

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA (FOA)
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes

**Influência da terapêutica hormonal estrogênica e
do treinamento de força sobre o tecido muscular
esquelético de ratas senis**

Araçatuba - SP

2016

Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes

Influência da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força sobre o tecido muscular esquelético de ratas senis

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Cássia M. Dornelles

Coorientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

Coorientador externo: Prof. Dr. Antonio Musarò

Araçatuba - SP
2016

Autorizo a reprodução e divulgação parcial ou total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M827i Morais, Samuel Rodrigues Lourenço de.
Influência da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força sobre o tecido muscular esquelético de ratas senis / Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes. - Araçatuba, 2016
89 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Rita Cássia Menegati Dornelles
Coorientadora: Profa. Patricia Chakur Brum
Coorientador: Prof. Antonio Musarò

1. Envelhecimento 2. Estrogênios 3. Estresse oxidativo
4. Treinamento de força 5. Sirtuínas I. Título.

CDD 612

FOLHA DE APROVAÇÃO

Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes

Influência da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força sobre o tecido muscular esquelético de ratas senis

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de “Doutor em Ciências Fisiológicas”.

Área de concentração: Fisiologia

Orientado: Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes

Orientadora: Profa. Dra. Rita Cássia M. Dornelles

Coorientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

Coorientador externo: Prof. Dr. Antonio Musarò

Aprovado em 22/08/2016

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

Instituição: FOA/UNESP

Prof^a. Dr^a. Aline Villa Nova Bacurau

Instituição: EEFE/USP

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Instituição: FMRP/USP

Prof. Dr. Edilson Ervolino

Instituição: FOA/UNESP

Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

Instituição: FMV/UNESP

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 23. 03. 1983, Goiânia – GO.

Filiação: Neusa Maria Rodrigues Morais

João Batista de Morais

2005/2008: Curso de Licenciatura Plena em Educação Física – Universidade Estadual do Norte Pioneiro – FAEFIJA – Jacarezinho – PR.

2008/2009: Especialização em Fisiologia do Exercício (Latu Sensu) - Universidade Estadual do Norte Pioneiro – FAEFIJA – Jacarezinho – PR.

2009/2011: Pós-Graduação Stricto-Sensu em Ciências Fisiológicas nível de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (FOA) – Araçatuba – SP - Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - Sociedade Brasileira de Fisiologia.

2012/2016: Pós-Graduação Stricto-Sensu em Ciências Fisiológicas nível de Doutorado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (FOA) – Araçatuba – SP - Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - Sociedade Brasileira de Fisiologia.

DEDICATÓRIA

A DEUS, por me conceder tantas oportunidades e pessoas especiais durante toda essa trajetória e, em especial, fonte de amor, fé e persistência.

A minha família, meus pais João e Neusa, e meu irmão Silas, pelo apoio incondicional e compreensão, fundamental para que eu pudesse trilhar o árduo caminho em busca de meus sonhos.

A minha noiva Mariana, pelo carinho e companheirismo, permanecendo ao meu lado em todos os momentos, tornando-os sempre mais fáceis.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me concederem e me ensinarem a importância do estudo. Muito obrigado pela criação e os valores que a mim foram transmitidos. Espero retribuir tudo o que fizeram por mim e que quando a paternidade chegar, que eu consiga manter a base de nossa família, assim como foi feito por vocês! Se pudesse escolher, meus pais seriam vocês para sempre! Amo vocês!

Ao meu irmão, pelo companheirismo e compreensão pela constante ausência nos últimos anos. Muito obrigado por exercer o papel de filho enquanto eu não estava por perto! Torço muito por você! Te amo!

À minha noiva, Mariana, pelo companheirismo e amor, principalmente durante nossa estadia na Itália, onde passamos por algumas dificuldades que superamos com tranquilidade e muita paciência. Tenho certeza que essa experiência nos uniu ainda mais. Que nessa nova fase de nossas vidas possamos continuar trilhando nosso destino juntos e com muita cumplicidade. Muito obrigado por dividir sua vida comigo, te amo!

À minha admirável orientadora, Profa. Dra. Rita Cassia Menegati Dornelles, agradeço por dividir comigo sua sabedoria científica e de vida durante esses 4 anos, que foram de constante aprendizado. Diante desse mar de vaidade que assola grande parte dos pesquisadores, sua humildade e inteligência frente a situações incompreensíveis comuns neste meio, a tornam especial. Muito obrigado por me aceitar como aluno, por cada pequeno detalhe que me corrigiu durante essa jornada e, em especial, por acreditar em mim e em meus distantes sonhos. Tenho o sonho de ser um bom professor, e não mais que isso, e para que isso aconteça, levo comigo sua conduta e determinação. Te admiro como mulher e grande profissional que é, e espero que possamos ser companheiros e amigos de pesquisa por longa data. Sou muito grato a tudo que me proporcionou e desejo que o sucesso continue ao seu lado e que você seja muito feliz!

Ao Prof. Dr. João César Bedran de Castro, pelos grandes ensinamentos durante toda essa trajetória. Muito obrigado por compartilhar não só seus conhecimentos em relação a pesquisa, mas também suas experiências de vida, seus conselhos, que em várias situações foram fundamentais para a tomada de corretas decisões. Agradeço pelo seu engajamento no nosso programa de pós-graduação e por ter lutado pela criação deste programa. Muito obrigado por nos proporcionar sua agradável presença diária!

À minha coorientadora, Profa. Dra. Patricia Chakur Brum, por me proporcionar horizontes que eu jamais havia imaginado. Muito obrigado por me aceitar como seu coorientado sem ao menos me conhecer. Sou muito grato por permitir que eu frequentasse seu laboratório e conseqüentemente entrasse em contato com seus alunos, os quais tiveram grande influência em meu crescimento pessoal e científico. Não sei como agradecer-lá por todo apoio intelectual e estrutural que nos proporcionou, sempre com muito carinho e humildade. Sua escolha como coorientadora se deve a admiração que tenho pelo seus trabalhos e história de vida, que a tornam merecedora da posição que ocupa. Muito obrigado por tudo e, em especial pelos lanches que me dava antes que eu retornasse para Araçatuba! Gosto muito de você e espero que possamos continuar nossa amizade por muito tempo!

À Profa. Dra. Aline Villa Nova Bacurau, a quem devo grande parte deste trabalho apresentado. Muito obrigado por tudo o que me ensinou! Talvez para você não tenho signifique muito, mas mudou minhas perspectivas em relação à pesquisa. Aprendi muito com você, na verdade praticamente tudo sobre miologia que sei até hoje. Além disso, a ajuda que você e o Frank me proporcionaram no retorno da Itália foi de grande valia. Naquela uma semana que passei com vocês, praticamente morando em sua casa, aprendi muito sobre como construir um trabalho de qualidade. Você é uma profissional admirável e com muito potencial, torço muito por você e tenho certeza de que em breve estará inserida em um excelente laboratório, dando continuidade as suas interessantes pesquisas. Mais uma vez muito obrigado por todas as vezes que me recebeu prontamente, com atenção e carinho. Espero poder manter nosso contato e que eu possa retribuir tudo o que fez por mim.

Ao professor Dr. Edilson Ervolino, com quem aprendi muito. Meus sinceros agradecimentos por todas as vezes que me recebeu e me ajudou. Te admiro como profissional e como pessoa, sempre presando pela formação do aluno em primeiro lugar. Ressalto que você foi um dos poucos professores que me ofereceu ajuda durante o período o qual meu doutoramento foi colocado a prova, por essa atitude e pelas demais, serei sempre grato, muito obrigado CHEFE!

Ao professor Dr. Valdir Gouveia Garcia, pela grande oportunidade concedida em trabalhar com a laserterapia e por todos os ensinamentos, muito obrigado professor!
Ao professor Marcelo Macedo Crivelini, pela amizade e por ceder a seu departamento para o desenvolvimento de nossas pesquisas.

Ao Departamento de Ciências Básicas e todos os professores deste, que de algum modo me ajudaram durante esses sete anos de trabalho. Estendo os agradecimentos à Faculdade de Odontologia de Araçatuba e a todos seus funcionários.

Aos funcionários João, Alan e Camilo, por sempre me ajudarem com o fornecimento e manejo dos animais e por sempre estarem dispostos a ajudarem.

Ao funcionário Arnaldo, por me ensinar diversas noções de biotério e pela alegria demonstrada diariamente apesar da árdua tarefa que executa, servindo como exemplo de vida.

Ao amigo José Marcelo Tramarin, uma das pessoas mais alegres e solistas que já conheci. Muito obrigado por tudo que me ensinou e pelos excelentes momentos que compartilhamos!

Ao meu grande amigo de longa data, Michael Galbiatti Mendes, companheiro de várias fases de minha vida. Muito obrigado pelo apoio, conselhos e confiança ao longo desses dezoito anos de amizade! Te considero parte de família, como irmão, e prezo muito por nossa amizade, que espero levar até o fim da vida! Torço muito por você e pela sua felicidade!

Ao grande amigo e companheiro de pós-graduação, Wagner Garcez de Mello. Sua amizade, companheirismo e conselhos foram fundamentais para que eu chagasse até aqui. Sua empolgação em vencer e continuar nesse mundo da pesquisa é contagiante e estimula a todos que estão ao seu lado. Agradeço por dividir comigo seus sonhos e especialmente sua família, que fizeram parte de tudo isso. Espero que possamos alcançar nossos sonhos e de preferência na mesma bancada. Muito obrigado pela amizade!

Ao amigo Luiz Henrique Natali, pelas agradáveis conversas e trocas de experiência de vida durante os cafés. Torço muito pelo seu sucesso e sua felicidade!

Aos amigos Fabiana Fernandes e Alexandre Ginei Goya, melhores alunos de iniciação que alguém poderia ter. Espero poder ter contribuído com a formação de vocês de alguma maneira e agradeço por terem ajudado no desenvolvimento de meu trabalho de Doutorado e demais trabalhos. Desejo muitas felicidades a vocês!

A amiga e companheira de pós-graduação Camila Tami Stringuetta Garcia, pela amizade, convivência e grande ajuda no desenvolvimento do projeto. Te admiro pela sua bondade e por ser dona de um coração tão puro. Muitas felicidades a você e sua família! Muito obrigado!

Aos companheiros de laboratório Fernanda Fernandes, Ricardo Almeida, Angela Nicola e Melise. Muito obrigado pela amizade e ajuda durante meu doutoramento. Vocês foram minha família durante esse período! Desejo muita felicidade a todos vocês! Muito obrigado!

Aos amigos de pós-graduação do Departamento de Ciências Básicas pelo companheirismo e por compartilharem vários momentos e experiências comigo durante esse período.

Ao meu grande amigo Paulo Roberto Jannig. Muito obrigado por todo o apoio e ensinamentos, além de sua amizade. Desejo todo sucesso do mundo a você!

Aos amigos Luiz Bozi, Luiz Bechara, Vanessa Voltarelli e Juliane Cruz Campos. Muito obrigado pelo carinho e pela acolhida sempre muito alegre e divertida. Espero mantermos nossa amizade por toda a vida!

Ao Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício da Escola de Educação Física da Universidade de São Paulo (USP) por todo o apoio para a realização desta pesquisa.

Às grandes amigas Laura Barberi e Francesca Ascenzi pela grande contribuição neste estudo e pela amizade durante o estágio Sandwich. Sem vocês esse trabalho não seria finalizado! Meus eternos agradecimentos! Auguri a voi!

Ao grande mestre Antonio Musarò. Sua competência e inteligência são admiráveis! Os conhecimentos que obtive durante os seminários e nossas conversas serão para vida. Muito obrigado pela fundamental participação deste estudo, suas sugestões o tornaram de grande relevância e respaldo à sociedade. Mais uma vez obrigado por mudar minhas junto à pesquisa! Desejo-lhe muito sucesso! Boca al Lupo!

A todos os mestres que tive durante a vida!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo fundamental apoio financeiro para que essa pesquisa pudesse ser realizada (Processo 2013/18907-2; BEPE 2015/14592-2).

*“Lute com determinação, abrace a vida com paixão,
perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo
pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para
ser insignificante. ”*

Charles Chaplin

MORAIS, S. R. L. **Influência da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força sobre o tecido muscular esquelético de ratas senis.** 2016. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - Sociedade Brasileira de Fisiologia - SBFiS, Araçatuba - SP, 2016.

RESUMO

A diminuição das concentrações plasmáticas de estrógeno está intimamente relacionada com o aumento do estresse oxidativo e a diminuição da massa muscular em idosos. A terapêutica hormonal estrogênica (THE) e o treinamento de força (TF) apresentam resultados efetivos sobre a manutenção do tecido muscular em idosos. No entanto, os mecanismos responsáveis pelas melhorias induzidas por ambas as intervenções são pouco elucidados. Nesse sentido, avaliamos os efeitos da THE, do TF e a associação sobre a manutenção do tecido muscular esquelético de ratas periostropausadas. Ratas Wistar (18 meses) foram distribuídas em: Grupo não treinado (NT-Veh), Grupo NT tratado com a THE (NT-E₂), Grupo TF (TF-Veh) e Grupo TF-E₂. Os animais receberam a THE (17β estradiol; 2 x semana; 25 µg/kg/administração) e/ou praticaram TF (3 x semana; 80% sobrecarga) durante 16 semanas. A THE e o TF induzem benefícios ao tecido muscular esquelético de ratas periostropausadas, no entanto, por diferentes maneiras. Enquanto a THE induziu diminuição do estresse oxidativo muscular (Dihidroetidina), o TF resultou em melhoras significativas na função muscular, no sistema antioxidante muscular (Catalase) e na expressão de miRNAs (206, 146b e 133a). Já a interação das intervenções resultou em melhora no estado redox (Sirt1, Sirt3, PGC-1α, COXIV), na responsividade dos receptores estrogênicos (ERα, ERβ e GPR30), e atividade de vias de sinalização do tecido muscular (IGF-1/Akt-1/mTOR). Além disso, as intervenções de maneira isolada ou em associação, levaram ao aumento no percentual de fibras glicolíticas e redução das oxidativas. Sugerimos que a aderências das intervenções (associadas ou não) possam minimizar/atenuar a perda da massa muscular observada em fases tardias durante o processo de envelhecimento.

Palavras-chave: Envelhecimento. Estrógeno. Estresse oxidativo. Receptores estrogênicos. Treinamento de força. Sirtuínas. IGF-1. microRNAs.

MORAIS, S. R. L. **Influence of hormonal estrogenic therapy and strength training on skeletal muscle of senile rats**. 2016. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Sociedade Brasileira de Fisiologia - SBFiS, Araçatuba - SP, 2016.

ABSTRACT

The decrease of estrogen (E_2) circulating levels is strongly related to increased oxidative stress and the loss of muscle mass in elderly. The hormone replacement therapy (HRT) and strength training (ST) are the main effective interventions to prevent the loss of muscle mass, however, the mechanisms involved in interventions-induced benefits are not well elucidated. In this sense we evaluate the effect of HRT, ST and association on skeletal muscle maintenance of periostropoused rats. Female Wistar rats (18 months old) were randomly assigned into: non-exercised and non-treated group (NE-Veh), NE treated group (NE- E_2), exercised and non-treated group (ST-Veh) and ST- E_2 group. The animals received the HRT (17β estradiol; 2 x week; 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$) and/or performed ST (3 x week, 80% overload) for 16 weeks. The HRT and ST promoted beneficial effects on skeletal muscle of periostropoused rats, however, by different manners. While HRT treatment leaves the reduction of oxidative stress (Dihidroetidine), the ST resulted in significant improvement on skeletal muscle function, in skeletal muscle antioxidant system (Catalase) and in miRNAs expression (2016, 146b and 133a). Already, the association of interventions resulted in improvement of redox state (Sirt1, Sirt3, PGC-1 α , COXIV), in estrogen receptor responsiveness (ER α , ER β and GPR30) and the activity of skeletal muscle signaling pathways (IGF-1/Akt-1/mTOR). In addition, the interventions, isolated or combined, leaves an increase of the percentage of glycolytic fibers and reduced percentage of oxidative fibers. We suggest that the adherence to interventions (combined or not) could minimize/attenuate the loss of skeletal muscle mass observed in later phases of aging process.

Key-words: Aging. Estrogen. Oxidative stress. Estrogenic receptors. Strength training. Sirtuins. IGF-1. miRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do delineamento experimental

Figura 2 – Imagens representativas da inclusão do tecido muscular (FLH).

Figura 3 – Efeitos de 16 semanas de THE e TF sobre a capacidade máxima de geração de força voluntária e função muscular.

Figura 4 – Efeitos da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força na massa e força muscular.

Figura 5 – Expressão (RNAm) de ER α , ER β e GPR30 após tratamento com E₂, TF e a associação das terapias.

Figura 6 – Efeitos da terapêutica hormonal estrogênica e treinamento de força sobre o estresse oxidativo muscular de ratas periostropausadas

Figura 7 – Efeito da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força sobre o sistema antioxidante a biogênese mitocondrial muscular de ratas senis.

Figura 8 – Efeito da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força na expressão de genes atróficos.

Figura 9 – Atividade da via IGF/Akt/mTOR e microRNAs envolvidos na sinalização muscular após 16 semanas de terapêutica hormonal estrogênica e treinamento de força.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos primers (SYBR Green)

Tabela 2 – Parâmetros Fisiológicos

Tabela 3 – Resumo dos resultados obtidos

LISTA DE ABREVIATURAS

μm = micrômetro

Akt = proteína quinase, também conhecida como proteína quinase B, envolvida em vias de sinalização relacionadas a sobrevivência celular por inibir processos apoptóticos. A Akt1 é capaz de induzir síntese proteica, portanto, fator essencial na sinalização de vias relacionadas a síntese proteica que levam ao processo hipertrófico muscular como também o crescimento tecidual de forma geral.

AL = atividade locomotora

AST = área de secção transversa

CAT = Catalase

cDNA = DNA complementar sintetizado a partir de uma molécula de RNAm

CEUA = Comissão de Ética na Experimentação Animal

CMGFV = capacidade máxima de geração de força voluntária

COXIV = A *Cytochrome C oxidase subunit 4 isoform* é uma enzima pertencente a subunidade do complexo NADH oxidase envolvida no processo de transferência de elétrons para o citocromo C e moléculas de oxigênio. Sua expressão tem relação com a integridade da membrana mitocondrial e também com a disponibilidade energética.

DHE = Dihidroetidina

DNA = Ácido desoxirribonucleico

DTT = Ditioneitol

E2 = Estrógeno

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA = (*Ethylene glycol tetraacetic acid*) ácido etileno tetra acético glicol

EROs = Espécies reativas de oxigênio

ERs = *Estrogenic receptors* (receptores estrogênicos)

Esr = *estrogen receptor* (receptor estrogênico)

FLH = Músculo flexor longo do halux

GH = *Growth hormone* (hormônio do crescimento)

GnRH = *Gonadotropin-Releasing Hormone* (Hormônio liberador de gonadotrofinas)

GPR30 = Receptor estrogênico GRP30 (*G protein-coupled receptor* GPR30) recentemente descoberto, tem como função diferencial em relação ao ERs clássicos (ER α e ER β), exercer ações rápidas (não genômicas).

GPx1 = Glutathione peroxidase 1

GSH = Glutathione

IGF-1 = *Insulin-growth factor 1* (fator de crescimento derivado da insulina 1)

MHCI = Cadeias Pesadas de Miosina do tipo I

microRNA = Também conhecidos como miRNAs, são pequenas sequências de RNA de dupla-fita, com aproximadamente 22 nucleotídeos, cuja principal função é atuar como silenciadores pós-transcricionais, pareando-se aos RNAs específicos, regulando positivamente ou negativamente a expressão dos genes.

miR = microRNA

mTOR = A via mTOR (*mammalian target of rapamycin*) exerce função regulatória central na fisiologia e no metabolismo em mamíferos, sendo essencial no controle das funções de diversos tecidos como o fígado, músculo esquelético, tecido adiposo marrom e branco e cérebro.

MURF-1 = O gene atrófico *Muscle RING-finger protein-1*, geralmente se encontra altamente expresso em situações catabólicas, como distrofia de Duchenne e no processo sarcopênico.

Nrf2 = *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* é fator de transcrição que regula a expressão de genes antioxidantes que combatem o aumento excessivo do estresse oxidativo.

NT-E2 = grupo não treinado tratado com a THE

NT-Veh = grupo não treinado

O $_2^{\cdot -}$ = ânion superóxido

OVX = Ovariectomizadas

PBS = Tampão Fosfato de Salina

PCR = Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR)

PGC-1 α = *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein*

PMSF = Fenilmetilsulfito fluorido (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)

qRT-PCR = Análise quantitativa em tempo real

RNAm = São moléculas que transmitem a informação genética a partir do DNA ao ribossomo, onde ocorre a transdução de uma sequência específica de aminoácidos resultando em expressão gênica de determinada proteína.

ROS = Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)

Rpm = rotação por minuto

Ser = Serina

Sirt = Sirtuínas são classe de enzimas que processam a deacetilase das histonas ou a atividade da mono-ribosiltransferase, e parecem estar relacionadas com o processo de envelhecimento na regulação da transcrição, apoptose e resistência ao stress.

SOD = Superóxido dismutase

TF = Treinamento de força

TF-E2 = grupo treinado e tratado com a THE

TF-Veh = grupo treinado

THE = Terapia hormonal estrogênica

Thr = Treonina

UV = ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 TEORIAS SOBRE O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO.....	24
1.1.1 Envelhecimento programado.....	24
1.1.2 Encurtamento dos Telômeros.....	24
1.1.3 Teoria dos radicais livres.....	25
1.1.4 Envelhecimento neuroendócrino.....	26
1.2 Alterações no tecido muscular esquelético e o envelhecimento neuroendócrino.....	26
1.3 O envelhecimento e as vias de sinalização relacionadas a manutenção do tecido muscular esquelético.....	28
1.4 Influência da terapia hormonal estrogênica sobre a massa muscular em mulheres.....	30
1.5 Efeitos da prática do treinamento de força sobre a massa muscular durante a senescência feminina.....	31
2.0 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivos gerais.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 HIPÓTESE	37
5 MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1 Animais e delineamento experimental.....	39
5.3 Terapêutica hormonal estrogênica.....	40
5.4 Testes funcionais.....	40
5.4.1 Teste de deambulação.....	40
5.4.2 Avaliação da atividade locomotora em campo aberto.....	40
5.5 Protocolo de treinamento de força e mensuração da capacidade máxima de geração de força voluntária (CMGFV).....	41
5.6 Coleta do tecido muscular esquelético e sangue.....	43
5.7 Análise da estrutura muscular esquelética: Imunofluorescência para fibras do tipo I e determinação da área de secção transversa.....	44
5.8 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	45
5.8.1 Produtos da oxidação de dihidroetidina.....	45
5.9 Sistema de defesa antioxidante.....	45
5.9.1 Atividade da superóxido dismutase.....	45
5.9.2 Atividade da catalase.....	46

5.9.3 Atividade de glutatona.....	46
5.10 Dosagem plasmática de estradiol.....	46
5.11 Extração do RNA total e síntese de cDNA.....	47
5.12 Análise quantitativa em tempo real – PCR (qRT-PCR).....	47
5.13 Western blot.....	48
5.14 Análise estatística.....	49
6 RESULTADOS	51
6.1 A capacidade máxima de geração de força voluntária (CMGFV) e a função muscular em ratas periestropausadas após o treinamento de força.....	52
6.2 Morfologia e composição muscular após a da terapêutica hormonal e treinamento de força.....	54
6.3 Treinamento de força e a associação com a terapêutica hormonal estrogênica aumentam a expressão dos receptores estrogênicos (ERs).....	56
6.4 A associação da terapêutica hormonal estrogênica e o treinamento de força atenuam o estresse oxidativo e o estado redox muscular.....	57
6.6 Influência da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força sobre genes atróficos.....	60
6.7 Influência da terapêutica hormonal estrogênica, do treinamento de força e associação na expressão de IGF-1 <i>downstreams</i> e microRNAs envolvidos na modulação da massa muscular.....	61
7 DISCUSSÃO	66
REFERÊNCIAS	21
ANEXOS	35
ANEXO A – Certificado de Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal.....	36

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é assunto que intriga tanto cientistas quanto filósofos, e os debates sobre seus efeitos físicos e psicológicos remetem desde a Grécia antiga até os dias atuais. Para Platão (428-327 a.C.), “aqueles que vivem mais tempo atingem uma compreensão filosófica da vida mortal, que leva ao desejo de compreender ideias e verdades eternas, para além do mundo mortal” (DA COSTA et al., 2016). Giacomo Leopardi (1798-1837) descreveu de maneira clara a percepção do envelhecimento humano: “A velhice é o mal supremo, porque nos priva de todos os prazeres, deixando-nos apenas o apetite por eles, e traz com ele todos os sofrimentos. No entanto, nós tememos a morte, e nós desejamos a velhice” (DA COSTA et al., 2016).

Definições mais recentes caracterizam o processo de envelhecimento como irreversíveis alterações psico-fisiológicas, altamente influenciáveis pela herança genética e por fatores ambientais (ANTON et al., 2005):

$$[\text{fenótipo}] = [\text{genótipo}] + [\text{hábitos alimentares, estilo de vida}]$$

Comumente, os termos envelhecimento e senescência são usados para se referir a idosos. Grande parte dos gerontologistas usa o termo “senescência” para se referirem ao risco aumentado do surgimento de doenças, perda da funcionalidade e casos de morte. Portanto, a senescência se refere à perda progressiva das funções corporais com o passar do tempo, enquanto, o termo envelhecimento está associado com a perda da complexidade de diversos processos fisiológicos como estruturas anatômicas (GOLDBERGER et al., 2002), alterações na pressão arterial (KAPLAN et al., 1991), sistema locomotor (HAUSDORFF et al., 1997; TERRIER; DÉRIAZ, 2011), ciclos respiratórios (PENG et al., 2002; SCHUMANN et al., 2010), visão (AZEMIN et al., 2012), término do período fértil e risco aumentado de mortalidade (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013).

Embora o envelhecimento possa ser definido como a ruptura da auto-organização dos sistemas (VASTO et al., 2010), os mecanismos bioquímicos e biológicos envolvidos no processo de envelhecimento são pouco compreendidos (DA COSTA et al., 2016).

Na busca sobre a compreensão dos fatores responsáveis pelo envelhecimento humano, algumas teorias são propostas. Dentre estas destacam-se: 1) Envelhecimento programado (BJORKSTEN et al., 1968); 2) Encurtamento dos telômeros (KRUK et al., 1995) e 3) Teoria dos radicais livres (HARMAN, 1993).

1.1 TEORIAS SOBRE O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO

1.1.1 Envelhecimento programado

A teoria do envelhecimento programado refere-se aos processos adaptativos herdados durante o processo evolutivo, sugerindo que há a normal deterioração decorrente do envelhecimento referente à expectativa de vida limitada resultante dos benefícios evolutivos adquiridos (GOLDSMITH, 2012). Essa teoria vem sendo debatida nas últimas décadas, no entanto, a veracidade desta e quais os mecanismos envolvidos ainda permanecem pouco esclarecidos. Autores sugerem certo altruísmo em relação a esta teoria, postulando que o envelhecimento promove a eliminação de indivíduos em fase pós-reprodutiva como o intuito de não competirem por recursos e evitando a superpopulação, sugerindo o processo de adaptação através de sucessões de gerações (LONGO et al., 2005).

1.1.2 Encurtamento dos Telômeros

Diversos estudos elucidam a teoria da instabilidade genômica (encurtamento dos telômeros) como importante fator responsável pelo envelhecimento celular (KRUK et al., 1995; DA COSTA et al., 2016). Os telômeros são sequências repetidas de DNA localizados na porção terminal dos cromossomos, os quais não podem ser totalmente replicados pela DNA polimerase (JOHNSON et al., 1999). A cada divisão celular, ocorre o encurtamento dos telômeros (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961), comprometendo a manutenção e o normal funcionamento dos órgãos e consequentemente comprometendo a homeostasia fisiológica. Grande parte dos tecidos apresentam significativo encurtamento dos telômeros, inclusive o tecido muscular esquelético (DJOJOSUBROTO et al., 2003).

1.1.3 Teoria dos radicais livres

Atualmente, a teoria dos radicais livres aceita estes como uma das principais causas do envelhecimento humano (DA COSTA et al., 2016; HARMAN, 1981). Paralelamente ao envelhecimento ocorre o aumento excessivo na produção de radicais livres. Estes excedem a capacidade endógena antioxidante, caracterizando o estresse oxidativo (JANG; VAN REMMEN, 2011). A relação entre o estresse oxidativo durante o envelhecimento e o tecido muscular esquelético merece atenção (FRANCESCHI et al., 2007; RYALL et al., 2008).

As espécies reativas de oxigênio (EROs), resultantes do metabolismo de diversas reações bioquímicas que envolvem as moléculas de oxigênio (NOVO; PAROLA, 2008) são consideradas responsáveis por induzir danos as estruturas lipídicas, proteicas e ao DNA celular (PIEDRAFITA et al., 2015; RINNERTHALER et al., 2015; THANAN et al., 2014). Além disso, o aumento do estresse oxidativo em indivíduos senis, afeta negativamente tanto a translação quanto o *turnover* proteico (VOGEL et al., 2011). A suposição de que o envelhecimento possa ser causado pelo aumento do estresse oxidativo tem sido demonstrado em diversas pesquisas. Há evidências de que a super expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) promove o aumento da expectativa de vida em *Drosophila melanogaster* (ORR; SOHAL, 1994). De maneira oposta, camundongos geneticamente modificados (-/-) para as enzimas glutationa peroxidase 1 (GPx1), SOD1, SOD2 e SOD3, não apresentaram aumento na expectativa de vida (HO et al., 1997). A depleção de SOD em camundongos promove atrofia muscular semelhante a observada durante o envelhecimento, porém, com maior incidência e mais precocemente (JANG et al., 2010). Estudos demonstram que o dano oxidativo desencadeia a mutação deletéria do DNA mitocondrial resultando em disfunção deste e que o tecido muscular esquelético é particularmente suscetível a esse fenômeno (HAGEN et al., 2004; HEPPLER et al., 2006).

O sistema endócrino parece exercer importante função na modulação do estresse oxidativo. As concentrações fisiológicas de estrógeno (E₂) em mulheres proporciona função protetora frente ao processo de envelhecimento, possivelmente devido ao aumento na expressão de genes relacionados à ação antioxidante e longevidade (BORRÁS et al., 2003; VINA et al., 2011). Esse efeito foi confirmado em ratas ovariectomizadas pelo aumento da

peroxidação lipídica. Quando submetidas à reposição hormonal estrogênica, a peroxidação lipídica foi semelhante aos valores observados em ratas intactas (BORRÁS et al., 2003).

1.1.4 Envelhecimento neuroendócrino

Diversas são as alterações fisiológicas associadas ao processo de envelhecimento, dentre estas, destaca-se o declínio progressivo das funções do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, apresentando alterações em sua estrutura, síntese e liberação hormonal (HERTOGHE, 2005; WANG et al., 2015; NICOLA et al., 2016). Esse declínio funcional gradativo propicia deficiência endócrina, a qual está potencialmente envolvida com a senescência humana (VITALE et al., 2012). Esse cenário é ainda mais complexo em mulheres, devido às alterações dos hormônios ovarianos ocorrerem simultaneamente ao envelhecimento (GREISING et al., 2011). Essas alterações se iniciam durante a fase de transição entre o período fértil e o fim da vida reprodutiva feminina, denominada perimenopausa (senescência reprodutiva). Durante este período específico, há consideráveis alterações fase-dependentes que envolvem a ativação e desativação de complexos sistemas regulatórios (PETRICKA; BENFEY, 2011). A redução da neurosecreção de hormônios GnRH da região medial basal do hipotálamo (RUBIN, 2000), e alterada secreção de neurotransmissores como o glutamato (NEAL-PERRY et al., 2005), GABA (MITSUSHIMA et al., 2002), noradrenalina (MACKINNON et al., 1983) e kisspeptina (DUNGAN et al., 2007; GIANETTI; SEMINARA, 2008), podem estar envolvidos no processo de transição do envelhecimento feminino (NICOLA et al., 2016). Tanto a espécie humana como roedores e primatas, demonstram similaridade durante a fase transicional perimenopausal, apresentando irregularidade cíclica e fértil, além de flutuações nas concentrações dos hormônios esteroidais e baixa sensibilidade ao E₂ (BRINTON, 2012; FINCH, 2014).

1.2 Alterações no tecido muscular esquelético e o envelhecimento neuroendócrino

O período de transição menopausal e o concomitante declínio na concentração de E₂ está relacionado com a diminuição da massa muscular (HALL et al., 2011; HARRIS, 1997; ROUBENOFF; HUGHES, 2000; THOMAS, 2007). Sabe-se que as concentrações plasmáticas dos hormônios sexuais influenciam os mecanismos responsáveis pela

manutenção da massa muscular, possivelmente, através de ação direta do E₂, uma vez que foi demonstrada a existência de receptores para E₂ (ERs) na membrana celular, citoplasma e membrana nuclear de fibras musculares (BROWN, 2008). Há evidências sobre a relação entre as concentrações de E₂ e a capacidade de geração de força muscular, pois em roedores ovariectomizadas (OVX) foi observada diminuição entre 10 e 20% na geração de força e esse efeito foi revertido pela reposição estrogênica (17β-estradiol) (HERTOGHE, 2005; LIGHTFOOT, 2008).

As baixas concentrações plasmáticas dos hormônios sexuais, detectadas em mulheres menopausadas (MESSIER et al., 2011), estão relacionadas com a sarcopenia que é caracterizada pela perda progressiva da massa e força muscular (CLOSE et al., 2007; TAN et al., 2012) diminuição da área de secção transversa de fibras musculares glicolíticas (tipo II) e, conseqüentemente redução da eficácia das proteínas contrateis durante o envelhecimento (LÉGER et al., 2008). Durante esse período, a diminuição das concentrações plasmáticas estrogênicas (estradiol e estrona) ocorre de maneira muito rápida, por volta de seis meses previamente à menopausa, onde as diminuições do estradiol são mais severas (RANNEVIK et al., 1995; SIPILÄ et al., 2013). A sarcopenia (perda da massa muscular) pode ser explicada por diversos fatores: redução da capacidade de auto reparo muscular (COLLINS et al., 2005), aumento da apoptose mitocondrial mediada pelo aumento de calpaínas (DIRKS; LEEUWENBURGH, 2005; VON et al., 2006), aumento dos níveis de estresse oxidativo (CONLEY et al., 2000; SIU et al., 2008), alterações no *turnover* proteico (NAIR, 1995), alterações hormonais e de citocinas (LEE et al., 2007), deservação progressiva, reduzida da capilarização e aumento do infiltrado adiposo intra-miocelular (TAN et al., 2012).

Destacamos também, outros hormônios que influenciam a homeostasia muscular, como o hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento derivado da insulina (IGF-1) (DA COSTA, 2016), ambos diminuídos durante o envelhecimento. Além disso, parece haver íntima relação sobre os benefícios promovidos pelo E₂ no tecido muscular esquelético e a via IGF-1/Akt/mTOR (OLIVIERI et al., 2014; PÖLLÄNEN et al., 2010).

1.3 O envelhecimento e as vias de sinalização relacionadas a manutenção do tecido muscular esquelético

Durante o envelhecimento o tecido muscular esquelético passa por diversos processos de remodelamento estrutural e funcional, resultando em desarranjo de vias responsáveis por sua homeostase (SANDRI et al., 2013). O tamanho das fibras musculares é controlado por dois processos simultâneos: o turnover celular, refletindo em acréscimo ou perda mionuclear, e o balanço entre a síntese e a degradação proteica. A contribuição das células satélites nos processos de proliferação e fusão às fibras musculares durante a fase embrionária/neonatal é bem evidenciado (PALLAFACCHINA et al., 2012). No entanto, a relevância da perda mionuclear durante o envelhecimento é controversa. Por outro lado, o desbalanço entre a síntese e a degradação proteica durante a senescência é o principal responsável pela atrofia muscular em idosos, modulada pela clássica via denominada *insulin growth-factor 1* (IGF-1), e pela consequente ativação das quinases *protein kinase B* (Akt), *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e a *Ribosomal protein S6 kinase beta-1* (P70S6K1) (SANDRI et al., 2013).

A via IGF-1/Akt exerce grande influência no processo de envelhecimento muscular. O aumento na síntese proteica ocorre devido a ativação da mTOR e simultânea inibição da degradação proteica por meio da inibição da via *Fork head box* (FoxO) e a redução da massa muscular se deve a diminuição da atividade da Akt (SCHIAFFINO, MAMMUCARI, 2011; SCHIAFFINO et al., 2013). No entanto, o aumento da via dFoxO, homólogo a via FoxO em Drosófilas, não somente preserva a função muscular como também estimula o processo autofágico reduzindo a quantidade de proteínas agregadas no tecido muscular, comum durante o envelhecimento (DEMONTIS, PERRIMON, 2010). Apesar das evidências sobre as alterações proteômicas e epigenéticas comuns durante o processo de envelhecimento, há diversas questões a serem elucidadas (SORIANO-ARROQUIA et al., 2016).

Os microRNAs emergiram como importantes moduladores da expressão gênica relacionados ao desenvolvimento e homeostase muscular durante a senescência. Os miRNAs são pequenas sequências de RNA compostos por aproximadamente 22 nucleotídeos que exercem fundamental papel nas complexas sinalizações regulatórias pós-transcricionais sobre a manutenção das funções celulares como crescimento,

desenvolvimento e metabolismo (FAN et al., 2016). Estima-se que 60% dos genes em humanos sejam regulados por miRNAs, sugerindo que o tecido muscular esquelético seja rico em miRNAs e que os mesmos desempenhem importantes funções em processos biológicos como o silenciamento de genes, como observado em idosos (ZACHAREWICZ et al., 2013). As funções dos miRNAs podem ser realizadas tanto pela supressão da translação de seu RNAm alvo ou pela degradação deste, demonstrando potente e sensitiva regulação sobre a expressão genica e funções celulares durante o processo de envelhecimento do tecido muscular esquelético (GUO et al., 2010).

O tecido muscular de animais jovens e idosos apresenta diferenças substanciais em relação a expressão gênica e proteica (McDONAGH et al., 2014), e conseqüentemente alterações na expressão dos miRNAs (JUNG, SUH, 2014). Apesar da existência de poucos estudos avaliando os efeitos da desregulação dos miRNAs no envelhecimento muscular (HU et al., 2014), sugere-se que tais alterações possam estar envolvidas na perda de massa muscular observada em idosos.

Por meio de análises moleculares em tecidos musculares que apresentavam atrofia foi observado aumento expressivo de duas ubiquitinas ligase fortemente envolvidas em processos atroficos musculares, denominadas *Muscle Ring Finger 1* (MuRF-1) e *Muscle Atrophy F-box* (MAFbx) (BODINE et al., 2011). Tais genes são modulados pela família de genes transcricionais *Forkhead* (FoxO), especialmente FoxO1 e FoxO3 (SANDRI et al., 2004). Durante o processo atrofico, a FoxO3 se liga a região promotora da MAFbx resultando em aumento da transcrição de MAFbx e conseqüentemente levando a atrofia muscular (SANDRI et al., 2004). O miR-182 demonstra direta interação com a FoxO3, se ligando a região 3' UTR, levando a redução das concentrações proteicas desse gene (HUDSON et al., 2014). Além disso, a super expressão do miR-182 foi capaz de proteger a atrofia induzida por dexametasona em cultura de células musculares, via inibição da FoxO3 (HUDSON et al., 2014).

Os estímulos induzidos pelas junções neuromusculares (JNM) junto às fibras musculares são essenciais para a manutenção da massa muscular (VALDEZ et al., 2010). No entanto, a estabilidade das JNM declina durante o envelhecimento, sendo um dos principais fatores responsáveis pelo comprometimento da massa muscular em idosos (BUTIKOFER et al., 2011; SAKELLARIOU et al., 2014). Recente estudo demonstrou a

relação do miR-206 no controle homeostático dos JNM em roedores senis, onde a ausência deste miRNA acelerou o processo de atrofia das fibras musculares induzido por desnervação (VALDEZ et al., 2014). Tal efeito se deve ao efeito inibidor deste miRNA sobre fatores que levam ao aumento do processo de desnervação, como a histona deacetilase (HDCA4) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (WILLIAMS et al., 2009). Outros fatores que também participam do processo de desnervação dos JNM como fator iniciador de translação (EIF4E3) e o fator de morte celular programado (PDCD10), parecem ter sua expressão reduzida na presença do miR-206 e miR-21 (SOARES et al., 2014).

A via IGF-1 demonstra grande potencial em modular a massa muscular (ADAMS, McCUE, 1998; LEE et al., 2004). Por outro lado, o miR-1 é expresso inversamente ao IGF-1, exercendo efeito inibidor sobre a expressão deste (ELIA et al., 2009; HITACHI; TSUCHIDA, 2014; WANG, 2013), desempenhando importante função no mecanismo regulatório pós-transcricional da massa muscular em idosos.

1.4 Influência da terapia hormonal estrogênica sobre a massa muscular em mulheres

Dentre as estratégias utilizadas com o objetivo de prevenir e minimizar o deterioramento da massa muscular em mulheres menopausadas, a terapia hormonal estrogênica (THE) demonstra resultados positivos. Porém, a literatura apresenta resultados contraditórios (MESSIER et al., 2011). Estudos prévios demonstram que a administração de E2 por 12 semanas foi capaz de promover aumento de massa magra (SØRENSEN et al., 2001) e prevenção da perda de massa muscular em mulheres (JONES et al., 2009; SØRENSEN et al., 2001). Por outro lado, não foi observado aumento significativo da massa muscular em mulheres que receberam administração de E2 por 64 semanas (HANSEN et al., 2003) e também a inexistência de diferença em relação à incidência de diminuição da massa muscular entre mulheres com e sem reposição hormonal estrogênica (KENNY et al., 2003). Além disso, a THE parece exercer efeito antioxidante (LI; XIANG; PING, 2015) via seus respectivos receptores.

1.5 Efeitos da prática do treinamento de força sobre a massa muscular durante a senescência feminina

Além da THE, atualmente, a prática do treinamento de força (TF) resulta em efeitos positivos na prevenção e na diminuição dos efeitos da sarcopenia (GARCÍA-PALLARS; IZQUIERDO, 2011; HARDEN, 2013; JONES et al., 2009; SAKUMA; YAMAGUCHI, 2010). Os benefícios promovidos pela prática do TF são diversos e incluem o aumento na produção de força (GARCÍA-PALLARS; IZQUIERDO, 2011), hipertrofia das fibras musculares (principalmente as do tipo IIA), aumento no tamanho do domínio mionuclear (GREIG et al., 2011), da síntese proteica (TANG et al., 2008), aumento na expressão de fatores de regulação miogênica (MRFs) (COSTA et al., 2007; KIM et al., 2005; SNIJDERS; VERDIJK; VAN LOON, 2009) e efeito anti-inflamatório (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Recentes estudos sugerem que a prática do TF (9-16 semanas) promove o aumento da área da fibra muscular com concomitante aumento na ativação e proliferação de células satélites (KADI; CHARIFI; DENIS, 2004; KADI et al., 2004; OLSEN et al., 2006; PETRELLA et al., 2006) e a diminuição da expressão de miostatina (COSTA et al., 2007). O protocolo experimental proposto por Hornberger e Farrar (HORNBERGER; FARRAR, 2004b) foi capaz de induzir adaptações fisiológicas decorrentes da prática do TF em ratos semelhantes ao observado em humanos. Após 8 semanas de TF, com auxílio de escada e sobrecarga, os autores observaram aumento de 23% no peso total no músculo *flexor longo do halux* (FLH), concomitante aumento de 24% no conteúdo proteico miofibrilar e a hipertrofia deste músculo em ratos jovens. No entanto, os mecanismos responsáveis tanto pelo processo hipertrófico e aos demais efeitos citados anteriormente permanecem pouco compreendidos (TANG et al., 2008), especialmente em relação ao organismo feminino no período do envelhecimento.

O exercício físico por si só não é capaz de prevenir as mudanças no tecido muscular esquelético induzida pelo envelhecimento. Outros fatores como os hormônios anabólicos (E₂, IGF-1 e Testosterona) são considerados mecanismos subjacentes (RYALL; SCHERTZER; LYNCH, 2008). Embora seja aceito que as mudanças estruturais e funcionais do músculo esquelético sejam inevitáveis, não está claro se os efeitos deletérios presentes durante o processo de envelhecimento possam ser cessados ou até mesmo revertidos (MELOV et al., 2007; RYALL; SCHERTZER; LYNCH, 2008). A combinação, TF e THE, resulta em efeitos positivos em mulheres menopausadas, ou seja, aumento significativo na

área de secção transversa muscular, porém, sem diferenças significativas quando comparados ao efeito isolado da suplementação estrogênica (SIPILÄ et al., 2001). No entanto, os mecanismos responsáveis por tais melhorias ainda são pouco elucidados. Portanto, há controvérsias sobre o efeito combinado destes. Sendo assim, tal combinação merece atenção, onde as variações na concentração hormonal e a caracterização do TF pertinentes ao presente estudo possam revelar diferentes resultados em relação aos demonstrados pela literatura.

Justificativa

2.0 JUSTIFICATIVA

Dentre as diversas alterações fisiológicas pertinentes à menopausa e ao avanço da idade, a alteração das vias de manutenção do tecido muscular esquelético merece atenção devido à gravidade de suas modificações e o impacto funcional causado. Diversos estudos demonstram que o E2 exerce importante função frente aos mecanismos responsáveis pela manutenção do tecido muscular esquelético. No entanto, não está totalmente clara a relação do E2 com a miogênese muscular, principalmente durante o envelhecimento. A THE demonstra-se benéfica, porém, as diferentes doses, períodos de administração e interferências de fatores como administração medicamentosa e perfil nutricional tornam os resultados contraditórios (MESSIER et al., 2011). Importante detalhe se refere ao modelo experimental a ser utilizado no presente estudo. Usamos as ratas Wistar como modelo experimental devido ao fato destas apresentam ciclicidade estral semelhante ao ciclo menstrual observado em mulheres, ou seja, perfil hormonal similar. Com o envelhecimento, as ratas tornam-se acíclicas, pois entram em estágio denominado de estro constante, caracterizado por concentração baixa e constante de E2 e células vaginais cornificadas (CHAKRABORTY; GORE, 2004; FERREIRA et al., 2015). Após este período, as ratas passam por estágio chamado diestro persistente, em que a concentração do estrogênio é mais baixa (embora detectável) e apresentam citologia vaginal leucocitária (LEFEVRE; MCCLINTOCK, 1988; NICOLA et al., 2016). Portanto, a senescência reprodutiva é caracterizada por períodos de ciclo estral irregular e com fases prolongadas, sendo referido como periestropausa ao período que antecede o cessar da ocorrência do proestro, denominado de estropausa (CHAKRABORTY; GORE, 2004). Dessa forma, durante o décimo sétimo mês de idade, o ciclo estral dos animais foi acompanhado mediante esfregaço vaginal (diário) para a confirmação da aciclicidade estral até o décimo oitavo mês, idade em que iniciamos os protocolos experimentais da terapia hormonal estrogênica (THE) e treinamento de força (TF).

Diversas pesquisas com o objetivo de avaliar as consequências da menopausa bem como possíveis intervenções para prevenção e/ou reversão da sarcopenia, realizam a castração em fêmeas jovens. Mesmo que a castração determine o hipoestrogenismo, o modelo não mimetiza os efeitos pertinentes do envelhecimento fisiológico natural sobre órgãos e sistemas. Sabe-se que o envelhecimento endócrino ocorre de maneira simultânea,

ou seja, envelhecimento central e periférico (hipotálamo-hipófise-gônadas). Sendo assim, o presente modelo busca mimetizar as situações reais de envelhecimento observadas durante a menopausa. Há diversas questões a serem elucidadas sobre o efeito da prática de TF, da THE e associação destes sobre o TME durante o envelhecimento. Em relação à prática de exercícios e o avanço da idade, não está claro como o envelhecimento afeta a resposta adaptativa ao TF, especialmente no organismo feminino (GREIG et al., 2011). Poucos estudos sobre envelhecimento muscular trazem relatos sobre os efeitos do envelhecimento e da resposta induzida pelo TF em mulheres. Além disso, não está claro se as adaptações musculares induzidas pelo exercício diferem em mulheres menopausadas com e sem THE (HALL et al., 2011).

Devido às alterações do sistema muscular esquelético observado durante o envelhecimento, o risco de quedas torna-se cada vez mais frequente, tornando-se desafio para os sistemas de saúde pública e que precisa urgentemente ser abordado (COLUMBIA, 2012). As quedas estão relacionadas como causa de parte grande das hospitalizações, injúrias, dores crônicas, redução da qualidade de vida, perda da autonomia (atividades rotineiras), imobilização, depressão e em vários casos, resulta em óbito (HALPERIN et al., 2012; VAN DEN BERGH; VAN GEEL; GEUSENS, 2012).

Objetivos e Hipótese

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos da terapêutica hormonal estrogênica, da prática do TF e da associação, sobre o estresse oxidativo e a manutenção da massa muscular de ratas na peri menopausa.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar se as intervenções citadas anteriormente de maneira isolada ou em associação poderiam amenizar a perda da massa muscular durante a peri menopausa, atenuando o estresse oxidativo e consequentemente promovendo melhorias sobre os mecanismos (epigenéticos) responsáveis pela manutenção do tecido muscular esquelético.

4 HIPÓTESE

Hipotetizamos que os benefícios induzidos pela terapêutica hormonal estrogênica e pela prática do treinamento de força e quando associados minimizam a produção de estresse oxidativo muscular, contribuindo para manutenção da massa muscular em ratas peri menopausadas.

Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e delineamento experimental

Os experimentos foram realizados com ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), obtidas junto ao biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA-UNESP, com idade inicial de dezessete meses e vinte e um meses ao final do período experimental. Os animais foram mantidos no Biotério do departamento de Ciências Básicas com controle de umidade ($55\pm 10\%$), temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz claro-escuro (12h/12h - início da fase escura 19 horas). Para evitar a influência da hereditariedade em nossos resultados, os animais foram aleatoriamente distribuídos e alojados 4 animais por caixa e tiveram livre acesso a ração (Presence[®] Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil) e água. O protocolo experimental foi aprovado (Anexo 1) pela Comissão Local de Ética no Uso de Animais da presente instituição (UNESP – Araçatuba (CEUA)).

Em relação aos critérios de inclusão e exclusão, utilizamos somente fêmeas múltiparas e com aciclicidade estral, avaliado por meio do acompanhamento do ciclo estral (EVANS; LONG, 1922; CORA et al., 2015), onde a alteração na duração das 4 fases do ciclo estral (Metaestro, Diestro, Proestro e Estro) expressam de maneira indireta as concentrações plasmáticas dos hormônios ovarianos. Portanto, somente ratas que apresentaram estas características após 03 ciclos consecutivos constituíram os grupos experimentais. Os animais receberam a THE e/ou foram submetidas a prática do TF por 16 semanas.

5.2 Grupos Experimentais

Após o acompanhamento de 01 mês do ciclo estral (17^o ao 18^o mês) e confirmação da aciclicidade dos animais, estes foram distribuídos (10 animais por grupo) nos seguintes grupos:

1) Grupo não treinado (NT-Veh): ratas acíclicas que não foram submetidas à prática do TF e não receberam a THE, somente injeções com o veículo diluente (óleo de milho) usado para diluição do 17β -estradiol;

2) Grupo não treinado e com THE (NT-E₂): ratas acíclicas que não foram submetidas à prática do TF e receberam a THE (17 β-estradiol);

3) Grupo treinado (TF-Veh): ratas acíclicas submetidas à prática do TF e não receberam a THE, somente injeções com o veículo diluente (óleo de milho);

4) Grupo treinado (TF) e com THE (TF-E₂): ratas acíclicas submetidas à prática do TF e receberam a THE (17 β-estradiol).

O estudo foi desenvolvido com mascaramento parcial dos dados, onde as pessoas envolvidas possuíam conhecimento mínimo sobre os nomes e as intervenções aplicadas aos grupos experimentais.

5.3 Terapêutica hormonal estrogênica

Os animais pertencentes aos grupos NT-E₂ e TF-E₂ receberam a THE (17β-estradiol, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MS, USA) duas vezes por semana (25 µg/kg/dose) (adaptado de MAROSI et al., 2012) por via subcutânea durante 16 semanas.

5.4 Testes funcionais

5.4.1 Teste de deambulação

A avaliação de deambulação possui elevada correlação com a força muscular, sendo ótimo indicativo do estado da função muscular esquelética (KENNEL et al., 1996). Neste teste, as patas traseiras dos animais foram colocadas em contato com tinta (guache) não tóxica e em seguida, os animais foram posicionados em uma caixa retangular de madeira (45 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura; sem teto e forrada com papel branco) para caminharem por três tentativas. Antes de terem as patas pintadas, os animais caminharam pela caixa três vezes. Em seguida, o comprimento da passada foi mensurado. Os dados foram obtidos previamente (17 meses de idade) e ao fim do período experimental (21 meses de idade).

5.4.2 Avaliação da atividade locomotora em campo aberto

A atividade locomotora (AL) foi avaliada em campo aberto em condições similares as que os animais encontram em seu habitat (biotério). A AL foi avaliada durante o período noturno (fase escura) onde os animais apresentam maior atividade motora.

Previamente a obtenção dos dados, os animais foram colocados em caixas (caixa de polietileno, 40x40x30 cm), semelhantes às que os mesmos permanecem no biotério. A caixa foi colocada em sala com temperatura e humidade controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 60%) e, em seguida, os animais, individualmente, foram colocados na caixa para explorarem o ambiente 30 minutos antes do início da obtenção dos dados. Em seguida, foi acoplado ao dorso dos animais, aparato com emissão de luz, constituído de velcro, lâmpada ultravioleta (UV) (não detectável pela retina de roedores) e pequena bateria de lítio. O movimento de cada animal foi gravado durante 30 minutos por câmara digital de alta definição (Cisco TelePresence Precision HD USB Camera, Amsterdam, Netherlands) acoplado a software específico para este tipo de análise (Master Track movement recorder system, Araçatuba, SP, Brasil). A câmara foi acoplada em suporte a distância de 1,30 m em relação ao aparato de emissão de luz, permitindo a captação de toda a extensão da caixa, como também da movimentação dos animais dentro deste perímetro. A distância total percorrida, tempo e velocidade de movimentação foram obtidos. Os dados foram obtidos previamente (17 meses de idade) e ao fim do período experimental (21 meses de idade).

5.5 Protocolo de treinamento de força e mensuração da capacidade máxima de geração de força voluntária (CMGFV)

Inicialmente, os animais foram familiarizados (adaptados) a escada (1.1 x 0.18 m, 2 cm de espaço entre os degraus, 80° de inclinação), utilizada para a realização do protocolo de TF. O período de adaptação teve duração de três sessões em dias não consecutivos sem o uso de sobrecarga (HORNBERGER; FARRAR, 2004; STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016). Após o período de adaptação, a capacidade máxima de geração de força voluntária (CMGFV) foi avaliada. O teste de CMGFV foi realizado com o uso de aparato [(BD Falcon 50 mL conical tube, BD Sciences®, Bedford, MA, USA) e esferas de aço (Cabana S/A, São Paulo, SP, Brasil)] utilizado com sobrecarga, presa a parte proximal da cauda dos animais com o auxílio de fita adesiva (Missner, Missner & Missner, Blumenau, SC, Brasil). A sobrecarga inicial imposta foi correspondente a 75% da massa corporal dos animais (individual), sendo acrescida em 30 gramas a cada sessão realizada de maneira completa (subida completa da escada).

A cada tentativa, os animais descansaram por 5 minutos, e em seguida realizaram nova série até que ocorresse a insucesso na subida da escada (subida incompleta). Quando a falha ocorreu, a sobrecarga anterior à falha foi considerada como a CMGFV, utilizada para controle a intensidade do TF e induzir correta sobrecarga a cada animal, respeitando o princípio da individualidade do treinamento. O teste de CMGFV foi realizado a cada 30 dias para que fosse mantida a intensidade suficiente para a obtenção de benefícios ao tecido muscular esquelético, uma vez que os animais se adaptam rapidamente as sobrecargas impostas.

Durante a primeira semana do protocolo de treinamento, os animais realizaram o TF com sobrecarga de 60% em relação ao teste inicial de CMGFV, na segunda semana com 70% e na terceira 80%. A intensidade de 80% foi mantida até o final do período experimental, 16 semanas. Os animais realizaram três sessões semanais de TF em dias não consecutivos e cada sessão foi constituída por seis séries (subidas), resultando entre 48 a 62 movimentos isotônicos por série (HORNBERGER; FARRAR, 2004). A figura 1 apresenta o esquema do delineamento experimental.

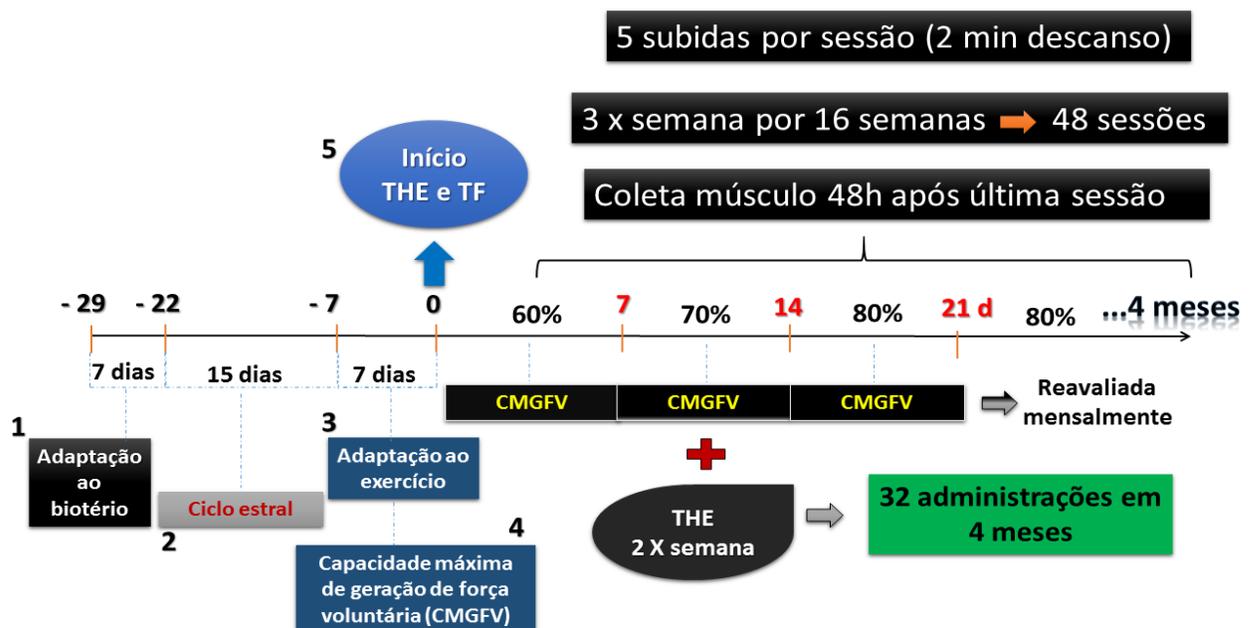


Figura 1 - Representação do delineamento experimental.

5.6 Coleta do tecido muscular esquelético e sangue

Quarenta e oito horas após a última sessão de TF, os animais foram decapitados para coleta de sangue e do músculo Flexor longo do hálux (FLH). A escolha do músculo FHL se deve ao fato de ser o principal músculo recrutado e responsivo ao método de TF proposto em nosso estudo (HORNBERGER; FARRAR, 2004) e também por ser constituído principalmente por fibras glicolíticas, as mais afetadas durante o envelhecimento. Os músculos FLH de ambos os membros foram cuidadosamente dissecados, pesados e em seguida armazenados de acordo com as respectivas análises realizadas (Fig. 2). O músculo FLH direito foi destinado à análise de imunofluorescência para determinação de fibras do tipo I (oxidativas) e produção de ânions superóxido por meio de sonda específica (Dihidroetidina (DHE)). Previamente a inclusão, incisão transversal na região medial foi realizada cuidadosamente com o auxílio de lâmina e base de cera dental, onde a incisão tem grande importância para a penetração do isopentano no tecido durante o processo de congelamento. Em seguida, o tecido foi fixado com uso de Tissue-Tek (Sakura Finetek Inc, Torrance, CA, USA), posicionado em base identificada e orientado pela região tendinosa, onde a loja posterior do FLH foi colocada em contato com o meio fixador, mantendo o tecido na correta posição durante o congelamento. Após a fixação e orientação, o tecido foi imerso em isopentano (crioprotetor que evita o surgimento de artefatos nas amostras) pré-resfriado em nitrogênio líquido até que o tecido estivesse congelado, e em seguida, armazenados em nitrogênio líquido. O músculo FLH do membro esquerdo foi destinado a avaliações epigenéticas (RNAm e microRNA) e proteicas. Logo após a remoção, o tecido foi pesado, armazenado em tubos RNase free, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer - 80°C (Indrel Ultra Freezer, Indrel Ind Ltda, PR, Brasil).

O sangue foi rapidamente armazenado em tubos devidamente heparinizados e em seguida centrifugados (3000 rpm; 15 minutos; 2°C) (Beckman J-6M Induction Drive Centrifuge; Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA). O plasma foi aliquotado e armazenado a - 20°C até a quantificação plasmática estrogênica.

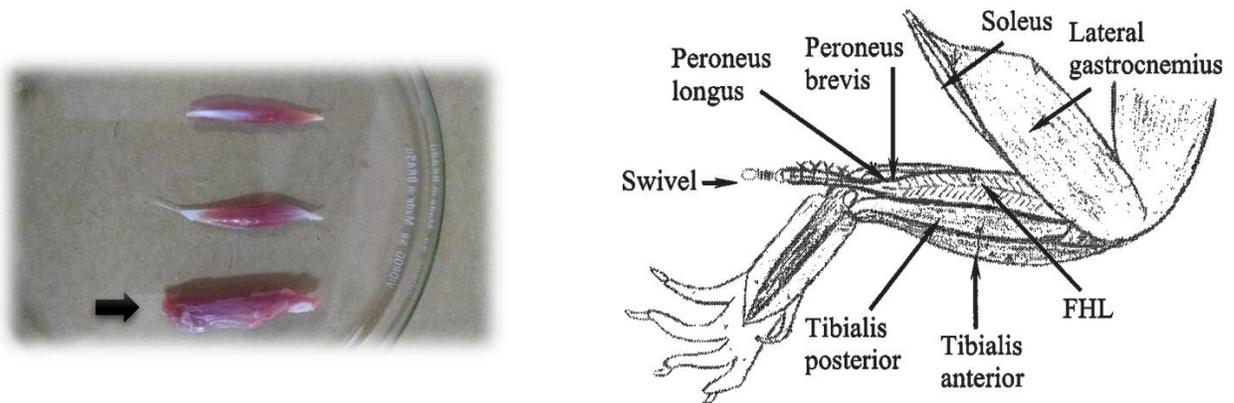


Figura 2 – Imagem do músculo Flexor longo do halux (sinalizado com a seta) após a remoção. Ao lado, a localização anatômica (FHL) do tecido localizado no membro inferior de roedores (modificado de HORNBERGER; FARRAR, 2004).

5.7 Análise da estrutura muscular esquelética: Imunofluorescência para fibras do tipo I e determinação da área de secção transversa

Cortes histológicos longitudinais com 10 μm espessura foram obtidos com o auxílio de criostato (Leica CM 1850, Leica Biosystems, Nussloch, BW, Germany). A imunistoquímica para as Cadeias Pesadas de Miosina do tipo I (MHCI) foram realizadas após fixação dos cortes histológicos em formalina a 4% (Sigma-Aldrich; #HT501128, Brasil) por dez minutos em temperatura ambiente, permeabilizadas em Triton X-100 a 0.2% (Bio-Rad; #01-0407, USA) e albumina sérica bovina a 1% (BSA; Amresco, #E588, USA), diluída em PBS (Tampão Fosfato de Salina; Sigma-Aldrich, #P4417, Brazil) por dez minutos e, o bloqueio realizado em goat serum a 10% (Sigma-Aldrich, G9023, Brazil) em PBS por 45 minutos. Os espécimes foram incubados em solução contendo os anticorpos primários para: 1) MHCI (diluição 1:6.000; Abcam, #ab11083, USA) para a diferenciação de fibras do tipo I; e 2) Laminina (diluição 1:100; Abcam, #ab7784, USA) para a delimitação das fibras musculares, com goat serum a 1.5% diluído em PBS, por uma hora e trinta minutos em temperatura ambiente. Após lavagem com Triton X-100 a 0.2% diluído em PBS, os cortes foram incubados por quarenta minutos em PBS contendo goat serum a 1.5% e os respectivos anticorpos secundários para MHCI (1:500 diluição; Alexa Fluor 568 goat anti-mouse (Life Technologies, #A11004, USA), e Laminina (1:500 diluição; Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit, Life Technologies, #A11008, USA). Após trinta

minutos de lavagem em Triton X-100 a 0.2% diluído em PBS, as laminas foram cobertas com lamínulas com o uso de glicerol (60% Glicerol, 40% 0.1 M Tris-HCl pH 9.3).

Em seguida, a avaliação da área de secção transversa (AST) foi realizada, onde avaliamos em torno de 300 fibras por animal, utilizando software ImageJ (Image Processing in Java, Bethesda, MD, NIH, USA). A captura das imagens foi realizada com magnificação de 200x em objetiva de 20x. A aquisição das imagens foi processada em computador acoplado ao sistema de vídeo por software específico (LAS V4.2, Leica Microsystems, Wetzlar, Hessen, Germany). Todas as análises foram conduzidas por mesmo avaliador, cego a identificação dos grupos experimentais (SRLM).

5.8 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

5.8.1 Produtos da oxidação de dihidroetidina

A dihidroetidina (DHE) é molécula não fluorescente que ao ser oxidada por ERO produz intercalantes de DNA que emitem fluorescência. A fluorescência total (observada em microscópio de fluorescência) derivada da oxidação da DHE permite a análise da produção total de EROS em tecidos, mais especificamente de ânions superóxido. Para análise de fluorescência total, secções dos músculos (10 μm) foram incubadas com DHE (10 μM) a 37°C por 30 min (MANSOUR et al., 2012; SULLIVAN-GUNN et al., 2011). As imagens foram obtidas em microscópio confocal (Zeiss LSM510 Meta) e a intensidade de fluorescência quantificada por meio do programa Image J (Scion Corporation, NIH, EUA).

5.9 Sistema de defesa antioxidante

5.9.1 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pelo método que consiste na inibição da redução do citocromo C por radicais superóxidos gerados pelo sistema xantina-xantina-oxidase, proporcionada pela SOD, que compete com o citocromo C pelos radicais gerados (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). O músculo FLH foi homogeneizado em tampão fosfato (50 mM PBS, pH 7,4 + 1mM EDTA) e centrifugado (12000 x g durante 15 minutos a 4°C). Inicialmente, a taxa de redução do citocromo C foi avaliada na ausência das amostras, pela leitura da taxa de alteração de absorbância em 550nm durante 5

minutos, em solução contendo citocromo C (19 mM), xantina (1,18 mM) e xantina oxidase diluídos em tampão fosfato (0,05 M, pH 7,8). A concentração de xantina oxidase foi ajustada para uma taxa de redução de citocromo C de 0,025 unidades de absorvância por minuto (UA/min). Na sequência, a taxa de redução de citocromo C foi acompanhada durante 5 minutos na presença da amostra diluída na solução supracitada. A atividade de SOD da amostra foi calculada pela diferença entre a taxa de oxidação de citocromo C e na presença de amostra.

5.9.2 Atividade da catalase

A atividade da catalase foi avaliada pelo acompanhamento da decomposição de peróxido de hidrogênio adicionado às amostras, por meio de leitura de absorvância em 240nm. O tecido muscular foi homogeneizado em tampão fosfato (50 mM PBS, pH 7,4 + 1 mM EDTA) e centrifugados (12000 x g durante 15 minutos a 4°C). A fração sobrenadante foi utilizada no ensaio. O peróxido de hidrogênio foi adicionado ao lisado na concentração final de 10mM e a absorvância em 240 nm foi acompanhada durante 4 minutos. A taxa de decaimento da absorvância correspondeu à atividade de catalase presente na amostra testada (WEYDERT; CULLEN, 2010).

5.9.3 Atividade de glutathiona

Para avaliação dos níveis totais de glutathiona, principal agente redutor celular, utilizamos kit de detecção fluorescente (Glutathione Fluorescent Detection Kit, Arbor Assays LLC, EUA). Aproximadamente 15 mg dos músculos foram homogeneizados em tampão fosfato gelado (100 mM, pH 7) e centrifugados (14000 x g por 10 min a 4°C). As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com volume igual de ácido sulfosalicílico (5%) gelado. Os níveis de glutathiona foram avaliados por fluorescência (λ_{exc} 390 nm, λ_{em} 510 nm) em espectrofluorímetro de placa de 96 poços (Wallac Victor2 1420-Multilabel Counter, Perkin ElmerTM, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

5.10 Dosagem plasmática de estradiol

A concentração plasmática de estradiol foi determinada por meio de kit de ELISA (IBL International GMBH, Hamburg, Germany), seguindo as orientações fornecidas pelo

fabricante. As amostras sanguíneas foram obtidas quatro dias após a última administração de estradiol, em seguida centrifugadas (1500 x g, 15 min, 4°C) e o soro removido e armazenado a -80°C até a realização das análises. As amostras foram distribuídas em triplicatas e a concentração mínima detectável foi de 0.28 ng/mL. Os valores foram apresentados em ng/mL.

5.11 Extração do RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído do músculo FLH com o uso de TRIzol (Life Technologies, CA, USA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Em seguida foi avaliado a concentração e pureza do RNA por meio da mensuração da absorbância em 260 e 280 nm com uso de NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA). A integridade do RNA foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose. Em seguida, realizamos a transcrição reversa para síntese de cDNA. O cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA total com uso de kit (High Capacity RNA-to-cDNA kit; Life Technologies, USA) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Já a síntese de cDNA para a avaliação de MicroRNAs (miRNAs) foi realizada com o uso de kit específico para a transcrição reversa de miRNAs (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies).

5.12 Análise quantitativa em tempo real – PCR (qRT-PCR)

As análises quantitativas em tempo real foram realizadas em um ABI PRISM 7500 SDS (Life Technologies), usando o método de Taqman para miR-1 (#TM002222; Applied Biosystems, USA), miR-181a (#TM00480; Applied Biosystems, USA), Esr 1- α (#Rn01640372_m1; Applied Biosystems, USA), Esr 2- β , #Rn00562610_m1; Applied Biosystems, USA) and U6 (#TM 001013; Applied Biosystems, USA). A expressão relativa de IGF-1, Atrogin, *Muscle Ringer Finger-1* (MURF-1), Sirtuína 1 (Sirt1), fator eritróide nuclear 2 (Nrf2), *Cytochrome C oxidase subunit 4* (COXIV), G protein-coupled receptor GPR30 (GPR30) e Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT1) foram avaliados com uso de SYBR Green. Os primers foram construídos especificamente de acordo com as características genéticas do modelo experimental utilizado neste estudo com uso de ferramenta específica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A sequência de cada primer está demonstrada na tabela 1. Os valores quantitativos obtidos

nas amostras de tecido muscular foram normalizados pela expressão de HPRT1. O nível relativo de cada gene e miRNA foi calculado usando o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), demonstrado como variação média de aumento de expressão gênica.

Tabela 1 – Sequência dos primers (SYBR Green)

Genes	Forward sequence	Reverse sequence
IGF-1	5' – GGT GAC GTG GCA TTT TCT GT – 3'	5' – CTT CCG GAC CTG TGA TCT GA – 3'
Atrogin	5' – ACG ATG TTG CAG CCA AGA AGA – 3'	5' – GCT TCC CCC AAA GTG CAG TA – 3'
MURF-1	5' – CAC CCG ATG TGC AAG GAA CA – 3'	5' – ATG CTT TGT AAG GGG GCA ACT – 3'
Sirt1	5' - CCC AGA TCC TCA AGC CAT GT - 3'	5' - GCT GGA TTT TGT GTG TGT GT - 3'
COXIV	5' - TGC AGC AAA TGG GTC TCC TA - 3'	5' - TGA GAC GGG TTT GCT TTG TG - 3'
GPR30	5' - GTC TTC TGC GCC ACA TAC AG - 3'	5' - TGA TCT TCG CAG TGG TCC TT - 3'
Nrf2	5' - CTG CCA AAC TTG CTC CAT GT - 3'	5' - CAG TCT TCA CCA CCC CTG AT - 3'
HPRT1	5' - GCC TCC CAT CTC CTT CAT GA - 3'	5' - TTC CTC CTC AGA CCG CTT TT - 3'

5.13 Western blot

O músculo FLH foi homogeneizado em tampão de lise (Tris-HCl, pH 7.5/20 mM, EDTA/2 mM, EGTA/2 mM, sucrose/250 mM, DTT/5 mM, Triton-X/0.1%, PMSF/1 mM, NaF/10 mM, SOV4/0.2 mM) e cocktail inibidor de protease/1x (Sigma Aldrich), centrifugado (15 min, 12000 rpm, 4° C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e usado para as análises. A avaliação da concentração proteica foi mensurada pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, München, Germany). Os sobrenadantes das amostras do tecido muscular foram homogeneizados com 5.25 µL of DTT e 3.75 µL de tampão de amostra e aquecidas por cinco minutos a 95° C em um termociclador (T1, Biometra). As proteínas foram eletro transferidas para membrana de nitrocelulose por meio de equipamento específico (Trans-Blot® Turbo equipment, Bio-Rad, München, Germany). As membranas foram incubadas com anticorpos para Akt1 (Cell Signaling, 1:250, #4056), mTOR (Cell Signaling, 1:500, #2971), gp91^{phox} (BD Transduction Laboratories, 1:300, #554002), α-Tubulin (Sigma Aldrich, 1:800, #T5168), phospho-Akt1 (Thr308) (Sigma Aldrich, 1:250, # 4504332), phospho-mTOR (Ser2448) (Cell Signaling, 1:300, #2972). As concentrações da α-tubulina foram usadas como controle para a quantificação proteica. Os sinais foram adquiridos com o uso do ChemiDoc-It Imaging

System (UVP, LLC) e as análises foram analisadas com o uso do software Image Lab[®] software (Bio-Rad Laboratories, München, Germany).

5.14 Análise estatística

Os dados obtidos nesse estudo foram apresentados na forma de média \pm erro padrão da média e comparados por meio de análise de variância (two-way ANOVA test) (THE e TF como variáveis independentes) seguido pelo pós-teste de Tukey. Para todas as análises foi adotado nível de significância $p \leq 0,05$ (α) e o valor de 0.8 para o fator β (OpenEpi, versão 3.1, www.openepi.com). O tamanho amostral foi determinado baseado em prévios estudos relacionados ao tema de pesquisa do presente estudo. As análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Prism 6.0, La Jolla, CA, USA).

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Parâmetros Fisiológicos

Com o objetivo de verificar se as intervenções alteraram o peso de tecidos responsivos às intervenções utilizadas em nosso estudo, avaliamos o peso dos tecidos adiposo, uterino, ovariano, ingesta e as concentrações plasmáticas de E₂. O peso do tecido adiposo não foi influenciado pela THE (Tabela 2). Já os animais treinados, que receberam ou não a THE, apresentaram redução significativa na quantidade de tecido adiposo (Tabela 2). As intervenções, de maneira isolada ou em associação, não induziram alterações no peso dos tecidos ovariano e uterino assim como na ingesta de ração e água. Não houve diferença significativa nas concentrações plasmáticas de E₂, no entanto, vale a pena salientar que a última administração de E₂ ocorreu quatro dias prévios a coleta do material biológico (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros Fisiológicos

	Grupos			
	NT-Veh	NT-E ₂	TF-Veh	TF-E ₂
Tecido adiposo (g/mc)	21.71±1.73	20.90±1.05	14.58±3.88*	12.79±2.53*
Útero (g/mc)	0.81±0.09	0.74±0.08	0.75±0.10	0.58±0.13
Ovário (g/mc)	0.18±0.04	0.22±0.03	0.25±0.08	0.23±0.05
Consumo ração (g)	122.40±18.43	120.59±9.09	0.25±0.08	145.78±11.07
Consumo água (mL)	170.12±22.45	173.28±28.91	164.32±26.34	145.78±11.07
Estrógeno (pg/mL)	32.28±1.35	33.34±0.7	31.87±2.3	34.63±1.5

O consumo de água e ração foram mensurados semanalmente e o consume mensal foi apresentado. O peso do tecido adiposo, uterino e ovariano foram normalizados em relação a massa corporal (mc) (100 g/mc). A concentração plasmática estrogênica foi mensurada por meio de kit comercial de ELISA. Os dados foram apresentados na forma de média ± erro padrão da media (SEM). * p≤ 0.05 vs. grupo NT-Veh.

6.1 A capacidade máxima de geração de força voluntária (CMGFV) e a função muscular em ratas periostropausadas após o treinamento de força

Dentre os fatores negativos que acometem o tecido muscular esquelético durante o envelhecimento, a perda da massa e força muscular merecem destaque. Assim, iniciamos nossas análises verificando como as intervenções, de maneira isolada ou em associação, poderiam ter influenciado a CMGFV e a função muscular de ratas periostropausadas. Observamos que os animais que não foram submetidos a nenhuma das intervenções (NT-Veh) e os que receberam THE não demonstraram alterações significantes em relação à geração de força (CMGFV) (Fig. 3A). Já os animais que foram submetidos ao TF, associado ou não a THE, demonstraram ganho exponencial de força durante o período experimental (16 semanas) (Fig. 3A). Em relação a esse parâmetro, a associação das intervenções não potencializou o efeito induzido pela prática do TF (Fig. 3A).

O ganho de força obtido pelos animais submetidos ao TF refletiu positivamente sobre a função muscular. Em relação ao teste de deambulação (Fig. 3B), os animais pertencentes aos grupos TF-Veh e TF-E₂ apresentaram melhoras após as intervenções. No entanto, o resultado promovido pela prática isolada do TF mostrou-se superior do que a observada em associação a THE. As ratas pertencentes ao grupo NT-Veh apresentaram redução no tempo de movimentação, avaliado aos 18 meses e ao fim do período experimental (21 meses). Durante esse mesmo período, os animais que receberam a THE (NT-E₂) mantiveram valores semelhantes aos obtidos anteriormente, ou seja, os resultados sinalizam participação do hormônio esteroide na capacidade de movimentação dos animais (Fig. 3C). Já os animais treinados (TF-Veh e TF-E₂) demonstraram melhora significativa em relação a movimentação observada durante a primeira avaliação (Fig. 3C). Nenhuma alteração significativa foi observada sobre a velocidade de movimentação dos animais, no entanto, a associação das intervenções resultou em interessante resultado. Os animais pertencentes ao grupo TF-E₂ percorreram maior distância em relação ao teste inicial e também quando comparados aos animais pertencentes ao grupo NT-Veh (Fig. 3D). Portanto, observamos que o TF foi eficaz em induzir melhorias na parte funcional muscular em relação a THE.

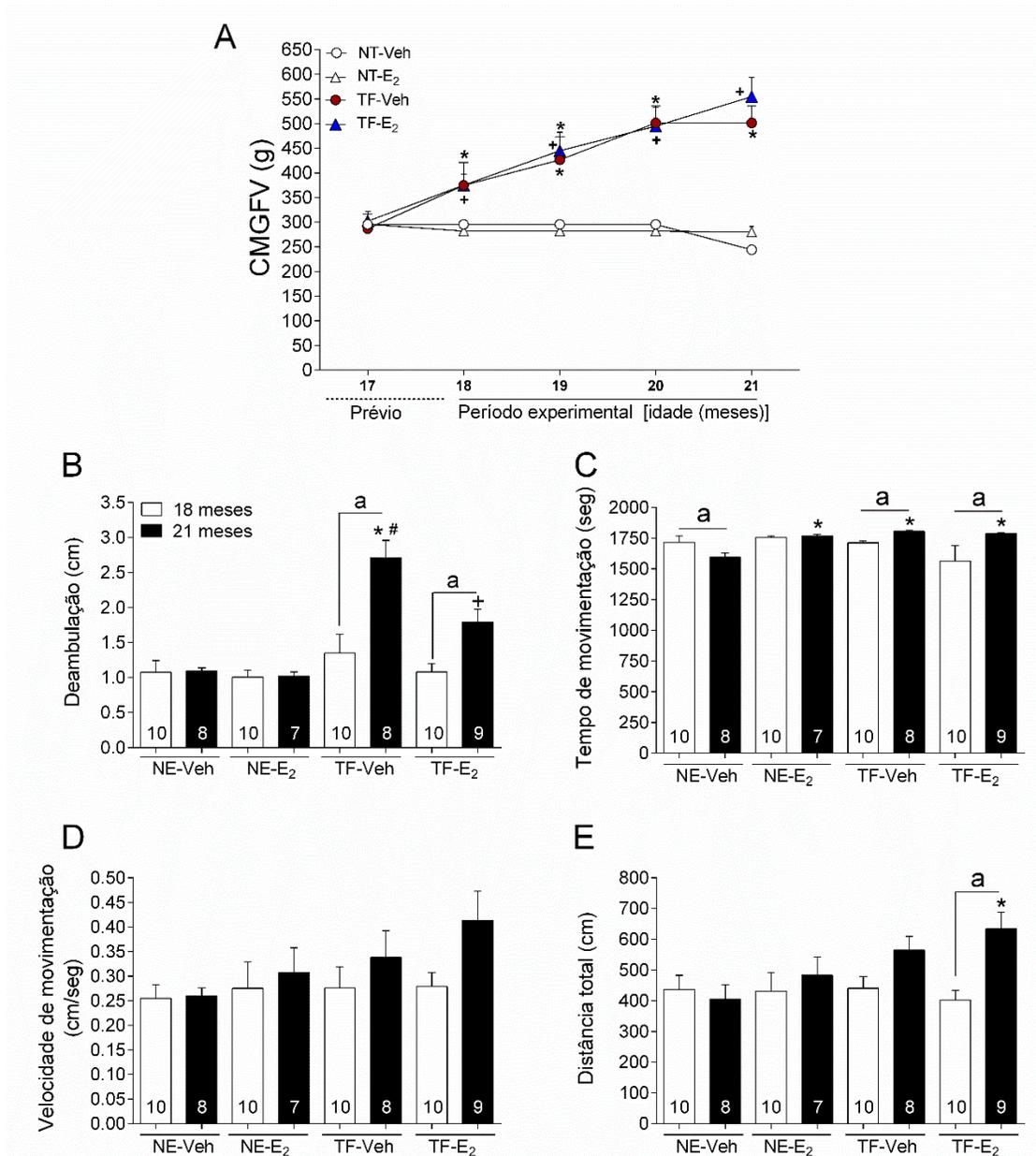


Figura 3 – Efeitos de 16 semanas de THE e TF sobre a capacidade máxima de geração de força voluntária e função muscular. (a) Capacidade máxima de geração de força voluntária (CMGFV), (b) Teste de deambulação, (c) Tempo de movimentação, (d) Velocidade de movimentação e (e) Distância total percorrida, previamente e após 16 semanas, avaliado em ratas senis aos 21 meses de idade que não foram submetidas a nenhuma das intervenções (NT-Veh), tratadas com 17 β -estradiol (NT-E₂), submetidas ao treinamento de força (TF-Veh) e a associação das intervenções (TF-E₂). Os valores foram apresentados como média e erro padrão da média (SEM). * $p < 0.0001$ vs. grupo NT-Veh; + $p < 0.05$ vs. grupo NT-E₂, # $p < 0.05$ vs. grupo TF-E₂, ^a $p < 0.05$ vs. aos 18 meses de idade. O número amostral avaliado em cada experimento está disposto nas barras dos resultados.

6.2 Morfologia e composição muscular após a da terapêutica hormonal e treinamento de força

Com o intuito de avaliar se o aumento da força (CGMFV) e a melhora na função muscular resultaram em alterações morfológicas e na composição muscular, a tipagem, o peso, o percentual de fibras bem como a área de secção transversa (AST) do músculo FLH foram avaliados. Aos 21 meses de idade, observamos que os animais que não receberam nenhuma das intervenções (NT-Veh) apresentaram menor AST quando comparados aos demais grupos (Figura 4A e 4E). Tanto a THE (4B) quanto a prática do TF (4C), isoladamente ou associadas (4D), preveniram a diminuição da AST destes animais (4E).

Interessantemente, os animais pertencentes aos grupos NT-E₂, TF-Veh e TF-E₂ apresentaram resultados significantes em relação ao metabolismo muscular, com alterações no percentual de tipagem das fibras musculares. Estes animais apresentaram aumento no percentual de fibras glicolíticas (tipo II) e redução das fibras oxidativas (tipo I), quando comparados aos animais pertencentes ao grupo NT-Veh (Fig. 4F). A associação das intervenções resultou em diminuição do percentual de fibras oxidativas não somente em relação ao grupo NT-Veh, mas também em relação ao grupo NE-E₂ (Fig. 4F). Além disso, os animais treinados apresentaram aumento no percentual de fibras glicolíticas (tipo II) quando comparados aos animais do grupo NT-Veh (Fig. 4F). Em relação ao peso do músculo FLH, as intervenções de maneira isolada ou em associação resultaram em aumento significativo do tecido muscular (Fig. 4G).

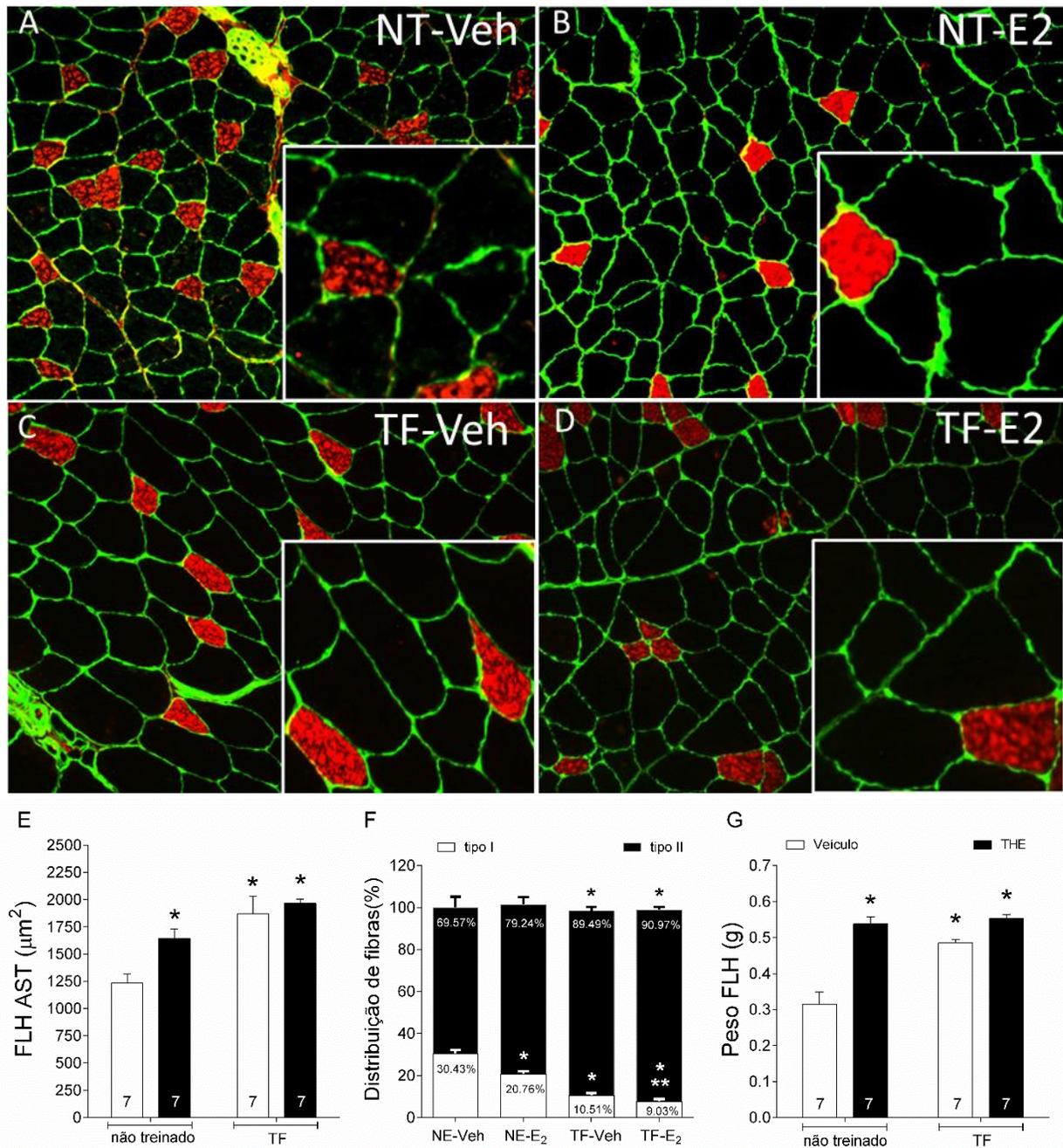


Figura 4 – Efeitos da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força na massa e força muscular. Imagens representativas de secções transversais do músculo *flexor longo do halux* (FLH) com imunomarcagem positiva para miosinas de cadeia pesada (MHC, tipo I) (vermelho) e Laminina (verde). As células em vermelho indicam marcação positiva para fibras lentas (MHC tipo I). (A, B, C e D) MHC, (E) Área de secção transversal (AST), (F) Percentual de distribuição de fibras e (G) Peso do músculo FLH. As análises foram avaliadas no músculo *flexor longo do hálux* (FLH) de ratas senis aos 21 meses de idade que não foram submetidas a nenhuma das intervenções (NT-Veh), tratadas com 17 β -estradiol (NT-E₂), submetidas ao treinamento

de força (TF-Veh) e a associação das intervenções (TF-E₂) por 16 semanas. Os dados foram apresentados com média±erro padrão da media (SEM). * p<0.05 vs. NT-Veh; ** p<0.05 vs. NT-E₂, com o uso de two-way ANOVA. O número de animais estudados em cada análise está disposto na barra representativa de cada grupo.

6.3 Treinamento de força e a associação com a terapêutica hormonal estrogênica aumentam a expressão dos receptores estrogênicos (ERs)

Com o objetivo de verificar se a THE, TF ou a associação das terapias poderiam alterar a expressão dos ERs, nos administramos E₂ [50 µg/kg/semana] para ratas senis dos 18 aos 21 meses de idade, durante o período da peri menopausa. Em nosso estudo, a expressão dos receptores ER α (Fig. 5A), GPR30 (Fig. 5B) e ER β (Fig. 5C) não apresentaram alteração significativa com o uso da THE enquanto os animais treinados demonstraram aumento significativo do ER β (Fig. 5C). As terapias combinadas aumentaram a expressão de receptores ER α , ER β e GPR30 (Fig. 5). Nossos resultados sugerem que o ER β parece ser mais sensível aos estímulos mecânicos induzidos pelo TF do que os demais receptores, enquanto os ER α e GPR30 parecem ser responsivos somente a associação entre o TF e a THE.

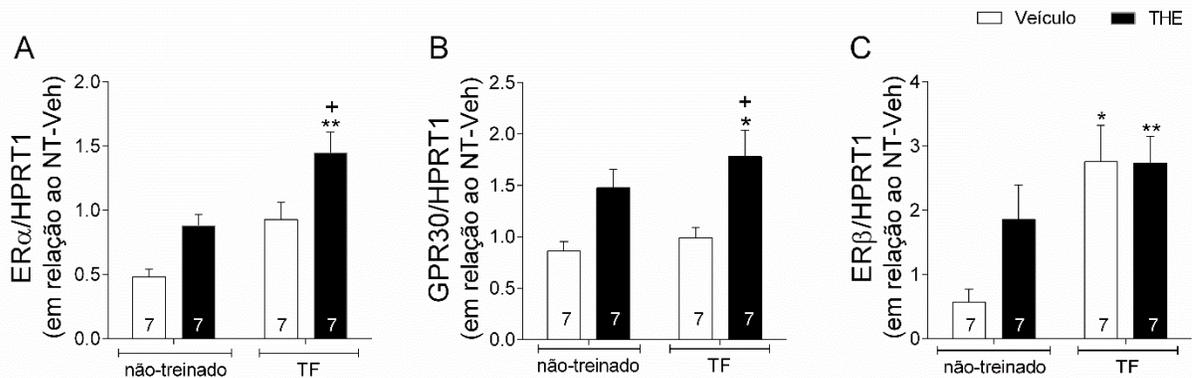


Figura 5 – Expressão (RNAm) de ER α , ER β e GPR30 após tratamento com E₂, TF e a associação das terapias. Níveis de expressão de RNAm dos receptores estrogênicos α (A), GPR30 (B) e β (C) avaliados no músculo *flexor longo do hálux* (FLH) de ratas senis aos 21 meses de idade que não foram submetidas a nenhuma das intervenções (NT-Veh), tratadas com 17 β -estradiol (NT-E₂), submetidas ao treinamento de força (TF-Veh) e a associação das intervenções (TF-E₂) por 16 semanas. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão da media (SEM). * p<0.05 vs. NT-Veh; ** p<0.05 vs. NT-E₂; + p<0.05 vs. TF-Veh, com o uso de two-way ANOVA. O número de animais estudados em cada análise está disposto na barra representativa de cada grupo.

6.4 A associação da terapêutica hormonal estrogênica e o treinamento de força atenuam o estresse oxidativo e o estado redox muscular

Sabe-se que os ERs estão envolvidos na modulação de genes antioxidantes no tecido muscular esquelético (BALTGALVIS et al., 2010). Nesse sentido, investigamos se as intervenções (THE e TF) isoladamente ou em associação poderiam influenciar o estresse oxidativo muscular. Observamos que os animais não treinados e que receberam a terapêutica hormonal (NT-E₂) apresentaram redução significativa na produção de ânions superóxido quando comparados aos animais pertencentes ao grupo NE-Veh (Figura 6A e B). No entanto, a redução observada neste grupo de animais não foi acompanhada por diminuição do dano lipídico da membrana muscular (Figura 6C).

A associação das terapias (TF-E₂) resultou em diminuição dos níveis de hidroperóxidos lipídicos em comparação ao grupo NT-Veh, sugerindo maior integridade da membrana muscular destes animais. Sugerimos que a melhora na integridade da membrana celular do músculo FLH possa ter sido influenciada pelo aumento da expressão do receptor estrogênico não genômico GPR30 (Figura 5B) (PERSKY, 2000; ENNS; TIIDUS, 2010; KENDALL; ESTON, 2002; TIIDUS, 1995; WHITING; RESTALL; BRAIN, 2000).

Dentre os fatores antioxidantes, o fator eritróide nuclear 2 (Nrf2) é conhecido como um dos principais moduladores de genes antioxidantes, regulando a expressão enzimática e de componentes como SOD, CAT e GSH (LIU; ZHANG; LIANG, 2015; WANG et al., 2015). Em nosso estudo observamos aumento significativo de Nrf2 somente nos animais que receberam a terapêutica hormonal estrogênica (NT-E₂) (Figura 7A). No entanto, o aumento na expressão de Nrf2 demonstrada pelo grupo NT-E₂ não resultou em melhora da defesa antioxidante (CAT, SOD, GSH) (Figura 7B, C e D). Porém, a associação com o TF (TF-E₂) resultou em aumento da atividade de CAT (Figura 7C).

Sabe-se que a atividade mitocondrial exerce grande influência tanto na produção de ERO quanto na síntese de genes antioxidantes. Nesse sentido, avaliamos se a melhora observada no sistema antioxidante muscular possa ter alguma relação com a biogênese mitocondrial. A associação das intervenções resultou em aumento expressivo na expressão de Sirt1 (Figura 7E). Este aumento influenciou positivamente a expressão do *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein 1* (PGC-

1α) (Figura 7F), acompanhada pelo aumento na expressão de Sirt3 (Figura 7G), o qual possui relação com a expressão de genes antioxidantes (KONG et al., 2010). Além disso, a THE isolada e em associação ao TF resultou em aumento da expressão de COXIV (7H), indicador de integridade da membrana mitocondrial (KONG et al., 2010; WANG et al., 2015).

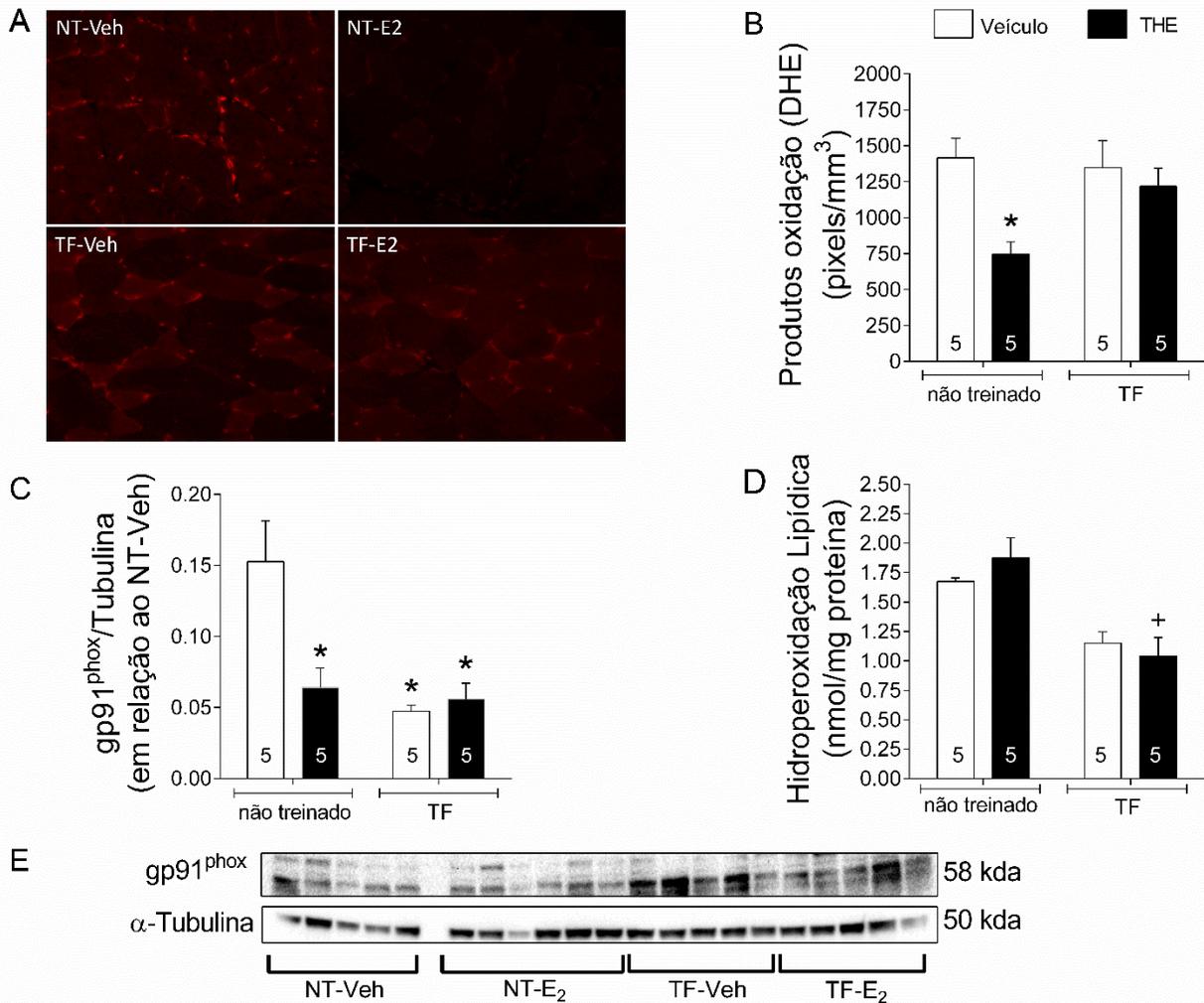


Figura 6 – Efeitos da terapêutica hormonal estrogênica e treinamento de força sobre o estresse oxidativo muscular de ratas perimenopausadas. (A) Imagens representativas da fluorescência emitida pelos núcleos das fibras musculares; (B) quantificação dos produtos da oxidação avaliados pela fluorescência da dihidroetidina (DHE) em cortes seriados do músculo *flexor longo do hálux* (FLH); (C) Concentração proteica de gp91^{phox}; (D) Produção de hidroperóxidos lipídicos e (E) Blots representativos da gp91^{phox} e Tubulina, avaliados no músculo *flexor hallucis longus* (FLH) de ratas senis aos 21 meses de idade que não foram submetidas a nenhuma das intervenções (NT-Veh), tratadas com 17 β -estradiol (NT-E₂), submetidas ao treinamento

de força (TF-Veh) e a associação das intervenções (TF-E₂) por 16 semanas. Os dados foram apresentados com média±erro padrão da media (SEM). * p<0.05 vs. NT-Veh; ** p<0.05 vs. NT-E₂; + p<0.05 vs. TF-Veh, com o uso de two-way ANOVA. O número de animais estudados em cada análise está disposto na barra representativa de cada grupo.

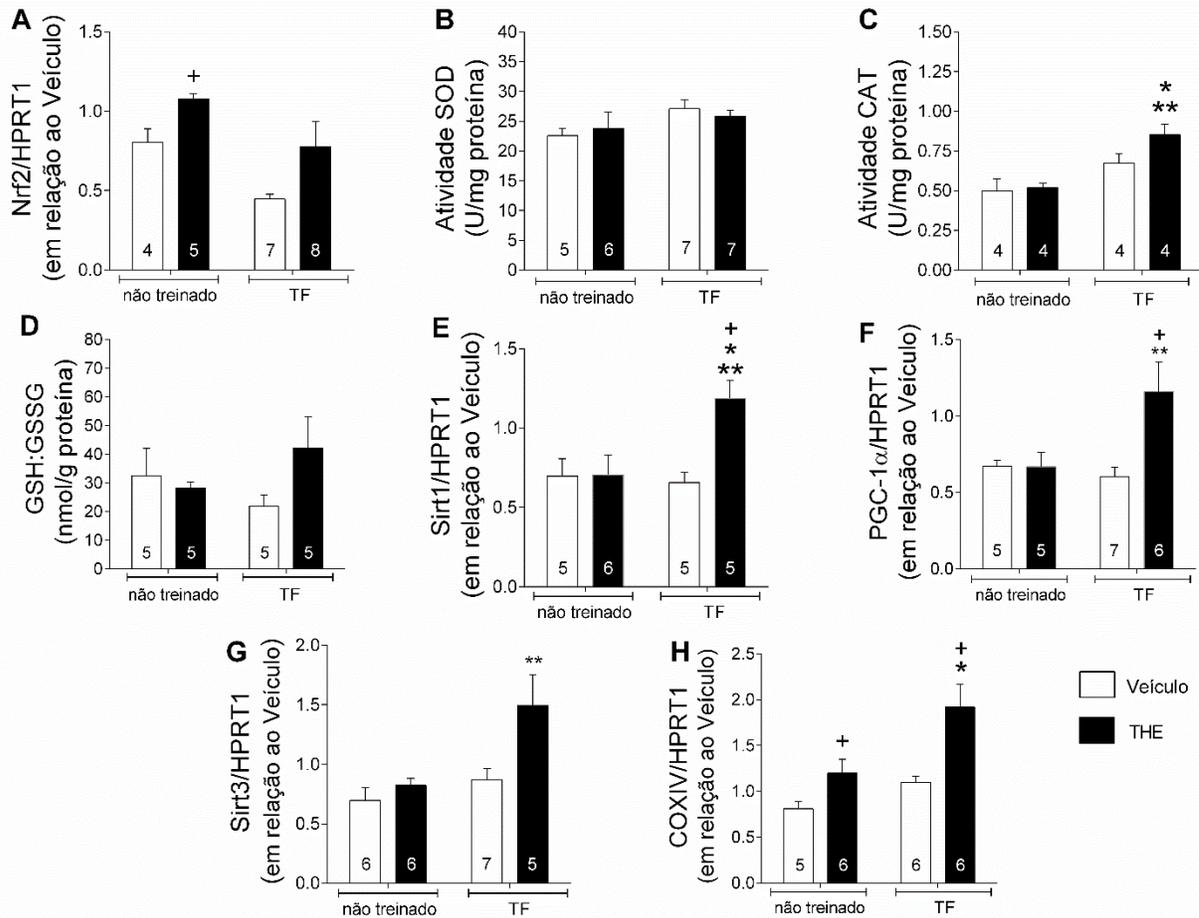


Figura 7 – Efeito da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força sobre o sistema antioxidante e a biogênese mitocondrial muscular de ratas senis. (A) Expressão de RNAm do fator eritróide nuclear 2 (Nrf2); Atividades da superóxido dismutase (SOD) (B), catalase (CAT) (C) e a razão GSH:GSSG (D); Expressão de RNAm da Sirtuína 1 (Sirt1) (E), *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein 1* (PGC-1α) (F), Sirt3 (G) e *Cytochrome C oxidase subunit 4* (COXIV) (H) avaliados no músculo *flexor longo do hálux* (FLH) de ratas senis aos 21 meses de idade que não foram submetidas a nenhuma das intervenções (NT-Veh), tratadas com 17 β-estradiol (NT-E₂), submetidas ao treinamento de força (TF-Veh) e a associação das intervenções (TF-E₂) por 16 semanas. Os dados foram apresentados com média±erro padrão da media (SEM). * p<0.05 vs. NT-Veh; ** p<0.05 vs. NT-E₂; + p<0.05 vs. TF-Veh,

com o uso de two-way ANOVA. O número de animais estudados em cada análise está disposto na barra representativa de cada grupo.

6.6 Influência da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força sobre genes atrofícos

Investigamos se a atenuação do estresse oxidativo e a melhora do sistema antioxidante poderia influenciar a expressão de 2 genes atrofícos geralmente aumentados em idosos, MuRF-1 e Atrogin-1. Observamos que as intervenções de maneira isolada ou em associação não induziram alterações na expressão de Atrogin-1 (Figura 8A). Em relação à MuRF-1, a THE associada ou não ao TF não promoveu alterações na expressão de MuRF-1 (Figura 8B). No entanto, a prática do TF por 16 semanas resultou em diminuição deste gene relacionado ao detrimento muscular em idosos (Figura 8B).

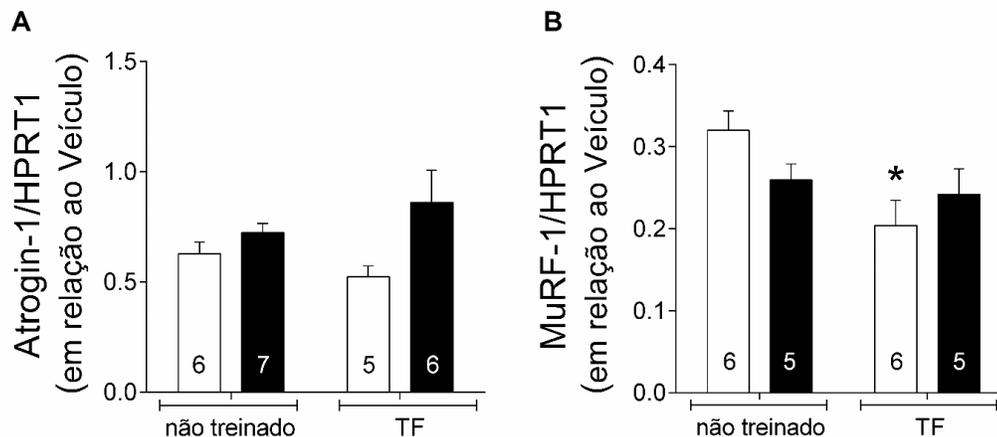


Figura 8 – Efeito da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força na expressão de genes atrofícos. (A) Expressão de RNAm de Atrogin-1 (A) e *muscle ringer finger-1* (MuRF-1) (B) avaliados no músculo *flexor longo do hálux* (FLH) de ratas senis aos 21 meses de idade que não foram submetidas a nenhuma das intervenções (NT-Veh), tratadas com 17 β -estradiol (NT-E₂), submetidas ao treinamento de força (TF-Veh) e a associação das intervenções (TF-E₂) por 16 semanas. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão da media (SEM). * $p < 0.05$ vs. NT-Veh com o uso de two-way ANOVA. O número de animais estudados em cada análise está disposto na barra representativa de cada grupo.

6.7 Influência da terapêutica hormonal estrogênica, do treinamento de força e associação na expressão de IGF-1 *downstreams* e microRNAs envolvidos na modulação da massa muscular

Com o objetivo de compreender quais os mecanismos envolvidos no aumento da massa e AST induzidos tanto pela THE e pelo TF, investigamos a expressão de IGF-1, conhecido por implementar os resultados positivos promovidos pela THE como também sendo dos reguladores principais da massa muscular (OLIVIERI et al., 2014; PÖLLÄNEN et al., 2010).

A associação das terapias (TF-E₂) resultou em aumento na expressão de IGF-1 (Fig. 8A), associado a significativa fosforilação proteica de seus *downstreams*, Akt1^{Thr308}/Akt total (Figura 8B) e mTOR^{Ser2448}/mTOR total (Figura 9C), sugerindo melhora na síntese proteica em ratas periestropausadas induzido pela associação das intervenções (TF-E₂). Observamos que paralelamente ao aumento da expressão de IGF-1 houve grande redução na expressão de miR-1 nos animais pertencente ao grupo TF-E₂ (Figura 9D), uma vez que o aumento da expressão está relacionado com a inibição da expressão de IGF-1. Em relação ao miR-181a, nenhuma das intervenções, isoladamente ou em associação, promoveu alterações na expressão deste miRNA, envolvido na diminuição do diâmetro de miotúbulos quando sua expressão encontra-se aumentada (Figura 9E) (SORIANO-ARROQUIA et al., 2016).

Além dos microRNAs citados anteriormente, miR-182, miR-206, miR-146b e 133a exercem importante função na homeostase muscular (BROWN; GOLJANEK-WHYSALL, 2015; KHANNA; GE; CHEN, 2014). Os animais treinados e que receberam a THE (TF-E₂) demonstraram aumento na expressão de miR-182 (Figura 9F), enquanto que o aumento na expressão de miR-206 (Figura 9G) e miR-146b (Figura 9H) foi restrito aos animais treinados (TF-Veh). Em relação ao miR-133a, somente os animais treinados (TF-Veh) apresentaram aumento deste miR, onde o aumento posso ser uma resposta adaptativa ao TF (Figura 9I).

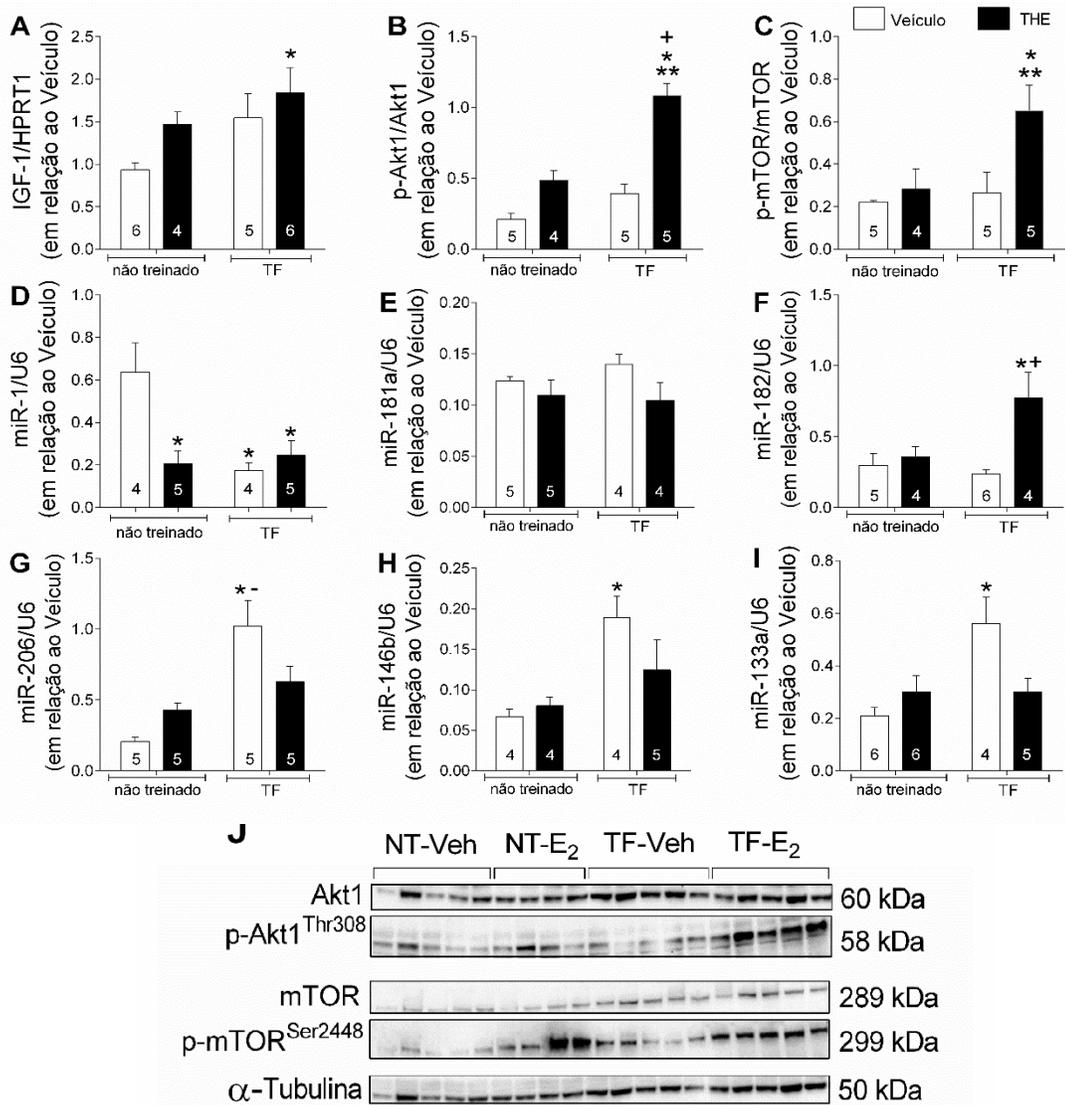


Figura 9 – Atividade da via IGF/Akt/mTOR e microRNAs envolvidos na sinalização muscular após 16 semanas de terapêutica hormonal estrogênica e treinamento de força. Expressão de RNAm (A) IGF-1; fosforilação de (B) p-Akt^{Thr308}/Akt total e (C) p-mTOR^{Ser2448}/mTOR; Expressão dos miRNAs (D) miR-1, (E) miR-181a, (F) miR-182, (G) miR-206, (H) miR-146b, (I) miR-133a e (J) imagem representativa dos blots. As análises foram avaliadas no músculo *flexor longo do hálux* (FLH) de ratas senis aos 21 meses de idade que não foram submetidas a nenhuma das intervenções (NT-Veh), tratadas com 17 β -estradiol (NT-E₂), submetidas ao treinamento de força (TF-Veh) e a associação das intervenções (TF-E₂) por 16 semanas. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0.05$ vs. NT-Veh; ** $p < 0.05$ vs. NT-E₂; - $p < 0.05$ vs. TF-E₂, com o uso de two-way ANOVA. O número de animais estudados em cada análise está disposto na barra representativa de cada grupo.

Tabela 3 – Resumo dos resultados obtidos.

	NT-Veh	NT-E ₂	TF-Veh	TF-E ₂
Tecido adiposo			Redução	Redução
Tecido ovariano (peso)				
Tecido uterino (peso)				
Ingesta de Água				
Ingesta de Ração				
Estrógeno				
CMGFV			Aumento	Aumento
Deambulação			Melhora	Melhora
Tempo de movimentação		Manutenção	Aumento	Aumento
Velocidade movimentação				
Distância total percorrida				Aumento
Área de secção transversal		Aumento	Aumento	Aumento
Percentual de fibras tipo I		Redução	Redução	Redução
Percentual de fibras tipo II			Aumento	Aumento
Peso músculo FLH		Aumento	Aumento	Aumento
ER α (RNAm)				Aumento
GPR30 (RNAm)				Aumento
ER β (RNAm)			Aumento	Aumento
Dihidroetidina (DHE)		Redução		
Gp91phox (proteína)		Redução	Redução	Redução
Hidroperoxidação lipídica				Redução

Tabela 3 – Resumo dos resultados obtidos (continuação).

	NT-Veh	NT-E ₂	TF-Veh	TF-E ₂
Nrf2		Aumento		
SOD				
CAT				Aumento
GSH:GSSG				
Sirt1				Aumento
PGC-1 α				Aumento
Sirt3				Aumento
COXIV				Aumento
Atrogin-1				
MuRF-1			Redução	
IGF-1 (RNAm)				Aumento
p-Akt1				Aumento
p-mTOR				Aumento
miR-1		Redução	Redução	Redução
miR-181a				
miR-182				Aumento
miR-206			Aumento	
miR-146b			Aumento	
miR-133a			Aumento	

Discussão

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que a THE e o TF induzem benefícios ao tecido muscular esquelético de ratas periestropausadas, no entanto, por diferentes maneiras. Enquanto a THE induziu diminuição do estresse oxidativo muscular, o TF resultou em melhoras significativas na função e no sistema antioxidante muscular. Já a interação das intervenções resultou em melhora no estado redox, na responsividade dos receptores estrogênicos, aumento na expressão de miRNAs e atividade de vias de sinalização envolvidas na manutenção do tecido muscular esquelético (resumo dos resultados apresentados em sumário ao fim dos resultados [Tabela 3]).

Uma das principais características referente à perda da massa e função muscular em idosos é o desequilíbrio entre a síntese e a degradação proteica (SORIANO-ARROQUIA et al., 2016). Dentre os fatores conhecidos por iniciarem este desequilíbrio e os demais desarranjos fisiológicos relacionados ao processo de envelhecimento, o aumento do estresse oxidativo é postulado como um dos principais fatores (BENBASSAT; MAKI; UNTERMAN, 2009; SHARPLES et al., 2015; SZCZESNY; TANN; MITRA, 2010; TROMM et al., 2015). Nossos dados demonstram que o aumento da massa e área muscular foi acompanhado por significativa redução do estresse oxidativo muscular (DHE e gp91^{phox}).

Apesar de não observamos aumento na produção de ERO no grupo NT-Veh, a THE induziu redução da produção de ânions superóxido e aumento da expressão de Nrf2 quando comparado a este grupo. Os derivados do ânion superóxido são considerados um dos principais agentes oxidantes responsáveis por induzir danos celulares (BEKESI et al., 2007). Além disso, a redução das concentrações de gp91^{phox}, importante isoenzima pertencente ao complexo enzimático NADH oxidase, reduzida em resposta a THE, ao TF e a associação, suporta a hipótese de que a gp91^{phox} exerce ação fundamental na perda muscular associada a doenças musculares (WHITEHEAD et al., 2010). Nossos dados, obtidos em fibras musculares, reforçam a hipótese de que o 17 β -estradiol promove diminuição na expressão e concentração proteica de gp91^{phox} como detectado em células endoteliais humanas (WAGNER; SCHROETER; HECKER, 2001). Em relação a prática do TF, sugerimos que esta seja intervenção eficaz na prevenção da perda da massa muscular resultando do aumento excessivo do estresse oxidativo. Além disso, sugerimos

que a redução na expressão de MuRF-1 induzido pela prática do TF possa estar relacionada com a redução nas concentrações proteicas de gp91^{phox}.

No entanto, os efeitos significativos na integridade da membrana muscular foram obtidos com a associação das intervenções (TF-E₂). Sugerimos que tal resultado possa ter sido influenciado em parte pelo aumento na expressão do receptor não-genômico GPR30, citado em alguns estudos por exercer efeito positivo sobre a integridade de membranas celulares (PERSKY et al., 2000; ENNS; TIIDUS, 2010; KENDALL; ESTON, 2002; TIIDUS, 1995; WHITING; RESTALL; BRAIN, 2000). No entanto, a THE induziu aumento na expressão de COXIV, potencializado pela prática do TF, que por sua vez, de maneira isolada, não alterou a expressão de COXIV.

O aumento na expressão de COXIV, Sirt1, PGC-1 α e Sirt3 induzidos pela associação das intervenções, sugere melhora possível na integridade e na biogênese mitocondrial. A expressão de Sirt1, PGC-1 α e Sirt3 apresentam correlação entre si, resultando em cascata de sinalização desencadeada pela Sirt1, a qual estimula a expressão de PGC-1 α (BRENMOEHL; HOEFLICH, 2013) que por sua vez, exerce influência fundamental na expressão de Sirt3 (KONG et al., 2010). Resumidamente, o aumento destes 3 fatores resulta em melhora em todo âmbito mitocondrial, favorecendo a transcrição de genes e proteínas relacionados à proliferação mitocondrial, produção de energia, redução do dano ao DNA mitocondrial e do estresse oxidativo basal (cultura de mioblastos) (BRENMOEHL; HOEFLICH, 2013; KONG et al., 2010). A melhora na integridade e na biogênese mitocondrial refletiu positivamente sobre o sistema antioxidante muscular (CAT).

A melhora no estado redox muscular, observado com a interação das intervenções, resultou em aumento da expressão de IGF-1, induzindo aumento significativo da via de sinalização IGF-1/Akt/mTOR, resultando em manutenção da massa do músculo FLH, prevenindo possivelmente o início da diminuição da síntese proteica observada em idosos (Sarcopenia) (BARBIERI; SESTILI, 2011).

Estudos sugerem que os benefícios promovidos pela THE são implementados pela via IGF-1/Akt e, que essa resposta possa ser mediada pelo ER α , cuja expressão encontra-se aumentada nos animais pertencentes ao grupo TF-E₂ (AHTIAINEN et al., 2012; OLIVIERI et al., 2014; POLLANEN et al., 2010). Observamos que as terapias de

maneira isolada não induziram alterações na sinalização e nem na fosforilação da Akt^{Thr308} e da mTOR^{Ser2448}, no entanto, quando associadas, observamos efeito aditivo (sinérgico) entre ambas, resultando em melhora significativa na síntese proteica muscular.

Interessantemente, as ações do receptor GPR30 podem não estar somente relacionadas em estimular a expressão de genes antioxidantes. Estudos sugerem que este receptor possa estar envolvido em estimular a expressão de IGF-1 e seu respectivo receptor (IGF-1R) (KAMANGA-SOLLO et al., 2008; LAPPANO et al., 2013; WHITEHEAD et al., 2010). Portanto, nossos dados sugerem que o receptor GPR30 possa estar envolvido positivamente em duas importantes vias relacionadas a manutenção do tecido muscular esquelético: o estado redox muscular e a via de sinalização proteica (IGF/Akt/mTOR).

Recentemente os microRNAs emergiram como fundamentais reguladores pós-transcricionais, estimulando ou inibindo a expressão de diversos genes relacionados a vários processos biológicos durante o envelhecimento (OLIVIERI et al., 2014). Em nosso estudo, as intervenções de maneira isolada ou associadas, levaram a redução da expressão de miR-1, acompanhada por significativo aumento na expressão de IGF-1 observado nos animais pertencentes ao grupo TF-E₂. É importante mencionar que a expressão de miR-1 e IGF-1 são inversamente correlacionados (ELIA et al., 2009; HITACHI; TSUCHIDA, 2014; WANG, 2013). Sugerimos que a diminuição da expressão de miR-1 seja, em parte, mecanismo regulatório pós-transcricional da massa muscular (CUI et al., 2016), e que possa estar envolvido na manutenção da massa muscular obtida em nosso estudo observado nos animais que receberam a THE, praticaram o TF e a associação de ambos.

Recente estudo demonstrou que a expressão aumentada do miR-181a resulta em diminuição no diâmetro de miotúbulos (*in vitro*) e que a expressão e a função deste miRNA está inversamente correlacionado com a expressão de Sirt1 (SORIANO-ARROQUIA et al., 2016). Nesse sentido, investigamos se o aumento na expressão de Sirt1 poderia ter influenciado a expressão do miR-181a em nosso estudo (*in vivo*). Diferentemente ao observado *in vitro*, o aumento da expressão da Sirt1 não foi acompanhado pela redução do miR-181a, a qual não foi influenciada pelas intervenções.

Talvez, esse seja o primeiro estudo a avaliar essa relação (miR-181a/Sirt1) *in vivo* e, especialmente durante o período peri menopausal. Ainda em relação a Sirt1, Gosh e colaboradores (GHOSH; MCBURNEY; ROBBINS, 2010) demonstraram que essa sirtuína modula negativamente a sinalização da via mTOR em cultura de células musculares, resultado oposto ao obtido em nosso estudo. Controversamente, estudos sugerem que a Sirt1 possa estar envolvido no processo hipertrófico muscular (LEE; GOLDBERG, 2013; SHARPLES et al., 2015; SIN; YUNG; SIU, 2015) e no aumento da expectativa de vida (SATOH et al., 2013). Em nosso estudo, concluímos que a Sirt1 induziu melhora significativa na biogênese mitocondrial via PGC-1 α , sem comprometer a cascata de sinalização IGF-1/Akt/mTOR.

A prática do treinamento de força por 16 semanas levou ao aumento na expressão de microRNAs importantes, envolvidos na homeostase muscular (miR-206, miR-146b e miR-133a). O aumento na expressão do miR-206 observado nos animais que foram somente treinados, sugere possíveis melhorias na comunicação e aumento no número de junções neuromusculares (ALVES et al., 2014). Nossos dados corroboram com o referido estudo, onde submetemos os animais à prática do TF por período similar e observamos grande aumento na expressão do miR-206. Os animais treinados também demonstraram aumento na expressão do miR-146b, conhecido por exercer efeito positivo sobre a diferenciação miogênica e reduzindo a expressão dos genes Smad4, Notch1 e Hmga2 durante a diferenciação de mioblastos (KHANNA; GE; CHEN, 2014). Além disso, a *via forkhead box O3* (FoxO3), envolvida na indução de atrofia muscular via genes atrógenos, é alvo do miR-182, super expresso nos animais pertencentes ao grupo TF-E₂. Sugerimos que possivelmente, os miRNAs 182, 206 e 146b, promoveram aos animais treinados melhores condições contra a perda de massa muscular (miR-182), melhora na comunicação neuromuscular (miR-206) e maior capacidade de diferenciação e reparo muscular (miR-146b).

Paralelamente a perda de massa observa-se também a diminuição da força muscular, que em diversas situações resulta em quedas, fraturas, imobilizações e até mesmo em óbito (TAN et al., 2012). Em nosso estudo, a capacidade de geração de força, avaliada de maneira indireta (CMGFV), demonstrou que os animais que receberam a THE mantiveram a capacidade inicial de CMGFV e apresentaram a AST maior em

relação aos animais que não receberam a THE (NE-Veh). No entanto, o uso da THE em mulheres menopausadas apresenta resultados contraditórios em relação à força e massa muscular. Enquanto o uso da THE por 12 semanas em mulheres de 56 a 58 anos foi capaz de induzir o aumento da massa magra (SORENSEN et al., 2001; JONES et al., 2009), o uso da terapia por período mais prolongado (64 semanas, 55-60 anos) não promoveu nenhuma alteração no percentual de massa magra além da não ocorrência de diminuição da massa muscular durante esse período (HANSEN ET AL., 2003).

Já os animais treinados que receberam ou não a THE, demonstraram ganho progressivo na CMGFV. Esses resultados corroboram com o aumento da AST e da alteração do metabolismo muscular, onde a diminuição do percentual de fibras oxidativas e aumento das fibras glicolíticas possa ter influência no aumento na capacidade de geração de força destes animais (TF-Veh e TF-E₂). Sugerimos que as mudanças nas tipagens de fibras possam ser mecanismo inicial contra a perda da massa muscular, uma vez que o tipo de fibra mais acometido durante o envelhecimento são as fibras glicolíticas (LÉGER et al., 2008; TAN et al., 2012). Sabe-se que um dos fatores envolvidos nas mudanças metabólicas das fibras musculares durante o envelhecimento é o *Myocyte Enhancer Factor 2* (MEF), resultando em diminuição no percentual de fibras glicolíticas e aumento de fibras oxidativas (SHUM et al., 2012; ZIERATH; HAWLEY, 2004). Sugerimos que possivelmente tanto a THE quanto o TF, possam ter influência sobre este fator (MEF2), resultando em manutenção no percentual das fibras glicolíticas.

Tal aumento na CMGFV resultou em melhorias na função locomotora destes animais, onde a prática do TF mostrou-se mais efetiva do que a THE. Enquanto a THE preveniu a redução no tempo de movimentação dos animais, o TF melhorou a deambulação (BEIJERSBERGEN et al., 2013; HVID et al., 2016) e o tempo de movimentação. No entanto, somente a associação das intervenções resultou na maior distância total percorrida pelos animais, avaliados previamente e após as 16 semanas de TF e THE. Esses resultados demonstram que todos os benefícios fisiológicos obtidos resultaram em melhorias na função muscular.

A THE e a prática do TF induziram resultados promissores frente a prevenção da perda de massa muscular durante a senescência feminina. Nossos dados evidenciam redução do estresse oxidativo muscular, melhora no sistema de defesa antioxidante

resultante da melhora na biogênese e integridade mitocondrial, resultando em melhor integridade da massa muscular de ratas periostropausadas submetidas à associação das intervenções. Essas respostas parecem ser finamente orquestradas por específicos moduladores da homeostase muscular (miR-1, Sirt1, PGC-1 α , Sirt3, miR-182, miR-206 e miR-146b) durante a fase tardia da periostropausa.

Portanto, a administração da THE juntamente com a prática do TF durante o período da periostropausa (similar a perimenopausa em mulheres) mostra-se eficaz na diminuição dos efeitos decrementais musculares observados em fases tardias do envelhecimento. Além disso, diante dos dados obtidos, acredita-se que a aderência às intervenções possibilite melhor qualidade funcional muscular durante o processo de envelhecimento feminino.

Referências

REFERÊNCIAS

AHTIAINEN, M. et al. Hormone therapy is associated with better body composition and adipokine/glucose profiles: a study with monozygotic co-twin control design. **Menopause**, v. 19, n. 12, p. 1329–1335, 2012.

BALTGALVIS, K. A. et al. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

BARBIERI, E.; SESTILI, P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. **Journal of signal transduction**, v. 2012, p. 982794, 2011.

BEKESI G. et al. The effect of estrogens on superoxide anion generation by human neutrophil granulocytes: possible consequences of the antioxidant defense. **Gynecol Endocrinology**, 23(8):451-4, 2007.

BENBASSAT, C. A.; MAKI, K. C.; UNTERMAN, T. G. Circulating Levels of Insulin-Like Growth Factor (IGF) Binding Protein-1 and -3 in Aging Men : Relationships to Insulin , Glucose , IGF , and Dehydroepiandrosterone Sulfate Levels and Anthropometric Measures. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 5, p. 1484–1491, 2009.

BJORKSTEN, J. The crosslinkage theory of aging. **Journal of American Geriatrics Soc.** 16, 408–427, 1968.

BORRÁS, C. et al. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 5, p. 546–552, 2003.

BROWN, D. M.; GOLJANEK-WHYSALL, K. MicroRNAs: Modulators of the underlying pathophysiology of sarcopenia? **Ageing Research Reviews**, v. 24, p. 263–273, 2015.

BROWN, M. Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. **Advances in physiology education**, v. 32, n. 2, p. 120–126, 2008.

BUTIKOFER, L. et al. Destabilization of the neuromuscular junction by proteolytic cleavage of agrin results in precocious sarcopenia. **FASEB Journal**, v. 25, p. 4378–4393, 2011.

CHAKRABORTY, T. R.; GORE, A. C. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 229, n. 10, p. 977–987, 2004.

COLUMBIA, B. National Fall Prevention Workshop: Stepping up pan-Canadian coordination. **Chronic Diseases and Injuries in Canada**, v. 32, n. 4, p. 227–228, 2012.

CORA, M.C., KOOISTRA, L., TRAVLOS, G., 2015. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol. Pathol.* 43, 776–793.

COSTA, A. et al. Impact of repeated bouts of eccentric exercise on myogenic gene expression. **European Journal of Applied Physiology**, v. 101, n. 4, p. 427–436, 2007.

DA COSTA, J. P. et al. A synopsis on Aging – theories, mechanisms and future prospects. **Ageing Research Reviews**, v. 29, p. 90–112, 2016.

DEMONTIS, F.; PERRIMON, N. FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. **Cell**, v. 5, p. 813-25, 2010.

DIAZ, F. Cytochrome c oxidase deficiency: patients and animal models. **Biochimica**

et biophysica acta, v. 1802, n. 1, p. 100–110, 2010.

ELIA, L. et al. Reciprocal regulation of microrna-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. **Circulation**, v. 120, n. 23, p. 2377–2385, 2009.

ENNS, D. L.; TIIDUS, P. M. The influence of estrogen on skeletal muscle: Sex matters. **Sports Medicine**, v. 40, n. 1, p. 41–58, 1 jan. 2010.

EVANS, H. M.; LONG, J. A. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 8(3):38-39, 1922.

FAN, J. MicroRNA-Regulated Proinflammatory Cytokines in Sarcopenia. *Mediators Inflammation*, v. 1, 2016.

FERREIRA, L. B. et al. Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. **Experimental Gerontology**, v. 72, p. 157–161, 2015.

FRANCESCHI, C. et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, n. 1, p. 92–105, jan. 2007.

GARCÍA-PALLARS, J.; IZQUIERDO, M. Strategies to optimize concurrent training of strength and aerobic fitness for rowing and canoeing. **Sports Medicine**, v. 41, n. 4, p. 329–343, 2011.

GHOSH, H. S.; MCBURNEY, M.; ROBBINS, P. D. SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. 1–8, 2010.

GREIG, C. A. et al. Blunting of adaptive responses to resistance exercise training in

women over 75y. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 11, p. 884–890, 2011.

GREISING, S. M. et al. Estradiol's beneficial effect on murine muscle function is independent of muscle activity. **Journal of applied physiology**, v. 110, n. October 2010, p. 109–115, 2011.

GUO, H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 12, p. 835-40, 2010.

HAGEN, J. L. et al. Skeletal muscle aging in F344BN F1-hybrid rats: I. Mitochondrial dysfunction contributes to the age-associated reduction in VO₂max. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 59, n. 11, p. 1099–1110, 2004.

HALL, D. T. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in muscle wasting syndrome, sarcopenia, and cachexia. **Aging**, v. 3, n. 8, p. 702–15, 2011.

HALPERIN, E. et al. Low admission Norton scale scores are associated with falls long after rehabilitation in the elderly with hip fractures. **Clinical Interventions in Aging**, v. 7, p. 431–436, 2012.

HANSEN, R. D. et al. Effects of 20-mg oestradiol implant therapy on bone mineral density, fat distribution and muscle mass in postmenopausal women. **Acta Diabetologica**, v. 40, n. SUPPL. 1, 2003.

HARDEN P.N., S. S. N. Optimal management of. **Embase Annals of Saudi Medicine**, p. 1–2, 2013.

HARMAN, D. Free radical involvement in aging. **Drugs Aging**, 3, 60–80, 1993.

HARRIS, T. Muscle mass and strength: relation to function in population studies. **The Journal of nutrition**, v. 127, p. 1004S–1006S, 1997.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**. 25, 585–621, 1961.

HEPPLE, R. T. et al. Caloric restriction protects mitochondrial function with aging in skeletal and cardiac muscles. **Rejuvenation research**, v. 9, n. 2, p. 219–22, 2006.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271–280, 1995.

HERTOGHE, T. The “multiple hormone deficiency” theory of aging: Is human senescence caused mainly by multiple hormone deficiencies? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1057, p. 448–465, 2005.

HITACHI, K.; TSUCHIDA, K. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. **Frontiers in Physiology**, v. 4 JAN, n. January, p. 1–7, 2014.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian journal of applied physiology**, v. 29, n. 1, p. 16–31, 2004.

HU, Z. et al. MicroRNA-29 induces cellular senescence in aging muscle through multiple signaling pathways. **Aging (Albany NY)**, v. 6, p. 160-175, 2014.

HUDSON, M.B. et al. miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 307, p. 314–319, 2014.

JACOBS, K. M. et al. SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression.

International Journal of Biological Sciences, v. 4, n. 5, p. 291–299, 2008.

JANG, Y. C. et al. Increased superoxide in vivo accelerates age-associated muscle atrophy through mitochondrial dysfunction and neuromuscular junction degeneration. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 5, p. 1376–1390, 2010.

JANG, Y. C.; VAN REMMEN, H. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 2-3, p. 193–198, 2011.

JONES, T. E. et al. Sarcopenia - Mechanisms and Treatments. **Journal of Geriatric Physical Therapy**, v. 32, n. 2, p. 39–45, 2009.

JUNG, H.J.; SUH, Y. Circulating miRNAs in ageing and ageing-related diseases. **Journal of Genetic Genomics**, v. 41, p. 465–472, 2014.

KADI, F. et al. Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. **Muscle & nerve**, v. 29, n. January, p. 120–127, 2004.

KAMANGA-SOLLO, E. et al. Potential role of G-protein-coupled receptor 30 (GPR30) in estradiol-17beta-stimulated IGF-I mRNA expression in bovine satellite cell cultures. **Domestic animal endocrinology**, v. 35, n. 3, p. 254–262, 2008.

KENDALL, B.; ESTON, R. Exercise-Induced Muscle Damage and the Potential Protective Role of Estrogen. **Sports Medicine**, v. 32, n. 2, p. 103–123, 2002.

KENNY, A. M. et al. Prevalence of Sarcopenia and Predictors of Skeletal Muscle Mass in Nonobese Women Who Are Long-Term Users of Estrogen-Replacement Therapy. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 58, n. 5, p. M436–M440, 2003.

KHANNA, N.; GE, Y.; CHEN, J. MicroRNA-146b promotes myogenic differentiation and modulates multiple gene targets in muscle cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

KIM, J. et al. Resting and load-induced levels of myogenic gene transcripts differ between older adults with demonstrable sarcopenia and young men and women. **Journal of applied physiology**, v. 99, n. 6, p. 2149–2158, 2005.

KONG, X. et al. Sirtuin 3, a new target of PGC-1 α , plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, 2010.

LAPPANO, R. et al. Cross-talk between GPER and growth factor signaling. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, p. 50–56, 2013.

LEE, D.; GOLDBERG, A. L. SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 42, p. 30515–30526, 2013.

LEFEVRE, J.; MCCLINTOCK, M. K. Senescence Differences in Female Rats: A Longitudinal Study in Estrous Cycles and Behavior' of Individual. **Biology of Reproduction**, n. 38, p. 780–789, 1988.

LI, W.; XIANG, W.; PING, Y. Activation of novel estrogen receptor GPER results in inhibition of cardiocyte apoptosis and cardioprotection. **Molecular Medicine Reports**, v. 1, p. 2425–2430, 2015.

LIGHTFOOT, J. T. Sex hormones' regulation of rodent physical activity: A review. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 126–132, 2008.

LINDSEY, S. H. et al. Estrogen receptor GPR30 reduces oxidative stress and

proteinuria in the salt-sensitive female mRen2.Lewis rat. **Hypertension**, v. 58, n. 4, p. 665–671, 2011.

LIU, Y.; ZHANG, L.; LIANG, J. Activation of the Nrf2 defense pathway contributes to neuroprotective effects of phloretin on oxidative stress injury after cerebral ischemia/reperfusion in rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 351, n. 1-2, p. 88–92, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MACKINNON, P. C. et al. Hypothalamic adrenergic activity precedes the preovulatory luteinizing hormone surge in the rat. **Neuroscience**. Lett. 43, 221–226, 1983.

MANSOUR, Z. et al. Remote and local ischemic postconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion. **Journal of Vascular Surgery**, v. 56, n. 3, p. 774–782.e1, 2012.

MAROSI, K. et al. Are the neuroprotective effects of estradiol and physical exercise comparable during ageing in female rats? **Biogerontology**, v. 13, n. 4, p. 413–427, 2012.

MCCORD JM, FRIDOVICH I., F. I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Hemoglobin**, n. 22, 1969.

MCDONAGH B.; SAKELLARIOU G. K.; JACKSON M. J. Application of redox proteomics to skeletal muscle aging and exercise. *Biochemical Society Transactions*, v. 4, p. 965-70, 2014.

MCKAY, B. R. et al. Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle-lengthening contractions in humans. **The**

Journal of physiology, v. 586, n. Pt 22, p. 5549–5560, 2008.

MELOV, S. et al. Resistance exercise reverses aging in human skeletal muscle. **PloS one**, v. 2, n. 5, p. e465, 2007.

MESSIER, V. et al. Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones. **Maturitas**, v. 68, n. 4, p. 331–336, 2011.

NICOLA, A. C. et al. The transition to reproductive senescence is characterized by increase in A6 and AVPV neuron activity with attenuation of noradrenaline content. **Experimental Gerontology**, v. 81, p. 19–27, 2016.

OLIVIERI, F. et al. Hormone replacement therapy enhances IGF-1 signaling in skeletal muscle by diminishing miR-182 and miR-223 expressions: A study on postmenopausal monozygotic twin pairs. **Aging Cell**, v. 13, n. 5, p. 850–861, 2014.

OLSEN, S. et al. Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. **The Journal of physiology**, v. 573, n. Pt 2, p. 525–34, 2006.

PALLAFACCHINA, G; BLAAUW, B; SCHIAFFINO S. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. **Nutrition metabolism & cardiovascular diseases**, v. 1, p. 12-18, 2012.

PERSKY, AM et al. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. **Proc Soc Exp Biol Med**, n. 44463, p. 59–66, 2000.

PÖLLÄNEN, E. et al. Effects of combined hormone replacement therapy or its effective agents on the IGF-1 pathway in skeletal muscle. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 20, n. 5, p. 372–379, 2010.

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

PETRELLA, J. K. et al. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 291, n. 5, p. E937–E946, 2006.

RONDA, A. C.; VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. 17 β -Estradiol protects mitochondrial functions through extracellular-signal-regulated kinase in C2C12 muscle cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 4, p. 1011–1023, 2013.

ROUBENOFF, R.; HUGHES, V. A. Sarcopenia : Current Concepts. v. 55, n. 12, p. 716–724, 2000.

RUBIN, B. S. Hypothalamic alterations and reproductive aging in female rats: evidence of altered luteinizing hormone-releasing hormone neuronal function. **Biol. Reprod.** 63, 968–976, 2000.

RYALL, J. G.; SCHERTZER, J. D.; LYNCH, G. S. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. **Biogerontology**, v. 9, n. 4, p. 213–228, 2008.

SANDRI, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, p. 399–412, 2004.

SANDRI, M. et al. Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle: the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. **Biogerontology**, v. 14, n. 3, p. 1754-1761, 2013.

SANSONE, L. et al. SIRT1 silencing confers neuroprotection through IGF-1 pathway activation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 8, p. 1754–1761, 2013.

SATOH, A. et al. Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 Homeobox 1 in the DMH and LH. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 3, p. 416–430, 2013.

SCHIAFFINO, S; MAMMUCARI, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. **Skeletal Muscle**, v. 1, 2011.

SCHIAFFINO S et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **The FEBS Journal**, v. 17, p. 4294-314, 2013.

SHARPLES, A. P. et al. Longevity and skeletal muscle mass: The role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake. **Aging Cell**, v. 14, n. 4, p. 511–523, 2015.

SIN, T. K.; YUNG, B. Y.; SIU, P. M. Modulation of SIRT1-foxo1 signaling axis by resveratrol: Implications in skeletal muscle aging and insulin resistance. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 2, p. 541–552, 2015.

SIPILÄ, S. et al. Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. **Clinical science**, v. 101, p. 147–157, 2001.

SAKELLARIOU, G.K. et al. Neuron-specific expression of CuZnSOD prevents the loss of muscle mass and function that occurs in homozygous CuZnSOD-knockout mice. **FASEB Journal**, v. 28, p. 1666–1681, 2014.

SAKUMA, K.; YAMAGUCHI, A. Molecular mechanisms in aging and current strategies to counteract sarcopenia. **Current aging science**, v. 3, n. 2, p. 90–101, 2010.

SNIJDERS, T.; VERDIJK, L. B.; VAN LOON, L. J. C. The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. **Ageing Research Reviews**, v. 8, n. 4, p. 328–338, 2009.

SOARES, R.J. et al. Involvement of microRNAs in the regulation of muscle wasting during catabolic conditions. **Journal of Biology Chemistry**, v. 289, p. 21909–21925, 2014.

SØRENSEN, M. B. et al. Obesity and sarcopenia after menopause are reversed by sex hormone replacement therapy. **Obesity research**, v. 9, n. 10, p. 622–626, 2001.

SORIANO-ARROQUIA, A. et al. The functional consequences of age-related changes in microRNA expression in skeletal muscle. **Biogerontology**, 2016.

STRINGHETTA-GARCIA, C. T. et al. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. **Bone**, v. 85, p. 45–54, 2016.

SULLIVAN-GUNN, M. J. et al. Decreased NADPH oxidase expression and antioxidant activity in cachectic skeletal muscle. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 2, n. 3, p. 181–188, 2011.

SZCZESNY, B.; TANN, A. W.; MITRA, S. Age- and tissue-specific changes in mitochondrial and nuclear DNA base excision repair activity in mice: Susceptibility of skeletal muscles to oxidative injury. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, n. 5, p. 330–337, 2010.

TANG, J. E. et al. Resistance training alters the response of fed state mixed muscle protein synthesis in young men. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 294, n. 1, p. R172–R178, 2008.

THOMAS, D. R. Loss of skeletal muscle mass in aging: Examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. **Clinical Nutrition**, v. 26, n. 4, p. 389–399, 2007.

TIIDUS, P. M. Can estrogens diminish exercise induced muscle damage? **Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee**, v. 20, n. 1, p. 26–38, 1995.

TROMM, C. B. et al. The role of continuous versus fractionated physical training on muscle oxidative stress parameters and calcium-handling proteins in aged rats. **Ageing Clinical and Experimental Research**, p. 1–9, 2015.

VALDEZ, G. et al. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 14863–14868, 2010.

VALDEZ, G. et al. The role of muscle microRNAs in repairing the neuromuscular junction. **PLoS One**, v. 9, p. 93140, 2014.

VAN DEN BERGH, J. P.; VAN GEEL, T. A.; GEUSENS, P. P. Osteoporosis, frailty and fracture: implications for case finding and therapy. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 163–172, 2012.

VINA, J. et al. Females live longer than males: role of oxidative stress. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 36, p. 3959–65, 2011.

VITALE, G. et al. Low circulating IGF-I bioactivity is associated with human longevity: Findings in centenarians' offspring. **Ageing**, v. 4, n. 9, p. 580–589, 2012.

ZACHAREWICZ, E; LAMON, S; RUSSELL, AP. MicroRNAs in skeletal muscle and their regulation with exercise, ageing, and disease. *Frontiers in Physiology*, v. 4, p. 1-11, 2013.

WANG, F. et al. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. **Aging Cell**, v. 6, n. 4, p. 505–514, 2007.

WANG, P. et al. Acute exercise stress promotes Ref 1 /Nrf 2 signaling and increases mitochondrial antioxidant activity in skeletal muscle. **Experimental Physiology**, v. 0, p. n/a–n/a, 2015.

WANG, X. H. MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 16, n. 3, p. 258–66, 2013.

WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature protocols**, v. 5, n. 1, p. 51–66, 2010.

WHITEHEAD, N. P. et al. Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.

WHITING, K. P.; RESTALL, C. J.; BRAIN, P. F. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. **Life Sciences**, v. 67, n. 7, p. 743–757, 2000.

WILLIAMS, A.H. et al. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. **Science**, v. 326, p. 1549–1554, 2009.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Influência do estrógeno e do treinamento de força sobre as vias de manutenção do tecido muscular esquelético em ratas senis” sob responsabilidade da Pesquisadora **RITA CASSIA MENEGATI DORNELLES** e colaboração de Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes, Patricia Chakur Brum, José Carlos Silva Camargo Filho e Wagner Garcez de Mello está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **FOA-00856-2013**.

CERTIFICATE

We certify that the research “**Estrogen and strength training influence on skeletal muscle maintenance pathways in senile rats**”, process number **FOA-00856-2013**, under responsibility of **RITA CASSIA MENEGATI DORNELLES** and with collaboration of Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes, Patricia Chakur Brum, José Carlos Silva Camargo Filho and Wagner Garcez de Mello agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

Prof. Adj. MARY MARCONDES
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator