



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

NATALIA SANTANIELO SILVA MAGOSSO

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE FORÇA E DA REPOSIÇÃO HORMONAL NO
MECANISMO DE AÇÃO DE IRISINA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**SÃO CARLOS
2015**

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE FORÇA E DA REPOSIÇÃO HORMONAL NO
MECANISMO DE AÇÃO DE IRISINA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

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

NATALIA SANTANIELO SILVA MAGOSSO

**EFEITOS DO TREINAMENTO DE FORÇA E DA REPOSIÇÃO HORMONAL NO
MECANISMO DE AÇÃO DE IRISINA DE RATAS OVARIETOMIZADAS**

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

Área de concentração: Fisiologia do Exercício.
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez.

**SÃO CARLOS
2015**

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

M211et Magosso, Natalia Santanielo Silva.
Efeitos do treinamento de força e da reposição hormonal
no mecanismo de ação de irisina de ratas ovariectomizadas
/ Natalia Santanielo Silva Magosso. -- São Carlos : UFSCar,
2015.
54 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

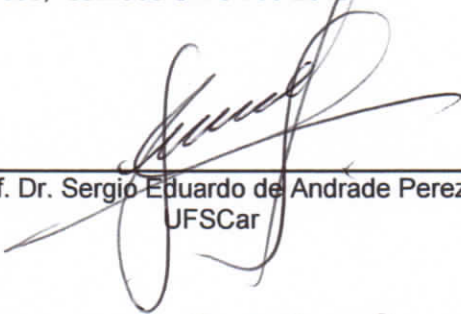
1. Fisiologia. 2. Ovariectomia. 3. Terapia de reposição
hormonal. 4. Treinamento de força. 5. Irisina. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

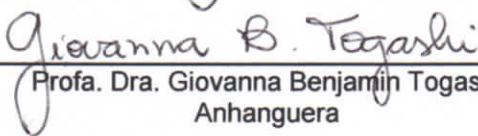


Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Natalia Santanielo Silva Magosso, realizada em 04/09/2015:



Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez
UFSCar



Profa. Dra. Giovanna Benjamin Togashi
Anhanguera



Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo
UFSCar

Dedico este trabalho aos meus pais, Marcelo e Dulce, que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e me apoiaram muito para que eu pudesse realiza-los. Ao meu marido, Rodrigo, por ter permanecido meu lado, me incentivando a percorrer este caminho, por compartilhar angústias e dúvidas estendendo sua mão amiga em momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais, Marcelo e Dulce e aos meus irmãos, Marcela e Rogerio, infinito agradecimento, pelo amor, paciência, incentivo, apoio, confiança e motivação incondicional. Que sempre me impulsionam em direção às vitórias dos meus desafios.

Ao meu marido, Rodrigo, por ser meu porto seguro, pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão, respeito e tolerância. O seu amor e suas atitudes me dão forças para continuar.

Ao meu orientador Prof. Sergio Eduardo de Andrade Perez, pela liberdade e confiança referente ao presente trabalho, além da indiscutível amizade e compreensão em momentos difíceis.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Fisiologia do Exercício Cristiani, Luciane, Marina, Maria Fernanda, Fernanda Anderson, Mateus, Markus, Fabiano, Gustavo, Jefferson, por todos os momentos, pelos ensinamentos, troca de experiências, amizade conversas e risadas.

À professora Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo por sempre abrir as portas do seu laboratório quando eu mais precisei. Aos alunos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Sabrina Peviani Messa, Vinicius Guzzoni, Uliana Stotzer, e aluna do Laboratório de Metabolismo e Nutrição aplicados ao exercício Cynthia Castro, pelos ensinamentos, ajudas nas análises moleculares e conversas. Vocês foram muito importantes para o desenvolvimento do meu trabalho.

À Fapesp, pela bolsa e pelo financiamento do projeto, que proporcionaram a realização deste mestrado.

*E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte,
e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.*

William Shakespeare

RESUMO

A redução da concentração de estrógeno, situação fisiológica do envelhecimento feminino, além de alterações como aumento do risco de doença coronariana, perda de massa muscular e perda de massa óssea, também está associada a alterações da composição de gordura. Estudos do nosso laboratório de pesquisa mostram que o TF produz benefícios como aumento da quantidade de massa magra, controle glicêmico e redução do conteúdo de lipídeos no fígado e nos músculos. A Irisina é conhecida por ser um potencial alvo terapêutico em doenças metabólicas, incluindo a obesidade, e os seus mecanismos moleculares iniciam através do exercício físico. **Objetivo:** Investigar os efeitos do TF e da RH nos níveis plasmáticos de Irisina, expressão gênica e proteica de fatores envolvidos na ação de Irisina em ratas ovariectomizadas. **Metodologia:** 66 ratas Holtzman foram randomicamente distribuídas em seis grupos experimentais: 1) Sham-Sed; 2) Sham-TF; 3) Ovx-Sed; 4) Ovx-TF; 5) Ovx-Sed-RH; 6) Ovx-TF-RH. O protocolo TF exigiu dos animais a escalada vertical de 1,1 m com pesos atados às suas caudas. Cada sessão consistiu de 4 a 8 escaladas, com intervalo de 2 minutos entre as escaladas, realizadas uma vez a cada três dias durante 12 semanas. As análises de expressão de RNAm de PGC1- α , FNDC5 e UCP1 foram realizadas por PCR-RT pelo método $\Delta\Delta Ct$, as análises de expressão proteica de FNDC5 e UCP1 foram realizadas pela técnica de Western Blotting e as análises de concentração de Irisina e 17 β -estradiol foram determinadas por ELISA. **Resultados:** Os nossos resultados indicam que os grupos Sham, Ovx e RH que realizaram 12 semanas de TF apresentaram respostas positivas no mecanismo de ação de Irisina, apresentando maior expressão de RNAm de PGC-1 α no musculo gastrocnêmio, maior expressão proteica de FNDC5, maior concentração de Irisina no plasma e maior expressão proteica de UCP1 na gordura mesentérica. **Conclusão:** As ratas ovariectomizadas apresentaram menor concentração circulante Irisina, que favorecem o escurecimento do tecido adiposo branco, porém, o TF por 12 semanas foi uma estratégia de intervenção eficaz para apresentar maior concentração circulante de Irisina em ratas intactas e ovariectomizadas. E o TF associado à RH foi uma estratégia de intervenção eficaz para apresentar maior concentração circulante de Irisina em ovariectomizadas.

Palavras chaves: ovariectomia, reposição hormonal, treinamento de força, irisina.

ABSTRACT

The reduction in estrogen concentration, a physiological situation of the female aging, in addition to changes such as increased risk of coronary heart disease, loss of muscle mass and loss of bone mass is also associated with changes in fat composition. Studies from our research laboratory show that ST produces benefits such as increasing the amount of lean body mass, glucose control and reduced lipid content in the liver and muscles. Irisin is known to be a potential therapeutic target in metabolic diseases, including obesity, and its molecular mechanisms are initiated through exercise. **Objective:** To investigate the effects of ST and HR in plasma levels of Irisin, gene and protein expression of factors involved in the action of Irisin in ovariectomized rats. **Methods:** 66 rats Holtzman were randomly divided into six groups: 1) Sham-Sed; 2) Sham-ST; 3) Ovx-Sed; 4) Ovx-ST; 5) Ovx-Sed-RH; 6) Ovx-ST-RH. The ST protocol required the animals to climb a 1.1 m-long vertical ladder with weights attached to their tails. Each session consisted of 4 to 8 climbs with 2 minutes interval between climbing, performed once every three days for 12 weeks. Analyses of PGC1- α mRNA expression, and FNDC5 and UCP1 were performed by RT-PCR $\Delta\Delta C_t$ method, protein expression analysis of FNDC5 and UCP1 were performed by the Western blotting technique, Irisin and 17 β -estradiol levels were determined by ELISA. **Results:** Our results show that the Sham, Ovx and HR groups who underwent 12 weeks of ST had a higher expression of the Irisin action mechanism, with higher mRNA expression of PGC-1 α in the gastrocnemius muscle, increased protein expression FNDC5, higher Irisin concentration in the plasma and increased protein expression of UCP1 in mesenteric fat. **Conclusion:** Ovariectomized rats had lower circulating concentration Irisin, which promotes browning of white adipose tissue, however, the ST for 12 weeks was an effective intervention strategy to contain higher circulating concentration of Irisin in intact and ovariectomized rats. And the TF associated with RH was an effective intervention strategy to contain higher circulating concentration of Irisin in ovariectomized.

Key words: ovariectomy, hormone replacement therapy, strength training, irisin.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Organograma dos grupos experimentais.....	19
Figura 2. Desenho Experimental	20
Figura 3. Modelo Experimental. Dimensões da Escalada Utilizada.	22
Figura 4. Capacidade máxima de Carregamento.....	23
Figura 5. Sessões de Treinamento de Força.	24
Figura 6. Exemplo de um gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio indicando a integridade do RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 28S e 18S.....	26
Gráfico 7. Exemplo de curva de MELT original representativa dos ciclos do PCR-RT no tecido muscular (Gastrocnêmio). (A) GAPDH, (B) PGC-1 α , (C) FNDC5.....	28
Gráfico 8. Exemplo de curva de MELT original representativa dos ciclos do PCR-RT no tecido adiposo (Gordura Mesentérica). (A) GAPDH, (B) UCP1.....	29
Gráfico 9. Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT no tecido muscular (Gastrocnêmio). (A) GAPDH e (B) PGC-1 α	29
Gráfico 10. Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT no tecido muscular (Gastrocnêmio). (A) GAPDH e (B) UCP1.	29
Gráfico 11. Carga máxima de carregamento nos grupos Sham-TF, Ovx-TF e Ovx-TF-RH. Os dados estão apresentados em média \pm erro padrão. p<0,05 comparado ao grupo *Semana 1; #Semana 4; @Semana 8; \$Semana 12.....	35
Gráfico 12. Expressão de RNAm de PGC-1 α /GAPDH no músculo gastrocnêmio. p<0,05 comparado ao grupo *Sham-Sed; #Sham-TF; @Ovx-Sed; \$OvxTr, &Ovx-RH (n = 6). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RH: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força.	36
Gráfico 13. Expressão de RNAm de FNDC5/GAPDH no músculo gastrocnêmio. p<0,05 comparado ao grupo @Ovx-Sed (n = 6). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RH: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força.	37
Gráfico 14. Expressão Proteica de FNDC5/GAPDH no músculo gastrocnêmio. p<0,05 comparado ao grupo *Sham-Sed; @Ovx-Sed; \$OvxTr; &Ovx-RH (n = 4). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RH: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força.....	38
Gráfico 15. Expressão de RNAm de UCP1/GAPDH na gordura mesentérica. p<0,05 comparado ao grupo *Sham-Sed; @Ovx-Sed (n = 6). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RH: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força.	39

Gráfico 16. Expressão Proteica de UCP1/GAPDH na gordura mesentérica. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Sham-Sed; #Sham-TF; @Ovx-Sed; \$OvxTr; &Ovx-RH (n = 4). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RF: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força. 40

Gráfico 17. Concentração de Irisina (ng/ml) no plasma. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Sham-Sed; #Sham-TF; @Ovx-Sed; \$Ovx-TF; &Ovx-RH (n = 4). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RH: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força. 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos <i>primers</i> usados para PCR-RT.....	27
Tabela 2. Efeitos da Ovariectomia, Treinamento de Força e Reposição Hormonal nos parâmetros dimensionais.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

FNDC5: Fibronectintype III Domain-Containingprotein 5

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

IMC: Índice de Massa Corporal

Ovx: Ovariectomizado

Ovx-Sed: Ovariectomizado Sedentário

Ovx-Sed-RH: Ovariectomizado Sedentário com Reposição Hormonal

Ovx-TF: Ovariectomizado Treinamento de Força

Ovx-TF-RH: Ovariectomizado Treinamento de Força com Reposição Hormonal

PGC1- α : *PeroxisomeProliferator-Activated Receptor-GammaCoactivator 1 alpha*

RH: Reposição Hormonal

RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro

Sham-Sed: Sham operado Sedentário

Sham-TF: Sham operado Treinamento de Força

TF: Treinamento de Força

TRH: Tratamento de Reposição Hormonal

UCP1: *Uncoupling Protein 1*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	HIPÓTESE	18
3	OBJETIVOS.....	18
2.1	Geral.....	18
2.2	Específicos	18
3	METODOLOGIA	19
3.1	Animais e condições experimentais.....	19
3.2	Grupos Experimentais.....	19
3.2.1	Grupos Sham (Pseudo Ovariectomizado)	20
3.3	Procedimentos Cirúrgicos	21
3.4	Reposição Hormonal (RH)	21
3.5	Treinamento de Força (TR)	21
3.6	Sacrifício dos animais e retirada dos tecidos	24
3.7	Expressão Gênica (RNAm)	25
3.7.1	Homogeneização da amostra para expressão gênica.....	25
3.7.2	Extração do RNA	25
3.7.3	Quantificação do RNA	25
3.7.4	Análise da integridade do RNA total.....	26
3.7.5	Tratamento com DNase	26
3.7.6	Reação de transcrição reversa (RT).....	27
3.7.7	Construção dos primers.....	27
3.7.8	PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR).....	28
3.8	Western Blotting: análise do conteúdo protéico	30
3.8.1	Homogeneização da amostra para <i>Western Blotting</i>	30
3.8.2	Determinação da concentração de proteínas totais.....	30
3.8.3	Tratamento das amostras e separação das proteínas por eletroforese	30
3.8.4	Incubação com anticorpo primário e secundário.....	31
3.8.5	Revelação e densitometria das bandas.....	31
3.9	Determinação por ELISA da concentração de Irisina no plasma	32
3.10	Determinação por ELISA da concentração de 17 β -estradiol no soro.....	32
3.11	Análise Estatística.....	32
4	RESULTADOS	33

4.1	Parâmetros Dimensionais	33
4.2	Carga Máxima de Carregamento	34
4.3	Efeito do Treinamento de Força no mecanismo de ação da Irisina	35
4.4	40
4.5	Irisina Circulante.....	40
5	DISCUSSÃO.....	42
6	CONCLUSÕES:	46
7	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A redução da concentração de estrógeno, situação fisiológica do envelhecimento feminino, além das alterações tais como aumento do risco de doença coronariana (SCARABIN-CARRE *et al.*, 2012; ROUTLEDGE *et al.*, 2015), perda de massa muscular (sarcopenia) (SIROLA e KROGER, 2011; MAGGIO *et al.*, 2013) perda de massa óssea (osteoporose) (RACHNER *et al.*, 2011; SIROLA e KROGER, 2011), também está associada a alterações da composição de gordura (SAHA *et al.*, 2013), sendo uma problemática de grande importância para saúde pública (AWA *et al.*, 2012; WIETLISBACH *et al.*, 2013), uma vez que a obesidade está associada ao risco de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 (GREGOR e HOTAMISLIGIL, 2011) e esteatose hepática não alcoólica (POLYZOS *et al.*, 2009).

O crescimento da população com sobrepeso e obesa é um fenômeno mundial, onde as modificações ocorrem de forma radical e bastante acelerada. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2014, 39% dos adultos com idade maior de 18 anos estavam com sobrepeso (IMC ≥ 25 kg / m²) (39% dos homens e 40% das mulheres) e 13% eram obesos (IMC ≥ 30 kg / m²) (11% dos homens e 15% das mulheres).

A obesidade é caracterizada pelo aumento da massa gorda, porém, nem todos os depósitos de gordura são iguais. Tradicionalmente, o tecido adiposo é composto por duas formas distintas, tecido adiposo branco e marrom. O tecido adiposo branco é especializado em armazenar energia na forma de triglicerol (TRAYHURN, 2013), fornecendo substrato para outros tecidos, tais como o músculo durante o jejum e os períodos de alta demanda energética. Já o tecido adiposo marrom é especializado na produção de calor, alimentado principalmente pela oxidação de ácidos graxos, através da presença de uma específica "proteína de desacoplamento", a UCP1 (*Uncoupling Protein 1*) mitocondrial, importante em promover o desacoplamento mitocondrial entre a cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa (FRITAH *et al.*, 2012). A geração de calor através do tecido adiposo marrom pode ser gerada por efeitos termorreguladores para permitir a manutenção da temperatura do corpo (CANNON e NEDERGAARD, 2004; HARMS e SEALE, 2013; HUH *et al.*, 2014) e peso corporal.

Atualmente, existe uma crescente busca pela compreensão dos mecanismos fisiológicos e dos efeitos deletérios associados à redução da concentração de estrógeno. O Tratamento de Reposição Hormonal (TRH) e o exercício físico têm sido recomendados para reduzir ou minimizar os efeitos deletérios da redução da concentração de estrógeno (TAYLOR, 1997; STEINBERG *et al.*, 2003). O TRH é uma estratégia farmacológica amplamente utilizada

(CANDERELLI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007), porém, estudos mostram que quanto maior o tempo de uso do TRH maior a incidência de câncer (OLSON *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007).

Alguns autores enfatizam o exercício físico como estratégia não farmacológica para prevenir e reduzir os efeitos deletérios da menopausa (CORRIVEAU *et al.*, 2008). Dentre as modalidades de exercício, o Treinamento de Força (TF) tem sido associado ao aumento da força, massa muscular e óssea (BARRY e CARSON, 2004), contribuindo ainda mais na prevenção e tratamento das alterações cardiovasculares e metabólicas ocorridas durante a menopausa.

Em estudos experimentais com ratos, a menopausa é mimetizada por uma técnica chamada Ovariectomia (PRESTES *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2012; SHIGUEMOTO *et al.*, 2012), que produz efeitos como fibrose cardíaca (LEE TM *et al.*, 2014), perda de massa muscular (sarcopenia) (BUNRATSAMI *et al.*, 2015), perda da densidade óssea (SHIGUEMOTO *et al.*, 2012), aumento da massa corporal e aumento do tecido adiposo corporal (JUNG *et al.*, 2014), assim como a menopausa. Em ratas ovariectomizadas, um programa de 12 semanas de TF produz benefícios como aumento da quantidade de massa magra, da função cardíaca, da sensibilidade à insulina e no controle glicêmico (LEITE *et al.*, 2010), além de redução do conteúdo de lipídeos no fígado e nos músculos sóleo e tibial anterior (PRESTES *et al.*, 2009).

O exercício físico estimula o músculo esquelético a produzir e liberar miocinas que possuem funções endócrinas (PEDERSEN e FEBBRAIO, 2012). Estas miocinas participam como mensageiras do músculo, fígado, tecido adiposo, coração, cérebro, e vasos sanguíneos (PEDERSEN, 2012). Dentre estas miocinas está a irisina, cuja concentração aumenta durante o exercício físico, levando à geração de calor (BOSTROM *et al.*, 2012). Os mecanismos moleculares da Irisina são iniciados pelo exercício físico, que induz o aumento da expressão de PGC1- α (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator 1 alpha*) no músculo, esse aumento é acompanhado por uma maior expressão de FNDC5 (Fibronectintype III Domain-Containingprotein 5). O FNDC5 é clivado, liberando na circulação sanguínea a Irisina, que se liga a um receptor ou receptores (não identificado) na superfície de adipócitos de gordura branca. Essa ligação regula positivamente a liberação de UCP1. A regulação positiva de UCP1 provoca um desacoplamento da respiração mitocondrial, promovendo a perda de energia na forma de calor (BOSTROM *et al.*, 2012; CASTILLO-QUAN, 2012; WU *et al.*, 2012). Contudo, a Irisina pode desempenhar um importante papel protetor nas desordens metabólicas, tais como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo

2 e esteatose hepática. Além disso, pela redução da obesidade e processos inflamatórios que a permeiam, a Irisina pode ter um papel potencial no tratamento da osteoporose e doenças neurodegenerativas (SANCHIS-GOMAR *et al.*, 2012; DUN *et al.*, 2013). No caso de animais experimentais confinados em pequenas caixas, o exercício físico se torna um dos grandes componentes do gasto energético da atividade física.

Tendo em vista que a redução de estrógeno é um grande precursor de doenças metabólicas, e a Irisina é um potencial alvo terapêutico em doenças metabólicas, incluindo a obesidade, é de fundamental importância o estudo de diferentes estratégias que podem levar à sua liberação podendo minimizar ou até mesmo reverter os efeitos deletérios da ovariectomia.

2 HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho foi que ratas do grupo Ovx apresentariam menor concentração de irisina, porém, o TF por 12 semanas, seria uma estratégia de intervenção eficaz para apresentar maior concentração circulante de irisina em ratas intactas e ovariectomizadas. A RH também seria uma estratégia eficaz para apresentar maior concentração circulante de irisina, porém, a associação do TF com a RH, seriam uma estratégia de intervenção com maior eficácia para apresentar maior concentração circulante de irisina em ratas ovariectomizadas.

3 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos do TF e da RH nos níveis plasmáticos de irisina e a expressão gênica e proteica de fatores envolvidos na sua ação em ratas ovariectomizadas.

2.2 Específicos

Analisar os efeitos do TF e da RH em ratas ovariectomizadas sobre:

- Níveis plasmáticos de 17β Estradiol;
- Níveis plasmáticos de irisina;
- Expressão gênica de PGC1 α no músculo gastrocnêmio;
- Expressão gênica de FNDC5 no músculo gastrocnêmio;
- Expressão gênica de UCP1 na gordura mesentérica;
- Expressão proteica do FNDC5 no músculo gastrocnêmio;
- Expressão proteica de UCP1 na gordura mesentérica.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizadas 66 ratas Holtzman, adultas, obtidas do biotério da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araraquara. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro ratas por gaiola) no biotério do laboratório de Fisiologia do Exercício do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) sob condições constantes de temperatura (22 ± 2 °C), iluminação em ciclo invertido (20h00min-08h00min claro; 08h00min-20h00min escuro) e oferta de água e dieta *ad libitum*. Todos os animais, após chegada ao biotério, permaneceram por três semanas em condição de aclimação. Após este período, os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Ufscar (CEUA), protocolo n°. 005/2013. Todos os procedimentos com animais foram conduzidos de acordo com o Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (National Research Council, 1996).

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram randomicamente distribuídos em seis grupos experimentais: 1) Sham operado Sedentário (Sham-Sed); 2) Sham operado Treinamento de Força (Sham-TF); 3) Ovariectomizado Sedentário (Ovx-Sed); 4) Ovariectomizado Treinamento de Força (Ovx-TF); 5) Ovariectomizado Sedentário Reposição Hormonal (Ovx-Sed-RH); 6) Ovariectomizado Reposição Hormonal e Treinamento de Força (Ovx-TF-RH) (Figura 1).

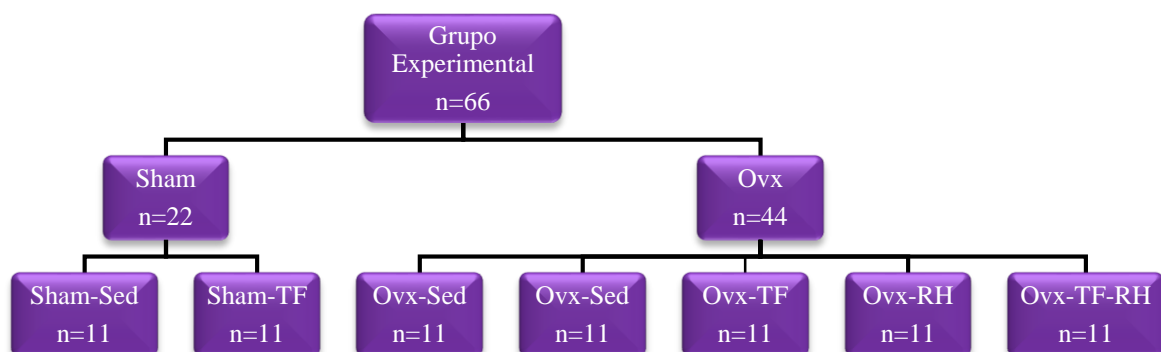


Figura 1. Organograma dos grupos experimentais

3.2.1 Grupos Sham (Pseudo Ovariectomizado)

Os animais dos grupos Sham (Sham-Sed e Sham-TF) foram submetidos a uma pseudo ovariectomia, procedimento que mimetiza o procedimento cirúrgico da ovariectomia, porém, após exposto, o ovário é recolocado intacto ao seu local natural.

3.2.2 Grupos Ovariectomizadas

Os animais dos grupos Ovx (Ovx-Sed e Ovx-TF) foram submetidos à cirurgia bilateral de remoção dos ovários (ovariectomia) como será descrito adiante.

3.2.3 Grupos Reposição hormonal

Os animais dos grupos RH (Ovx-RH e Ovx-TF-RH) receberam implantes de capsulas silastics subcutaneamente com uma solução de óleo-17 β -estradiol após uma semana do procedimento cirúrgico da ovariectomia, e um reimplante de capsulas silastics subcutaneamente com uma solução de óleo-17 β -estradiol foi realizado após sete semanas do procedimento cirúrgico da ovariectomia.

Os animais treinados (Sham-TF, Ovx-TF e Ovx-TF-RH) realizaram 12 semanas de Treinamento de Força. O Treinamento de Força iniciou ao mesmo tempo, para cada grupo, e será descrito a seguir. Os animais foram sacrificados 48 horas após a última sessão do Treinamento de Força (Figura 2).

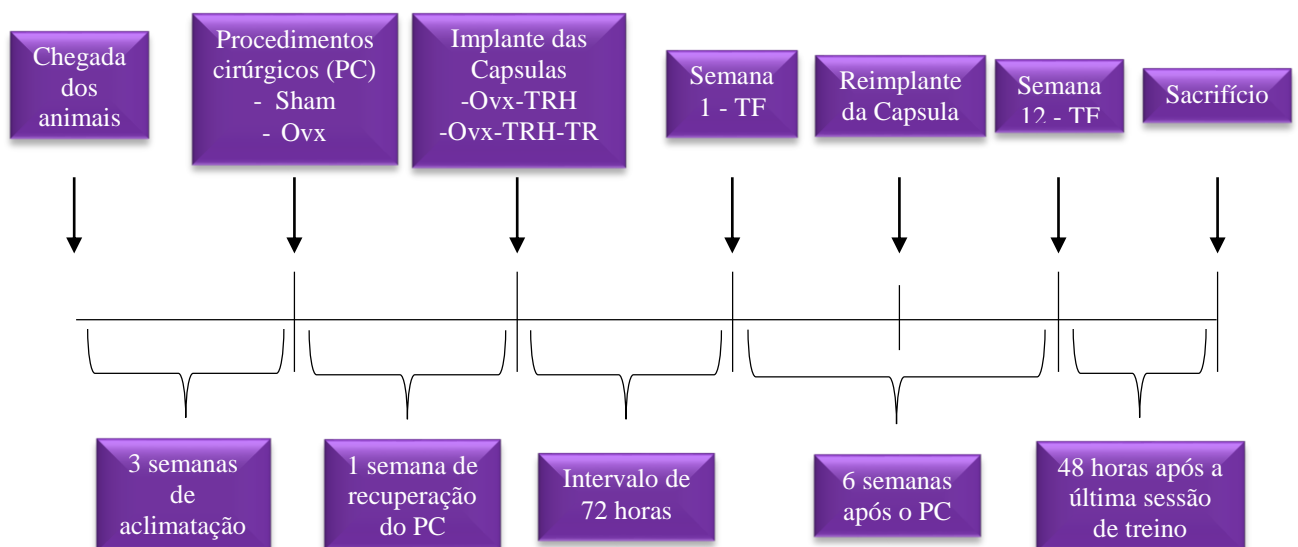


Figura 2. Desenho Experimental

3.3 Procedimentos Cirúrgicos

As ratas dos grupos Ovx e Sham foram submetidas a operação quando alcançaram 250g de massa corporal, de acordo com a técnica proposta por (KALU, 1991). Durante todos os procedimentos da ovariectomia as ratas foram mantidas sobre o efeito anestésico proporcionado pela Ketamina-Xilazina (61,5-7,6 mg/kg, intraperitoneal). A sham operação foi realizada através dos mesmos procedimentos do grupo Ovx, porém os ovários não foram removidos, e sim apenas expostos e devolvidos ao local de origem. Os animais do grupo Ovx tiveram seus ovários removidos. Foi respeitado um período de 1 semana de recuperação pós-cirurgia para dar início aos procedimentos do protocolo de Treinamento de Força. Todos os animais tiveram o mesmo tempo de exposição para os procedimentos cirúrgicos até a data do sacrifício (92 dias).

3.4 Reposição Hormonal (RH)

Os animais do grupo Reposição Hormonal (Ovx-Sed-RH e Ovx-TF-RH) receberam implantes de capsulas silastics subcutaneamente de acordo com a técnica descrita por STROM *et al.* (2008). As cápsulas Silastic são segmentos de 30mm de tubo de Silastic (diâmetro interno/externo 1,02/2,16mm), o veículo utilizado foi o óleo de girassol placebo e solução com o hormônio (5% - 50mg de 17b-estradiol/mL). Com auxílio da régua mediu-se 1,5 cm da cânula de Silastic e cortou-se os pedaços. Pipetou-se 10uL da solução com hormônio em cada cápsula Silastic, selou os dois lados com a cola Silastic, resultando em uma coluna de óleo-17b-estradiol. As cápsulas foram armazenadas 24h para secagem da cola. Após a secagem, foram mantidas em solução fisiológica (Salina, 0,9%) por 2h. Antes da implantação as cápsulas foram cuidadosamente lavadas. A implantação da cápsula foi feita através de uma incisão de 0,5 cm no dorso das ratas utilizando uma pinça. Após a incisão foi realizada a sutura. Segundo STROM *et al.* (2008) esta administração 17b-estradiol produz níveis séricos fisiológicos de hormônios, significativamente diferente a Ovx. Para o implante das capsulas, as ratas foram anestesiadas com uma mistura de Ketamina-Xilazina (61,5-7,6 mg/kg, intraperitoneal).

3.5 Treinamento de Força (TR)

Inicialmente, as ratas foram familiarizadas ao protocolo de Treinamento de Força que exige que os animais escalem uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2-cm, inclinação de 80°) com o aparato de carga preso às suas caudas. O tamanho da escada fez com que os animais realizassem de 8 a 12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi preso à porção proximal da cauda com uma fita auto-adesiva. Com o aparato fixado à cauda, as ratas foram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada. Caso necessário, um estímulo com pinça foi aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento de escalada. No topo da escada as ratas alcançaram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram durante 2 minutos. Este procedimento foi repetido até que os animais consigam voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem a necessidade de estímulo (Figura 3).

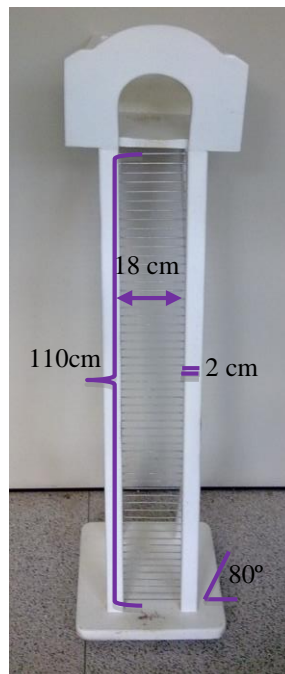


Figura 3. Modelo Experimental. Dimensões da Escalada Utilizada.

Três dias após a familiarização, a primeira sessão de treinamento consistiu de 4 a 8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas. Para a primeira escalada o animal deveria carregar uma carga de 75% da sua massa corporal. Após 2 minutos de recuperação, a segunda escalada foi realizada com a adição de uma carga de 30g. Este acréscimo de carga (+ 30g) foi repetido consecutivamente em cada escalada até uma carga com a qual a rata não conseguisse escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguiu progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento da rata (Figura 4).

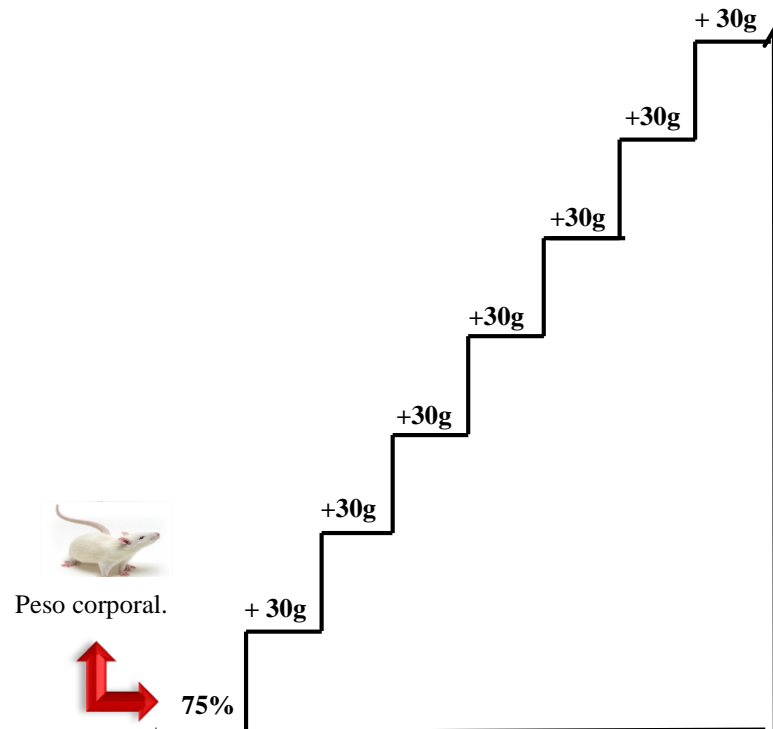


Figura 4. Capacidade máxima de Carregamento.

As sessões de treinamento foram realizadas uma vez a cada três dias e consistiram de quatro escaladas na escada, com 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subsequentes foram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada. Esta padronização de sessões de treinamento foi realizada durante 12 semanas de treino, totalizando 27 sessões de Treinamento de Força (Figura 5). O protocolo de Treinamento de Força foi adaptado conforme descrito por PRESTES *et al.* (2009).

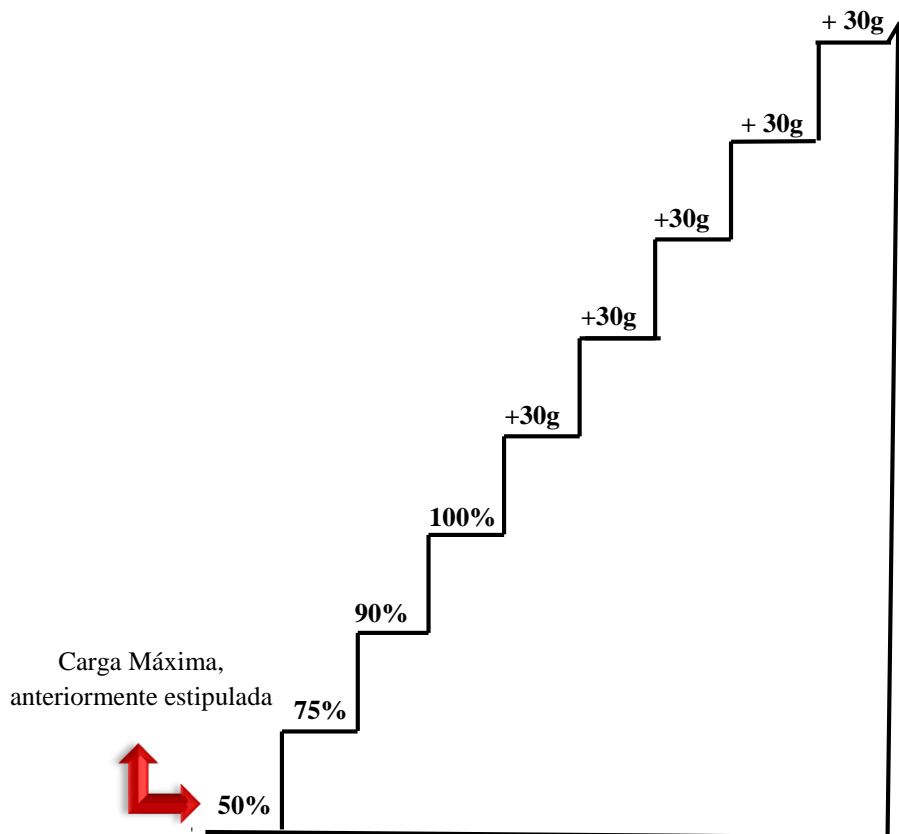


Figura 5. Sessões de Treinamento de Força.

3.6 Sacrifício dos animais e retirada dos tecidos

Ao término do período experimental os animais foram sacrificados por decapitação. Os grupos do treinamento foram sacrificados 48 horas após a última sessão de treino e os grupos Sham foram sacrificados no mesmo período. O músculo gastrocnêmio esquerdo, a gordura mesentérica e o sangue foram retirados e armazenados. Tanto o tecido muscular quanto as gorduras foram armazenadas primeiramente no nitrogênio e em seguida no freezer -80°C .

Foram coletados 8ml de sangue, dos quais 4ml foram colocados em um tubo a vácuo 13x75mm com EDTA k3 e centrifugados (3000rpm por 10 minuto em 4°C). O plasma obtido (sobrenadante) foi retirado e armazenado a -20°C . O restante do sangue foi colocado em um tubo falcon (15ml) e centrifugado (3000rpm por 10 minuto em 4°C). O soro obtido (sobrenadante) foi retirado e armazenado a -20°C .

3.7 Expressão Gênica (RNAm)

Para possibilitar a integridade da molécula de RNA, a extração do RNA foi obtida pelo método do isotiocianato de guanidina, em meio ácido com Trizol conforme recomendações do fabricante. O produto comercial utilizado foi o TRIzol® (*Invitrogen, Carlsbad, California, USA*).

3.7.1 Homogeneização da amostra para expressão gênica

Para o processo de homogeneização, primeiramente realizaram-se cortes de aproximadamente 100mg no tecido ainda congelado no gelo e em seguida adicionados em tubo de ensaio de vidro com TRIzol® (1 mL/100 mg do tecido). A homogeneização foi realizada com homogeneizador de tecidos (Polytron - Fisher Scientific) (velocidade aproximada: 6 por 60 seg.). O homogenato foi recuperado em micro tubo do tipo *eppendorf*.

3.7.2 Extração do RNA

No homogenato em TRIzol®, acrescentou clorofórmio (200 µL/1mL de TRIzol®) e em seguida submetido a uma vigorosa agitação. A função do clorofórmio é separar as fases aquosas e lipídicas, pois dissolve lipídeos, permitindo a separação dos componentes hidro e lipofílicos. A mistura foi centrifugada (12000 rpm; 4°C; 15 minutos). A fase aquosa, correspondente a 60% do volume total, foi transferida a outro *eppendorf*, e em seguida adicionou-se o isopropanol (500 µL). Após a adição do Isopropanol, uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente foi realizada e em seguida, os mesmos foram centrifugados (12000 rpm; 4°C; 10 minutos). O sobrenadante resultante foi desprezado por inversão, e o *pellet* formado foi lavado com etanol a 75% e centrifugado (7000 rpm; 4°C; 5 minutos). O sobrenadante resultante foi desprezado novamente e o *pellet* foi colocado a temperatura ambiente para que o processo de secagem acontecesse. Após secagem, a ressuspensão do RNA foi feita em água DEPC (10µL) e mantido em gelo.

3.7.3 Quantificação do RNA

Posteriormente ao processo de Extração do RNA, a quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria (NanoDrop 2000 – *ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA*), através de 1 µl de cada amostra. Todas as amostras utilizadas tiveram a

razão 260nm/280nm acima de 1,8. Essa relação 260/280 ($\geq 1,8$) fornece uma estimativa da pureza do ácido nucléico (SAMBROOK *et al.*, 1989)

3.7.4 Análise da integridade do RNA total

Para verificar a integridade das amostras de RNA extraído, realizou-se uma eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,5% (p/v), (1,2 g de agarose; 8,0 ml de tampão de corrida 10x, composto de MOPS 20 mM pH 7,0, acetato de sódio 50 mM e EDTA 5 mM; 65 ml de água tratada com DEPC; 6,4 ml de formaldeído), por 40 minutos a 77 V constante, revelado com brometo de etídio. O gel foi exposto a uma luz ultravioleta em transiluminador por sistema de fotodocumentação. O RNA estoque foi armazenado a -80°C . A integridade do RNA foi confirmada pela visualização em luz ultravioleta do padrão de eletroforese das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal (Figura 6).

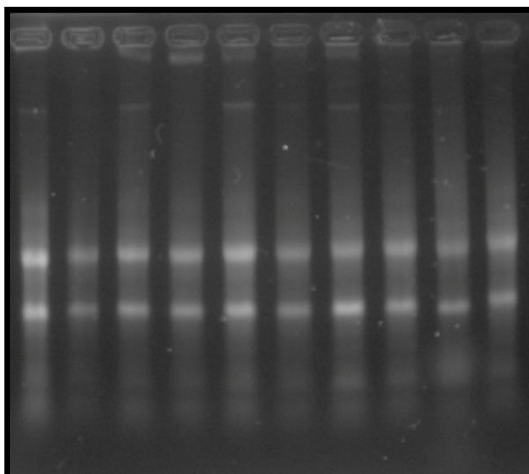


Figura 6. Exemplo de um gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio indicando a integridade do RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 28S e 18S.

3.7.5 Tratamento com DNase

Para impossibilitar possíveis contaminações do DNA genômico em análises futuras, as amostras foram tratadas com DNase I (Kit Invitrogen). Desse modo, para a realização do tratamento citado, adicionou-se em um eppendorf de 0,5mL: 1 μg de RNA; 1 μL de tampão de reação de DNase I (10x); 1 μL de DNase I 1U/ μL e água tratada com DEPC q.s.p. 10 μL . Em seguida, incubou-se a mistura por 15 minutos em temperatura ambiente e

posteriormente a DNase foi inativada por meio da adição de 1 μ L de EDTA (25mM) e aquecimento por 10 minutos a 65°C.

Para esta reação utilizou-se o kit SynthesiscDNA da Bio-Rad. Todos os passos para a confecção do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) seguiu as especificações do fabricante conforme a bula. O volume final produzido para cada amostra foi de 20 μ l. As amostras foram armazenadas no freezer -80°C.

3.7.6 Reação de transcrição reversa (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi obtida a partir de 1 μ g de RNA total extraído. Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit SynthesiscDNA da Bio-Rad (Cat. 170-8891): tampão (5X) (4 μ L), MgCl₂ (2,4 μ L), dNTP (500 μ M) (1 μ L) em H₂O-DEPC e enzima transcriptase reversa (1 μ L). A mistura citada foi incubada por 5 minutos a 25°C, seguida por aquecimento a 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos. Todos os passos para a confecção do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) seguiu as especificações do fabricante conforme a bula. O cDNA obtido foi armazenado a -80°C para futuras realização da reação de polimerização em cadeia (PCR) em tempo real.

3.7.7 Contrução dos primers

Foram utilizados *primers* apropriados para cada gene. Para os desenhos dos *primers* para PGC-1 α , FNDC5, UCP1 e GAPDH utilizou-se os dados da plataforma *Pubmed*. O Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) foi usado como um controle endógeno. As sequências e número de localização no *Pubmed* estão apontados na Tabela 01.

Tabela 1. Oligonucleotídeos *primers* usados para PCR-RT.

Gene	Forward Primer	Reverse primer	N. de acesso
PGC-1α	GGCCCGGTACAGTGAGTGTT	ATTGCTCCGGCCCTTCTT	NM_031347.1
FNDC5	CTCTTCATGTGGGCAGGTGTC	GCTGGTCTCTGATGCACTCTTG	NM_001270981.1
UCP1	GGCATCCAGAGGCAAATCAGC	CCAATGAATACCGCCACGCC	NM_012682.2
GAPDH	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG	GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA	NM_017008.3

PGC-1 α , *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator 1 alpha*; FNDC5, *Fibronectin type III Domain-Containing protein 5*; UCP1, *Uncoupling Protein 1*; GAPDH, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*.

3.7.8 PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)

A expressão dos genes de interesse foi quantificada por quantitativo RT-PCR, utilizando o aparelho CFX96touch™ sistema de detecção em tempo real e C1000™ ThermalCycler (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, Pennsylvania, USA) e o reagente SYBR Green (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) como marcador fluorescente. As reações foram realizadas em 15 µL de uma mistura contendo 1 µL do cDNA da amostra, 0,5 µL de cada *primer* (sense e anti-sense), 5,5 µL de água DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato, isenta de RNase) e 7,5 µL do *mix* SYBR Green PCR Master (dNTP, tampão de reação, Taq DNA polimerase e SYBER Green I) (Abgene Life Sciences, Epsom, KT, Inglaterra). Os ciclos consistiram de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 94°C por 15 segundos; temperatura de anelamento (T_m) 57-61°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. As condições de temperatura e concentração dos *primers* para a PCR em tempo real foram previamente estabelecidas para cada um dos genes de interesse. Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de MELT (Figura 7 e 8). Os valores de *thresholdcycle* (C_t) são os pontos onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com o menor número de ciclos durante a fase exponencial da amplificação (Figura 9 e 10).

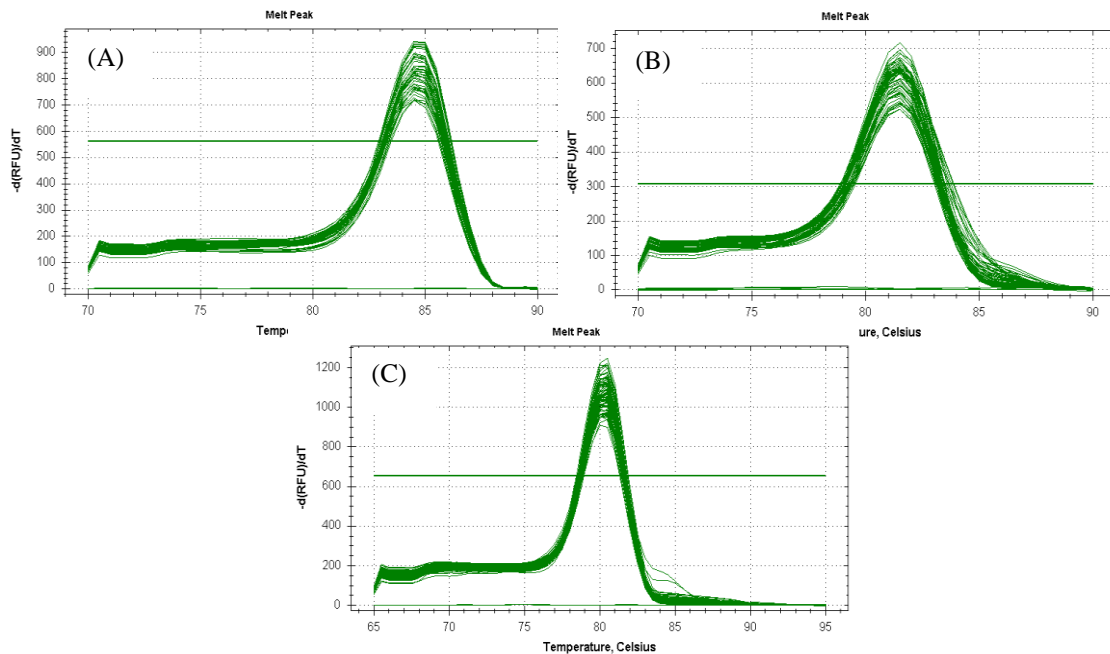


Gráfico 7. Exemplo de curva de MELT original representativa dos ciclos do PCR-RT no tecido muscular (Gastrocnêmio). (A) GAPDH, (B) PGC-1 α , (C) FNDC5.

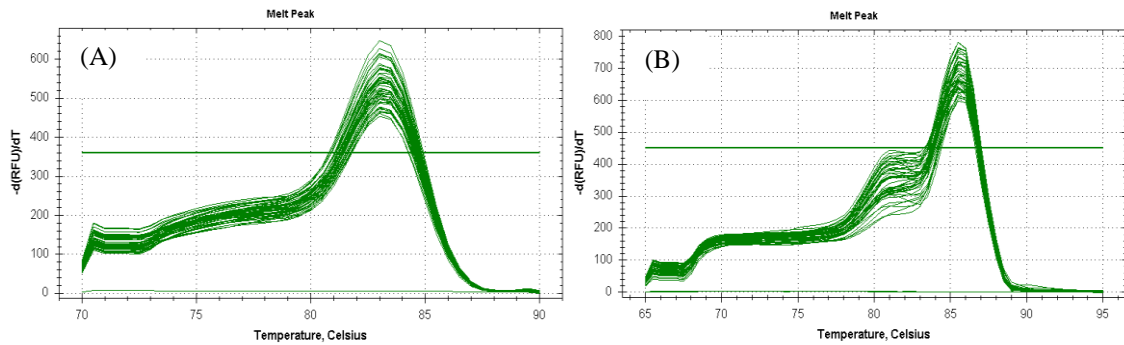


Gráfico 8. Exemplo de curva de MELT original representativa dos ciclos do PCR-RT no tecido adiposo (Gordura Mesentérica). (A) GAPDH, (B) UCP1.

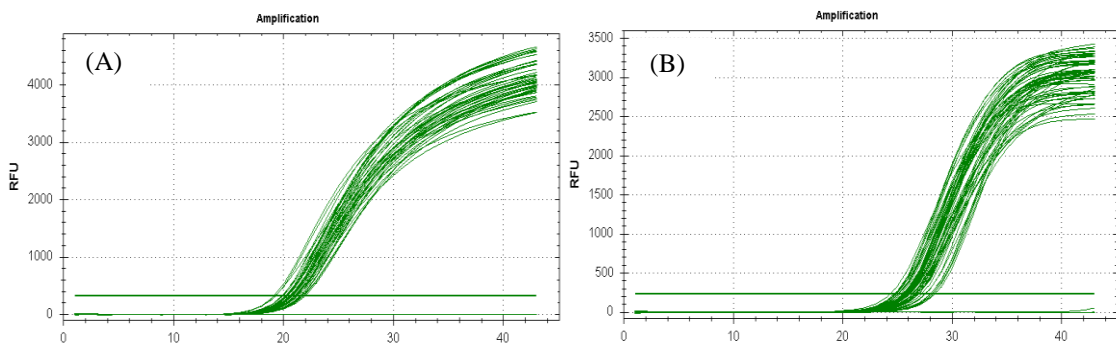


Gráfico 9. Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT no tecido muscular (Gastrocnêmio). (A) GAPDH e (B) PGC-1α.

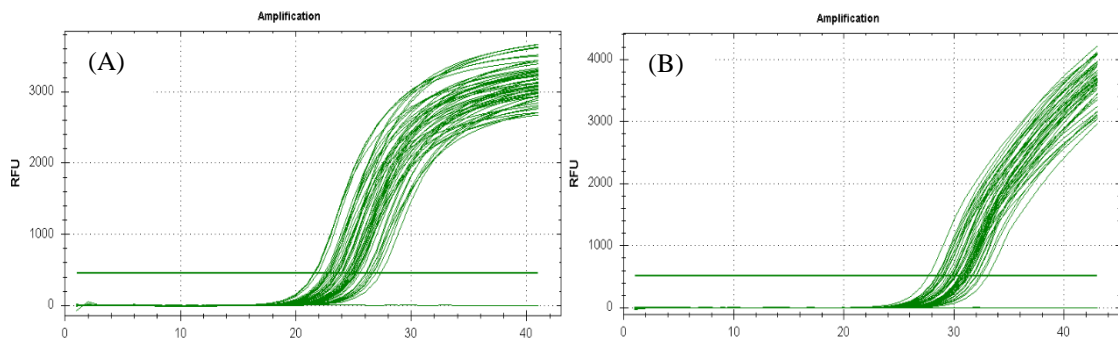


Gráfico 10. Exemplo de curva de amplificação original representativa dos ciclos do PCR-RT no tecido muscular (Gastrocnêmio). (A) GAPDH e (B) UCP1.

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

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

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

3.8 Western Blotting: análise do conteúdo protéico

3.8.1 Homogeneização da amostra para *Western Blotting*

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

3.8.2 Determinação da concentração de proteínas totais

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

3.8.3 Tratamento das amostras e separação das proteínas por eletroforese

As alíquotas do lisado de células foram ressuspensas em tampão de amostra Laemmli (1:4) e as proteínas (40µg) fracionadas por SDS-PAGE (12%). As proteínas fracionadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando tampão de transferência (Tris-HCl- 25 mM, glicina - 192 mM e metanol – 20%) e tensão de 100V. A transferência foi realizada no sistema úmido utilizando. Para avaliação da membrana foi realizada a incubação com Ponceau-S (5 minutos). Após a incubação com Ponceau-S, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com PBS-T. (PBS 1×, Tween-20 0,25%).

Em seguida, a membrana quando inseridas ao anticorpo da marca *Abcam*® foi bloqueada a temperatura ambiente por 4 horas em tampão PBS-T contendo leite desnatado Molico(5%), já a membrana quando inserida ao anticorpo da marca *CellSignaling Technology*® foi bloqueada a temperatura ambiente por 1 hora em tampão PBS-T contendo albumina (5%).

3.8.4 Incubação com anticorpo primário e secundário

As membranas foram incubadas overnight (4°C) com diluições adequadas dos respectivos anticorpos primários, conforme segue:

- Anti-FNDC5 (#174833- *Abcam*®): Foi diluído em 1:1.000, ou seja, 10ul do anticorpo foi diluído em 9,990ml de tampão PBS-T contendo leite desnatado Molico® (5%).
- Anti-UCP1 (#23841- *Abcam*®): A concentração da diluição foi 1:1.000, ou seja, 10ul do anticorpo foi diluído em 9,990ml de tampão PBS-T contendo leite desnatado Molico® (5%).
- Anti-GAPDH (#8245 - *Abcam*®): A concentração da diluição foi 1:10.000, ou seja, 1ul do anticorpo foi diluído em 9,999ml de tampão PBS-T contendo leite desnatado Molico® (5%).
- β -actin (#4970) (*CellSignaling Technology*®): A concentração da diluição foi 1:10.000, ou seja, 1ul do anticorpo foi diluído em 9,999ml de tampão PBS-T contendo albumina (5%).

Após a incubação do anticorpo primário em overnight, a membrana foi incubada com anticorpo secundário- anti-RabbitIgG(#A0545) por 2 horas. A concentração da diluição do anticorpo secundário foi 1:3.000, ou seja, 3,33ul do anticorpo foi diluído em 9,996,67ml de tampão PBS-T (PBS 1×, Tween-20 0,25%) conjugado com peroxidase, em PBS-T. Entre cada passo da incubação com anticorpo primário e secundário, foram realizadas três lavagens de 5 minutos com PBS-T.

3.8.5 Revelação e densitometria das bandas

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

o anti- β -actina foram utilizados como controle interno do anti-FNDC5 e anti-UCP1, respectivamente.

3.9 Determinação por ELISA da concentração de Irisina no plasma

O sangue foi coletado após a eutanásia dos animais e colocado em um tubo a vácuo 13x75mm com EDTA k3, o plasma foi separado por meio de centrifugação (3000 rpm por 10 minuto em 4°C). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C. A extração do peptídeo do plasma foi realizado de acordo com as especificações do fabricante (Buffer A - RK-BA-1; Buffer B - RK-BB-1 e 18 SEP-COLUMN - RK-SEPCOL-1). A dosagem da concentração da Irisina foi realizada por ELISA por meio do Kit comercial de acordo com as especificações do fabricante (EK-067-16, *Phoenix Pharmaceuticals, Inc*). Todas as amostras foram testadas em duplicada. A quantificação foi dada em relação à curva padrão com a utilização do modelo de regressão não linear de quatro parâmetros logística (4PL), comumente utilizada em ensaios biológicos ou imunoenaios, como ELISA.

3.10 Determinação por ELISA da concentração de 17 β -estradiol no soro

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

3.11 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Com as variáveis apresentando distribuição normal, foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way. Quando as médias dos grupos foram diferentes ($p \leq 005$), foi realizada a análise de post-hoc (Tukey). As análises estatísticas foram feitas usando o programa estatístico SPSS Statistics 17.0. As apresentações dos resultados foram feitas média \pm erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros Dimensionais

A ingestão alimentar foi analisada pelos seus valores médios nas semanas 1, 4, 8 e 12 após a semana da ovariectomia, onde não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 2).

Em relação à massa corporal, o grupo Ovx-Sed, apresentou maior massa corporal quando comparado ao grupo Sham-Sed (17,44%). Os grupos Ovx-RH e Ovx-TF-RH apresentaram menor massa corporal quando comparado ao grupo Ovx-Sed (14,60%, 11,93%). O grupo Ovx-RH também apresentou menor massa corporal quando comparado ao grupo Ovx-TF (8,69%) (Tabela 2).

Comprovando a eficiência da Ovariectomia, os grupos Ovx-Sed e Ovx-TF apresentaram menor massa uterina relativizada pela massa corporal quando comparados aos grupos Sham-Sed (89,11%) e Sham-TF (84,10%). Os grupos Ovx-RH e Ovx-TF-RH apresentaram maior massa uterina relativizada pela massa corporal quando comparados aos grupos Ovx-Sed (573,38% e 659,60%) e Ovx-TF (458,31% e 529,79%), respectivamente. (Tabela 2).

As análises do 17 β Estradiol mostraram que os grupos Ovx-Sed e Ovx-TF apresentaram menor concentração de 17 β Estradiol quando comparado aos grupos Sham-Sed (56,21% e 57,01%) e Sham-TF (56,31% e 57,09%), respectivamente. Porém, os grupos Sham-Sed e Sham-TF apresentaram menor concentração de 17 β Estradiol quando comparados aos grupos Ovx-RH (24,03% e 20,36%) e Ovx-TF-RH (23,80% e 20,14%), respectivamente (Tabela 2). Em relação aos grupos Ovx, os grupos Ovx-RH e Ovx-TF-RH apresentaram maior concentração de 17 β Estradiol quando comparados aos grupos Ovx-Sed (183,37% e 174,98%) e Ovx-TF (188,59% e 180,05%), respectivamente. Em relação aos grupos com RH, o grupo Ovx-TF-RH apresentou menor concentração de 17 β Estradiol quando comparado ao grupo Ovx-RH (2,96%) (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos da Ovariectomia, Treinamento de Força e Reposição Hormonal nos parâmetros dimensionais.

Grupos experimentais	Sham-Sed n=11	Sham-TF n=11	Ovx-Sed n=11	Ovx-TF n=11	Ovx-RH n=11	Ovx-TF-RH n=11
Ingestão Alimentar g/d	92,81±6,23	86,06±2,60	91,42±5,37	87,80±4,14	88,20±2,79	84,42±2,22
Massa Corporal (M.C) (g)	305,64±5,61	319,32±3,75	358,94±10,10 *	346,20±6,92	306,55±9,12 @ \$	316,12±6,36 @
Massa Uterina/M.C (mg/g)	2,30±0,18	1,90±0,11	0,25±0,01 *	0,30±0,02 #	1,69±0,05 @ \$	1,90±0,12 @. \$
17 β Estradiol (pg/ml)	34,05±0,14	34,13±0,12	14,91±0,25 *	14,63±0,63 #	42,25±0,83 *# @ \$	41,00±0,61 * # @ \$ &

Os dados estão apresentados em média ± erro padrão. Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RH: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força. p<0,05 comparado ao grupo *Sham-Sed; #Sham-TF; @Ovx-Sed; \$OvxTr; &Ovx-RH.

4.2 Carga Máxima de Carregamento

Durante as 12 semanas de treinamento, os grupos Sham-TF, Ovx-TF e Ovx-TF-RH apresentaram um aumento da capacidade de carga máxima de carregamento (Figura 11). No grupo Sham-TF as cargas de trabalho aumentaram após as semanas 4, 8 e 12 em comparação com a semana 1 (80,96%, 128,80% e 161,19%), e após as semanas 8 e 12 em comparação com a semana 4 (26,44% e 15,15%), respectivamente. No grupo Ovx-TF as cargas de trabalho aumentaram após as semanas 4, 8 e 12 em comparação com a semana 1 (110,11%, 146% e 182,71%), após as semanas 8 e 12 em comparação com a 4 (17,08% e 34,55%) e após a semana 12 em comparação com a semana 8 (14,92%), respectivamente. Em relação ao grupo Ovx-TF-RH as cargas de trabalho aumentaram após as semanas 4, 8 e 12 em comparação com a semana 1 (98,96%, 144,94% e 177,66%) e após as semanas 8 e 12 em comparação com a semana 4 (23,11% e 39,56%), respectivamente. No entanto, em relação à carga máxima de carregamento, não houve diferença significativa entre os grupos treinados (Sham-TF, Ovx-TF e Ovx-TF-RH) ao longo do período de 12 semanas.

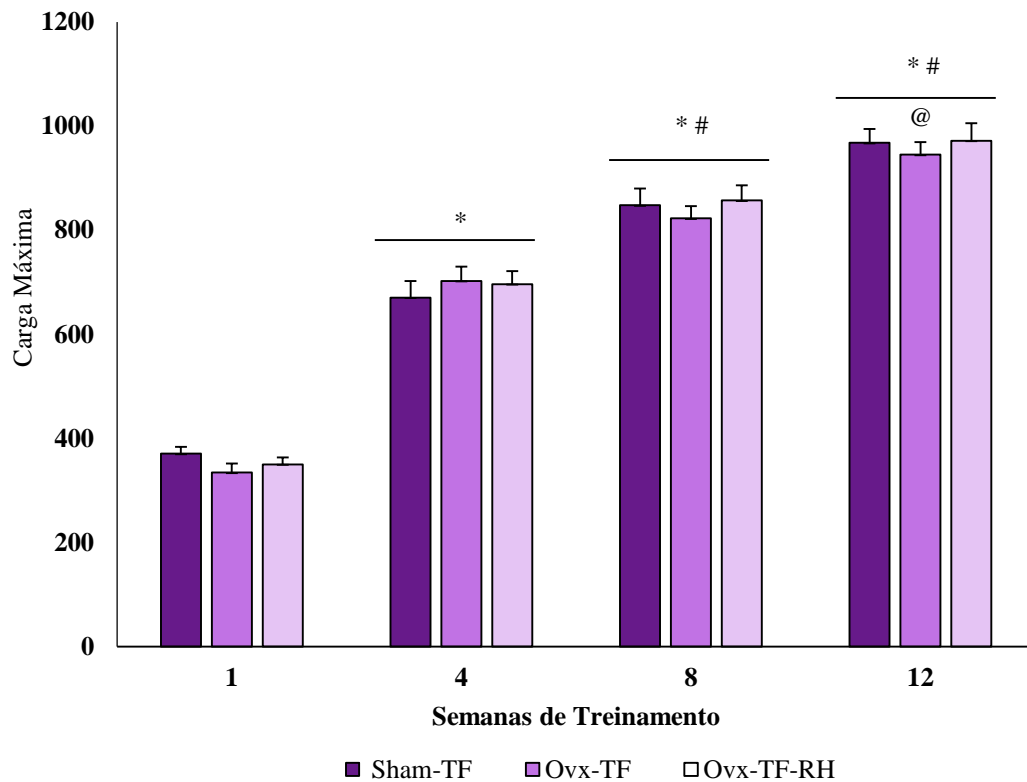


Gráfico 11. Carga máxima de carregamento nos grupos Sham-TF, Ovx-TF e Ovx-TF-RH. Os dados estão apresentados em média \pm erro padrão. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Semana 1; #Semana 4; @Semana 8; §Semana 12.

4.3 Efeito do Treinamento de Força no mecanismo de ação da Irisina

Os resultados de expressão de RNAm de PGC1- α , FNDC5 e UCP1 foram relativizados pela expressão de RNAm de GAPDH. A expressão de RNAm de PGC1- α no músculo gastrocnêmio, sugerida como reguladora chave da expressão FNDC5, foi menor no grupo Ovx-Sed quando comparado ao grupo Sham-Sed (28,70%). O grupo Ovx-TF apresentou menor expressão de RNAm de PGC1- α quando comparado ao grupo Sham-TF (46,47%). Os grupos Ovx-TF, Ovx-RH e Ovx-TF-RH apresentaram maior expressão de RNAm de PGC1- α quando comparados ao grupo Ovx-Sed (148%, 129,08% e 385,07%). O grupo Ovx-TF-RH apresentou maior expressão de RNAm de PGC1- α quando comparado aos grupos Ovx-TF (95,53%) e o Ovx-RH (111,75%). Estes resultados são apresentados na Figura 12.

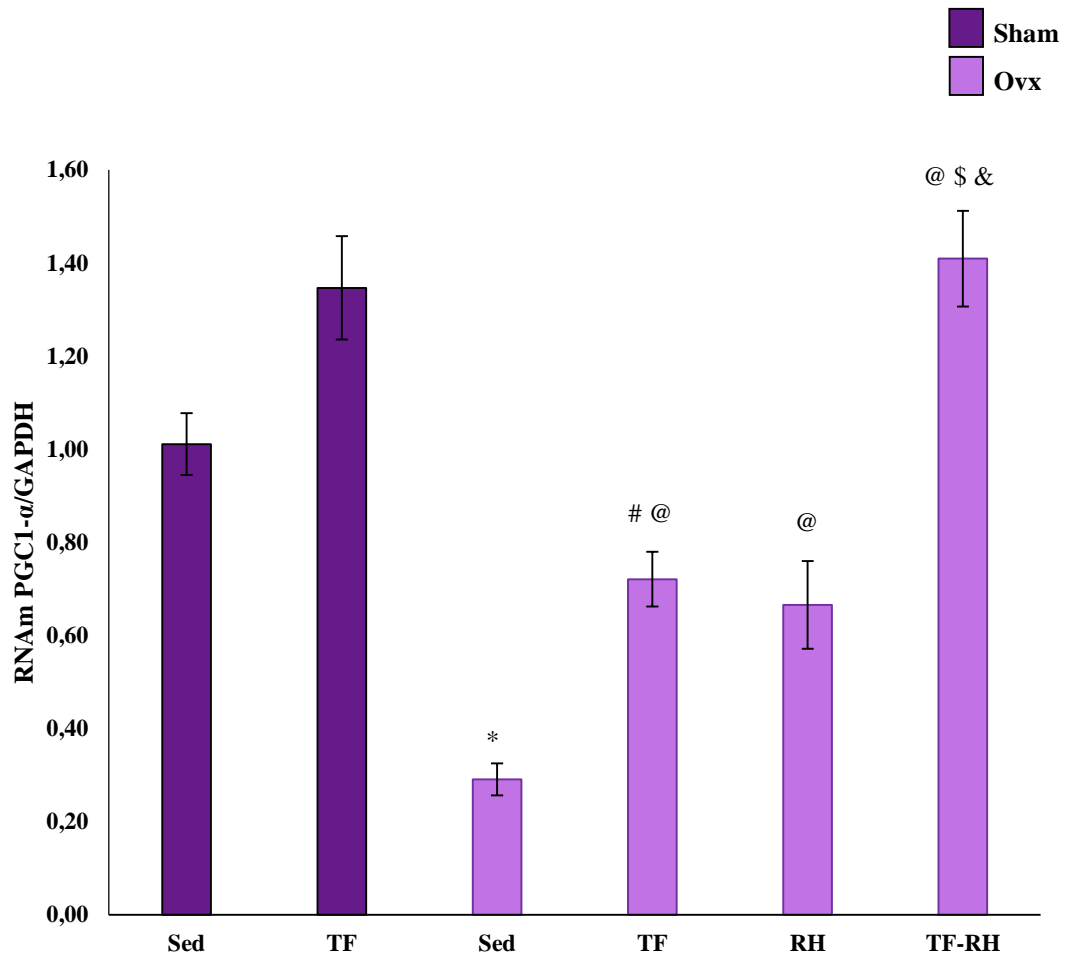


Gráfico 12. Expressão de RNAm de PGC-1 α /GAPDH no músculo gastrocnêmio. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Sham-Sed; #Sham-TF; @Ovx-Sed; \$OvxTr, &Ovx-RH (n = 6). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RH: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força.

A expressão de RNAm de FNDC5, por sua vez, foi maior apenas no grupo Ovx-TF quando comparado ao grupo Ovx-Sed (144,91%) (Figura 13).

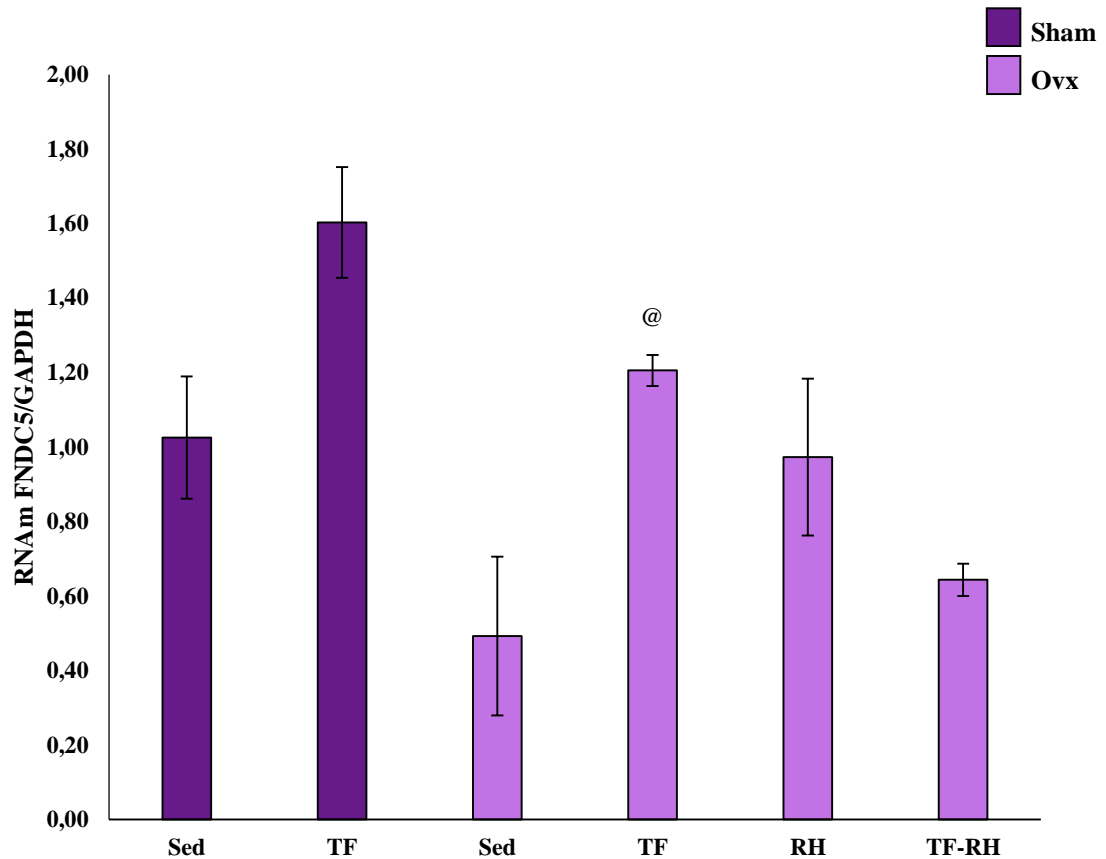


Gráfico 13. Expressão de RNAm de FNDC5/GAPDH no músculo gastrocnêmio. $p < 0,05$ comparado ao grupo [@]Ovx-Sed (n = 6). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RH: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força.

Alterações na expressão de RNAm de FNDC5 também foram confirmadas através da concentração de proteína. As análises de Western Blotting, mostraram que o grupo Sham-TF apresentou maior expressão proteica de FNDC5 quando comparado ao Sham-Sed (97,57%). Os grupos Ovx-TF e o Ovx-TF-RH apresentaram maior expressão proteica de FNDC5 quando comparados ao Ovx-Sed (227,97% e 217,60%). O grupo Ovx-RH apresentou menor expressão proteica de FNDC5 quando comparado ao grupo Ovx-TF (48,44%). Entre os grupos com Reposição Hormonal também houve diferença estatística, onde o grupo Ovx-TF-RH apresentou maior expressão proteica de FNDC5 quando comparado ao grupo Ovx-RH (87,81%). A expressão proteica de FNDC5 foi relativizada pela expressão proteica de GAPDH. Estes dados são apresentados na Figura 14.

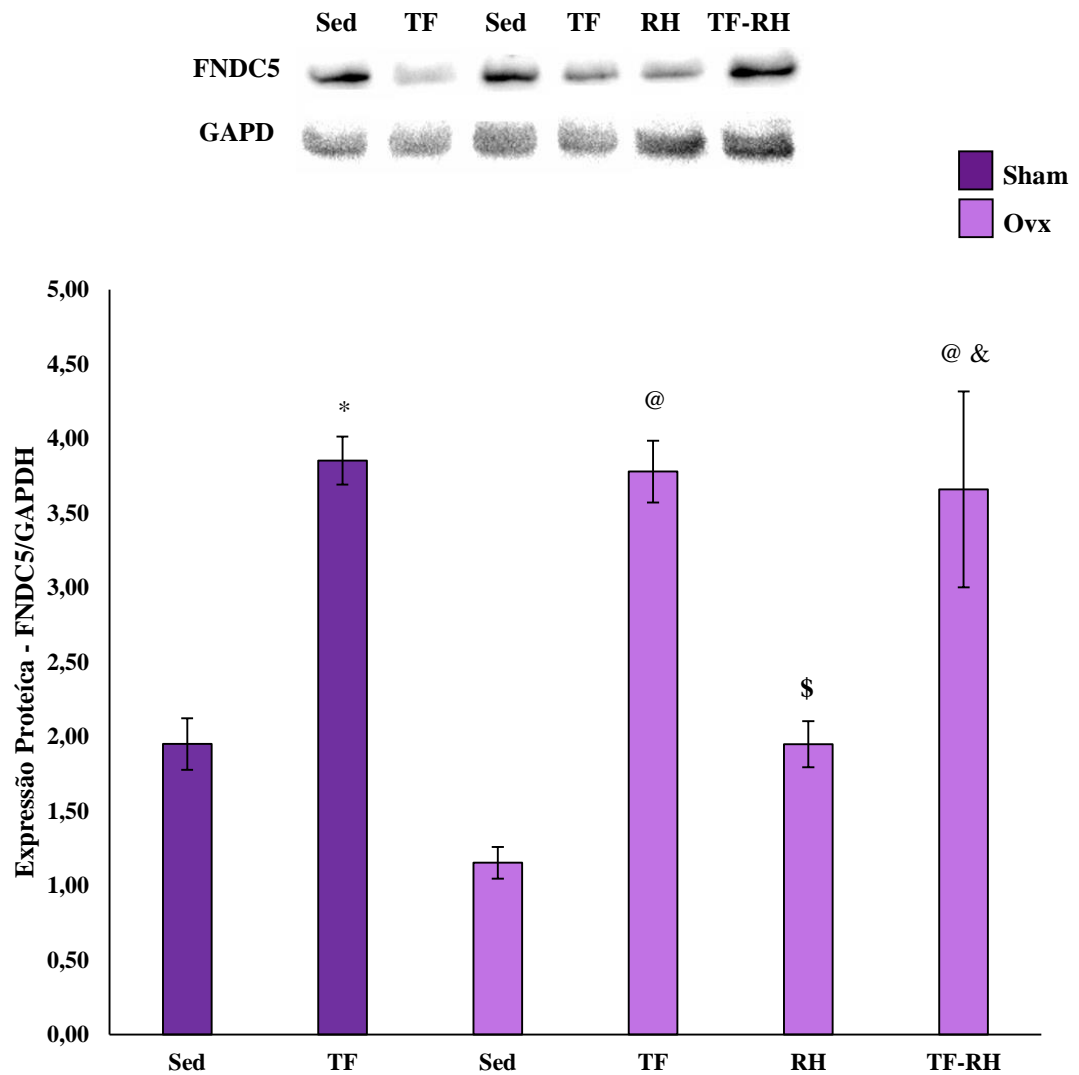


Gráfico 14. Expressão Proteica de FNDC5/GAPDH no músculo gastrocnêmio. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Sham-Sed; @Ovx-Sed; \$OvxTr; &Ovx-RH (n = 4). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RH: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força.

O FNDC5 é conhecido pela literatura por induzir a expressão de UCP1 nos tecidos adiposos brancos através da liberação da Irisina. Sendo assim, a expressão de RNAm de UCP1 na gordura mesentérica foi menor no grupo Ovx-Sed quando comparado ao grupo Sham-Sed (56,64%). Em relação ao grupo Ovx-Sed, os grupos Ovx-TF e Ovx-TF-RH apresentaram maior expressão de RNAm de UCP1 (106,48% e 150,89%) (Figura 15).

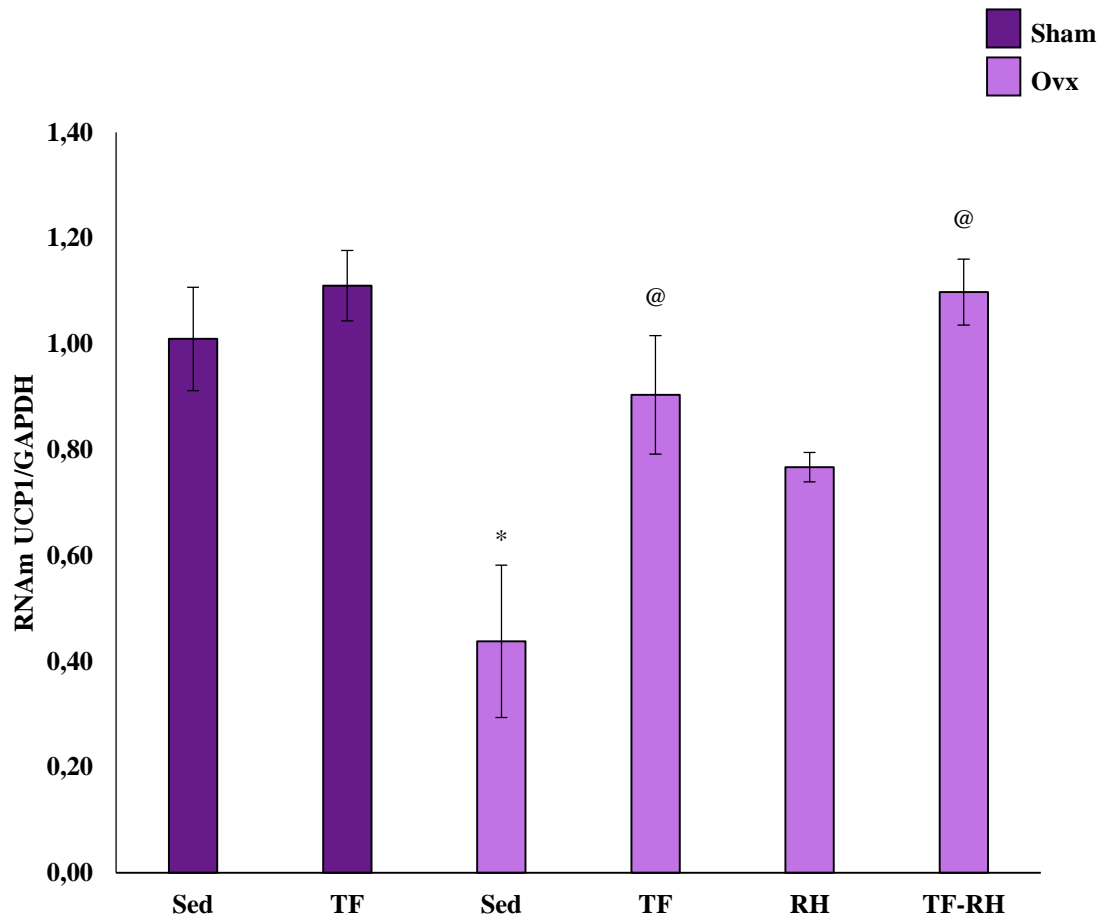


Gráfico 15. Expressão de RNAm de UCP1/GAPDH na gordura mesentérica. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Sham-Sed; @Ovx-Sed ($n = 6$). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RH: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força.

Alterações na expressão de RNAm de UCP1 também foram confirmadas através da concentração de proteína. As análises de Western Blotting mostraram que, dentre os grupos Sham, o grupo TR apresentou maior expressão proteica de UCP1 quando comparado ao grupo Sed (199,72%) e Ovx-TF apresentou menor expressão de UCP1 quando comparado ao grupo Sham-TF (51,69%). Em relação aos grupos Ovx, os grupos TF e o TF-RH, apresentaram maior expressão proteica de UCP1 quando comparados ao grupo Sed (209,08% e 332,97%). E em relação ao grupo RH, o grupo TF-RH apresentou maior expressão proteica quando comparado ao grupo RH (90,38%). A expressão proteica de UCP1 foi relativizada pela expressão proteica de β Actina e os valores apresentados na Figura 16.

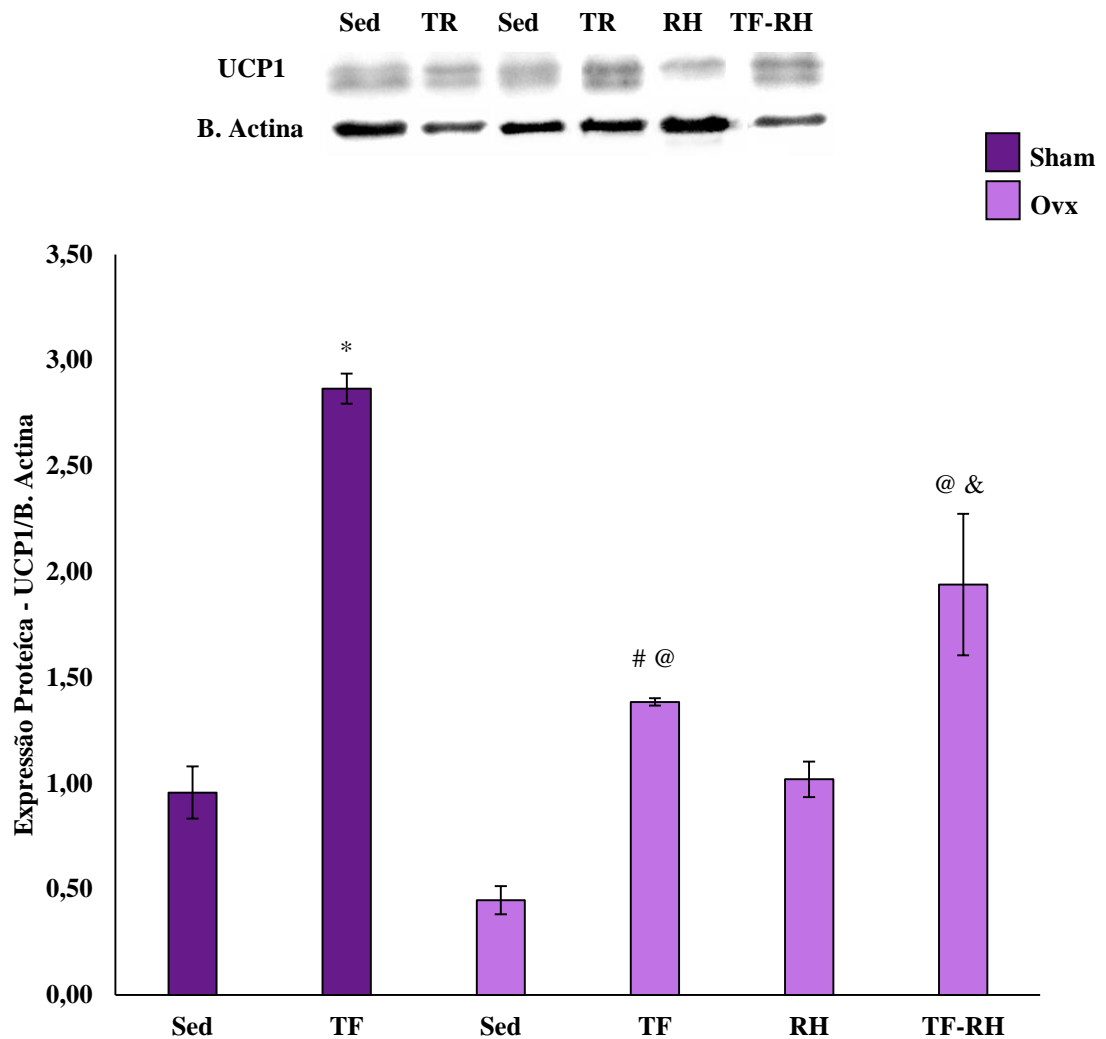


Gráfico 16. Expressão Proteica de UCP1/GAPDH na gordura mesentérica. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Sham-Sed; #Sham-TF; @Ovx-Sed; §OvxTr; &Ovx-RH (n = 4). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RF: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força.

4.5 Irisina Circulante

Após 12 semanas de TR a concentração circulante de Irisina foi analisada no plasma sob condição de repouso, revelando que o grupo Sham-TF apresentou maior concentração de Irisina quando comparado ao Sham-Sed (100,12%). Em relação ao grupo Ovx-Sed, os grupos Ovx-TF e Ovx-TF-RH apresentaram maior concentração de Irisina (42,21% e 62,60%), respectivamente. O grupo Ovx-TF-RH apresentou maior concentração de Irisina quando comparado ao grupo Ovx-RH (107,18%). Os valores de irisina circulante são apresentados na Figura 17.

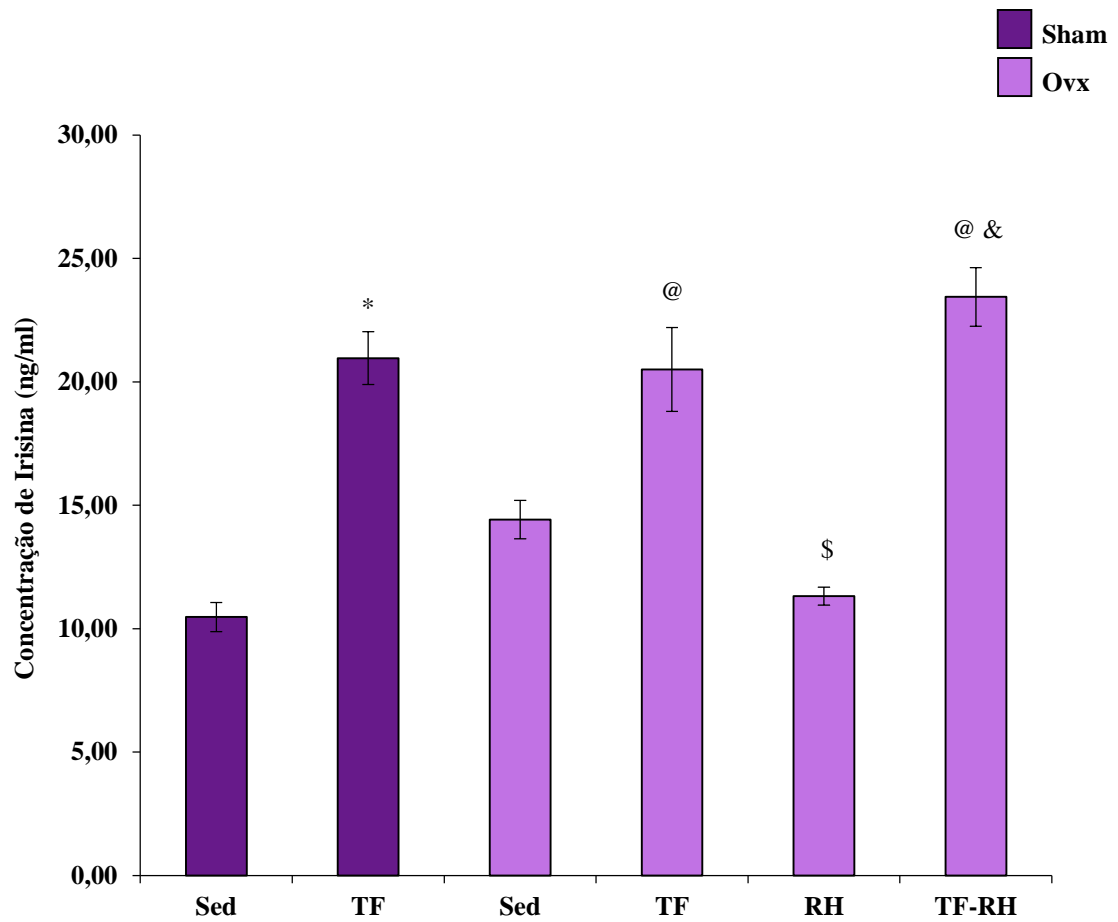


Gráfico 17. Concentração de Irisina (ng/ml) no plasma. $p < 0,05$ comparado ao grupo *Sham-Sed; #Sham-TF; @Ovx-Sed; \$Ovx-TF; &Ovx-RH (n = 4). Sham: Sham operados; Ovx: Ovariectomizadas; RH: Reposição Hormonal; TF: Treinamento de Força.

5 DISCUSSÃO

Embora esteja bem estabelecido que o exercício estimula a via da Irisina, há poucas pesquisas com essas respostas no TF. Esse é o primeiro estudo a analisar o efeito do TF no mecanismo de ação da Irisina em ratas após a Ovx e RH. O principal achado do estudo foi demonstrar que ratas Ovx apresentam menor expressão do mecanismo de ação de Irisina (PGC-1- α /FNDC5/Irisina/UCP1). Entretanto, os grupos que realizaram o TF por 12 semanas, com ou sem RH, apresentaram maior expressão do mecanismo de ação de Irisina, indicando assim, os potenciais benefícios do TF como uma importante estratégia alternativa para controlar os efeitos da menopausa.

Em relação aos parâmetros dimensionais, apesar de não haver diferença significativa na ingestão alimentar entre os grupos, o grupo Ovx-Sed apresentou maior massa corporal quando comparado ao Sham-Sed. Estudos mostram que independentemente da ingestão alimentar, roedores Ovx apresentam maior massa corporal, o que pode ser explicado pela diminuição da eficiência metabólica (ROGERS *et al.*, 2009; PRASANNARONG *et al.*, 2012; VIEIRA POTTER *et al.*, 2012; VIEIRA-POTTER *et al.*, 2015). Entretanto, as ratas dos grupos Ovx-RH e Ovx-TF-RH apresentaram menor massa corporal quando comparadas ao grupo controle (Ovx-Sed). A literatura evidencia que um decréscimo de estrogênio, devido à ovariectomia, está associado ao aumento de massa corporal (STUBBINS *et al.*, 2012; VIEIRA POTTER *et al.*, 2012), sendo atenuado por reposição hormonal (CHEN *et al.*, 2014; FIGUEROBA *et al.*, 2015). Isso ocorre porque o 17 β Estradiol regula vários aspectos da homeostase energética por meio de ações periféricas e mecanismos centrais. As regiões mais importantes do cérebro que medeiam os efeitos do 17 β Estradiol sobre a homeostase energética são o hipotálamo e a parte posterior do cérebro (SANTOLLO *et al.*, 2011).

Quanto ao peso uterino, os grupos Ovx sem a RH apresentaram menor massa uterina quando comparadas aos grupos Sham. Essa menor massa uterina ocorre devido a uma atrofia do endométrio resultante de uma falta de hormônios secretados pelos ovários, evidenciando novamente a eficiência da ovariectomia (KIM *et al.*, 2012; VIEIRA-POTTER *et al.*, 2015). Essa situação foi diferente para as ratas que obtiveram a reposição hormonal, evidenciando que a RH com 17 β Estradiol foi eficiente em produzir uma maior massa uterina, quando comparada aos grupos Ovx sem a RH (CHEN *et al.*, 2014).

A RH com 17 β Estradiol foi realizada em dois períodos, na primeira semana e sétima semana após o procedimento cirúrgico da ovariectomia. A concentração do 17 β Estradiol foi analisada nos grupos após o sacrifício. Sendo assim, ela foi maior nos grupos Sham

(Sham-Sed e Sham-TF) quando comparada aos grupos Ovx (Ovx-Sed e Ovx-TF), demonstrando novamente a eficiência da ovariectomia. Em relação aos grupos Ovx (Ovx-Sed e Ovx-TF) a concentração de 17β Estradiol foi menor quando comparada aos grupos RH (Ovx-RH e Ovx-TF-RH). Esses resultados indicam que a cápsula silástica produziu concentração de 17β Estradiol suficiente para reverter a concentração dos grupos Ovx (Ovx-Sed e Ovx-TF). Entretanto, nos grupos Sham (Sham-Sed e Sham-TF) a concentração de 17β Estradiol foi menor quando comparada aos grupos RH (Ovx-RH e Ovx-TF-RH). Ou seja, a concentração de 17β Estradiol dos grupos RH (Ovx-RH e Ovx-TF-RH) foram supra fisiológicas. Segundo STROM *et al.* (2008), a utilização de cápsulas silásticas, como descrito no presente estudo, é um método confiável para a produzir concentrações fisiológicas de 17β Estradiol em ratas Ovx, entre a segunda e a quarta semana após a administração. Desta maneira, nossos resultados supra fisiológicos podem ser explicados devido ao reimplante das cápsulas silásticas, pois realizamos o reimplante sem análises anteriores das concentrações de 17β Estradiol e, por isso, acreditamos que concentrações 17β Estradiol ainda eram suficientes para produzir seus efeitos, quando realizamos o reimplante.

O protocolo crescente de TF empregava sobrecargas individuais, sendo reajustadas a cada dia de treino, de acordo com a capacidade de carregamento, preservando sempre a individualidade biológica dos animais. Ademais, o intervalo utilizado de 2 minutos é suficiente para proporcionar uma recuperação metabólica entre as series (SMITH, 2004). Esse protocolo de treinamento promoveu uma evolução da carga de carregamento entre as semanas, porém não houve uma diferença da evolução da carga de carregamento entre os grupos, mostrando que as intervenções de ovariectomia (RODRIGUES *et al.*, 2013; STOTZER *et al.*, 2015) e reposição hormonal não interferem no aumento da força muscular (Figura 11).

A pós-menopausa é caracterizada por um excesso relativo do tecido adiposo associado ao déficit de massa muscular, o que representa um grande risco para a mulher (WANNAMETHEE e ATKINS, 2015). O TF, por sua vez, fornece amplos benefícios sistêmicos, incluindo um aumento de força muscular (CONCEICAO *et al.*, 2013; WEISGARBER *et al.*, 2015) e diminuição da glicemia em jejum e melhora na composição corporal de mulheres pós-menopausa (CONCEICAO *et al.*, 2013). O modelo de TF em escada demonstra ser eficaz em aumentar a massa muscular esquelética (PRESTES *et al.*, 2012) e diminuir os depósitos de gordura (LEITE *et al.*, 2009) de ratas ovariectomizadas. Sendo assim, o musculo esquelético é cada vez mais reconhecido como um órgão endócrino, podendo secretar miocinas, como por exemplo a Irisina, que regula processos fisiológicos e patológicos

relacionados com a obesidade, otimizando o controle de peso corporal e perfil metabólico (LEE *et al.*, 2014).

Segundo BOSTROM *et al.* (2012), durante o treinamento de endurance a Irisina é secretada a partir da clivagem de FNDC5, que é regulado pelo PGC1- α . Os benefícios promovidos pela Irisina ocorrem através de um processo de escurecimento dos adipócitos, e esse processo é induzido pela UCP1, que promove efeitos positivos como a termogênese em humanos (HUH *et al.*, 2014), regulando o metabolismo da gordura (HARMS e SEALE, 2013).

Os nossos resultados comprovam que os grupos Sham, Ovx e RH que realizaram 12 semanas de TF apresentaram respostas positivas no mecanismo de ação de Irisina, apresentando maior expressão de RNAm de PGC-1 α no músculo gastrocnêmio, maior expressão proteica de FNDC5, maior concentração de Irisina no plasma e maior expressão proteica de UCP1 na gordura mesentérica, conforme descrito na literatura em animais intactos (BOSTROM *et al.*, 2012; SPIEGELMAN, 2013). Esses resultados evidenciam o benefício do TF para respostas metabólicas na diminuição do estrogênio, pois o grupo Ovx-TF não apresentou níveis significativamente diferentes do grupo Sham-Sed.

Em relação aos resultados dos grupos Ovx (Ovx-Sed e Ovx-TF), observamos que o mecanismo de ação de Irisina (PGC1- α /FNDC5/Irisina/UCP1) apresentou menor ação quando comparado aos grupos Sham (Sham-Sed e Sham-TF). Uma vez que o mecanismo de ação de Irisina é dependente da expressão de PGC1- α no músculo (BOSTROM *et al.*, 2012), esses resultados podem ser explicados pelo fato da ovariectomia estar associada a perdas musculares (sarcopenia) (SHIGUEMOTO *et al.*, 2007; PIGHON *et al.*, 2009), conseqüentemente à diminuição das ações fisiológicas musculares.

O grupo Ovx-RH apresentou maior expressão de RNAm de PGC1- α quando comparado ao Ovx-Sed, o que pode indicar que o 17-B-estradiol é relacionado com a expressão PGC1- α no músculo esquelético. O presente estudo nos parece ser um dos primeiros estudos a relacionar a expressão estrogênio PGC1- α no músculo esquelético. Por outro lado, esta relação já foi descrita no coração (HSIEH *et al.*, 2006). De acordo com WIJK *et al.* (2003) a presença de receptores de estrogênio em fibras musculares sugere que inúmeros sistemas podem estar ligados à sua ação, tais como a manutenção da força muscular, fator de proteção tecidual e ação inibidora na geração de radicais livres. Entretanto, a expressão de FNDC5, a concentração de Irisina e a expressão de UCP1 não apresentaram diferenças significativas com a intervenção da RH comparadas com o grupo Ovx-Sed. Porém, quando o TF foi associado com a RH, a expressão de FNDC5, a concentração de Irisina e a expressão de UCP1 apresentaram maior expressão quando comparadas ao grupo Ovx-Sed. Com esses dados, concluímos que a RH

sozinha não substitui o TF, porém, quando ambos são associados em ratas Ovx, apresentam maior níveis do mecanismo de ação de irisina em relação ao grupo Sham-Sed.

Os resultados do presente estudo demonstram que o TF é eficaz na capacidade do escurecimento do tecido adiposo branco em ratas Ovx, uma vez que este efeito é mediado pelo mecanismo de ação da irisina (PGC1- α /FNDC5/Irisina/UCP1). Um recente estudo mostra que o TF progressivo foi eficiente para promover maior concentração de irisina circulante, tanto em camundongos (19 meses) quanto em homens (65 anos) idosos, e concomitante houve a melhora da força muscular e da função muscular (KIM *et al.*, 2015). Estes resultados corroboram com a literatura (BOSTROM *et al.*, 2012; CASTILLO-QUAN, 2012; SANCHIS-GOMAR *et al.*, 2012; HUH *et al.*, 2014).

Apesar desses evidentes benefícios proporcionados pelo TF, o presente estudo apresenta limitações que impedem definir com mais clareza a resposta do mecanismo de ação da irisina, uma vez que não foram realizadas análises do tecido adiposo marrom, da esteatose hepática e da gordura corporal total. Essas análises nos dariam um suporte maior para entendermos a verdadeira ação da irisina.

O presente estudo pode contribuir para a comunidade científica na obtenção de novas perspectivas para o tratamento da obesidade associada à menopausa. Com base em nossos resultados, o TF pode ser uma estratégia de intervenção eficaz para aumentar a concentração circulante de Irisina de ratas ovariectomizadas, a qual exerce importante papel na regulação no metabolismo energético envolvendo a gordura como substrato.

6 CONCLUSÕES:

Confimando nossa hipótese, os resultados do presente estudo mostram que as ratas ovariectomizadas apresentaram menor concentração circulante irisina, que favorecem o escurecimento do tecido adiposo branco, porém, o TF por 12 semanas foi uma estratégia de intervenção eficaz para apresentar maior concentração circulante de Irisina em ratas intactas e ovariectomizadas. E o TF associado à RH foi uma estratégia de intervenção eficaz para apresentar maior concentração circulante de Irisina em ratas e ovariectomizadas.

7 REFERÊNCIAS

AWA, W. L. et al. Type 2 diabetes from pediatric to geriatric age: analysis of gender and obesity among 120,183 patients from the German/Austrian DPV database. **Eur J Endocrinol**, v. 167, n. 2, p. 245-54, Aug 2012. ISSN 1479-683X (Electronic)

0804-4643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22645200> >.

BARRY, B. K.; CARSON, R. G. The consequences of resistance training for movement control in older adults. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 59, n. 7, p. 730-54, Jul 2004. ISSN 1079-5006 (Print)

1079-5006 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15304540> >.

BOSTROM, P. et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463-8, Jan 26 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237023> >.

BUNRATSAMI, S. et al. Estrogen replacement improves skeletal muscle performance by increasing parvalbumin levels in ovariectomized rats. **Acta Histochem**, v. 117, n. 2, p. 163-75, Mar 2015. ISSN 1618-0372 (Electronic)

0065-1281 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25578914> >.

CANDERELLI, R. et al. Benefits of hormone replacement therapy in postmenopausal women. **J Am Acad Nurse Pract**, v. 19, n. 12, p. 635-41, Dec 2007. ISSN 1041-2972 (Print)

1041-2972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042129> >.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 277-359, Jan 2004. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715917> >.

CASTILLO-QUAN, J. I. From white to brown fat through the PGC-1alpha-dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity. **Dis Model Mech**, v. 5, n. 3, p. 293-5, May 2012. ISSN 1754-8411 (Electronic)

1754-8403 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566556> >.

CHEN, J. et al. Estrogen via estrogen receptor beta partially inhibits mandibular condylar cartilage growth. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 22, n. 11, p. 1861-8, Nov 2014. ISSN 1522-9653 (Electronic)

1063-4584 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25046534> >.

CONCEICAO, M. S. et al. Sixteen weeks of resistance training can decrease the risk of metabolic syndrome in healthy postmenopausal women. **Clin Interv Aging**, v. 8, p. 1221-8, 2013. ISSN 1178-1998 (Electronic)

1176-9092 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24072967> >.

CORRIVEAU, P. et al. Resistance training prevents liver fat accumulation in ovariectomized rats. **Maturitas**, v. 59, n. 3, p. 259-67, Mar 20 2008. ISSN 0378-5122 (Print)

0378-5122 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367352> >.

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**, v. 112, n. 4, p. 1437-44, Apr 2012. ISSN 1439-6327 (Electronic)

1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830097> >.

DUN, S. L. et al. Irisin-immunoreactivity in neural and non-neural cells of the rodent. **Neuroscience**, v. 240, p. 155-62, Jun 14 2013. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470775> >.

FIGUEROBA, S. R. et al. Dependence of cytokine levels on the sex of experimental animals: a pilot study on the effect of oestrogen in the temporomandibular joint synovial tissues. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Jul 17 2015. ISSN 1399-0020 (Electronic)

0901-5027 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26194775> >.

FRITAH, A. et al. Absence of RIP140 reveals a pathway regulating glut4-dependent glucose uptake in oxidative skeletal muscle through UCPI-mediated activation of AMPK. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32520, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389706> >.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 415-45, 2011. ISSN 1545-3278 (Electronic)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219177> >.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med**, v. 19, n. 10, p. 1252-63, Oct 2013. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24100998> >.

HSIEH, Y. C. et al. Flutamide restores cardiac function after trauma-hemorrhage via an estrogen-dependent pathway through upregulation of PGC-1. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 1, p. H416-23, Jan 2006. ISSN 0363-6135 (Print)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155096> >.

HUH, J. Y. et al. Exercise-induced irisin secretion is independent of age or fitness level and increased irisin may directly modulate muscle metabolism through AMPK activation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 11, p. E2154-61, Nov 2014. ISSN 1945-7197 (Electronic)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25119310> >.

JUNG, S. R. et al. Changes of bone metabolism based on the different interventions with exercise type or additional intake material in ovariectomized rats. **J Exerc Nutrition Biochem**, v. 18, n. 1, p. 111-7, Mar 2014. ISSN 2233-6834 (Print)

2233-6834 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25566446> >.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v. 15, n. 3, p. 175-91, Dec 1991. ISSN 0169-6009 (Print)

0169-6009 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1773131> >.

KIM, D. I. et al. The effects of Sutaehwan-Gami on menopausal symptoms induced by ovariectomy in rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 227, 2012. ISSN 1472-6882 (Electronic)

1472-6882 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23173704> >.

KIM, H. J. et al. Resistance exercise training increases the expression of irisin concomitant with improved of muscle function in aging mice and human. **Exp Gerontol**, Jul 13 2015. ISSN 1873-6815 (Electronic)

0531-5565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26183690> >.

LEE, P. et al. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. **Cell Metab**, v. 19, n. 2, p. 302-9, Feb 4 2014. ISSN 1932-7420 (Electronic)

1550-4131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24506871> >.

LEE TM; LIN SZ; NC, C. Membrane ER α attenuates myocardial fibrosis via RhoA/ROCK-mediated actin remodeling in ovariectomized female infarcted rats. **J Mol Med (Berl)**, v. 1, p. 43-51, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Membrane+ER%CE%B1+attenuates+myocardial+fibrosis+via+RhoA%2FROCK-mediated+actin+remodeling+in+ovariectomized+female+infarcted+rats> >.

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**, v. 34, n. 6, p. 1079-86, Dec 2009. ISSN 1715-5312 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029517> >.

LEITE, R. D. et al. Menopause: highlighting the effects of resistance training. **Int J Sports Med**, v. 31, n. 11, p. 761-7, Nov 2010. ISSN 1439-3964 (Electronic)

0172-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21058218> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print)

1046-2023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

MAGGIO, M.; LAURETANI, F.; CEDA, G. P. Sex hormones and sarcopenia in older persons. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 16, n. 1, p. 3-13, Jan 2013. ISSN 1473-6519 (Electronic)

1363-1950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23222704> >.

OLSON, S. H.; BANDERA, E. V.; ORLOW, I. Variants in estrogen biosynthesis genes, sex steroid hormone levels, and endometrial cancer: a HuGE review. **Am J Epidemiol**, v. 165, n. 3, p. 235-45, Feb 1 2007. ISSN 0002-9262 (Print)

0002-9262 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110639> >.

PEDERSEN, B. K. A muscular twist on the fate of fat. **N Engl J Med**, v. 366, n. 16, p. 1544-5, Apr 19 2012. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22512488> >.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 8, p. 457-65, Aug 2012. ISSN 1759-5037 (Electronic)

1759-5029 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22473333> >.

PIGHON, A. et al. Resistance training attenuates fat mass regain after weight loss in ovariectomized rats. **Maturitas**, v. 64, n. 1, p. 52-7, Sep 20 2009. ISSN 1873-4111 (Electronic)

0378-5122 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683884> >.

POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; ZAVOS, C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. **Curr Mol Med**, v. 9, n. 3, p. 299-314, Apr 2009. ISSN 1566-5240 (Print)

1566-5240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19355912> >.

PRASANNARONG, M.; VICHAIWONG, K.; SAENGSIKISUWAN, V. Calorie restriction prevents the development of insulin resistance and impaired insulin signaling in skeletal muscle of ovariectomized rats. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 6, p. 1051-61, Jun 2012. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22406051> >.

PRESTES, J. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 4, p. 700-6, Aug 2009. ISSN 1715-5312 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767806> >.

PRESTES, J. et al. Resistance training and glycogen content in ovariectomized rats. **Int J Sports Med**, v. 33, n. 7, p. 550-4, Jul 2012. ISSN 1439-3964 (Electronic)

0172-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22499573> >.

RACHNER, T. D.; KHOSLA, S.; HOFBAUER, L. C. Osteoporosis: now and the future. **Lancet**, v. 377, n. 9773, p. 1276-87, Apr 9 2011. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21450337> >.

RODRIGUES, M. F. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on oxidative stress markers in the rat liver. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 68, n. 9, p. 1247-54, Sep 2013. ISSN 1980-5322 (Electronic)

1807-5932 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141842> >.

ROGERS, N. H. et al. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2161-8, May 2009. ISSN 1945-7170 (Electronic)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19179442> >.

ROUTLEDGE, F. S. et al. Endothelial function in postmenopausal women with nighttime systolic hypertension. **Menopause**, Jan 5 2015. ISSN 1530-0374 (Electronic)

1072-3714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25563797> >.

SAHA, K. R. et al. Changes in lipid profile of postmenopausal women. **Mymensingh Med J**, v. 22, n. 4, p. 706-11, Oct 2013. ISSN 1022-4742 (Print)

1022-4742 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24292300> >.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 2nd ed. Libraries Australia: Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. , 1989. ISBN 0879693096

SANCHIS-GOMAR, F. et al. Irisin: a new potential hormonal target for the treatment of obesity and type 2 diabetes. **J Diabetes**, v. 4, n. 3, p. 196, Sep 2012. ISSN 1753-0407 (Electronic)

1753-0407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22372821> >.

SANTOLLO, J.; TORREGROSSA, A. M.; ECKEL, L. A. Estradiol acts in the medial preoptic area, arcuate nucleus, and dorsal raphe nucleus to reduce food intake in ovariectomized rats. **Horm Behav**, v. 60, n. 1, p. 86-93, Jun 2011. ISSN 1095-6867 (Electronic)

0018-506X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21439964> >.

SCARABIN-CARRE, V. et al. High level of plasma estradiol as a new predictor of ischemic arterial disease in older postmenopausal women: the three-city cohort study. **J Am Heart Assoc**, v. 1, n. 3, p. e001388, Jun 2012. ISSN 2047-9980 (Electronic)

2047-9980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23130139> >.

SHIGUEMOTO, G. E. et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scand J Med Sci Sports**, v. 22, n. 5, p. 607-17, Oct 2012. ISSN 1600-0838 (Electronic)

0905-7188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362057> >.

SHIGUEMOTO, G. E. et al. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. **Maturitas**, v. 57, n. 3, p. 261-70, Jul 20 2007. ISSN 0378-5122 (Print)

0378-5122 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368767> >.

SIROLA, J.; KROGER, H. Similarities in acquired factors related to postmenopausal osteoporosis and sarcopenia. **J Osteoporos**, v. 2011, p. 536735, 2011. ISSN 2042-0064 (Electronic)

2042-0064 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21904688> >.

SMITH, L. L. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? **J Strength Cond Res**, v. 18, n. 1, p. 185-93, Feb 2004. ISSN 1064-8011 (Print)

1064-8011 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14971991> >.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, v. 150, n. 1, p. 76-85, Oct 1985. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3843705> >.

SPIEGELMAN, B. M. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 1774-82, Jun 2013. ISSN 1939-327X (Electronic)

0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23704518> >.

STEINBERG, F. M. et al. Soy protein with isoflavones has favorable effects on endothelial function that are independent of lipid and antioxidant effects in healthy postmenopausal women. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 1, p. 123-30, Jul 2003. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12816781> >.

STOTZER, U. S. et al. Resistance training suppresses intra-abdominal fatty acid synthesis in ovariectomized rats. **Int J Sports Med**, v. 36, n. 3, p. 226-33, Mar 2015. ISSN 1439-3964 (Electronic)

0172-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415388> >.

STROM, J. O.; THEODORSSON, E.; THEODORSSON, A. Order of magnitude differences between methods for maintaining physiological 17beta-oestradiol concentrations in ovariectomized rats. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 68, n. 8, p. 814-22, 2008. ISSN 1502-7686 (Electronic)

0036-5513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18821130> >.

STUBBINS, R. E. et al. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. **Diabetes Obes Metab**, v. 14, n. 1, p. 58-66, Jan 2012. ISSN 1463-1326 (Electronic)

1462-8902 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21834845> >.

TAYLOR, M. Alternatives to conventional hormone replacement therapy. **Compr Ther**, v. 23, n. 8, p. 514-32, Aug 1997. ISSN 0098-8243 (Print)

0098-8243 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9283741> >.

TRAYHURN, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 1-21, Jan 2013. ISSN 1522-1210 (Electronic)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303904> >.

VIEIRA-POTTER, V. J. et al. Female rats selectively bred for high intrinsic aerobic fitness are protected from ovariectomy-associated metabolic dysfunction. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 308, n. 6, p. R530-42, Mar 15 2015. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25608751> >.

VIEIRA POTTER, V. J. et al. Adipose tissue inflammation and reduced insulin sensitivity in ovariectomized mice occurs in the absence of increased adiposity. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4266-77, Sep 2012. ISSN 1945-7170 (Electronic)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22778213> >.

WANNAMETHEE, S. G.; ATKINS, J. L. Muscle loss and obesity: the health implications of sarcopenia and sarcopenic obesity. **Proc Nutr Soc**, p. 1-8, Apr 27 2015. ISSN 1475-2719 (Electronic)

0029-6651 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25913270> >.

WEISGARBER, K. D.; CANDOW, D. G.; FARTHING, J. P. Whey protein and high-volume resistance training in postmenopausal women. **J Nutr Health Aging**, v. 19, n. 5, p. 511-7, May 2015. ISSN 1760-4788 (Electronic)

1279-7707 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25923479> >.

WIETLISBACH, V. et al. The relation of body mass index and abdominal adiposity with dyslipidemia in 27 general populations of the WHO MONICA Project. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 23, n. 5, p. 432-42, May 2013. ISSN 1590-3729 (Electronic)

0939-4753 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209742> >.

WIJK, A. et al. Oestrogen receptor beta is expressed in adult human skeletal muscle both at the mRNA and protein level. **Acta Physiol Scand**, v. 179, n. 4, p. 381-7, Dec 2003. ISSN 0001-6772 (Print)

0001-6772 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656376> >.

WU, J. et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 366-76, Jul 20 2012. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796012> >.

ZHANG, S. M. et al. Use of oral conjugated estrogen alone and risk of breast cancer. **Am J Epidemiol**, v. 165, n. 5, p. 524-9, Mar 1 2007. ISSN 0002-9262 (Print)

0002-9262 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17132697> >.