidante da célula. Entretanto, um aumento na produção oxidante não necessariamente define a condição pró-oxidante do sistema em questão (HALLIWEL, 1994).

A segunda categoria de biomarcadores envolve a verificação nos níveis de antioxidantes. Em teoria a diminuição de alguns antioxidantes como (glutathione, ácido ascórbico, alfa-tocoferol) significa que o sistema biológico em questão sofreu ataque oxidativo. Apesar da verificação dos níveis de antioxidantes nos tecidos serem extremamente utilizada o método possui limitações já que outros fatores podem influenciar estas medições como dieta e alterações do metabolismo celular (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; HALLIWEL, 1994).

A terceira categoria de biomarcadores do EO envolve a verificação de moléculas oxidadas que são formadas pelo ataque de EROs a lipídios, proteínas e

DNA (HALLIWELL, 1994; HWANG; KIM, 2007). A mensuração de proteínas carboniladas (PC) geralmente é utilizada para verificar oxidação protéica; isoprostanos, malondialdeído (MDA) são sinais de PL e os níveis de bases oxidadas, 8-hidroxi- 2'- deoxiguanosina (8 OH-dG) avaliam a oxidação no DNA (HWANG; KIM, 2007).

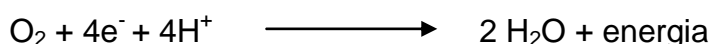
E por fim, a quarta categoria de biomarcadores inclui a mensuração do balanço redox celular. Para tanto, o marcador mais comumente utilizado é a razão GSH/GSSG que indica se houve uma produção oxidante exacerbada por meio dos níveis diminuídos de GSH e os níveis aumentados de GSSG (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; HALLIWELL, 1994). No entanto, a auto-oxidação do tecido devido à manipulação inadequada durante a remoção do mesmo pode afetar os resultados.



Figura 02 - As quatro classes de marcadores do estresse oxidativo em tecidos
Fonte: Adaptado de Powers e Jackson (2008)

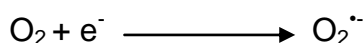
1.4 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Na CTE, o oxigênio molecular deve sofrer uma redução tetraeletrônica estável catalisada pela enzima citocromo oxidase que condiciona a reação a ocorrer em uma única etapa e sem a formação de intermediários instáveis, em cerca de 95% do oxigênio molecular, sendo reduzido a água no Complexo IV ou citocromo aa3.

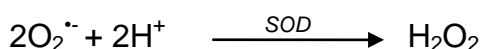


Contudo, o O_2 possui uma tendência a sofrer redução monoeletrônica, recebendo um elétron por vez. Por isso, cerca de 5% do O_2 é reduzido no andamento do metabolismo celular formando espécies reativas de oxigênio (EROs) (TURRENS et al, 2003; YU, 1994). São assim chamadas por possuírem elétrons de valência desemparelhados, o que confere a estas moléculas elevada instabilidade e alta reatividade, possuindo um tempo de vida fugaz na ordem de milésimos de segundos. Apesar da breve existência possuem um tempo de vida livre, reagindo com a matéria circundante na busca de estabilidade (YU, 1994).

O primeiro radical livre que se forma durante a conversão univalente do oxigênio é o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (HALLIWELL, 1994).

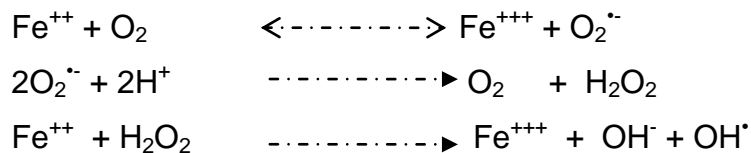


O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio, forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio de um processo direto que ocorre com a participação de oxidases ou por meio de um processo indireto chamado de dismutação que é catalisado pelas duas isoformas da enzima superóxido dismutase: cobre -zinco (CuZn-SOD) que se encontra no citosol e manganês (Mn-SOD) que se situa na mitocôndria da célula (HALLIWELL, 1994; TURRENS, 2003).

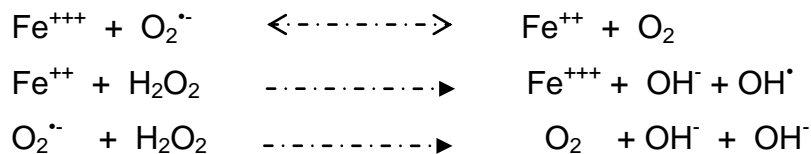


O H_2O_2 é considerado um agente oxidante fraco. Em leucócitos e mieloperoxidases ocorre a sua transformação em ácido hipocloroso (HOCL), forte oxidante fisiológico e poderoso agente antimicrobiano (HALLIWELL, 1994).

Todavia, na presença de metais de transição como o ferro e o cobre pode sofrer quebra na ligação O-O, formando o radical hidroxil (OH^\bullet), um dos mais potentes oxidantes porque tem a capacidade de atravessar a membrana e reagir com biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA causando efeitos prejudiciais aos sistemas biológicos (SJODIN et al., 1990; TURRENS, 2003). Esta reação que envolve a formação do (OH^\bullet), a partir do H_2O_2 é chamada de reação de Fenton, descoberta no ano de 1834 (Reação 1).



O OH^\bullet também pode ser formado a partir da reação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ com o H_2O_2 na presença de íons ferro ou cobre, via reação de Haber e Weiss (Reação 2).



1.5 Efeitos biológicos das EROs

1.5.1 Efeitos positivos

A Figura. 03 mostra o envolvimento das EROS no crescimento e metabolismo normais, seja atuando como mediadores de mecanismos protetores essenciais, como a apoptose que elimina células cancerígenas, bem como outras células prejudiciais ao nosso organismo (SALGANIK, 2001), seja desempenhando um papel essencial na contração muscular. Um modesto aumento de EROs nas fibras musculares esqueléticas resulta em aumento na produção de força que é revertida

com uma dose maior de EROs (POWERS; JACKSON, 2008; SALGANIK, 2001). Ademais, as EROs estão envolvidas no fenômeno da imunidade, em particular pela ação contra antígenos durante a fagocitose (SALGANIK, 2001).

1.5.2 Efeitos negativos

As EROs possuem a capacidade de oxidar os ácidos graxos poliinsaturados (PUFFA), fosfolipídios e colesterol que compõem a membrana celular levando a uma alteração das propriedades funcionais e estruturais tais como a permeabilidade seletiva. Esta incapacidade de manter o equilíbrio hidroeletrolítico da célula acarreta alterações na estrutura e permeabilidade na membrana celular com consequente perda da seletividade das trocas iônicas bem como, liberação do conteúdo de organelas, podendo levar a apoptose da mesma (HWANG; KIM, 2007).

A PL é uma reação em cadeia, possuindo três etapas bem definidas: iniciação, propagação e término.

Vale ressaltar que a PL é avaliada pela formação de subprodutos de baixo peso molecular como o MDA que podem reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), resultando na formação de complexos coloridos que podem ser medidos por meio de espectrofotometria (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; HWANG; KIM, 2007).

As EROs podem oxidar proteínas que podem perder aminoácidos ou serem fragmentadas, com consequente perda da sua funcionalidade. A oxidação de proteínas e aminoácidos é acompanhada pelo aumento dos níveis relativos de grupamento carbonila, o qual é geralmente utilizado como índice para a ocorrência de dano oxidativo (STADTMAN; LEVINE, 2000). Além disso, a maioria das proteínas possui sítios de ligação com metais que por sua vez, é susceptível a reações de óxido - redução, resultando na degradação, fragmentação ou mesmo alteração da função protéica (VALKO et al., 2006).

As EROs também têm a capacidade de alterar o sistema lisossomal e proteossoma, as mais importantes vias envolvidas na degradação de proteínas (STADTMAN; LEVINE, 2000).

O ataque oxidativo ao DNA é atribuído a alguns mecanismos como a ação de radiação ionizante, fumo, inflamação crônica, ou mesmo alguns tipos de exercícios.

Estes ataques consistem em modificações nas bases purínicas e pirimídicas, danos aos mecanismos de reparo, bem como quebras da cadeia do DNA, e como consequência pode ocorrer mutagênese contribuindo para o câncer e envelhecimento celular (SALGANIK, 2001; WALLACE, 2002) (figura 4).

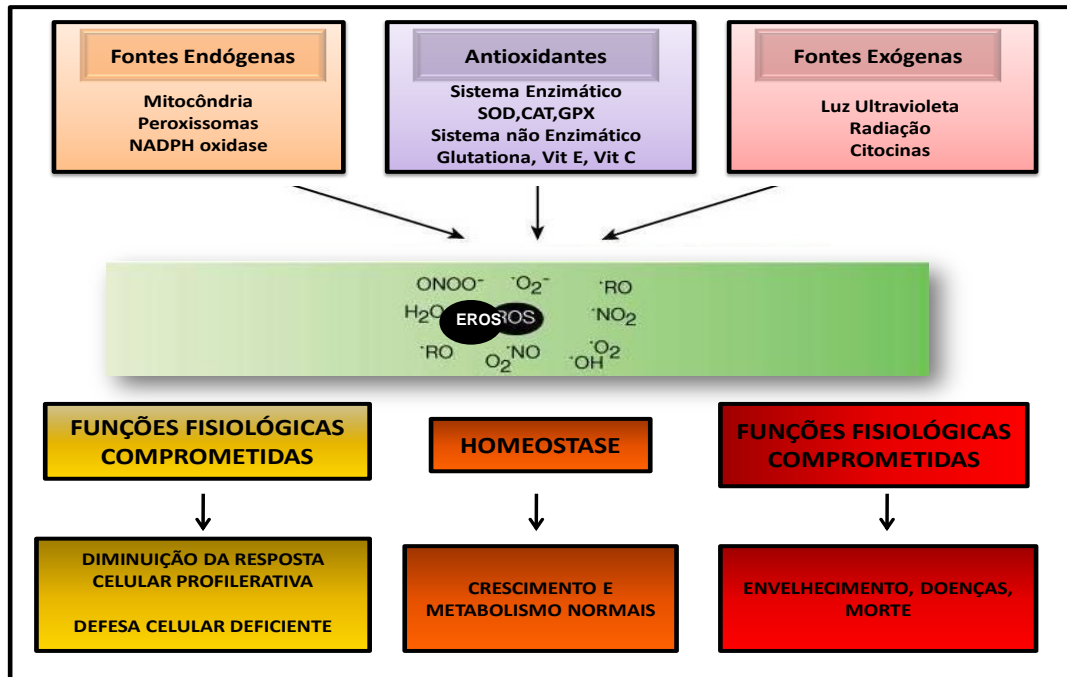


Figura 03 - Respostas celulares a EROS
Fonte: Adaptado de Finkel e Holbrook (2000)

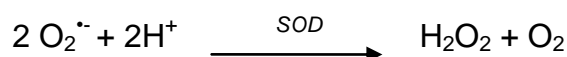
1.6 Sistema de defesa antioxidante

A proteção contra os efeitos deletérios das EROs é dada por meio de um sistema de defesa antioxidante que atua na neutralização direta ou indireta destas espécies, inibindo seus possíveis efeitos deletérios, prevenindo as reações em cadeia da PL (YU, 1994). Isso ocorre por intermédio de alguns mecanismos de ação que permitem denominar os antioxidantes de “*scavenger*” que atuam na transformação das EROs, a fim de diminuir sua reatividade como os tocoferóis e enzimas antioxidantes e de “*quencher*”, quando ocorre neutralização completa destas espécies como o ácido ascórbico. Estes antioxidantes podem advir da alimentação ou suplementação, classificando-se em enzimáticos, como o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GSH-Px) (Figura 5), e não enzimáticos, como a vitamina E (tocoferol), vitamina A (retinol), vitamina C (ácido

ascórbico), flavonóides, tióis incluindo a glutathiona (GSH), (ubiquinona Q₁₀), ácido úrico, bilirrubina, ferritina e micronutrientes que atuam como co-fatores enzimáticos (ferro, cobre, selênio, zinco, manganês). A eficiência desse sistema depende de uma correta ingestão de vitaminas e micronutrientes e da produção de antioxidantes endógenos, que pode ser alterada pelo exercício físico, treinamento, alimentação e envelhecimento (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; HALLIWELL, 1994).

1.6.1 Antioxidantes enzimáticos

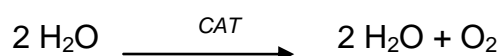
A enzima superóxido dismutase (SOD) foi descoberta em 1969 pelos pesquisadores McCord e Fridovich e é a primeira linha de defesa contra o EO. Esta enzima catalisa a dismutação de (O₂^{•-}) e a formação de H₂O₂ (MCCORD; FRIDOVICH, 1969).



Em mamíferos, existem três tipos de isoformas da SOD (SOD1, SOD2 e SOD3). Duas das isoformas da SOD são encontradas dentro das células, sendo a terceira isoforma encontrada no espaço extracelular.

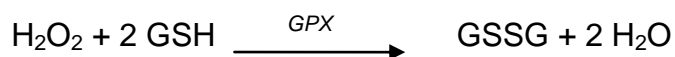
A SOD1 requer como cofator cobre-zinco e é principalmente localizada no citosol e no espaço intermembrana mitocondrial. A SOD2 utiliza manganês como cofator e está localizada na matriz mitocondrial. Finalmente a SOD3 requer cobre-zinco como cofator e está localizada no espaço extracelular (MCCORD; FRIDOVICH, 1969).

A CAT é uma hemoproteína presente em todas as células, principalmente nos peroxissomos, estruturas celulares que utilizam o oxigênio a fim de detoxificar substâncias e produzir H₂O₂. Esta enzima converte H₂O₂ em água e oxigênio (YU, 1999).



Ademais, o ferro é um importante cofator que ativa o sítio da enzima e embora a CAT e a GSH-Px compartilhem o mesmo substrato, a CAT tem uma afinidade muito menor pelo H_2O_2 em baixas concentrações quando comparada a GSH-Px (YU, 1994).

A GSH-Px está presente no citosol e na mitocôndria das células. Já foram identificados em mamíferos cinco tipos de isoformas da GSH-Px (GSH-Px1-GSH-Px5) e todas catalisam a redução de H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos (ROOH) a água (H_2O) e álcool (ROH), usando a glutathiona reduzida (GSH) ou em alguns casos a tioredoxina ou glutaredoxina como doadoras de elétrons. Quando a glutathiona é doadora de elétrons, a GSH é convertida em dissulfeto de glutathiona (GSSG) (FLOHÉ; GUNZLER, 1984).



Vale ressaltar que a recuperação da GSH é realizada pela glutathiona redutase (GSH-Rd), uma flavoproteína dependente da nicotinamida - adenina - dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH). A maioria dos tecidos produz NADPH pela glicose -6 - fosfato desidrogenase através da via das pentoses. A diminuição de NADPH em situações como o jejum pode acarretar prejuízos na função da GSH-Rd (FLOHÉ; GUNZLER, 1984).

1.6.2 Antioxidantes não enzimáticos

Um dos mais importantes antioxidantes não enzimáticos é a glutathiona, o tiol não protéico mais abundante nas células. Este antioxidante é primariamente sintetizado no fígado e transportado para os tecidos via circulação (WU et al., 2004). Tecidos com grande exposição a agentes oxidantes como o fígado, por exemplo, contêm grande quantidade de GSH. Em relação ao músculo esquelético a concentração de GSH varia de acordo com o tipo de fibra. Em fibras musculares de ratos, foi encontrada uma concentração em torno de 400% maior de GSH em fibras do tipo I do que em fibras IIb (POWERS; JACKSON, 2008). A glutathiona possui várias funções nas células, dentre elas, a de reagir diretamente com diversos

radicais, pela doação de um átomo de hidrogênio, ou seja, possui uma alta capacidade redutora e atua como substrato para GSH-Px, ao eliminar H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (WU et al., 2004). Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. Na presença do EO, observa-se uma diminuição da razão GSH/GSSG, bem como da quantidade de tióis totais (BAEZA et al., 2010; WU et al., 2004).

A GSH ainda está envolvida também na manutenção da concentração de outros antioxidantes como vitamina E e C, ajudando a manter os recursos limitados destas vitaminas no estado reduzido (WU et al., 2004).

A vitamina E (Vit E) é uma molécula lipossolúvel e tende a se concentrar no interior das membranas, agindo sinergicamente com o ascorbato. O α -tocoferol e outras formas de vitamina E agem como *chain-breaking*, porque são muito abundantes nas células e membranas mitocondriais e tem a capacidade de agir diretamente contra as EROs. A ação antioxidante da Vit E consiste em fornecer átomos de hidrogênio para as membranas celulares, impedindo a reação em cadeia que se propaga nas membranas lipídicas (CAY; NAZIROGLU; KOYLU 2009; WU et al., 2004).

Por sua vez, a vitamina C (Vit C) é provavelmente a mais importante vitamina hidrossolúvel nos fluidos extracelulares e também no citosol, também denominada de ácido ascórbico ou ácido desidroascórbico (DHAA). A Vit C nos fluidos, tem a capacidade de neutralizar as EROs como o OH^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$, LOOH, radical alcóxil ($[RO^{\bullet}]$) e, de uma forma indireta a Vit C regenera a forma ativa da Vit E e de outros antioxidantes como a glutatona, bem como, intercepta íons cobre que possuem uma ação oxidante poderosa (HALLIWELL, 1994).

Além desses antioxidantes, outros compostos desempenham um papel vital na proteção contra agentes oxidantes. São eles, os flavonóides, β -caroteno (precursor da vitamina A), Coenzima Q e ácido úrico entre outros (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; HALLIWELL, 1994).

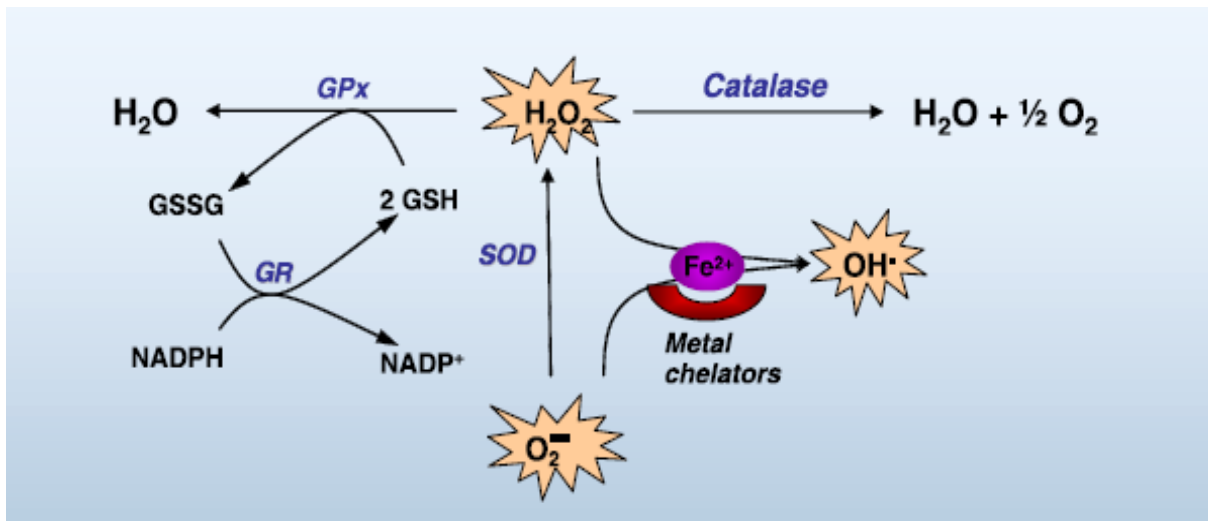


Figura 04 - Sistema de defesa antioxidante
 Fonte: Adaptado de Bashan et al. (2009)

1.7 Treinamento resistido, ovariectomia e estresse oxidativo no fígado

Tem sido demonstrado que o exercício aeróbio agudo, dependendo da intensidade, induz o EO (BLOOMER et al., 2006; FINAULD, 2006) e que o exercício moderado aeróbio crônico diminui os níveis de MDA e TBARS, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GSH-Px e antioxidantes não enzimáticos como a glutatona (PINHO et al., 2006; GOMEZ-CABRERA; DOMENECH; VINA, 2008).

Radak et al. (2004) mostraram que o exercício regular em esteira por oito semanas promoveu proteção no fígado de animais idosos pelo aumento de GSH hepática. Ou seja, o treinamento de *endurance* promoveu uma regulação ascendente na capacidade antioxidante no fígado mesmo na velhice.

Entretanto, no estudo de Ogonovszky et al. (2005), foram testados os efeitos do exercício moderado, extenuante e *overtraining* em biomarcadores do EO no fígado de animais, e os resultados mostraram danos oxidativos no DNA nuclear apenas no modelo de *overtraining*.

Ao longo dos anos, pesquisas evidenciam os benefícios do treinamento resistido com importantes aplicações clínicas para o estado de saúde e qualidade de vida da população em geral, especialmente em indivíduos que exigem cuidados

especiais, como portadores de doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, entre outras.

Na menopausa como já bem detalhado anteriormente, entre outras alterações, ocorre um declínio na massa muscular e massa óssea, acúmulo de triacilglicerol (TAG) nos hepatócitos, aumento na incidência de doença cardiovascular e EH entre outros (GUTIERREZ GROBE et al., 2010; MALTAIS et al., 2009; BROWN, 2008; KRAMER et al., 2004).

Nesse sentido, a atividade física, especialmente o TR é o maior determinante na manutenção da massa muscular e redução do acúmulo de gordura intramuscular (POLLOCK et al., 1994).

De acordo com Pollock et al. (1994), indivíduos idosos que se mantiveram regularmente em um programa de TR mantiveram níveis altos de massa muscular em relação a indivíduos sedentários, ou mesmo indivíduos que realizavam treinamento de *endurance*. Em outro estudo recente (DOMINGOS et al, 2011) foi evidenciado uma influência benéfica do TR no metabolismo lipídico hepático de ratas Ovx.

Dados escassos e contraditórios na literatura mostraram efeitos diferentes do TR crônico em marcadores do EO. Estudos têm demonstrado que uma única sessão de exercício resistido pode aumentar a formação de EROS e induzir EO, bem como dano muscular (BLOOMER et al., 2006; DIXON et al., 2006).

Entretanto, Vincent et al. (2002), verificaram o efeito de seis meses de TR em homens e mulheres e constataram que este tipo de treinamento reduziu os níveis de marcadores de PL e aumentou os níveis de glutathiona séricos.

No estudo de Silva et al. (2009), foram utilizados dois protocolos crônicos distintos, um deles foi caracterizado por contínuo e outro excêntrico intermitente e ambos proporcionaram uma diminuição nos marcadores de LPO e dano protéico, bem como regulações na atividade enzimática da SOD e CAT no fígado de ratos.

Corroborando com estes resultados, Cakir-Atabek et al. (2010) realizaram dois tipos de TR, visando estudar duas manifestações de força; hipertrofia e força sobre marcadores do EO em humanos. Os dois treinamentos foram realizados três dias na semana, por seis semanas, em dias não consecutivos, envolvendo a realização de seis exercícios. O treinamento de hipertrofia consistiu na realização de três séries de doze repetições e a intensidade correspondeu a 70% de uma

repetição máxima (1RM). No entanto, o treinamento de força caracterizou-se pela realização de três séries de seis repetições na intensidade de 85% de 1RM. Os resultados de ambos os treinamentos apresentaram uma resposta protetora contra o EO similar ao exercício aeróbio e estes efeitos se deram independente da intensidade estabelecida no treinamento.

Há grande escassez na literatura de estudos relacionando a condição de ovariectomia, TR e marcadores de EO no fígado de ratas. A falta de padronização em relação aos ensaios, tempo de retirada do tecido e protocolo de treinamento utilizado nos estudos dificulta demasiadamente as comparações. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de projetos para elucidar os efeitos do treinamento resistido sobre marcadores de EO hepáticos em ratas ovariectomizadas.

2 Objetivo

2.1 Objetivos

Verificar a influência da OVX e do TR sobre os marcadores de EO no fígado de ratas.

Verificar a influência da OVX e do TR sobre a expressão gênica da GSH - Px no fígado de ratas.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizadas 32 ratas Sprague-Dawley, provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araraquara, com oito semanas de idade, pesando inicialmente $218,34 \pm 2,49$ (média \pm erro padrão da média). Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (três animais por gaiola), com o assoalho recoberto com serragem e receberam água e ração *ad libitum*, sob condições constantes de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}$ C), umidade e iluminação em ciclo invertido (01:00- 13:00h: claro; 13:00- 01: 00h: escuro).

Todos os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, (Protocolo n.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).

Após chegada ao biotério do laboratório de fisiologia do exercício, os animais 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

A figura 6 apresenta o esquema de distribuição das ratas e o desenho experimental do estudo

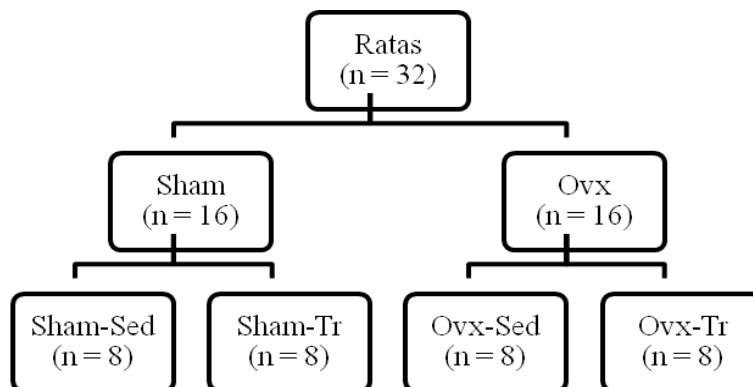


Figura 05 - Esquema de distribuição das ratas e desenho experimental

1)-Sham- Sedentário (Sham-Sed): As ratas do grupo Sham-Sed foram submetidas apenas à simulação da cirurgia de indução à Ovx (pseudo-ovariectomia), visando controlar os efeitos do estresse da cirurgia e, por não realizarem qualquer tipo de treinamento, permaneceram sedentárias durante todo o período experimental, apenas recebendo acompanhamento nutricional.

2)-Sedentário- Ovariectomia (Ovx-Sed): As ratas do grupo Ovx-Sed não realizaram nenhum tipo de exercício, porém foram submetidas à cirurgia de Ovx.

3)-Sham- Treinado (Sham-Tr): As ratas do grupo Sham-Tr foram submetidas à pseudo-ovariectomia, visando controlar os efeitos do estresse da cirurgia e realizaram o TR progressivo por dez semanas com cargas progressivas em escada como descrito no item 3.4

4)-Treinado- Ovariectomia (Ovx-Tr): As ratas do grupo Ovx-Tr foram submetidas à ovariectomia (Ovx) e realizaram o TR com cargas progressivas em escada como descrito no item 3.4.

3.3 Ovariectomia e operação sham

A ovariectomia é um procedimento cirúrgico de retirada dos ovários, a fim de induzir a menopausa. Foi realizada quando os animais completaram 250 g de massa corporal, de acordo com a técnica descrita por Kalu (1991). Para tanto, as ratas

foram anestesiadas com uma mistura de Ketamina-Xilazina (61,5-7,6 mg/kg, intraperitoneal), e seus reflexos testados para dar início aos procedimentos da Ovx.

Posteriormente, foi feita uma incisão lateral logo abaixo das costelas na derme e peritônio. Assim que o ovário era identificado, a ligadura era feita abaixo da trompa uterina, retirando-o. O procedimento foi repetido do outro lado. Nos animais Sham-Sed foi realizada a mesma cirurgia, no entanto não se realizou a ligadura nem a retirada dos ovários.

Nas setenta e duas horas após a Ovx as ratas foram mantidas em caixas individuais, e, 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 vinte e um dias de recuperação pós-cirurgia para dar início aos procedimentos do protocolo de treinamento resistido no grupo Ovx-Tr.

3.4 Treinamento resistido

Protocolo de Treinamento

O protocolo proposto por Hornerberger Jr. e Farrar (2004) foi adaptado para as necessidades e execução da pesquisa. Inicialmente as ratas foram familiarizadas com o treinamento resistido que consiste em subida de escadas (1,1 x 0,18m, 2 cm de espaçamento entre os degraus da grade, 80° de inclinação) com uma carga de aparatos fixados em suas caudas (Figura 7). O tamanho da escada obrigava os animais a fazer de 8 a 12 movimentos por escalada. O aparato fixado em suas caudas consistiu em frascos cônicos de vários pesos, presos a uma fita adesiva.

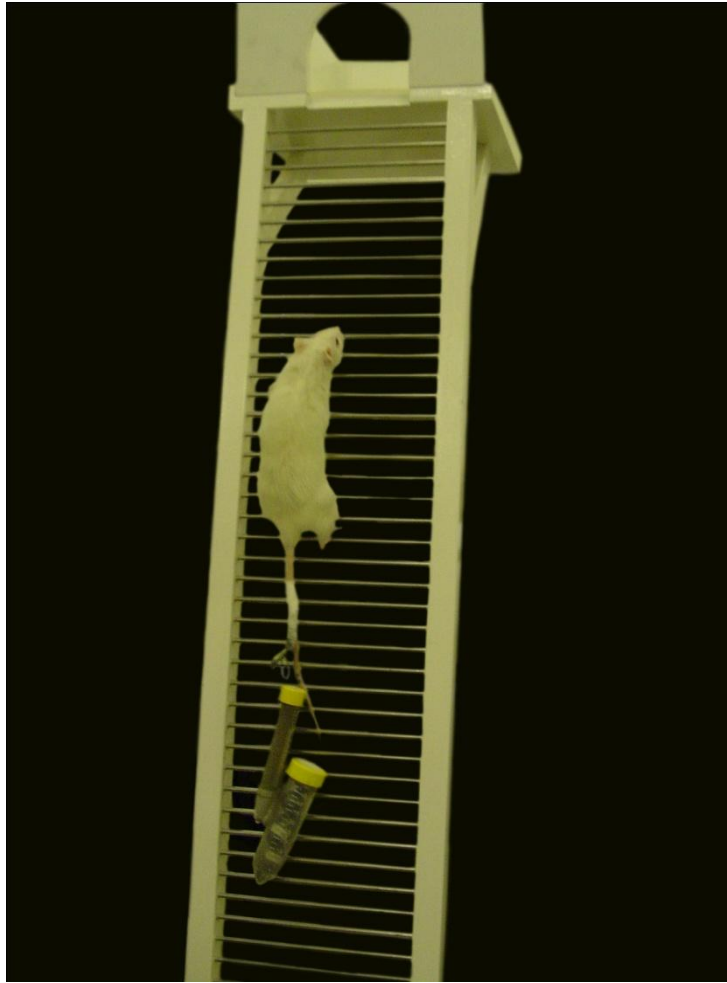


Figura 06 - Escada para treinamento resistido

O aparato foi fixado à cauda envolvendo a parcela proximal da mesma com uma tira autoadesiva (1,5cm, 3M Tartan). As ratas foram colocadas na parte inferior da escada e adaptadas ao ato de escalar. Inicialmente, foram motivadas a escalar aplicando-se em sua cauda um estímulo com pinça para iniciar o movimento. No topo da escada, havia uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansavam por 120 segundos.

Familiarização

Foram realizados três dias de familiarização, que consistiu em três escaladas consecutivas, sem o incentivo da pinçada na cauda. Três dias seguintes à familiarização com a escada (dois dias de descanso e no terceiro dia treinamento

novamente), os grupos experimentais começaram um regime de exercício resistido progressivo.

Determinação da carga máxima de carregamento

A primeira sessão de treinamento consistiu em determinar a carga máxima de carregamento. O protocolo consistiu em escalar de quatro a oito vezes carregando progressivamente cargas mais pesadas. Na escalada inicial foi aplicado 75% do peso do corpo do animal. Após completar o carregamento desta carga com sucesso, um peso adicional de 30 gramas foi 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. Então, a maior carga carregada com sucesso até o topo da escada foi considerada a carga de carregamento máxima dos ratos para aquela sessão (Figura 8).

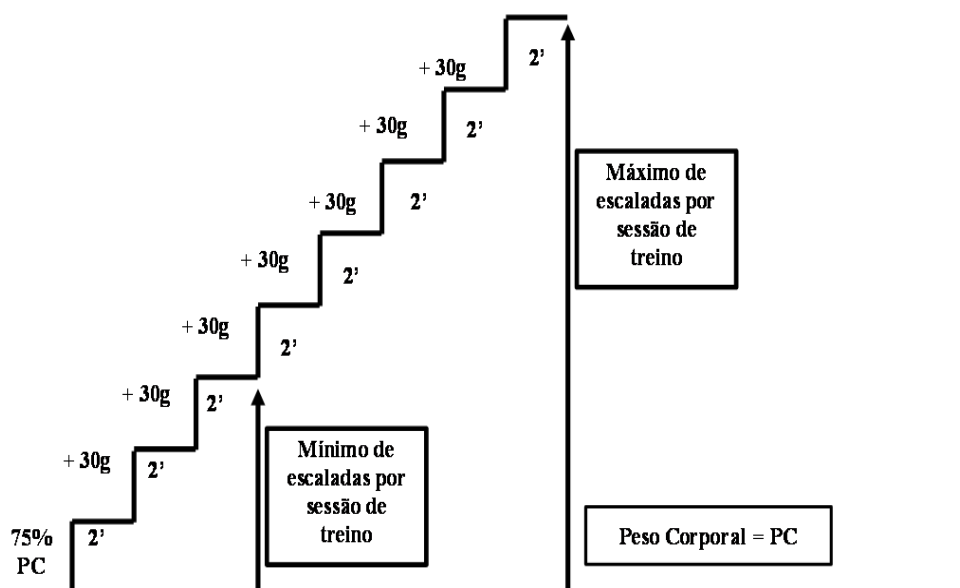


Figura 07 - Determinação da carga máxima de carregamento

Treinamento Resistido

As sessões de treinos subsequentes consistiram de quatro a nove escaladas. Durante as primeiras quatro escaladas, as ratas carregavam 65%, 85%, 95% e

100% de suas cargas máximas (Figura 9). Durante as subseqüentes escaladas, um adicional de 30 gramas era adicionado até que a rata obtivesse uma nova capacidade máxima de carregamento. O intervalo de recuperação entre as escaladas foi de 120 segundos.

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.

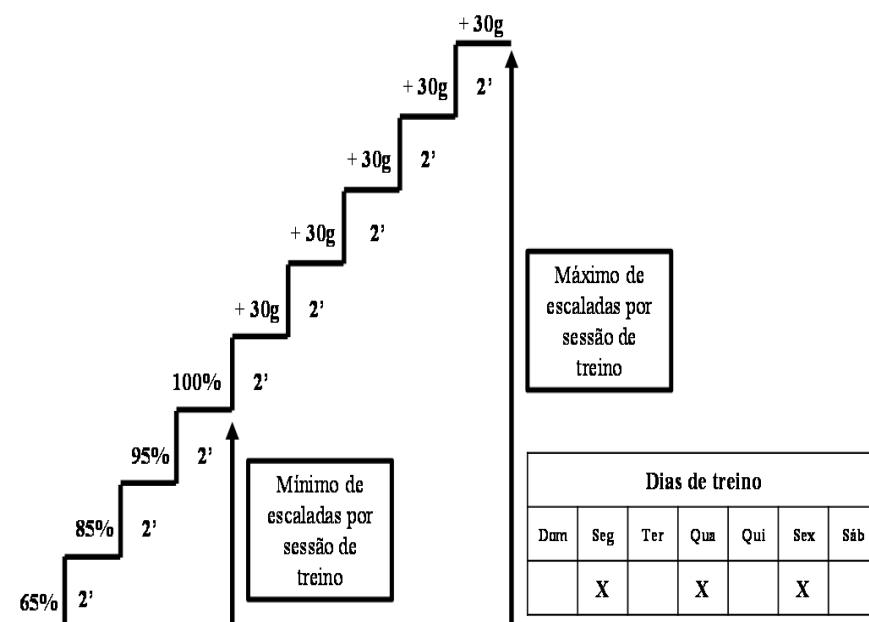


Figura 08 - Organização da carga de carregamento por sessão de treino

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 Resumo do desenho experimental

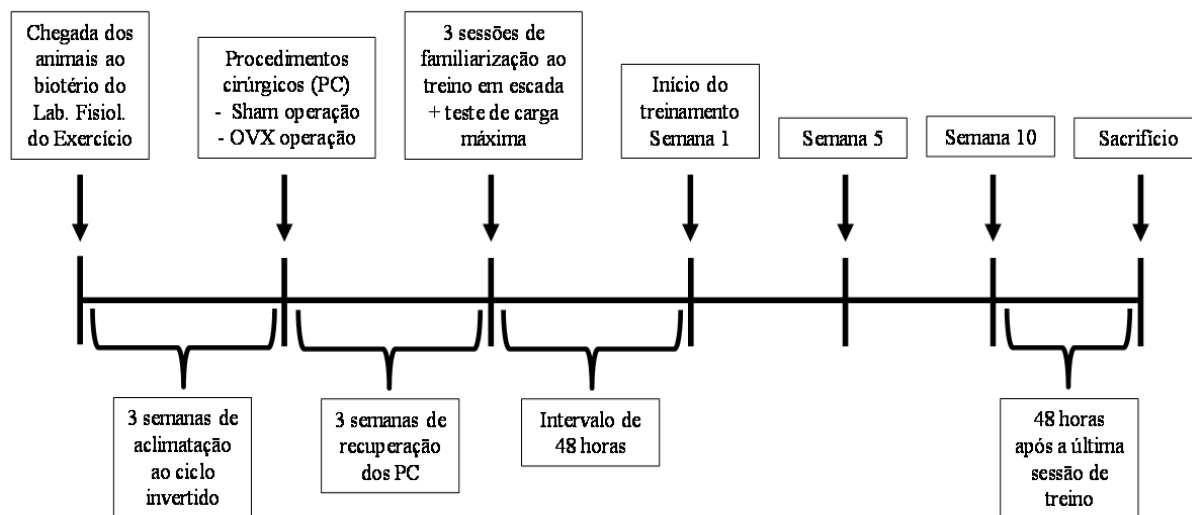


Figura 09 - Desenho experimental do estudo desde a chegada dos animais ao biotério do laboratório até o momento do sacrifício

3.7 Eutanásia e preparo das amostras do tecido hepático

Os animais foram eutanasiados por decapitação 48 horas após a última sessão de treino. Os animais sedentários foram eutanasiados no mesmo período. O lobo direito do fígado foi retirado, pesado, prontamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C para análises posteriores. O tecido hepático foi homogeneizado em tampão fosfato (0.1 mol/l, pH 7.4) em homogeneizador (Modelo MA 102 MINI E – Marconi) pelo tempo de 40 segundos à temperatura de $0-4^{\circ}\text{C}$. Posteriormente o homogeneizado foi centrifugado em (Centrífuga: Universal 320R, Hettich zentrifugen) por 15 minutos a ($1110 \times g$). O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de TBARS e atividade enzimática da CAT e SOD.

3.8 Atividade enzimática da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada seguindo o método de Aebi (1984). A atividade desta enzima é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio e obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Sendo

assim, sua atividade pode ser medida através da avaliação do consumo de H_2O_2 . Este ensaio baseia-se na diminuição da absorbância em 240nm; comprimento de onda de maior absorção do H_2O_2 .

Para a realização deste ensaio foram utilizados uma solução tampão fosfato a 50mmol/L (pH 7,4) e peróxido de hidrogênio. Em cubeta de quartzo, foram adicionados 390 μ l de tampão fosfato, pH 7,4, obtendo-se assim uma diluição da amostra de 1:39. Essa mistura foi pré-incubada a 37°C por 10 minutos e posteriormente a reação foi iniciada com a adição de 200 μ l de H_2O_2 . Os resultados foram expressos em U mg /proteína.

3.8.1 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD foi determinada utilizando Kit comercial EIA Cayman Chemical Assay® (706002) por meio do método xantina e hipoxantina. A atividade da SOD foi obtida com base na concentração conhecida dos padrões de SOD (U/ml).

3.9 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

A técnica consiste na medida de um cromógeno de cor rósea formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e alta temperatura. Para tanto, foi utilizado 100 μ l de homogeneizado e posteriormente adicionado o reagente de cor composto pelos ácidos de TCA-TBA-HCL (15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e 0,25N de ácido clorídrico). Essa mistura então foi aquecida por 30 minutos a 100°C e logo em seguida resfriada em gelo e centrifugada por 10 minutos a 3000 (1110 x g). Em seguida foi realizada a leitura da absorbância a 535nm (SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Utilizou-se padrão de tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos em nmol/g prot (COSTA; LIMA; SANTOS, 2006).

4 Determinação dos níveis de glutathiona

O ensaio é baseado na reação de GSH com 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB), também conhecido como (reagente de Ellman's), que produz o cromóforo ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) cuja absorvância máxima ocorre em 412nm. A taxa de formação de TNB é proporcional à concentração de GS (glutathiona total) na amostra (KOMURO et al., 1985). Para calcular a razão GSH/GSSH, a concentração de GSH (forma reduzida) foi determinada por diferença entre a glutathiona total e a oxidada (Tietze 1969). Amostras de tecido hepático (110mg/ml para glutathiona total e 200mg/ml para glutathiona oxidada) foram utilizadas. O tecido hepático para a mensuração da glutathiona total foi homogeneizado em ácido tricloroacético (TCA, Panreac) 5% e 0.01 N HCl (Panreac) e o tecido hepático para mensuração da glutathiona oxidada foi homogeneizado em tampão fosfato de 50 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM (Sigma), and NEM (N-etilmaleimida, Sigma). As misturas foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e mensurado no espectrofotômetro utilizando uma mistura de reações: DTNB (6 mM, Sigma), b-nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato, forma reduzida (b- NADPH, 0.3 mM, Sigma), e glutathiona redutase (250 unidades ml⁻¹, Sigma) (KOMURO et al., 1985). Os resultados foram expressos como mmol/g tecido. A curva padrão foi feita usando padrões de glutathiona, preparadas em 250 ml de 5% TCA e 0,01 N HCl.

4.1 Concentração de vitamina E hepática

A quantificação de vitamina E foi feita em HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Pressão) (Shimadzu Co, Kioto, Japan), a 292nm. As amostras foram preparadas em tubos de ensaio protegidos com papel alumínio e compostas por 200 mg de tecido hepático, 100µl de etanol 100% com BHT e 100 µl de padrão interno (acetato de alfa-tocoferila). Posteriormente as amostras foram agitadas em vortex (modelo- AP-56, Phoenix) por 5 segundos. Em seguida, a vitamina foi extraída com a adição de 400 µL de n-hexano, agitada por 2 minutos e centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante (n-hexano) foi pipetada em tubo de ensaio, que posteriormente foi seco em nitrogênio, e ressuspensa em 200 µL de

fase móvel, composta por acetonitrila/diclorometanol/metanol. Para a quantificação foi utilizada a razão entre a área do analito (vitamina) e a área do padrão interno (JORDÃO Jr. et al., 2004).

4.2 Proteínas totais

As determinações de proteína total no tecido hepático foram realizadas pelo método de biureto, utilizando-se o KIT LABTEST[®].

4.3 Quantificação da expressão gênica da GSH-Px

A quantificação da expressão gênica da GSH-Px, 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.

4.3.1 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, ependorfs e ponteiras utilizadas; manipulação de amostras e materiais com luvas; utilização de água tratada com dietil-pirocarbonato (água DEPC, autoclavada).

4.3.2 Extração do RNA total

Para a análise da expressão gênica das proteínas GSH-Px, 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 µL 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 µL) para um microtubo limpo. Eram adicionados 450 µL 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 µL 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 280nm. A razão $A_{260/280}$ é proporcional à concentração de RNA total na amostra.

4.3.3 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 (µg/µL):
concentração µg/µL = (A_{260} x 40 x diluição da amostra) x 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.

4.3.4 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 11).

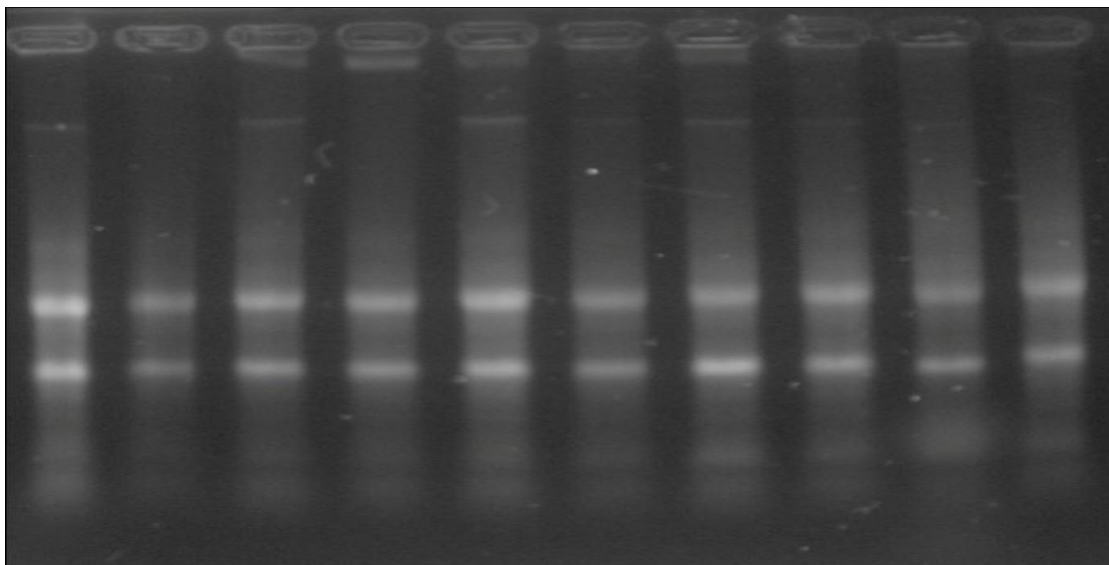


Figura 10 - Exemplo de um gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio indicando a integridade do RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 28S e 18S

4.3.5 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 Reaction 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 $^{\circ}$ C por 10 minutos.

Logo após o tratamento com DNase, adicionava-se 0,5 μ L do Primer Oligo (dT) 15 (*Promega Corporation, Madison, WI USA*) e a amostra permanecia em banho seco a 70 $^{\circ}$ 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 seguida foram encubadas em banho seco a 37°C por 60 minutos e, posteriormente estocadas a -80°C até o momento das análises.

4.3.6 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 (T_m) 57-61°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. As T_m dos primers foram previamente padronizadas.

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

Tabela1 - Oligonucleotídeos primers usados para PCR-RT

Genes	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')
GSH-Px	GGGCAAGGTGCTGCTCATTG	AGAGCGGGTGAGCCTTCTCA
GAPDH	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG	GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA

GSH-Px, Glutathiona Peroxidase; GAPDH gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de MELT (figura12).

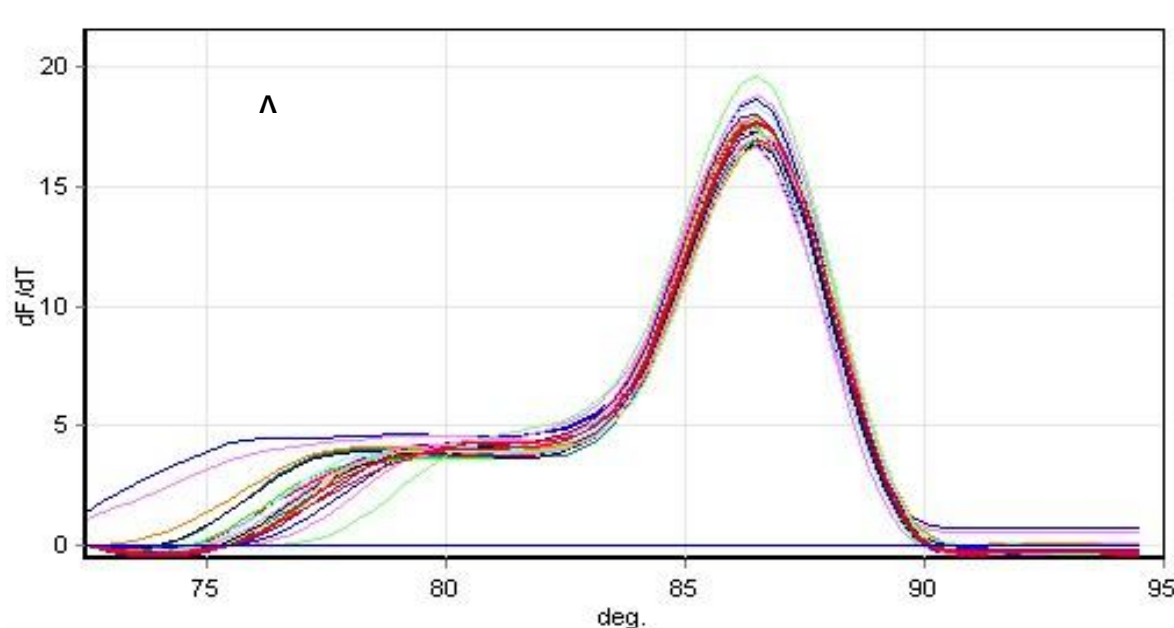


Figura 11 - Exemplo de curva de MELT original representativa dos ciclos do PCR-RT. A) GSH-Px

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 13).

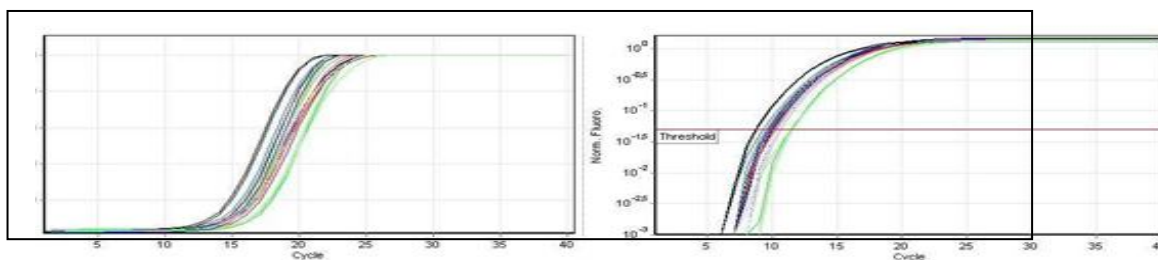


Figura 12 - Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT. A) GSH-Px

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 realizada:

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

Os $\Delta\Delta Ct$ dos grupos Sham-Sed, OVX-Sed, Sham-Tr e OVX-Tr foram calculados em relação ao Sham-Sed. O valor em unidades arbitrárias (UA) da expressão dos genes alvos foi calculado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Com os valores em UA foram realizados os testes estatísticos.

4.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os experimentos obedeceram a um desenho fatorial 2x2 tendo-se duas variáveis, ovariectomia e sham versus dois fatores exercício resistido e sedentarismo. Inicialmente foi realizada uma ANOVA adotando-se um nível de significância de $P < 0,05$. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk seguido de pós- teste de Fisher quando se verificou diferença significativa entre os diferentes grupos.

5 Resultados

Os resultados apresentados neste estudo seguirão a seguinte ordem:

1. Efeitos do treinamento resistido sobre parâmetros métricos
2. Evolução da carga máxima de carregamento durante 10 semanas de treinamento
3. Marcador de peroxidação lipídica, substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)
4. Concentração de GSH (glutathiona reduzida), dissulfeto de glutathiona (GSSG) e a relação GSH/GSSG
5. Concentração de vitamina E
6. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)
7. Expressão gênica da GSH - Px hepática

1. Efeitos do treinamento resistido sobre parâmetros métricos

A ovariectomia resultou em maior massa corporal e ingestão alimentar diária ($p < 0,05$) quando comparado com as ratas Sham-Sed (Tabela 2). Adicionalmente, a ovariectomia resultou em menor massa do fêmur (15%; $p < 0,05$) e massa do útero (77%; $p < 0,05$) (Tabela 2). No entanto, o grupo Sham-Tr apresentou a maior massa do fêmur (8%, 27% e 17%; $p < 0,05$) do que os grupos Sham-Sed, Ovx-Sed e Ovx-Tr, respectivamente. O grupo Ovx-Tr apresentou maior massa do fêmur (9%; $p < 0,05$) do que o grupo Ovx-Sed, denotando efeito do treinamento. (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre parâmetros métricos

	Sham-Sed	Ovx-Sed	Sham-Tr	Ovx-Tr
Peso Corporal (g)	342.57 ± 8.77	385.87 ± 8.29 [*]	309.62 ± 6.62 ^{*,†}	371.62 ± 7.44 ^{*,†,‡}
Ingestão Alimentar (g/d)	20.63 ± 0.49	22.38 ± 0.55 [*]	20,48 ± 0.39 ^{*,†}	22.34 ± 0.61 ^{*,†,‡}
Massa do útero (g)	0.83 ± 0.13	0.19 ± 0.02 [*]	0.76 ± 0.13 [†]	0.16 ± 0.00 ^{*,‡}
Massa do Fêmur (g/100 g MC)	0.26 ± 0.00	0.22 ± 0.00 [*]	0.28 ± 0.00 ^{*,†}	0.24 ± 0.00 ^{†,‡}

Valores são médias \pm erro padrão da média; $n = 8$ ratas por grupo. MC = massa corporal, * significativamente diferente de Sham-Sed ($p \leq 0.05$), † significativamente de Ovx-Sed ($p \leq 0.05$), ‡ significativamente diferente de Sham-Tr ($p \leq 0.05$).

2. Evolução da carga máxima de carregamento durante 10 semanas de treinamento

As cargas aumentaram gradativamente ao longo de 10 semanas a intervalos de 5 semanas. Para a carga máxima de carregamento durante as 10 semanas de treinamento, não houve nenhuma interação entre os grupos Sham-Tr e Ovx-Tr *versus* tempo, indicando que esses grupos aumentaram sua capacidade máxima de carregamento de maneira similar durante todo o tempo de treinamento (Figura 14). Deste modo, não houve nenhuma diferença nas cargas máximas entre ambos os grupos treinados cronicamente no período de 10 semanas.

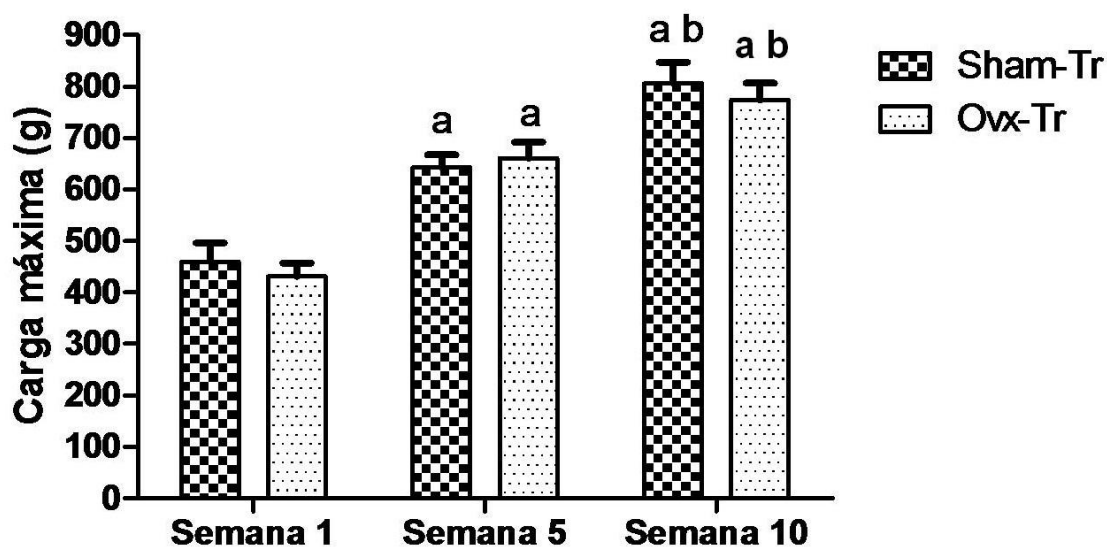


Figura 13 - Carga máxima (g) dos grupos Sham-Tr e Ovx-Tr nas semanas 1, 5 e 10

Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão da média ($n = 8$ por grupo). a, significativamente diferente de semana 1; b, significativamente diferente de semana 5 ($p < 0,05$)

3. Marcador de peroxidação lipídica (TBARS)

Os animais do grupo Sham-Tr tiveram um aumento no TBARS (29,5% e 30,7%, $p < 0,05$; Figura 15) em relação aos animais do grupo Sham-Sed e Ovx-Sed respectivamente. Além disso, os animais do grupo Ovx-Tr tiveram aumento nos níveis de TBARS (23%; Figura 15), quando comparados aos animais do grupo Ovx-Sed, evidenciando efeito do treinamento. Entretanto, não foram verificadas diferenças nos níveis do TBARS do grupo Ovx-Sed em relação ao grupo Sham-Sed.

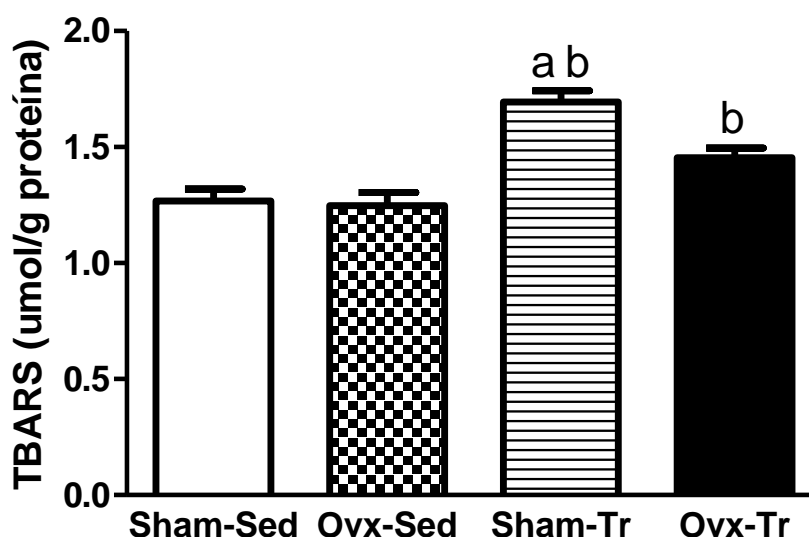


Figura 14 - Medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os resultados estão expressos com média \pm erro padrão da média (EPM), para oito animais em casa grupo. As letras representam as seguintes significâncias: a, significativamente diferente de Sham-Sed; b, significativamente diferente de Ovx-Sed ($p < 0,05$).

4. Concentração de GSH (glutathiona reduzida), dissulfeto de glutathiona (GSSG) e a relação GSH/GSSG

Os resultados mostraram diminuição no conteúdo de GSH (49%, $p < 0,05$; Figura 18) nos animais do grupo Ovx-Sed em relação aos animais do grupo Sham-

Sed. Adicionalmente, os animais do grupo Ovx-Tr mostraram uma diminuição na concentração de GSH (57,3% e 61,5% $p < 0,05$; Figura 18) quando comparados ao grupo Sham-Sed e Sham-Tr respectivamente, evidenciando um efeito severo da ovariectomia em diminuir a quantidade de GSH disponível no tecido hepático. .

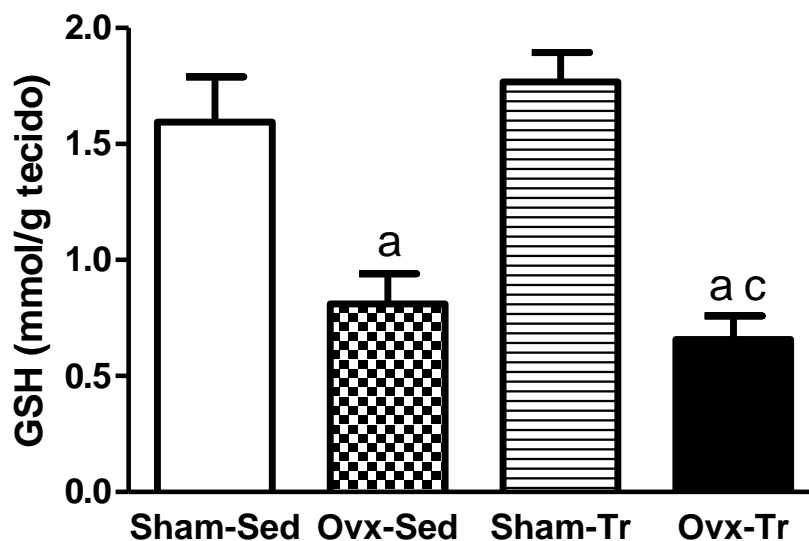


Figura 15 - Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

Os resultados estão expressos com média \pm erro padrão da média (EPM), para oito animais em casa grupo. As letras representam as seguintes significâncias: **a**, significativamente diferente de Sham-Sed; **c**, significativamente diferente de Sham-Tr ($p < 0,05$).

Foi observado um aumento de GSSG (37,7%, $p < 0,05$; Figura 19) nos animais treinados e uma diminuição nos animais ovariectomizados (32,3%, $p < 0,05$; figura 19) em relação ao grupo Sham- Sed respectivamente. Além disso, nos animais do grupo Ovx-Tr foi encontrado uma diminuição de GSSG (56,3%, $p < 0,05$; Figura 19) em relação ao grupo Sham-Tr.

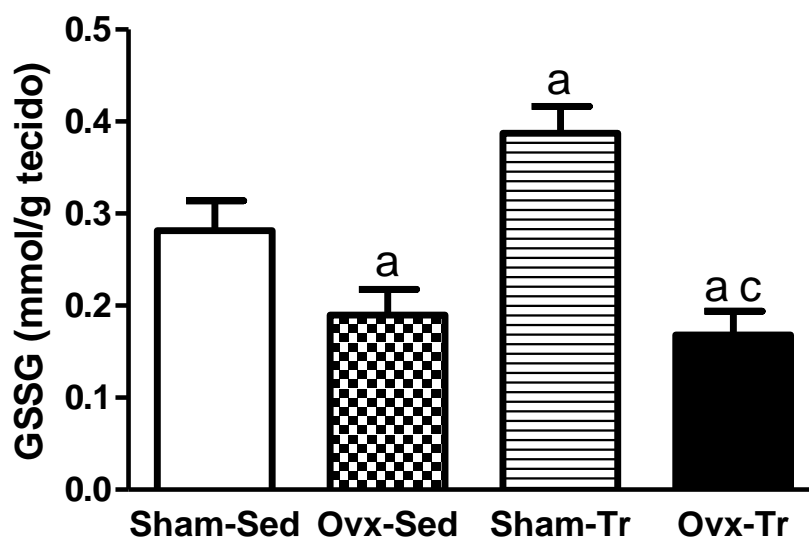


Figura 16 - Concentração de dissulfeto de glutationa (GSSG)

Os resultados estão expressos com média \pm erro padrão da média (EPM), para oito animais em casa grupo. As letras representam as seguintes significâncias: **a**, significativamente diferente de Sham-Sed; **c**, significativamente diferente de Sham-Tr ($p < 0,05$).

O resultado do ensaio mostrou diminuição da relação (GSH / GSSG) (28% e 19,2%, $p < 0,05$; Figura 20), nos grupos Ovx-Sed e Sham-Tr respectivamente, quando comparados ao grupo Sham-Sed. Além disso, foi verificada uma diminuição de (GSH / GSSG) (30,5% e 14%, $p < 0,05$; Figura 20) nos animais do grupo Ovx-Tr em relação aos animais do grupo Sham-Sed e Sham-Tr.

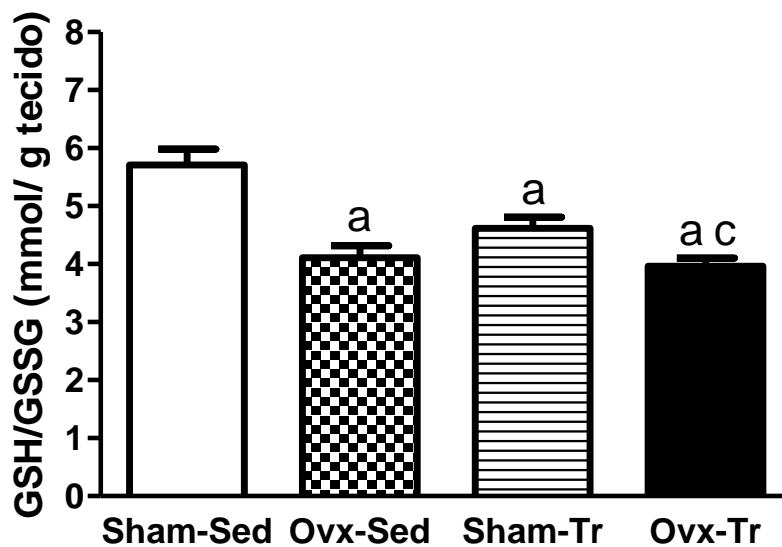


Figura 17 - Relação GSH/GSSG

Os resultados estão expressos com média \pm erro padrão da média (EPM), para oito animais em casa grupo. As letras representam as seguintes significâncias: **a**, significativamente diferente de Sham-Sed; **c**, significativamente diferente de Sham-Tr ($p < 0,05$)

5. Concentração de vitamina E

Uma diminuição na concentração de vitamina E (44,7, 35% e 41,3%, $p < 0,05$; Figura 21), foi observada nos animais dos grupos Ovx-Sed, Sham-Tr e Ovx-Tr respectivamente, quando comparado com os animais do grupo Sham-Sed.

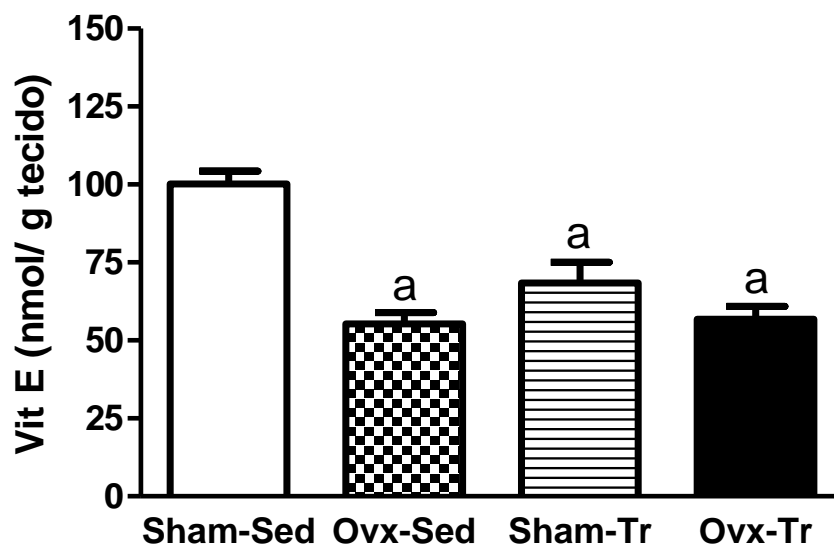


Figura 18 - Concentração hepática de vitamina E

Os resultados estão expressos com média \pm erro padrão da média (EPM), para oito animais em casa grupo. As letras representam as seguintes significâncias: **a**, significativamente diferente de Sham-Sed; ($p < 0,05$)

6. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A atividade enzimática da superóxido dismutase, bem como da catalase não apresentou diferença estatisticamente significativa nos quatro grupos avaliados neste estudo (Figuras 22 e 23).

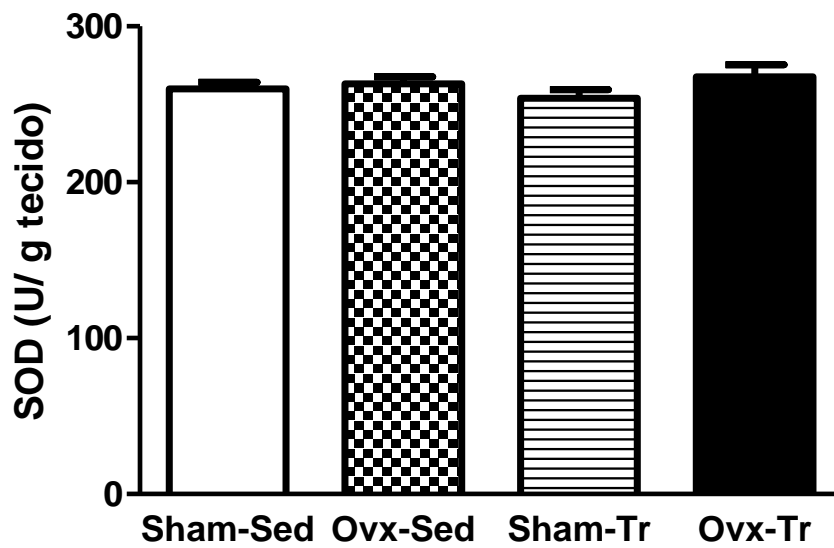


Figura 19 - Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

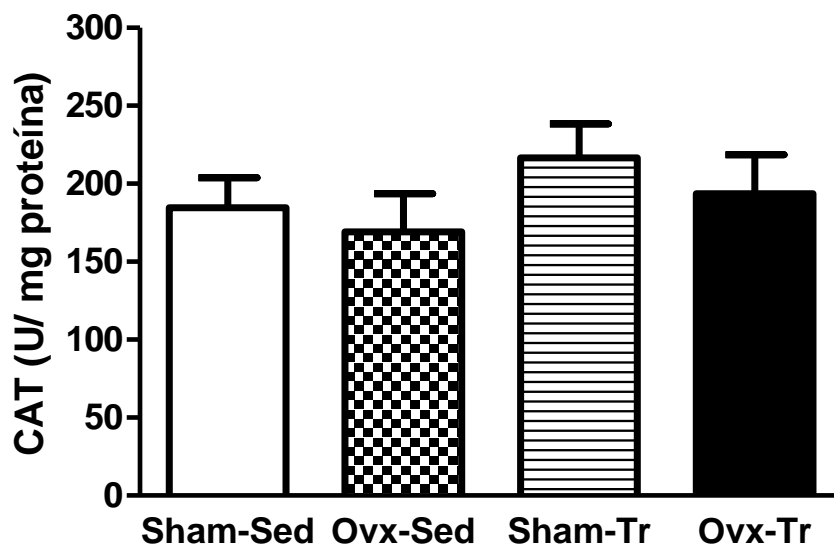


Figura 20 - Medida da atividade enzimática da catalase (CAT)

7. Expressão gênica da GSH-Px

Os resultados do PCR-RT demonstraram que nos animais do grupo Ovx-Sed ocorreu uma diminuição da expressão gênica da GSH-Px (49%, $p < 0,05$; Figura 24) quando comparado com o grupo Sham-Sed, denotando efeito da ovariectomia. No entanto, nos animais do grupo Ovx-Tr houve aumento da expressão da GSH-Px

(90,3%, $p < 0,05$; Figura 24) quando comparado ao grupo Ovx-Sed, evidenciando efeito do treinamento.

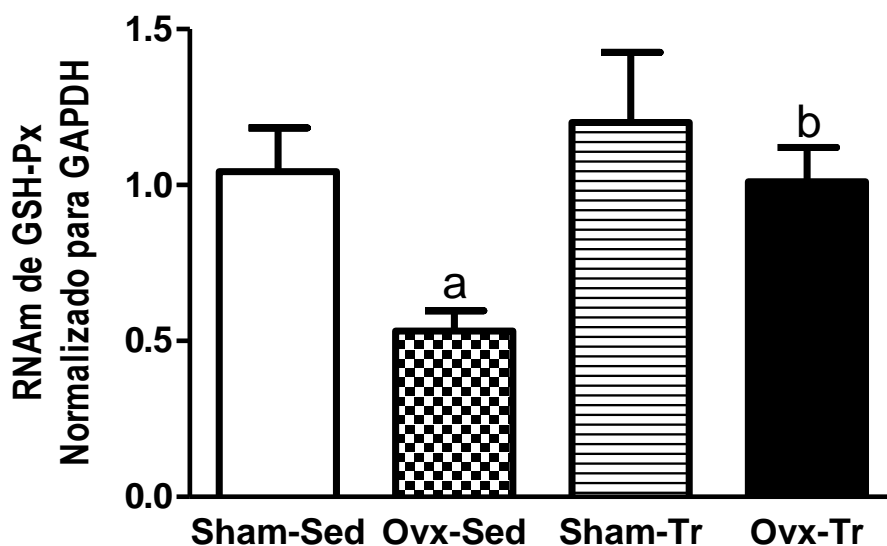


Figura 21 - Expressão gênica da GSH-Px

Os resultados estão expressos com média \pm erro padrão da média (EPM), para oito animais em casa grupo. As letras representam as seguintes significâncias: **a**, significativamente diferente de Sham-Sed; **b**, significativamente diferente de Ovx-Sed; Tr ($p < 0,05$).

6 Discussão

O principal achado deste estudo foi que o modelo de treinamento resistido usado na nossa pesquisa não foi capaz de reverter o estresse oxidativo (EO) promovido pela OVX no fígado. Além disso, este treinamento induziu mudanças negativas no balanço antioxidante/oxidante hepático, como evidenciado pelo aumento de (30%), diminuição da razão (19%) e concentração de vitamina E (35%).

Evidências indicam que o EO no fígado é um importante mecanismo na progressão de diversas patologias relacionadas à menopausa, como a EH e a EHNA (ALBANO et al., 2005; KOEK; LIEDORP; BAST, 2011). Evidências também mostram que o treinamento pode promover uma regulação ascendente nas defesas antioxidantes e reduzir o OS (ROSETY-RODRIGUEZ et al., 2006; CAKIR-ATABEK et al., 2010).

Radak et al. (2004) demonstraram que oito semanas de treinamento de *endurance* na esteira causou uma *down regulation* na produção de EROS no fígado de ratos idosos treinados e promoveu proteção hepática por meio dos níveis de GSH aumentados. Entretanto, Ogonovsky et al. (2005) demonstraram que um modelo de *overtraining* promoveu dano oxidativo no DNA. Neste contexto, Margonis et al. (2007) realizaram um protocolo de treinamento resistido em humanos e os resultados mostraram que o *overtraining* induziu respostas pronunciadas nos biomarcadores do EO proporcionais à carga de treinamento. Estudos recentes em humanos indicam que o treinamento resistido têm efeitos protetores contra o EO similares ao exercício aeróbio, que parecem ser independentes da intensidade do treinamento (CAKIR-ATABEK et al., 2010). Embora a maioria dos estudos tenham testado o efeito do exercício aeróbio na modulação do sistema antioxidante e peroxidação lipídica, informações sobre os efeitos do treinamento resistido no EO hepático são escassos.

Nosso estudo demonstrou que ambas as condições, treinamento resistido e ovariectomia promoveram uma pronunciada alteração no balanço redox hepático, como observado por meio da diminuição da razão GSH/GSSG (Fig. 2c). A relação entre as duas isoformas da glutatona (GSH e GSSG) é considerada um índice de balance redox celular; e sob condições de EO aumentado, a razão GSH/GSSG

diminui (BAEZA et al., 2010; WU et al., 2004). Em ambos os animais sedentários e treinados (Figure. 2a), a ovariectomia diminuiu os níveis de GSH hepático, que constitui em um mecanismo pelo qual as células mamárias defendem-se dos processos oxidativos, tendo o fígado como o maior produtor e exportador (Vina et al., 2003).

Em um recente estudo conduzido por Baeza et al. (2010), os resultados indicaram que a ovariectomia acelerou o processo de envelhecimento, o qual está diretamente relacionado à GSH reduzida. Neste contexto, Kireev (2008) demonstraram que o envelhecimento em ratas ovariectomizadas está associado a um aumento de substâncias pró-inflamatórias no fígado, como TNF- α , IL-1 β , and IL-6 bem como redução de algumas citocinas anti-inflamatórias (ex., IL-10), culminado no aumento da lipoperoxidação (LP). Em nosso estudo, a diminuição nos níveis de GSH nos grupos OVX pode ser explicada pelo processo inflamatório aumentado, o qual pode ter alterado a disponibilidade de importantes aminoácidos (ex., glutamina) para a síntese de glutatona. Além disso, um efluxo de GSH do fígado para o músculo esquelético pode ter ocorrido durante o treinamento resistido (LEW; PYKE; QUINTANILHA, 1985).

Por sua vez, o treinamento, não reverteu os efeitos deletérios nos níveis de GSH, e um aumento nos níveis de GSSG foi encontrado no grupo sham treinado (Sham-Tr), indicando aumento do EO no fígado destes animais (Fig. 2b).

A literatura tem claramente demonstrado que mudanças nos níveis da glutatona são acompanhadas por aumento da PL que é identificado pelo aumento na produção de MDA (BAEZA et al., 2010) presente estudo, não observamos efeito da ovariectomia em aumentar os níveis de MDA (Fig. 6). Uma explicação para este resultado é que o fígado possui alta taxa mitótica, com menor susceptibilidade ao dano de EROS e capacidade aumentada em reparar o DNA (WEI; KAO; LEE, 1996).

Por outro lado, o treinamento resistido aumentou os níveis de MDA independentemente do status ovariano (Fig.6), indicando que nosso protocolo de treinamento causou um intenso processo oxidativo nestes animais.

Da Silva et al. (2009), investigaram o efeito de diferentes protocolos de exercício físico em biomarcadores de EO no fígado de ratos e encontraram que o treinamento contínuo e excêntrico promoveram diminuição nos níveis da PL. Adicionalmente, Rosety-Rodriguez et al. (2006) demonstraram que o exercício

crônico moderado reduziu o dano oxidativo induzido por estresse emocional por meio da diminuição significativa na produção de EROS e produtos da PL no fígado, diferentemente dos nossos resultados.

O fígado contém altos níveis de xantina desidrogenase (XD), enzima que durante o exercício é convertida em xantina oxidase (XO). A XO reduz O_2 ao invés do $NADP^+$, produzindo superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (BLOOMER; GOLDFARB, 2004; RADAK; CHUNG; GOTO, 2008), o que explica em partes, o dano oxidativo encontrado nos animais treinados do nosso estudo.

A produção de EROS e dano hepático têm sido negativamente correlacionados com baixos níveis de vitamina E (LEO; ROSMAN; LIEBER, 1993). A vitamina E é um antioxidante solúvel em gordura no plasma que é principalmente estocado no fígado, realizando a função de eliminar radicais peroxil ($ROO\cdot$) (OSTMAN et al., 2009). Diversos estudos tem claramente demonstrado que os níveis de vitamina E plasmáticos estão reduzidos significativamente em pacientes com EH (LEO; ROSMAN; LIEBER, 1993). Neste contexto, Zamin et al. (2010) verificaram que a suplementação com vitamina E reduziu significativamente o EO no fígado, diminuindo a depleção de glutathiona, levando a conclusão de que a vitamina E tem um importante papel terapêutico na prevenção de doenças como a EH (PHUNG et al., 2001).

Em nosso estudo, a diminuição na concentração de vitamina E em ambos os animais ovariectomizados (ex., sedentários e treinados) pode ser explicada pela baixa concentração de GSH, uma vez que GSH reduz dihidroascorbato em ascorbato garantindo a reciclagem da vitamina E (Fig. 3). O treinamento resistido realizado não reverteu este efeito da ovariectomia e, além disso, causou uma diminuição da concentração de vitamina E no grupo sham (Sham-Tr), sugerindo EO hepático aumentado nestes animais. Este resultado corrobora com os achados de Aikawa et al. (1984), que evidenciaram depleção de vitamina E nos tecidos hepático e muscular em ratos treinados que tiveram dieta normal e com deficiência de vitamina E. Outra explicação para esta diminuição nos níveis de vitamina E é o processo de redistribuição de vitamina do fígado para o músculo ativo (SWIFT et al., 1998).

Outra consequência fisiológica da ovariectomia e menopausa é o aumento da atividade enzimática da CAT e a diminuição da atividade enzimática da SOD e GSH-

Px (TRESGUERRES et al., 2008; TREVISAN et al., 2001). Isso ocorre porque quando o EO aumenta a SOD diminui devido à inativação irreversível do seu produto H_2O_2 , enquanto ocorre o aumento da CAT com o intuito de eliminar o H_2O_2 .

Embora os resultados relacionados ao treinamento sejam conflitantes, a atividade física regular leva ao aumento da atividade enzimática antioxidante, especialmente em tecidos como músculo esquelético (RADAK et al., 1999; TERBLANCHE, 2000). Os efeitos do exercício crônico no EO hepático e sistema antioxidante têm sido investigados em vários estudos, os quais mostram que o exercício resulta em atividade enzimática da CAT reduzida (LAUGHLIN et al., 1990; LEEUWENBURGH et al., 1999) e atividade da SOD aumentada (BURNEIKO et al., 2006). Este desequilíbrio entre a atividade da SOD e CAT pode ser atribuído a altos níveis de moléculas pró-inflamatórias (PETERSEN; PEDERSEN, 2005), as quais são conhecidos em aumentar o RNAm da SOD (DOUGALL; NICK, 1991); adicionalmente, a atividade da CAT pode ser inibida pelos íons superóxido produzidos durante o exercício (KONO; FRIDOVICH, 1982). Em nosso estudo, não observamos mudanças na atividade da CAT e SOD frente às condições de ovariectomia e treinamento resistido que pode ser atribuída a uma possível adaptação fisiológica induzida pelo EO. (Fig. 4a, b).

Por sua vez, a ovariectomia exerceu uma diminuição pronunciada nos níveis do RNAm da GSH-Px (Fig. 5). Borrás et al. (2005), mostraram em linhagens de celulares mamárias tumorais (MCF-7), que o estradiol promove uma regulação ascendente na expressão de Mn-SOD e GSH-Px, mediada pela interação deste hormônio com o receptor de membrana, ativação da *quinase ativada por mitógeno* (MAP quinase) e ativação do NF-kappa, exercendo efeito protetor. Entretanto, o treinamento resistido aumentou os níveis de RNAm da GSH-Px (Fig. 5), indicando uma possível adaptação desta proteína ao aumento do dano oxidativo ocasionado pelo treinamento. Nossos resultados estão em concordância com os de Chang et al. (2004), que obtiveram efeitos similares com o treinamento de *endurance* providenciando proteção no fígado de ratos diabéticos. Entretanto, o aumento da expressão gênica da GSH-Px proporcionado pelo protocolo de treinamento realizado em nosso estudo, não foi acompanhado por um aumento nos níveis de GSH, que é necessário para a manutenção de uma condição catalítica ótima desta enzima. Como a atividade da GSH-Px não foi monitorada nos animais do nosso estudo é

difícil determinar se a regulação ascendente encontrada nos níveis de RNAm da GSH-Px foram adaptações positivas ou negativas.

Em suma, os achados relevantes encontrados neste trabalho são os seguintes: Primeiro, o programa de treinamento resistido adotado no nosso trabalho não reverteu o dano oxidativo hepático causado pela Ovx e também aumentou o EO no fígado. Segundo, o tipo de periodização utilizada neste modelo de treinamento resistido gerou estresse oxidativo no fígado de maneira similar aos modelos de *overtraining*. Terceiro, os biomarcadores hepáticos de estresse oxidativo usados no nosso estudo podem constituir uma ferramenta diagnóstica para o *overtraining*. Quarto, em vista dos resultados apresentados neste estudo, futuros trabalhos são necessários para elucidar e caracterizar com exatidão o nível de estresse psicológico e metabólico impostos a estes animais, frente ao modelo de treinamento resistido utilizado no nosso estudo, bem como estabelecer relações com o EO em outros órgão e sistemas.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Method. Enzimol.**, Amsterdam , v. 105, p. 121-126, 1984.
- AIKAWA K. M. et al. Exercise endurance-training alters vitamin E tissue levels and red-blood-cell hemolysis in rodents. **Biosci Rep.**, New York, v. 4, n. 3, p. 253-257,1984.
- ALBANO, E. et al. Review article: role of oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatosis. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, New York, v. 22, suppl. 2, p. 71-73, 2005.
- ALISON, M. R. Hepatic stem cells: from inside and outside the liver?. **Cell Prolif.**, New York, v. 37, p. 1-21, 2004.
- BAEZA, I. et al. Effects of growth hormone, melatonin, oestrogens and phytoestrogens on the oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio and lipid peroxidation in aged ovariectomized rats. **Biogerontology**, New York , v. 11, p. 687-701, 2010.
- BASHAN, N. et al. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 89, p. 27-71, 2009.
- BLACK, D. Molecular and cellular features of hepatic regeneration. **J.Surg. Res.**, Amsterdam, v. 117, p. 306-315, 2004.
- BLOOMER, R. J.; GOLDFARB, A. H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. **Can. J. Appl. Physiol.**, New Jersey, v. 29, p. 245-63, 2004.
- BLOOMER, R. J. et al. Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints. **Med. Sci. Sports Exerc.**, New York, v. 38, p. 1436-1442, 2006.
- BORRAS C, GAMBINI J, GOMEZ-CABRERA MC, SASTRE J, PaLLARDO FV, MANN GE, VINA J. 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. **Aging Cell**, New York, v. 4, p. 113-118, 2005.
- BROWN, M. Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. **Adv. Physiol. Educ.**, Bethesda, v. 32, p. 120-126, 2008.
- BURNEIKO RC, DINIZ YS, GALHARDI CM, RODRIGUES HG, EBAID GM, FAINE LA, PADOVANI CR, CICOGNA AC, NOVELLI EL. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol* 44 (7):1167-1172, 2006

CAKIR-ATABEK, H. et al. Effects of different resistance training intensity on indices of oxidative stress. **Eur. J. Appl. Physiol.**, New York, v. 24, p. 2491-2497, 2010.

CAY, M.; NAZIROGLU, M.; KOYLU, H. Selenium and vitamin E modulates cigarette smoke exposure-induced oxidative stress in blood of rats. **Biol. Trace Elem. Res.**, New York, v. 131, p. 62-70, 2009.

CHANG, S. P. et al. Increase of anti-oxidation by exercise in the liver of obese Zucker rats. **Clin. Exp. Farmacol. Physiol.**, New York, v. 31, p. 506-511, 2004.

COSTA, M. C.; SANTOS, C. C. R.; LIMA, S. E. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 345-350, 2006.

DIXON, C. B. et al. The Effect of acute resistance exercise on serum malondialdehyde in resistance-trained and untrained collegiate men. **J. Strength Cond. Res.**, v. 20, p. 693-698, 2006.

DOMINGOS, M. M. et al. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. **Eur. J. Appl. Physiol.**, New York, v. 112, n. 4, p. 1437-44, 2012.

DOUGALL WC, NICK HS. Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology* 129 (5):2376-2384, 1991

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. **Sports Med.**, New York, v. 36, p. 327-358, 2006.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, New York, v. 408, p. 239-247, 2000.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Meth. Enzymol.**, Amsterdam, v. 105, p. 114-121, 1984.

GOMEZ-CABRERA, M. C.; DOMENECH, E.; VINA, J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. **Free Radic. Biol. Med.**, Amsterdam, v. 44, p. 126-131, 2008.

GUTIERREZ-GROBE, Y. et al. Prevalence of non alcoholic fatty liver disease in premenopausal, postmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens. **Ann. Hepatol.**, Mexico City, v. 9, p. 402-409, 2010.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr. Rev.**, Campinas, v. 52, p. 253-265, 1994.

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.**, New Jersey, v. 29, p.16-31, 2004.

HWANG, E. S.; KIM, G. H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology**, Amsterdam, v. 229, p. 1-10, 2007.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress. **Antioxid. Redox.**, New Rochelle, v. 8, p. 1865-1879, 2006.

JORDÃO JR., A. A. et al. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food. Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v. 42, p. 459-464, 2004.

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

KIREEV, R. A. et al. Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage. **J. Pineal Res.**, New York, v. 45, p. 394-402, 2008.

KOEK, G. H.; LIEDORP, P. R.; BAST, A. The Role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. **Clin. Chim. Acta.**, Amsterdam, v. 412, p.1297-1305, 2011.

KOMURO C, ONO K, SHIBAMOTO Y, NISHIDAI T, TAKAHASHI M, ABE M. Rapid and simple method for quantitative determination of non-protein sulphhydryls in mouse liver by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr** 338 (1):209-212, 1985

KONO, Y., FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **J. Biol. Chem.**, Rockville, v. 257, n. 10, p. 5751-5754, 1982.

KRAMER, P. R.; KRAMER, S. F.; GUAN, G. 17 beta-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 50, p. 1967-1975, 2004.

LAUGHLIN, M. H. et al. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. **J. Appl. Physiol.**, New York, v. 68, n. 6, p. 2337-2343, 1990.

LEEUWENBURGH, C. et al. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. **Free Radic. Biol. Med.**, Amsterdam, v. 27, p. 186-192, 1999.

LEO, M. A.; ROSMAN, A. S.; LIEBER, C. S. Differential depletion of carotenoids and tocopherol in liver disease. **Hepatology**, New York, v. 17, n. 6, p. 977-86, 1993.

LEW, H.; PYKE, S.; QUINTANILHA, A. Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 185, n. 2, p. 262-266, 1985.

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

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

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

MARGONIS K. et al. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. **Free Radic. Biol. Med.**, Amsterdam, v. 43, n. 6, p. 901-910, 2007.

MASSAFRA, C. et al. Effects of estradiol and medroxyprogesterone-acetate treatment on erythrocyte antioxidant enzyme activities and malondialdehyde plasma levels in amenorrhoeic women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, p. 173-175, 1997.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Physiol. Chem.**, New York, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

NGUYEN, M. C. et al. Relationships between tamoxifen use, liver fat and body fat distribution in women with breast cancer. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, Charlottesville, v. 25, p. 296-8, 2001.

OGONOVSKY, H. et al. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. **Can. J. Appl. Physiol.**, New Jersey, v. 30, p. 186-195, 2005.

OMOYA, T. et al. Effects of idoxifene and estradiol on NF-kappaB activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. **Liver, LOCAL**, v. 21, p. 183-191, 2001.

OSTMAN, B. et al. Oxidative stress and bone mineral density in elderly men: antioxidant activity of alpha-tocopherol. **Free Radic. Biol. Med.**, Amsterdam, v. 47, p. 668-673, 2009.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl. Physiol.**, New York, v. 98, n. 4, p. 1154-1162, 2005.

PINHO, R. A. et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell Biol. Int.**, Amsterdam, v. 30, p. 848-853, 2006.

POLLOCK, M. L. et al. Exercise training and prescription for the elderly. **South Med. J.**, v. 78, p. S88-S95, 1994.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol. Rev.**, New York, v. 88, p. 1243-1276, 2008.

PHUNG, N. et al. Westmead Millennium Inst at Westmead Hosp, Univ of Sydney, Sydney Australia. Vitamin E but not glutathione precursors inhibits hepatic fibrosis in experimental NASH exhibiting oxidative stress and mitochondrial abnormalities. **Hepatology**, New York, v. 34, n. 361, p. 33, 2001.

RADAK, Z. et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radic. Biol. Med.**, Amsterdam, v. 27, n. 1-2, p. 69-74, 1999.

RADAK Z, CHUNG HY, NAITO H, TAKAHASHI R, JUNG KJ, KIM HJ, GOTO S. Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEB J* 18 (6):749-750, 2004

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic. Biol. Med.**, Amsterdam, v. 44, p. 153-159, 2008.

ROSETY-RODRIGUEZ M, ORDONEZ FJ, ROSETY I, FRIAS L, ROSETY MA, ROSETY JM, ROSETY M. 8-weeks training program attenuates mitochondrial oxidative stress in the liver of emotionally stressed rats. *Histol Histopathol* 21 (11):1167-1170, 2006

SALGANIK, R.I. The Benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. **J. Am. Coll. Nutr.**, Clearwater, v. 20, suppl. 5, p. 464S-472S, 2001.

SIES, H.; CADENAS, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. **Philos. Trans. R Soc. Lond B Biol. Sci.**, LOCAL, v. 311, p. 617-631, 1985.

SIGNORELLI, S. S. et al. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. **Maturitas**, Amsterdam, v. 53, p. 77-82, 2006.

SILVA, L. A. et al. Effect of different models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, Ottawa, v. 34, p. 60-65, 2009.

SJODIN, B.; HELLSTEN WESTING, Y.; APPLE, F. S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Med.**, New York, v. 10, p. 236-254, 1990.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 899, p. 191-208, 2000.

SWIFT JR., J. N. et al. Vitamin E concentration in rat skeletal muscle and liver after exercise. **Int. J. Sport Nutr.**, London, v. 8, n. 2, p. 105-112, 1998.

TERBLANCHE, S. E. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. **Cell Biol. Int.**, Amsterdam, v. 23 n. 11, p. 749-753, 2000.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 502-522, 1969.

TOPCUOGLU, A. et al. Effects of estrogens on oxidative protein damage in plasma and tissues in ovariectomised rats. **Clin. Invest. Med.**, Ottawa, v. 32, p. E133-E143, 2009.

TRESGUERRES J. et al. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Amsterdam, v. 108, p.318–326, 2008.

TRESGUERRES, J. A. et al. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Amsterdam, n. 3-5, p. 318-326, 2008.

TREVISAN, M. et al. Correlates of markers of oxidative status in the general population. **Am. J. Epidemiol.**, Oxford, v. 154, p. 348-356, 2001.

TURGEON, J. L. Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies. **Endocrine Reviews**, v. 27, p. 575–605, 2006.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiol.**, New York, v. 552, p. 335-344, 2003.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer. **Chem. Biol. Interact.**, Amsterdam, v. 160, p. 1-40, 2006.

VIÑA, J. et al. Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males. **Antioxid. Redox Signal.**, New Rochelle, v. 5, p. 549-556, 2003 .

VINCENT, K. R. et al. Resistance exercise training attenuates exercise-induced lipid peroxidation in the elderly. **Eur. J. Appl. Physiol.**, New York, v. 87, p. 4-5, 2002.

WALLACE, S. S. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. **Free Radic. Biol. Med.**, Amsterdam, v. 33, p. 1-14, 2002.

WALSH, B. et al. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v. 325, p. 1196-1204, 1991.

WEI, Y. H.; KAO, S. H.; LEE, H. C. Simultaneous increase of mitochondrial DNA deletions and lipid peroxidation in human aging. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, n. 786, p. 24-43, 1996.

WING, R.R. et al. Weight gain at the time of menopause. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v. 151, p. 97-102, 1991.

WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implications for health. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 13, p. 489-492, 2004.

YASUDA, M. et al. Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats. **Hepatology**, New York, v. 29, p. 719-727, 1999.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 74, p. 139-162, 1994.

ZAMIN JR., I. et al. The Vitamin E reduces liver lipoperoxidation and fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 47, p. 86-92, 2010.