



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – SBFis/UNESP**

DÉBORA PRAZIAS CAVALCANTE

**ANÁLISE DA QUALIDADE MUSCULAR E
FUNCIONALIDADE DE RATAS SENESCENTES APÓS
TREINAMENTO COMBINADO**

**ARAÇATUBA
2022**

DÉBORA PRAZIAS CAVALCANTE

**ANÁLISE DA QUALIDADE MUSCULAR E
FUNCIONALIDADE DE RATAS SENESCENTES APÓS
TREINAMENTO COMBINADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

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

**ARAÇATUBA
2022**

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

C376a Cavalcante, Débora Prazias.
Análise da qualidade muscular e funcionalidade de
ratas senescentes após treinamento combinado /
Débora Prazias Cavalcante. - Araçatuba, 2022
64 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Rita Cassia Menegati Dornelles

1. Periestropausa 2. Treinamento combinado
3. Irisina 4. Sarcopenia 5. Estresse oxidativo I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

FOLHA DE APROVAÇÃO

Débora Prazias Cavalcante

**Análise da qualidade muscular e funcionalidade de ratas
senescentes após treinamento combinado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

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

Aprovado em: 01/07/2022

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Camila Tami Stringhetta Garcia

Departamento de Medicina da Fundação Educacional de Penapólis (FUNEPE)

Prof. Dr. Rafael Pereira de Paula

Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)

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

Departamento de Ciências Básicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP)

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 15.06.1993, Araçatuba – SP

Filiação: Emiliane Prazias Cavalcante
Francisco Carlos Cavalcante

2014/2017: Curso de Graduação em Educação Física Bacharelado pela Universidade Toledo (UnToledo), Araçatuba – SP.

2019/2022: Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem a luz dEle eu não chegaria aqui, pela família maravilhosa que me concedeu, por me acalmar em momentos de tensão e por se fazer sempre presente.

Aos meus pais, Emiliane Prazias Cavalcante e Francisco Carlos Cavalcante, que são minha base, força e calma. Sem eles nada disso seria possível, sem seu apoio, companheirismo e ensinamentos, foi uma longa e árdua caminhada, mas sempre estiveram ao meu lado, mostrando que tudo na vida tem um propósito e devemos aprender em todos os momentos. Serei eternamente grata por todo esforço que fizeram e ainda fazem para contribuir com o meu crescimento profissional e também pessoal.

Ao meu amor e companheiro de vida, Maycon Chelis Mendonça, por me erguer em momentos que eu desabei, por enxugar minhas lágrimas e por passar noites em claro para me ajudar. Jamais esquecerei todo seu esforço para me ver feliz, você foi e continua sendo fundamental nessa jornada.

Ao meu avô, Walter Prazias, que não pode ver a conclusão dessa etapa em minha vida, mas que se fez tão presente enquanto estive aqui e tenho certeza que hoje é meu anjo da guarda que zela por mim e estaria muito feliz com essa etapa finalizada. Me faltam palavras para agradecer o quão maravilhoso ele foi em toda a minha jornada de vida e hoje é minha maior saudade.

À minha avó, Maria Emília Neves Prazias, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida, me apoiando e ajudando.

Aos meus tios, Walter Prazias Jr. e Bernadette Fatima Lousada Prazias, por me amarem como filha e sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas. O carinho de vocês fez toda a diferença para que eu chegasse até aqui e sou muito grata.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba / Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA / UNESP), ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas e a Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis) pela oportunidade e privilégio de realizar o Mestrado.

Ao Diretor da FOA / UNESP, Prof^a. Tit. Glauco Issamu Miyahara e ao Vice-Diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem pelo apoio.

Pró-Reitora de Pós-Graduação da UNESP (PROPG/UNESP), pelo apoio financeiro nas viagens para realização das disciplinas

À Seção Técnica de Pós-Graduação, em especial a Cristiane Regina Lui Matos a pelo empenho em atender e auxiliar-me, desde a minha convocação.

À Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE) por toda prontidão e suporte.

Aos Professores do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, pela ajuda, colaboração e aprendizado durante esta jornada.

Aos discentes e egressos do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela amizade e companheirismo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)
- Código de Financiamento 001.

A todos os funcionários da UNESP.

Muito obrigado a todos!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha família, por sempre acreditarem em mim, por estarem presente e me proporcionarem tanto amor e carinho. Muito obrigada!

À minha orientadora, Profa. Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles, por me fazer acreditar em mim, me dar todo suporte necessário para finalizar esta etapa da minha vida e me deixar apaixonada por nossa área de pesquisa. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto, por toda ajuda necessária, ensinamentos e conversas. Se fez muito importante nesse longo caminho. Muito obrigada!

À minha amiga, Profa. Dra. Fernanda Fernandes Breitenbach, que me recebeu de braços abertos e pronta para sanar todas as minhas inúmeras dúvidas, por sempre me incentivar, ajudar e acolher. Muito obrigada!

À minha amiga, Luana Galante Douradinho, que se mostrou uma verdadeira amiga nesse período, pronta a ajudar independente do horário. Mesmo sendo mais nova me ensinou muito e vou levar para sempre no meu coração. Muito obrigada!

À minha amiga, Ana Silvia Pires Soubhia, por acreditar em mim mais do que eu mesma, por entender minhas crises e ajudar a me acalmar. É e sempre será essencial em cada etapa da minha jornada. Muito Obrigada!

À minha amiga, Bianca de Melo, que se fez tão presente, comemorou comigo cada passo dado e me deu muita força quando eu mais precisei. Sem ela teria sido ainda mais difícil. Muito obrigada!

À todas as minhas amigas, Thainá Daguane Esperança, Beatriz Procópio Stringhetta, Joyce Onorato, Heloísa Vilas Boas Ruas Teixeira e Livia Vilas Boas Ruas Teixeira que de alguma forma contribuíram para a conclusão dessa etapa, por serem tão pacientes e amorosas comigo. Muito obrigada!

Aos integrantes do LaFEE, por toda parceria e colaboração durante esses anos. Muito obrigada!

A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.

Marcel Proust

RESUMO

A sarcopenia compõe a síndrome da fragilidade que pode levar a quedas, fraturas, incapacidade física e mortalidade. Evidências sugerem que a falta de exercício físico favorece a perda de força e massa muscular. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do treinamento combinado (TC) no estado redox (sangue e gastrocnêmio) e a imunomarcagem de irisina no gastrocnêmio de ratas Wistar no período de senescência reprodutiva. Ratas em periostropausa (17 – 21 meses) e aderentes ao exercício físico foram distribuídas nos grupos não treinadas (NT; n = 10) e TC (n = 10). Durante 4 meses, as ratas foram submetidas ao TC 3x por semana, com treinamento de força (TF) seguido de treinamento aeróbico (TA), o teste de capacidade de carga voluntária máxima (CCVM) e o teste incremental de velocidade máxima (TIVM) foram aplicados para ajustar as cargas e a velocidade durante o período de treinamento. Observamos que o exercício físico regular levou a ganhos de força muscular, hipertrofia e melhora da marcha, além de melhora da capacidade aeróbica, diminuição de TBARS e aumento da defesa antioxidante no músculo gastrocnêmio (TAC; SOD) e plasma (GSH; SOD; CAT). Aumento significativo da área de secção transversa na região mediana do músculo gastrocnêmio após o TC, porém a imunomarcagem de irisina nestas células não apresentou resultado significativo. As ratas submetidas ao TC, durante o período da periostropausa, apresentaram melhora na defesa antioxidante e diminuição do dano oxidativo, além de hipertrofia muscular, ganho de força, melhora da marcha e aumento da capacidade aeróbica quando comparados aos animais sedentários. O conjunto de resultados obtidos indicam importante atuação do TC no músculo gastrocnêmio, com potencial para prevenção no desenvolvimento de sarcopenia e controle motor no período da senescência.

Palavras-chave: periostropausa, treinamento combinado, irisina, sarcopenia, estresse oxidativo

ABSTRACT

Sarcopenia makes up the frailty syndrome that can lead to falls, fractures, physical disability and mortality. Evidence suggests that the lack of physical exercise favors the loss of strength, and muscle mass. Thus, the present study aims to evaluate the effects of combined training (CT) on the redox state (blood and gastrocnemius) and the immunostaining of irisin in the gastrocnemius of Wistar rats in the reproductive senescence period. Periestropause rats (17 – 21 months) and adherent to physical exercise were distributed into the untrained (NT; n = 10) and CT (n = 10) groups. For 4 months, the rats were submitted to CT 3x a week, with strength training (ST) followed by aerobic training (AT), the maximum voluntary carrying capacity test (MVCC) and the incremental maximum velocity test (IMV) were applied to adjust loads and speed during the training period. We observed that regular physical exercise led to gains in muscle strength, hypertrophy, and gait improvement, in addition to improved aerobic capacity, decreased TBARS, and increased antioxidant defense in the gastrocnemius muscle (FRAP; SOD) and plasma (GSH; SOD; CAT). An increase in irisin expression in the gastrocnemius was observed after CT, but not enough for a significant result. Rats submitted to CT, in the periostropause period, showed improvement in antioxidant defense and decreased oxidative damage, in addition to muscle hypertrophy, strength gain, improved gait, and increased aerobic capacity of animals submitted to CT when compared to sedentary animals. The set of results obtained shows an important role of CT in the gastrocnemius muscle, with the potential to prevent the development of sarcopenia and motor control in the period of senescence.

Keywords: periostropause, combined training, irisin, sarcopenia, oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A Sarcopenia compõe a síndrome da fragilidade	19
Figura 2 - Efeitos do treinamento de força e treinamento aeróbico em idosos	22
Figura 3 - Delineamento experimental	28
Figura 4 - Ciclo estral	38
Figura 5 - Teste de desempenho	39
Figura 6 - Efeito do Treinamento Combinado na massa muscular	40
Figura 7 - Imunomarcção com irisina	41
Figura 8 - Dano oxidativo proteico e lipídico	42
Figura 9 - Defesa antioxidante não-enzimática	43
Figura 10 - Defesa antioxidante enzimática	44
Figura 11 - Teste funcional de deambulação	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa corporal inicial e final de ratas Wistar NT e TC

38

LISTA DE SIGLAS

α - Alfa

AST - Área de secção transversa

AU - Ácido úrico

β - Beta

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

BSA - Bovine Serum Albumine

CAT - Catalase

CCVM - Capacidade de carregamento voluntário máximo

D - Diestro

DA - Doença de Alzheimer

DCV - Doenças cardiovasculares

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNPH - Dinitrofenilhidrazina

DTNB - Ácido 2-nitrobenzóico

E - Estro

EPM - Erro padrão da média

EO - Estresse oxidativo

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FNDC5 - Proteína 5 contendo domínio de fibronectina tipo III

FRAP - Ferric reducing antioxidant power

FSH - Hormônio folículo estimulante

g - Gramas

GLUT4 - Transportador de glicose insulino-sensível

GPx - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathione

GSSG - GSH oxidado

H₂O - Água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HCl - Ácido clorídrico

HIIT - High Intensity Interval Training

M - Metaestro

mM - miliMol

min - Minutos
mg - Miligramas
mol/L - Mol por litro
MAPKs - Proteínas quinases ativadas por mitógeno
mRNA - RNA mensageiro
mtDNA - DNA mitocondrial
mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos
NaOH - Hidróxido de sódio
nm - Nanômetro
NT - Não treinadas
O₂ - Oxigênio
P - Proestro
 p - Nível descritivo ou probabilidade de significância
PC - Proteína carbonilada
PGC - 1 α - Coativador do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma 1 α
pH - Potencial hidrogênico
PT - Proteína total
RI - Resistência à insulina
SNC - Sistema nervoso central
SOD - Superóxido dismutase
STRAW – Stages of Reproductive Aging Workshop
TA - Treinamento aeróbio
TC - Treinamento combinado
TF - Treinamento de força
TAB - Tecido adiposo branco
TAC - Capacidade antioxidante total
TAM - Tecido adiposo marrom
TBARs - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA - Ácido tricloroacético
tGSH - GSH reduzido + GSSG oxidado
TIVM - Teste incremental de velocidade máxima
UCP-1 - Proteína 1 de desacoplamento
 μ mol/L - Micro mol por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. METODOLOGIA.....	26
3.1 ANIMAIS	27
3.2 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS DE TRABALHO E CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	27
3.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO	28
3.4 TESTE FUNCIONAL DE DEAMBULAÇÃO	30
3.5 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	30
3.6 COLORAÇÃO PELA HEMATOXILINA-EOSINA (HE).....	30
3.7 IMUNOPEROXIDASE INDIRETA PARA DETECÇÃO DE IRISINA.....	31
3.8 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO	32
3.8.1 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL (PT) E ENSAIOS DE ATIVIDADE PLASMÁTICA	32
3.8.2 DANO OXIDATIVO LIPÍDICO E PROTEICO	33
3.8.3 DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICA.....	33
3.8.4 DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA	34
3.8.5 PREPARO DO HOMOGENATO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO	35
3.8.6 DANO OXIDATIVO LIPÍDICO E PROTEICO	36
3.8.7 DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICA.....	36
3.8.8 DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA	36
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1 PARÂMETROS GERAIS	38
4.2 TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO	38
4.3 MENSURAÇÃO DA ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSAL E PESO DO GASTROCNÊMIO DE RATAS NT E TC.....	40
4.4 IMUNOMARCAÇÃO COM IRISINA EM FIBRAS MUSCULARES APÓS TC	41
4.5 DANO OXIDATIVO PROTEICO E LIPÍDICO APÓS A REALIZAÇÃO DE TC	42
4.6 DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICA APÓS A REALIZAÇÃO DE TC	42
4.7 DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA APÓS A REALIZAÇÃO DE TC.....	43
4.8 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MARCHA DE ROEDORES E INDICATIVO DO ESTADO DA FUNÇÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA.....	44
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

A perimenopausa é fase natural da vida que ocorre durante o climatério, sendo período de transição na senescência reprodutiva feminina. Este período de transição resulta de conjunto de transformações que envolvem sequência de ativação e desativação de complexas vias regulatórias em humanos. Neste sentido, o eixo reprodutivo feminino (hipotálamo-hipófise-ovário-uterino) passa por grandes alterações, evidenciado pela variabilidade na duração do ciclo menstrual, flutuações nas concentrações hormonais, número de folículos ovarianos e ovulação irregular (BRINTON et al., 2015). A análise da concentração de hormônios ovarianos, como a realizada por Tepper e colaboradores (2012), ilustra bem a fase da perimenopausa, pois a concentração sérica de 17β -estradiol passa por declínio lento e constante, em seguida, concentração baixa ao longo do tempo e, em período mais tardio, aumento com declínio lento e aumento com declínio acentuado. A redução na secreção ovariana de estradiol é mais característica na fase tardia da perimenopausa, à medida que ciclos anovulatórios aumentam (DELAMATER & SANTORO, 2018). Destaque também para a inibina, hormônio ovariano que consiste em duas subunidades alfa e beta (α e βA ou βB) e formam os dímeros inibina A e inibina B, cuja secreção diminui na fase mais precoce da perimenopausa. A principal função da inibina, subunidade B, consiste em suprimir seletivamente a secreção hipofisária do hormônio folículo-estimulante (FSH) por retroalimentação negativa (ROBERTSON & BURGER, 2002). Na perimenopausa há redução no número de folículos e, conseqüentemente, menor secreção de inibina B, acarretando menor inibição hipofisária e aumentando a secreção de FSH. Portanto, o aumento de FSH nessa fase inicial não se deve, principalmente, a diminuição de estradiol.

Os estágios do envelhecimento reprodutivo na transição da perimenopausa para a pós-menopausa apresentam sintomas característicos inerentes, tais como a variabilidade

na duração do ciclo, sintomas vasomotores (ondas de calor) e flutuações hormonais, descritos e inseridos nos critérios STRAW (HARLOW, 2012; SANTORO & TAYLOR 2011). Neste período há maior riscos para instalação e ocorrência de doenças como as cardiovasculares (SERVIENTE et al., 2016), osteoporose (HAO et al., 2021), doença de Alzheimer (DA) (SCHEYER et al., 2018), bem como diminuição de massa e função muscular (GRECO et al., 2019).

No período da perimenopausa, a redução na concentração plasmática de estradiol e o comprometimento de sua atuação como regulador molecular de propriedades do músculo esquelético (JUPPI et al., 2020) contribuem para diminuição da massa muscular, pois favorecem mudanças estruturais importantes e diminuem a capacidade regenerativa, (THIRUPATHI et al., 2020; GONZALEZ-FREIRE et al., 2014). Em 1988, em reunião no Novo México, cientistas chegaram ao consenso sobre a importância da sarcopenia, evento fisiológico e patológico caracterizado pela diminuição da massa muscular e função, que afeta a deambulação, mobilidade, consumo de energia, independência, consumo de nutrientes, *status* e função respiratória (ROSENBERG, 1997). Atualmente, a sarcopenia é caracterizada como distúrbio muscular esquelético generalizado, progressivo e relacionado a idade, acompanhado por força muscular diminuída, baixa qualidade e quantidade muscular e desempenho funcional prejudicado (CRUZ-JENTOFT et al., 2019). A sarcopenia compõe a síndrome da fragilidade que pode levar a quedas, fraturas, incapacidade física e mortalidade (DUDA et al., 2019) além de maior risco de resistência à insulina, diabetes e doenças cardiovasculares (Fig.1) (BILSKI et al., 2022). Com o aumento da expectativa de vida e o rápido crescimento da população idosa, a sarcopenia tornou-se problema emergente de saúde pública. Possíveis mecanismos responsáveis pela sarcopenia já descritos incluem: deficiências nutricionais e sedentarismo, alterações bioquímicas e físicas, levando à atrofia das fibras, recrutamento ineficiente das células satélites, alteração

endócrina, estresse oxidativo e redução na estimulação neuronal devido à redução do número de motoneurônios alfa (α), determinando danos no DNA mitocondrial (mtDNA), e mutações que reduzem a produção de energia da célula afetada, resultando em anormalidade no sistema de transporte de elétrons que culminará na perda da fibra muscular (WANAGAT et al., 2001).

A sarcopenia compõe a síndrome da fragilidade

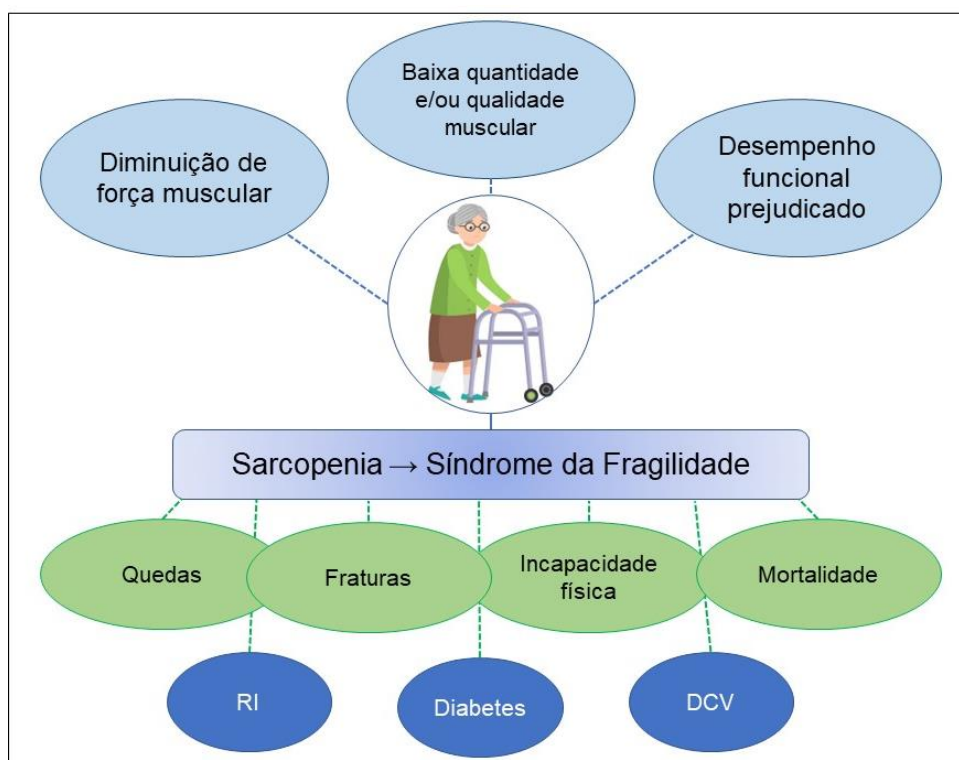


Figura 1 – A sarcopenia é caracterizada como distúrbio muscular esquelético generalizado, progressivo e relacionado a idade, acompanhado por força muscular diminuída, baixa quantidade e qualidade muscular e desempenho funcional prejudicado. A sarcopenia compõe a síndrome da fragilidade que pode levar a quedas, fraturas, incapacidade física e mortalidade, além de maior risco de resistência à insulina, diabetes e doenças cardiovasculares. Abreviações: RI: resistência à insulina; DCV: doenças cardiovasculares. Fonte: Modificado de BILSKI et al., 2022; DUDA et al., 2019; CRUZ-JENTOFT et al., 2019.

Há evidências de que a realização de atividade física melhora os sintomas da menopausa precoce, além de sintomas vasomotores (ASGHARI et al., 2017; AYATI et al., 2008; ELAVSKY & MCAULEY, 2007), diminui também sintomas físicos e mentais (ASGHARI et al., 2017) e propicia melhor qualidade de vida para essas mulheres (ASGHARI et al., 2017; MANSIKKAMÄKI et al., 2015; ELAVSKY & MCAULEY, 2007). Além disso, evidências sugerem que a falta de atividade física favorece a perda de força e massa

muscular (PASCUAL-FERNÁNDEZ et al., 2020). Sendo assim, o exercício é importante estímulo anabólico e pode melhorar força muscular, marcha, equilíbrio e capacidade aeróbia (BILSKI et al., 2022), tornando-se potente aliado para evitar o surgimento da sarcopenia (PASCUAL-FERNÁNDEZ et al., 2020).

É de conhecimento que a massa muscular esquelética, número e tamanho das fibras musculares, é regulada pelo equilíbrio da síntese e degradação das proteínas do músculo esquelético, portanto, a proteólise aumentada resulta em diminuição na massa muscular (IKEDA et al., 2019). A diferenciação dos tipos principais de fibras musculares é baseada no conteúdo do tipo de cadeia pesada de miosina dominante, o principal determinante das propriedades contráteis das células musculares. As fibras do tipo I tem alta densidade mitocondrial e capilar e fornecem energia para contrações longas. As fibras do tipo IIA e IIX são glicolíticas e predominam em atividades de alta intensidade de curta duração. A idade, nível de atividade física e peso corporal podem prever a predominância de tipos de fibras do indivíduo (JUPPI et al., 2020). A área de secção transversal do músculo esquelético diminui com o envelhecimento e sua composição torna-se predominante de fibras tipo I (IKEDA et al., 2019). Portanto, o condicionamento físico adequado na perimenopausa é significativo na melhora dos sintomas e na prevenção de doenças crônicas (HAO et al., 2021). Estudo do nosso laboratório, demonstrou que ratas no período da periostropausa após intervenção com treinamento de força 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 (MORAIS et al., 2016).

O exercício físico desencadeia adaptações fisiológicas dependentes de fatores como a duração do exercício, a frequência em que é realizado esse exercício e a intensidade do

mesmo, que vão gerar essas adaptações resultando em aumento do consumo de oxigênio (HAWLEY, 2009). O treinamento de força (TF) é estratégia importante para prevenir a sarcopenia, pois promove ativação e proliferação de células satélites, aumenta a síntese de proteínas musculares e induz sinalização do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que é responsável pelas alterações na síntese proteica, autofagia e expressão do coativador do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma 1 α (PGC-1 α) (BILSKI et al., 2022; HEO et al., 2017), por esta razão, o TF é recomendado para idosos para melhorar massa e função do músculo esquelético (BILSKI et al., 2022). Outro tipo de treinamento com efeitos benéficos para os idosos é o treinamento aeróbio (TA), pois aumenta ou mantém a capacidade aeróbia dos músculos esqueléticos, melhora a saúde cardiovascular, capacidade oxidativa muscular, tem efeito anti-inflamatório, reduz estresse oxidativo e resistência à insulina (Fig. 2) (BILSKI et al., 2022). A combinação de treinamento de força e aeróbio, denominado de treinamento combinado (TC) (MURACH & BAGLEY, 2016) em idosos parece ser a estratégia mais eficaz para melhorar as funções neuromusculares e cardiorrespiratórias, mantendo assim a capacidade funcional durante o envelhecimento (CASTOLDI et al., 2017; 2013).

Efeitos do treinamento de força e treinamento aeróbio em idosos

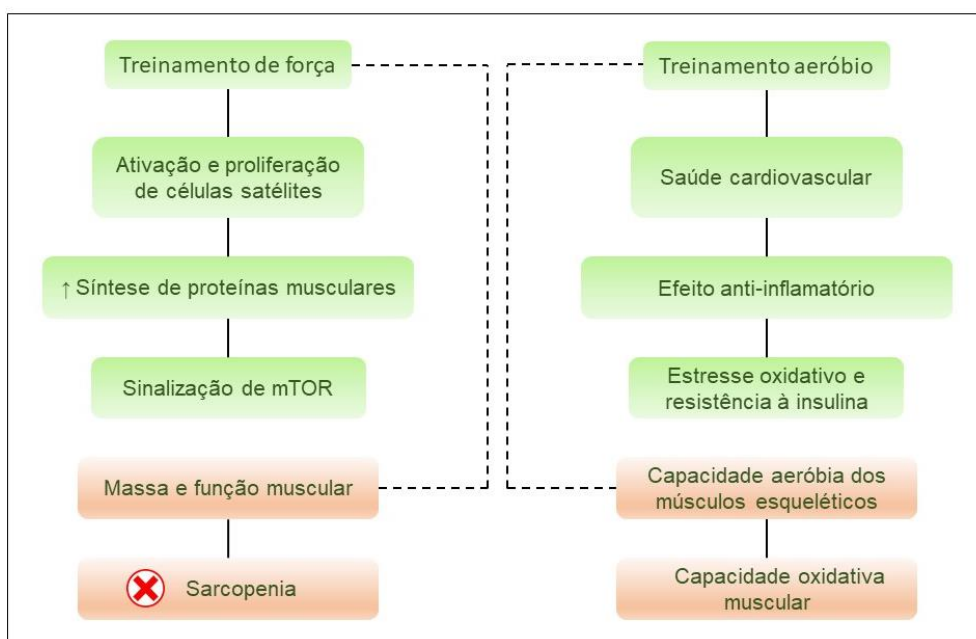


Figura 2 – O TF promove ativação e proliferação de células satélites, aumenta a síntese de proteínas musculares e induz sinalização de mTOR, que é responsável pelas alterações na síntese proteica, autofagia e expressão de PGC-1 α , por isso o TF melhora massa e função muscular prevenindo a sarcopenia. O TA melhora a saúde cardiovascular, tem efeito anti-inflamatório e reduz estresse oxidativo e resistência à insulina, tem influência direta na melhora da capacidade aeróbia e oxidativa dos músculos esqueléticos. Abreviações: TF: treinamento de força, mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos, PGC-1 α : coativador do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma 1 α , TA: treinamento aeróbio. Fonte: Modificado de BILSKI, et al., 2022.

Durante ou imediatamente após o exercício físico (KORTA et al., 2019), os miócitos ou células musculares secretam miocinas em resposta a contração muscular (WASEEM et al., 2022). Essas miocinas exercem vários efeitos biológicos, diretamente no tecido muscular (efeito autócrino), nos tecidos próximos (efeito parácrino) ou longe do local de secreção (efeito endócrino) quando transportado pelo sangue, interferindo em processos complexos de muitos órgãos como metabolismo, angiogênese e inflamação (MANCINELLI et al., 2021; LAURENS et al., 2020). Em 2012, Bostrom e colaboradores descreveram uma molécula secretada pelos miócitos, a irisina, fragmento de proteína da membrana celular denominada proteína 5 contendo domínio de fibronectina tipo III (FNDC5). A irisina é adipomiocina secretada principalmente pelo músculo esquelético, mas há evidências que os tecidos adiposos subcutâneos e viscerais também secretam essa molécula e ainda os testículos, fígado, pâncreas, cérebro, baço, coração e estômago à produzem em menores

quantidades (KORTA et al., 2019). A irisina converte tecido adiposo branco (TAB) em tecido adiposo marrom (TAM) através da regulação positiva da expressão da proteína 1 de desacoplamento (UCP-1), mediante ao aumento do gasto de energia (BOSTROM et al., 2012), está envolvida também na melhora da tolerância a glicose e na melhora da resistência à insulina (LI et al., 2019). Outras funções biológicas importantes já foram atribuídas a essa miocina, como regulação do comportamento depressivo, proliferação de osteoblastos e massa óssea cortical (WASEEM et al., 2022). Estudo com camundongos machos, observou que injeção de irisina duas vezes por semana intraperitoneal melhorou a regeneração, induziu hipertrofia e reduziu a degradação de proteínas devido à ativação de células satélites e aumento da síntese proteica (REZA et al., 2017). Sendo o músculo esquelético a principal fonte de irisina, ele determina as concentrações circulantes dessa miocina e a perda de massa muscular no período do envelhecimento pode diminuir essas concentrações (MANCINELLI et al., 2021). Park e colaboradores (2019), estudaram mulheres pós menopausadas, com 60 anos ou mais, e sugeriram a irisina como biomarcador para sarcopenia, pois foi observado concentrações diminuídas de irisina circulante nos grupos de sarcopenia e pré sarcopenia quando comparado ao grupo não-sarcopênico.

Estudos mostraram que a irisina influencia a expressão de diferentes genes neuronais que influenciam a plasticidade neuronal e podem neutralizar a neurodegeneração. A irisina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e afetar diretamente a função e a atividade neural, atuando na plasticidade sináptica e protegendo neurônios contra a neurodegeneração (FARSHBAF & ALVIÑA, 2021). O aumento da expressão de FNDC5 correlaciona-se positivamente com a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), uma das mais importantes moléculas sinalizadoras para plasticidade sináptica e neurogênese no hipocampo. Importante função na sinapse e

memória de camundongo, modelo para estudo da Doença de Alzheimer (DA), confirmaram os efeitos benéficos dos exercícios mediados pela irisina no funcionamento adequado do Sistema Nervoso Central (SNC) (KORTA et al., 2019). Estudo utilizando camundongos fêmeas e machos de 2 a 3 meses de idade foram submetidos a exercício aeróbio e a injeções cerebrais de oligômeros A β , tornando-os modelos experimentais da DA, o grupo observou que esses animais apresentaram proteção do comprometimento da memória e observaram também que os níveis hipocâmpais de irisina/FNDC5 e BDNF foram maiores nos animais submetidos ao treinamento quando comparado ao grupo sedentário (LOURENÇO et al., 2019). Outra investigação com homens e mulheres com 55 anos de idade que apresentaram risco de demência foram divididos em três grupos, treino cognitivo com atividades feitas no computador, treinamento físico multimodal incluindo aeróbio, força, equilíbrio, coordenação e flexibilidade e grupo controle, após o período de intervenção foi observado aumento da concentração de irisina no soro desses indivíduos do grupo treino cognitivo e treinamento físico, melhorando, de acordo com o autor, memória e cognição global (KUSTER et al., 2017). A irisina demonstrou regular a função mitocondrial em cardiomiócitos de modelo de infarto de miocárdio, restaurou o potencial de membrana mitocondrial e anulou a regulação negativa dos níveis do complexo respiratório mitocondrial, além de melhorar concentrações de glutathione (GSH), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX), evidenciando a participação da irisina na melhora da defesa antioxidante (XIN & LU, 2020).

Entre as hipóteses aceitas para explicar o envelhecimento, está a teoria dos radicais livres, proposta por Denham Harman (1956), a qual estabelece que o envelhecimento é derivado dos efeitos deletérios nas organelas celulares, causados pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (HARMAN, 1956). No período da senescência o indivíduo torna-se mais suscetível aos danos do estresse oxidativo (EO), resultante do desequilíbrio entre as

espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, com consequente dano celular (DANI et al., 2020; ALCAZAR et al., 2019; MIRANOWICZ-DZIERZAWSKA, 2018, HAAK et al., 2009). O EO causado pela diminuição da capacidade antioxidante resulta do aumento na produção de EROs e concentrações diminuídas de antioxidantes (GOMES et al., 2017; ALTENHÖFER et al., 2015). As EROs, em concentrações fisiológicas, desempenham funções na sinalização redox e sobrevivência celular, ativando ou inibindo enzimas e cascatas dependentes de genes (GOMES et al., 2017). Por consumir grande quantidade de oxigênio, o músculo esquelético pode gerar EROs na mesma proporção, interferindo nas alterações musculares como por exemplo na sarcopenia, observado no músculo envelhecido (GOMES et al., 2017). Outro tecido diretamente afetado pelo EO é o hipocampo que é extremamente sensível a este dano, favorecendo a neurodegeneração (POSTU et al., 2019; CHERBUIN et al., 2019). A micróglia, células imunes do SNC, tem suas funções afetadas no envelhecimento (D'AVILA et al., 2018; STREIT et al., 2014), e quando ativada produz mediadores inflamatórios, EROs e neurotoxicidade, associados a declínios cognitivos (D'AVILA et al., 2018; WOHLE & DELPECH, 2017). As enzimas antioxidantes podem ser modificadas por exercício físico, alimentação e como destacado anteriormente, pelo envelhecimento (GOMES et al., 2017; FRANZKE et al., 2014). Os idosos que praticam exercício físico tendem a aumentar as defesas antioxidantes (DANI et al., 2020), pois a atividade física é preditora da função mitocondrial muscular, uma vez que há diminuição de mitocôndrias e suas funções no período do envelhecimento (GOMES et al., 2017; CARTER et al., 2015; KANG et al., 2013). O exercício crônico está relacionado a concentrações diminuídas de marcadores de EO e aumento da capacidade antioxidante enzimática e não enzimática em indivíduos jovens, adultos e idosos (GOMES et al., 2017; TAKAHASHI et al., 2013; FATOUROS et al., 2004; LAFOREST et al., 1990).

Nossa hipótese é que a prática do treinamento combinado propicia aumento na imunomarcagem de irisina no músculo gastrocnêmio e induz benefícios em prol do estado redox, contribuindo para manutenção da massa muscular e melhor capacidade de marcha das ratas no período da periostropausa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do TC no estado redox (sangue e gastrocnêmio) e a imunomarcagem de irisina no gastrocnêmio de ratas Wistar no período de senescência reprodutiva.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar dano oxidativo proteico e lipídico, defesa antioxidante enzimática e não-enzimática, após realização do TC, no sangue e gastrocnêmio de ratas na periostropausa;
- Determinar imunomarcações de irisina no músculo esquelético gastrocnêmio de ratas na periostropausa, após realização do TC;
- Avaliar a qualidade da marcha dos roedores em período que antecede e após o período de realização do TC;
- Verificar, nas variáveis analisadas, os possíveis efeitos do exercício físico realizado durante o período da periostropausa.

3. METODOLOGIA

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba (FOA/UNESP)

(processo nº 00826-2018) e conduzido de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal.

3.1 Animais

Após a aprovação do protocolo experimental, 20 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com idade inicial de 17 meses, multíparas (3 a 4 procriações dos 2 aos 10 meses de idade), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), foram incluídas neste estudo. As ratas foram mantidas em caixas coletivas (4 animais/caixa) em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de luz invertida (12/12h) e umidade ($55 \pm 10\%$) controlados e acesso livre à água e ração (Presence® Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil).

3.2 Determinação dos grupos de trabalho e critério de inclusão e exclusão

Foram incluídas apenas ratas multíparas com 17 meses e com ciclo estral irregular, onde o mesmo foi verificado através do esfregaço vaginal e analisado a fresco ao microscópio óptico durante 2 semanas (FERNANDES et al., 2020; NICOLA et al., 2016; FERREIRA et al., 2015; LONG & EVANS, 1922). Após essa confirmação, foi verificada a treinabilidade das ratas afim de determinar aderência ao exercício físico. Para o protocolo do exercício aeróbio foi adotada a escala de desempenho em corrida com score de 1 a 5 (HENRIQUE, 2018; DISHMAN et al., 2006), classificado da seguinte maneira: 1) o animal se recusa a correr; 2) corrida sem constância (corre e para ou corre em direção errada); 3) corrida irregular; 4) corrida boa (ocasionalmente corre na parte de trás da esteira); 5) corrida excelente (corre permanentemente na parte da frente da esteira). Foram incluídos nos grupos experimentais apenas os animais que obtiveram classificação 3 ou mais. A análise de aderência das ratas ao treinamento resistido foi realizada com as ratas que apresentaram aderência ao exercício aeróbio. Os animais foram submetidos a teste de escalada voluntária na escada, sem a utilização de carga. Os animais que se recusaram a

subir escada foram classificados como não aderentes ao exercício e por isso excluídos do estudo. Ressaltamos que as ratas excluídas dos grupos de exercício também não fizeram fazer parte do grupo controle. Ao fim do processo de inclusão e exclusão, as ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: 1) ratas não submetidas a treinamento de exercício físico (NT); 2) Treinamento Combinado (TC) (Fig. 3).

Delineamento Experimental

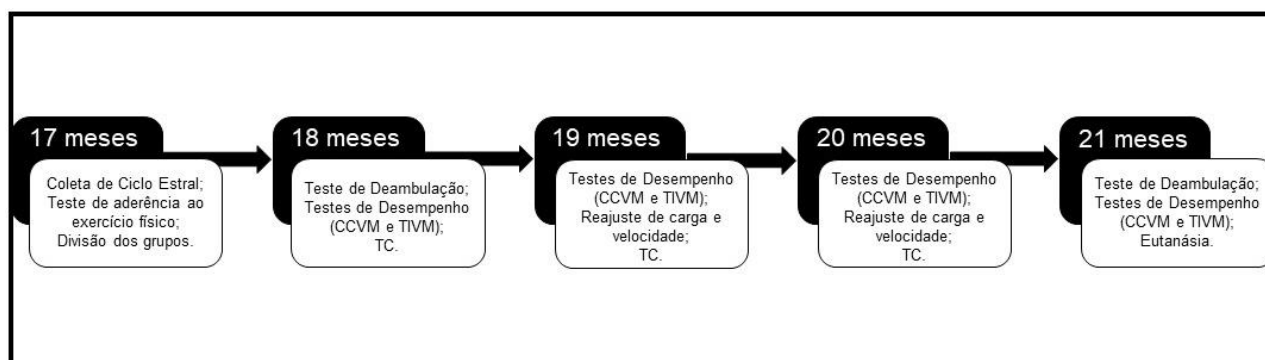


Figura 3 – Delineamento experimental resumido. Abreviações: CCVM (Teste de Capacidade de Carregamento Voluntário Máximo); TIVM (Teste Incremental de Velocidade Máximo).

3.3 Protocolo de treinamento físico

O treinamento combinado ocorreu em 03 sessões por semana no período de 120 dias. Cada sessão com 40 minutos de duração, sendo 20 minutos na fase anaeróbia e em seguida, 20 minutos na fase aeróbia.

Fase Anaeróbia: a familiarização na escada (1.13×0.18 m, grade de 2 cm, ângulo de 80° , com área de descanso de $20 \times 20 \times 20$ cm diâmetro no topo – fabricada pelo Setor de Manutenção - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, SP, Brasil) foi realizada uma (01) semana antes do início dos treinos, sendo executadas subidas voluntárias sem a utilização de carga. Após o período de familiarização foi aplicado o teste de capacidade de carregamento voluntário máximo (CCVM), onde acoplamos dois tubos plásticos (BD Falcon 50 mL tubo cônico, BD Biosciences®, Bedford, MA, USA) preenchidos com esferas de aço (Esferas de aço, Cabana S/A, SP, Brasil) unidos à cauda com fita

adesiva (Missner & Missner Ltda, Blumenau, SC, Brasil), seguindo o protocolo estabelecido por (HORNBEGER & FARRAR, 2004) e também já reproduzido anteriormente em nosso laboratório (PERES-UENO et al., 2020; MORAIS et al., 2017; STRINGHETTA-GARCIA et al., 2016; 2017). O teste teve início com 75% do peso corporal da rata e adicionado 30 gramas a cada série executada com sucesso até a falha concêntrica do movimento atingindo assim a CCVM. Foi tomado por parâmetro a última execução concêntrica do animal e a partir desta calculada a carga de trabalho. O programa foi composto pela execução do treinamento resistido e treinamento aeróbio, sendo executados nesta respectiva ordem, realizados três vezes na semana (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira) durante 120 dias. A fase anaeróbia foi realizada pela escalada na escada em 5 séries inicialmente à 60% da CCVM, sendo elevado 10% a cada semana até alcançarmos a carga de trabalho definitiva de 80% da CCVM.

Fase Aeróbia: a familiarização na esteira (fase aeróbia) foi realizada por três dias consecutivos, por 10 minutos/dia em velocidade de 10 metros por minuto (m/min) (NOKIA et al., 2016). Após a familiarização, as ratas ficaram 24 horas sem atividades e posteriormente realizaram o teste incremental de velocidade máxima (TIVM) proposto por Picoli e colaboradores (2018) a fim de determinar a velocidade de trabalho de cada animal estando associado com o VO_2 máximo. O teste consistiu em período inicial de aquecimento com duração de 5 minutos à velocidade de 6 m/minutos. Posteriormente, a velocidade foi aumentada para 11,4 m/min seguido por acréscimo de 5,4 m/min a cada 3 minutos de corrida até atingir a exaustão, caracterizada pela incapacidade de o animal continuar por mais de 10 segundos, chegando assim ao VO_2 pico (Picoli et al., 2018). Imediatamente após a fase anaeróbia as ratas foram colocadas na esteira ergométrica dando início a fase aeróbia, sendo esta composta por 20 minutos (ininterruptos) de corrida à 60% da velocidade máxima na primeira semana e 70% nas demais semanas até o fim do programa. A partir

da quarta semana foram realizados novos testes de CCVM e de velocidade na esteira, sendo repetidos a cada quatro semanas.

3.4 Teste funcional de deambulação

O teste de deambulação possibilita avaliação funcional da marcha de roedores e 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) atóxica preta e as patas dianteiras em tinta marrom. Em seguida, os animais foram posicionados em 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 e a largura da passada foram mensurados. Os dados foram obtidos previamente (17 meses de idade) e ao final do período de TC (21 meses de idade).

3.5 Coleta de Material Biológico

Quarenta e oito (48) horas após o último treinamento físico e realização do teste funcional, foi realizada a eutanásia dos animais por decapitação. O sangue foi coletado em tubos devidamente heparinizados e em seguida centrifugados (4°C; 1500 rpm; 15 minutos) (Beckman J-6M Induction Drive Centrifuge; Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA). O plasma foi aliquoteado e armazenado a - 80°C para análises posteriores. O músculo gastrocnêmio lateral (direito e esquerdo) foi cuidadosamente dissecado, pesado e congelado em nitrogênio líquido e em seguida, armazenados em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas e de imunoistoquímica.

3.6 Coloração pela hematoxilina-eosina (HE)

Para a análise histométrica, secções histológicas de 5 µm foram realizadas em micrótomo e colocadas em banho maria a 36° C para expandir o corte. Essas secções

histológicas foram submetidas à coloração pela HE. Para isso, as secções histológicas passaram pelo processo de desparafinização inicial em estufa (56°C a 58°C), durante 30 minutos. Seguida pela desparafinização completa em sequência de xilol, hidratação em série decrescente de etanol, lavagem em água. Logo após, imersão em Hematoxilina por 2 minutos, lavagem em água, imersão em Eosina por 5 minutos, lavagem em água, desidratação em série crescente de etanol, diafanização em sequência de xilol e recobrimento com meio de montagem e lamínulas de vidro.

3.7 Imunoperoxidase indireta para detecção de irisina

Para a análise imunoistoquímica, as secções histológicas de 5 µm foram submetidas à desparafinização inicial em estufa (56°C a 58°C), durante 30 minutos, seguida pela desparafinização completa em sequência de xilol, hidratação pelo etanol em série decrescente. A partir desta e previamente a cada uma das etapas da reação imunoistoquímica, os cortes histológicos foram submetidos a três lavagens em PBS durante 5 minutos, PBS acrescido de 0,05% de Triton® X-100 durante 5 minutos e PBS durante 5 minutos.

A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato 10mM e pH 6,0 (Antigen Retrieval Buffer 1, Spring Bioscience Corporation, Pleasanton/CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking Chamber®, Biocare Medical LLC., Concord/CA, EUA). Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução constituída de 3% de peróxido de hidrogênio em PBS durante 60 minutos, e em solução constituída de 4% de leite em pó desnatado em PBS durante 60 minutos, para o bloqueio da peroxidase e da biotina endógenas, respectivamente.

O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado em solução constituída de 1,5% de soro albumina bovino (BSA, Bovine serum albumine) em PBS acrescido de 0,05% de Triton® X-100 durante 12 horas. As lâminas contendo as amostras de cada grupo

experimental foram incubadas com o anticorpo primário anti-irisina do rato gerado em coelho (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EUA). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA).

A revelação foi realizada utilizando-se como cromógeno o composto 3,3'-diaminobenzidina (K3468; Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako North America Inc.). Para a contracoloração, os espécimes foram submetidos a lavagens em água, imersão em Hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavagens em água, desidratação em série crescente de etanol, diafanização em sequência de xilol e recobrimento com meio de montagem e lâminulas de vidro.

Como controle negativo da reação, as secções histológicas foram submetidas às mesmas etapas descritas, suprimindo-se apenas a utilização do anticorpo primário. Todas as etapas da reação imunoistoquímica basearam-se no protocolo descrito por Ervolino e colaboradores (2019).

3.8 Análise de Estresse Oxidativo

3.8.1 Concentração de proteína total (PT) e ensaios de atividade plasmática

A concentração de PT foi determinada pelo método de Hartree-Lowry (HARTREE, 1972; LOWRY et al., 1951), usando albumina sérica bovina como padrão. A atividade plasmática foi determinada pela reação de cor amido-iodo usando kit comercial (Labtest, Brasil). A mistura de reação contendo 0,04% (p/v) de amido solúvel como substrato em tampão fosfato 0,2 mol/L a pH 7,0 e incubada por 7,5 min a 37 °C. A reação foi então interrompida com a adição de solução contendo iodo/iodeto de potássio e HCl. As absorbâncias da amostra e do branco foram lidas a 660 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 10 mg de amido em 30min

de reação nas condições de ensaio descritas. As concentrações de PT dos homogeneizados de tecido foram usadas para normalização das atividades plasmáticas.

3.8.2 Dano oxidativo lipídico e proteico

A peroxidação foi determinada por meio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE & AUST, 1978). O sobrenadante foi agitado suavemente com mistura de reação contendo 15% (p/v) de ácido tricloroacético, 0,67% (p/v) de ácido tiobarbitúrico e 0,25 mol/L de HCl. As amostras foram incubadas em banho-maria a 95°C por 45 minutos e depois resfriadas em gelo. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos. Após centrifugação, o TBARS no sobrenadante foi determinado a 532 nm em leitor de microplacas (Biotek Powerwave 340, EUA). A quantidade de aldeídos formados foi calculada usando seu coeficiente de extinção ($\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressa em $\mu\text{mol/L}$. O teor de proteínas carboniladas foi quantificado pelo método alcalino de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) (MESQUITA et al., 2014). Resumidamente, DNPH (10 mmol/L em 0,5 M H_3PO_4) foi adicionado ao sobrenadante e a mistura foi incubada por 10 min à temperatura ambiente. NaOH (6 mol/L) foi então adicionado. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 450 nm contra um branco no qual a solução de proteína foi substituída por igual volume de solução tampão. O teor de carbonila foi calculado usando o coeficiente de absorção molar ($\epsilon_{450} = 22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em relação à concentração de PT.

3.8.3 Defesa antioxidante não-enzimática

A capacidade antioxidante total (TAC) foi determinada espectrofotometricamente usando o ensaio FRAP, conforme descrito anteriormente por Benzie e Strain (1996) com base na redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} , quelado por 2,4,6-tri (2 -piridil) - s-triazina (TPTZ) para

formar o complexo Fe^{2+} -TPTZ com absorvância máxima em 593 nm. Os resultados foram calculados usando curva padrão construída usando diferentes concentrações de soluções de FeSO_4 .

O teor de GSH reduzido + GSSG oxidado (tGSH) foi determinado espectrofotometricamente em ensaio ligeiramente modificado, conforme descrito anteriormente (AKERBOOM & SIES, 1981). Os sobrenadantes dos extratos ácidos foram adicionados em meio contendo 100 mmol/L de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 2 mmol/L EDTA, 0,6 mmol/L 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), 0,2 mmol/L NADPH e glutathiona redutase 0,5 kU/L, e a formação reduzida de DTNB foi determinada a 412 nm em curva padrão de GSH. Os níveis de tióis reativos a DTNB (como equivalentes de GSH) foram expressos como nmol/mg de PT.

As concentrações de ácido úrico (AU) foram determinadas com kit comercial (Labtest, Brasil). A uricase foi usada no ensaio para transformar ácido úrico em alantoína e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase, o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina e 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfonato de sódio, formando o cromógeno antipirilquinonimina (TRIVEDI et al., 1978). As concentrações de PT dos homogeneizados de tecido foram usadas para normalização dos parâmetros.

3.8.4 Defesa antioxidante enzimática

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada espectrofotometricamente (420 nm) usando a inibição da taxa de autooxidação de pirogalol em 50 mmol/L de tampão Tris-HCl (pH 8,2), contendo 1 mmol/L de DTPA. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de auto-oxidação do pirogalol em 50% (MARKLUND & MARKLUND, 1974).

A atividade de catalase (CAT) foi determinada espectrofotometricamente (240 nm) através da taxa de decomposição de peróxido de hidrogênio em 50 mmol/L de tampão

fosfato de potássio (pH 7,0) (AEBI, 1984). As unidades de atividade enzimática foram determinadas usando o coeficiente de extinção molar de H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade de CAT foi definida como a quantidade da enzima necessária para decompor 1 mmol de peróxido de hidrogênio por 1 minuto.

A atividade de GPx foi avaliada em ensaio acoplado com oxidação de NADPH catalisada por glutathione redutase (GR) usando hidroperóxido de terc-butila como substrato (WENDEL, 1981). A atividade da enzima foi determinada espectrofotometricamente monitorando o desaparecimento de NADPH a 340 nm em meio contendo 50 mmol/L de tampão fosfato de sódio (pH 7,5), 1 mmol/L EDTA, 0,1 mmol/L NADPH, 0,4 mmol/L de azida de sódio, 0,1 U /mL de GR, 1 mmol/L de GSH, 0,5 mmol/L de hidroperóxido de terc-butila e homogeneizados de tecido. A azida de sódio foi usada para bloquear a atividade da catalase. Um μ de atividade de GPx foi definido como 1 mmol de NADPH consumido por minuto, usando o coeficiente de extinção molar de NADPH ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As concentrações de PT dos homogeneizados de tecido foram usadas para normalização das atividades enzimáticas.

3.8.5 Preparo do homogenato do músculo gastrocnêmio

As amostras do músculo gastrocnêmio foram descongeladas em gelo e lavadas em solução salina gelada (NaCl 0,9%, m/v). O homogeneizador Potter-Elvehjem (modelo MA 099; Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) foi usado para preparar os homogenatos a 5% em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,4) contendo 0,2% (v/v) de Triton X-100, ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) 10 mmol/L e fluoreto de fenilmetanossulfonil 2 mmol/L (PMSF). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min a 4°C (Centrífuga Eppendorf R 5810; Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi coletado, aliquoteado e armazenado a -80°C para análise de Proteína Carbonilada (PC), TBARs, TAC, SOD, CAT e GPx. Os sobrenadantes para serem usados para determinação

da GSH foram preparados em 5% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA) contendo 2 mmol/L de ácido dietilenotriaminopenta acético (EDTA), centrifugado a 4000 rpm/10 min/4°C.

3.8.6 Dano oxidativo lipídico e proteico

A concentração de PC foi quantificada usando o método alcalino 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (MESQUITA et al. 2014). O conteúdo de carbonil foi calculado usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{450} = 22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da concentração de TBARS (BUEGE & AUST, 1978). A quantidade de aldeídos formados foi calculada pelo coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.8.7 Defesa antioxidante não-enzimática

A capacidade antioxidante total foi determinada espectrofotometricamente por meio da FRAP, conforme descrito anteriormente por Benzie e Strain (1996). Os resultados foram calculados utilizando curva padrão com diferentes concentrações de soluções de FeSO_4 . A concentração de GSH (GSH reduzida + GSSG oxidada) foi determinada espectrofotometricamente em ensaio ligeiramente modificado, como descrito anteriormente (AKERBOOM & SIES, 1981). Os sobrenadantes ácidos foram adicionados a meio contendo 100 mmol/L de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 2 mmol/L de EDTA, 0,6 mmol/L 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), 0,2 mmol/L de NADPH e 0,5 kU/L de glutathione redutase; a quantificação dos níveis foi baseada na curva padrão de GSH.

3.8.8 Defesa antioxidante enzimática

A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente (420 nm) mensurando a taxa de inibição da autooxidação do pirogalol em 50 mmol/L de tampão Tris-HCl (pH 8,2), contendo 1 mmol/L de ácido dietilenotriamina pentacético (DTPA). Uma

unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de autooxidação do pirogalol em 50% (MARKLUND & MARKLUND, 1974).

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente (240 nm) através da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,0) (AEBI, 1984). As unidades da atividade da enzima foram determinadas usando o coeficiente de extinção molar de H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade da CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 mmol de peróxido de hidrogênio por 1 minuto.

A atividade da GPx foi determinada pelo método que utiliza o peróxido de di-terc-butila como substrato da reação, ocorrendo oxidação da GSH pela GPx gerando GSSG, que é convertido em GSH pela glutathione redutase (GR), consumindo nessa reação uma molécula de NADPH (WENDEL, 1981). A atividade da enzima foi determinada espectrofotometricamente monitorando o consumo de NADPH a 340 nm em meio contendo 50 mmol/L de tampão fosfato de sódio (pH 7,5), 1 mmol/L de EDTA, 0,1 mmol/L de NADPH, 0,4 mmol/L de azida de sódio, 0,1 U/mL de GR, 1 mmol/L de GSH, 0,5 mmol/L de peróxido de terc-butila e amostras. A azida de sódio foi usada para bloquear a atividade da catalase. Uma U da atividade da GPx foi definida como 1 mmol de NADPH consumido por minuto, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.9 Análises Estatísticas

Para o teste funcional de deambulação a normalidade foi analisada pelo teste de D'Agostino & Pearson e demais testes foi usado o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e considerados estatisticamente significantes quando 5% ($p < 0,05$), representados por (*) quando diferença entre grupos e (***) quando comparados intragrupo. Os dados foram submetidos ao Teste

de análise de Variância (ANOVA) *one-way* e *Kruskal-Wallis*. Para análise intragrupo (18 vs 21 meses) os dados foram submetidos a teste *t* pareado.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros Gerais

A análise do esfregaço vaginal das ratas Wistar evidenciou a irregularidade no ciclo estral, com citologia vaginal leucocitária caracterizando a ocorrência do diestro persistente nos animais com 17 meses. O acompanhamento do ciclo estral das ratas, durante 15 dias, mostrou a permanência em diestro persistente em 73% do período equivalente a três ciclos consecutivos, caracterizando a periestro pausa (Fig. 4). Durante a intervenção de 120 dias de TC não houve diferença significativa no peso corporal dos animais (Tabela 1).

CICLO ESTRAL

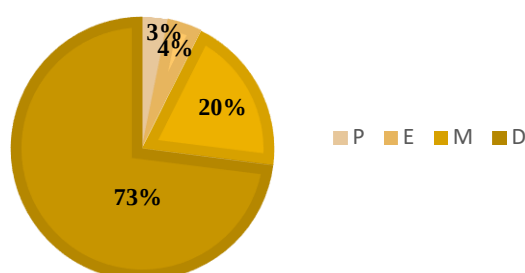


Figura 4 - Incidência das fases do ciclo estral das ratas Wistar com 17 meses em período equivalente a três ciclos consecutivos. Abreviações: P = proestro; E = estro; M = metaestro; D = diestro. Número de animais por grupo= 20.

TABELA 1. Massa corporal inicial (18 meses) e final (21 meses) de ratas Wistar não treinadas e treinadas durante 120 dias.

Grupos	Peso corporal (g)	
	18 meses	21 meses
NT	403.91± 8.37	391.07±10.66
TC	392.83±6.41	382.5±6.60

Os valores representam a média dos grupos experimentais. NT = não treinadas; TC = treinamento combinado. Número de animais por grupo= 20.

4.2 Treinamento físico combinado

As ratas do grupo NT realizaram o teste CCVM e TIVM no início e final do período experimental, ambos apresentaram resultado significativo, sugerindo diminuição de força

muscular e VO_2 máximo (Fig. 5a; c). Os resultados obtidos do teste CCVM com as ratas que realizaram o TC demonstrou evolução significativa em todos os meses (5 testes) de avaliação, sugerindo aumento gradual de força muscular em resposta ao treinamento (Fig. 5b). A análise do TIVM mostrou diferença significativa sugerindo aumento gradativo na velocidade e melhora do VO_2 máximo, porém quando comparado o 2º teste com os 3º e 4º não houve diferença significativa assim como comparando o 3º com o 4º teste, sugerindo adaptação aeróbia (Fig. 5d).

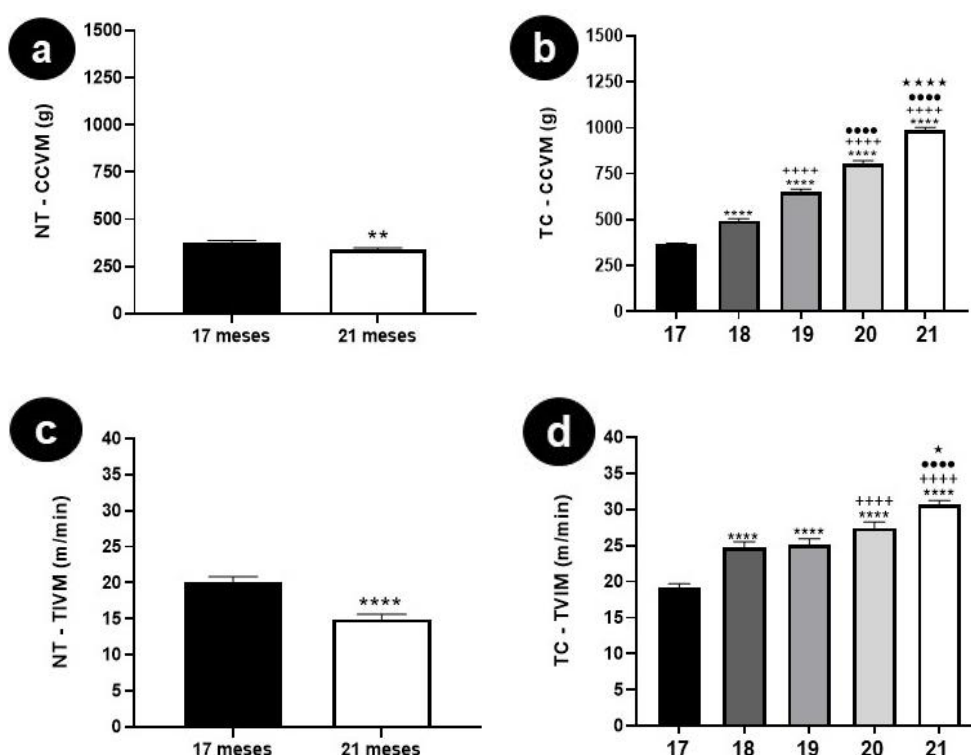


Figura 5 - Análise de desempenho das ratas NT e TC no período experimental. Análise CCVM (a) e TIVM (c) das ratas NT no início (17 meses) e ao final (21 meses) do estudo; análise do CCVM (b) e do TIVM (d) das ratas do grupo TC em cada mês do período experimental (17 – 21), com início aos 17 meses e o final, aos 21 meses. Os dados foram analisados pelo teste *t* não pareado (NT) e *one-way* ANOVA (CT); apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média, significância mínima de $p < 0,05$. NT = não treinadas; TC = treinamento combinado; CCVM = capacidade de carregamento voluntário máximo; TIVM = teste incremental de velocidade máxima; $p < 0,0031$: ** vs 17 meses (a); $p < 0,0001$: **** vs 17 meses (c); $p < 0,0001$: **** vs 1º; **** vs 2º; **** vs 3º; **** vs 4 (b); * $p = 0,0230$ vs 4º(d). Número de animais = 20/grupo.

4.3 Mensuração da área de secção transversal e peso do gastrocnêmio de ratas NT e TC

Com o intuito de avaliar se o aumento da força e a melhora na função muscular resultaram em alterações morfológicas e na composição muscular, o peso e a área de secção transversa (AST) do músculo gastrocnêmio foram avaliados. Aos 21 meses de idade (Fig. 6a; b), observamos que os animais que não treinaram apresentaram menor AST quando comparados ao grupo treinado (Fig. 6c). Em relação ao peso do músculo gastrocnêmio, a intervenção com TC resultou em aumento significativo do tecido muscular (Fig. 6c).

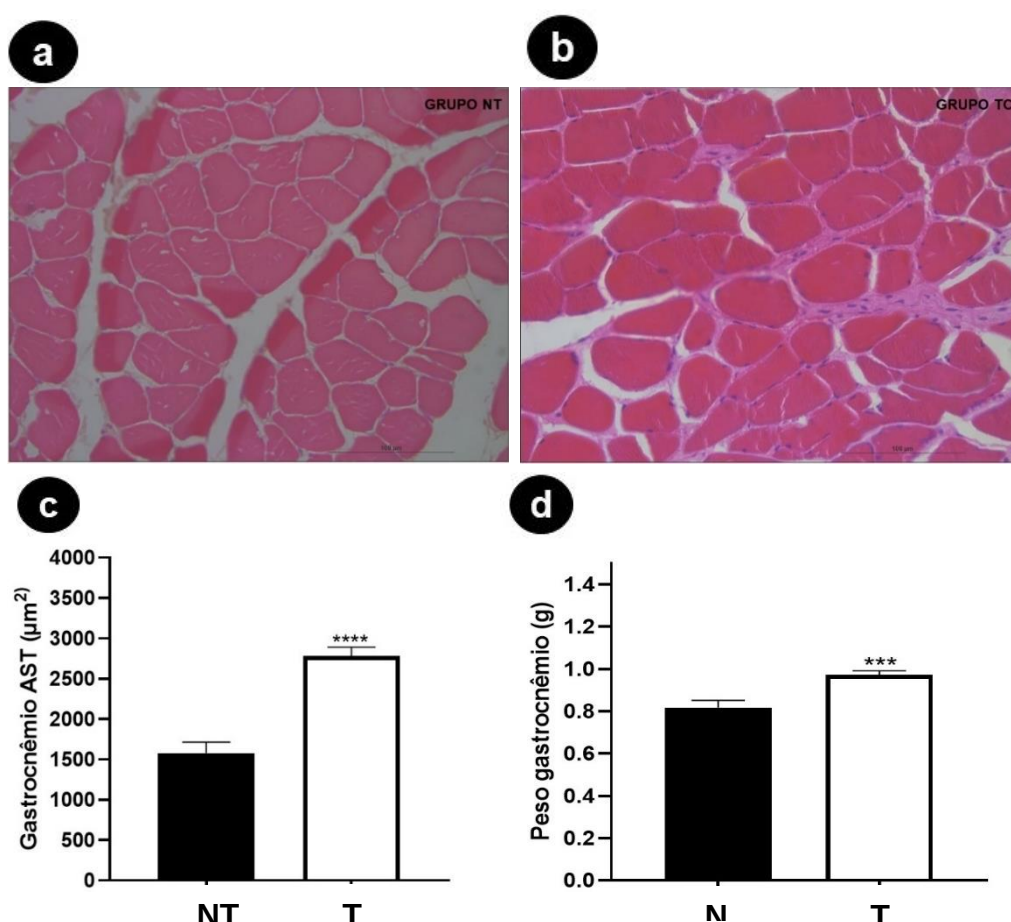


Figura 6 – Efeito do Treinamento Combinado na massa muscular. Mensuração da área de secção transversa do grupo NT (a) e TC (b), expresso em μm^2 (c) e do peso expresso em g (d) do músculo gastrocnêmio de ratas senescentes aos 21 meses do grupo não treinadas (NT) e do treinamento combinado (TC). Os dados foram analisados pelo teste *t* não pareado; estão apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média,

significância mínima de $p < 0,05$. NT= não treinadas; TC = treinamento combinado; AST = área de secção transversa. c = **** $p < 0,0001$; d = *** $p = 0,0008$. Número de animais por grupo = 6 - 11.

4.4 Imunomarcção com Irisina em fibras musculares após TC

Investigamos se o TC seria capaz de estimular maior imunomarcção de irisina através do músculo esquelético quando comparado com ratas não treinadas. Observamos número maior de células imunomarcadas com irisina no grupo TC (Fig. 7c) quando comparado ao grupo NT (Fig. 7b), porém através do Escore de Padrão de imunomarcção (Fig. 7a) constatou-se que a diferença de imunomarcção entre os grupos não foi o suficiente para resultado significativo.

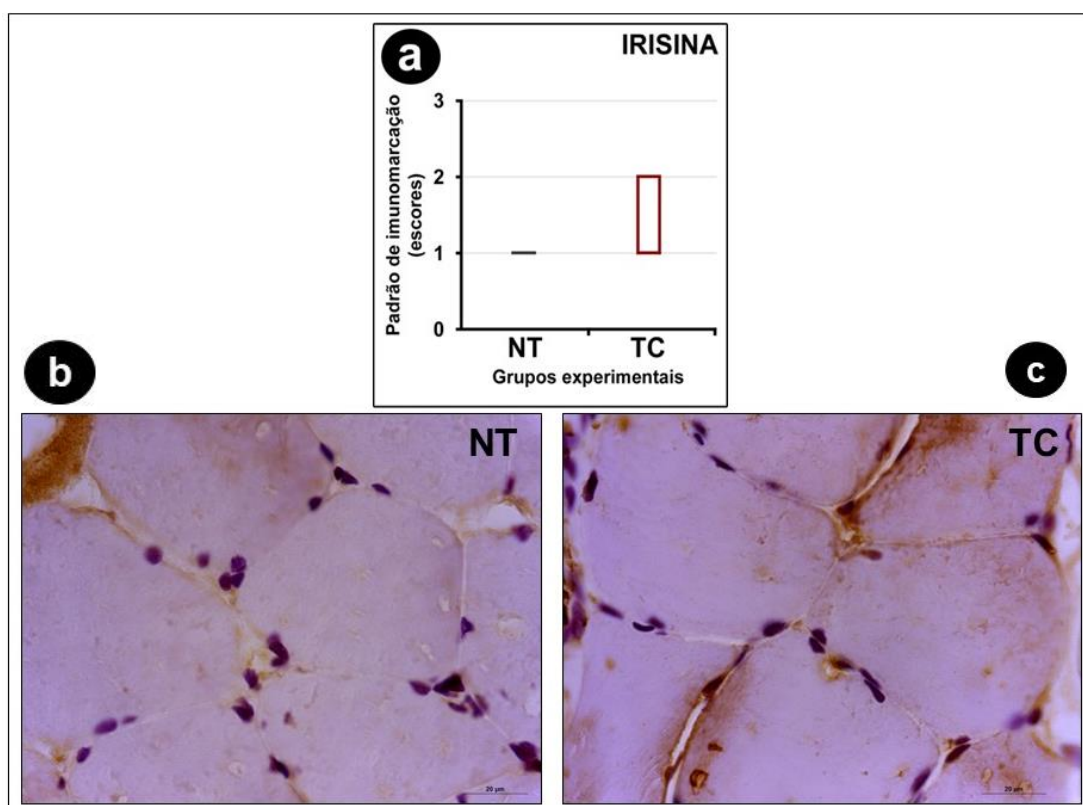


Figura 7 - Imunomarcção da irisina em fibras musculares de ratas senescentes aos 21 meses não treinadas (NT) e de ratas submetidas ao treinamento combinado (TC; 3x/semana/120 dias). Padrão de imunomarcção em escore (a) e células imunomarcadas com irisina no grupo NT (b) e no grupo TC (c).

4.5 Dano oxidativo proteico e lipídico após a realização de TC

O exercício combinado desencadeou diminuição de TBARs no plasma (Fig. 8a) e no músculo esquelético gastrocnêmio (Fig. 8b) das ratas submetidas ao treinamento físico quando comparado com as ratas NT. A análise da PC no tecido muscular não apresentou alteração estatisticamente significativa (Fig. 8c).

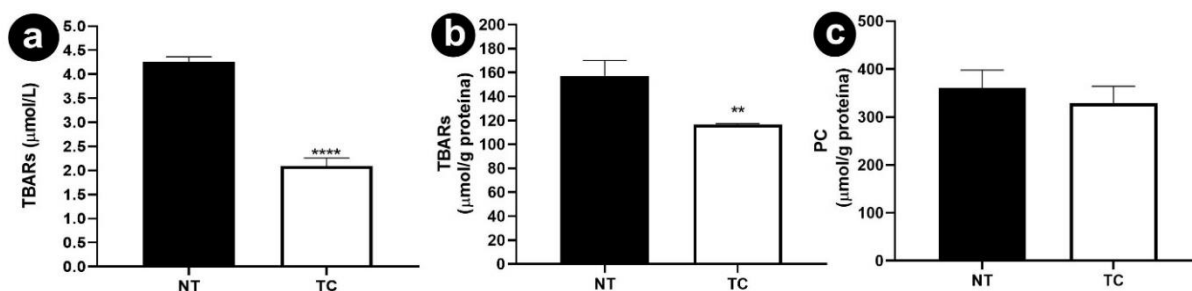


Figura 8 - Dano oxidativo proteico e lipídico. Concentração de TBARs no plasma (a) e no tecido muscular esquelético gastrocnêmio (b); concentração de PC no tecido muscular (c) de ratas senescentes aos 21 meses do grupo não treinadas (NT) e do treinamento combinado (TC). Os dados foram analisados pelo teste *t* não pareado e estão apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média, significância mínima de $p < 0,05$. TBARs = Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico; PC = proteína carbonilada; NT = não treinada; TC = treinamento combinado; a: **** = $p < 0,0001$; b: ** = $p < 0,0069$ Número de animais = 7 – 10/grupo.

4.6 Defesa antioxidante não-enzimática após a realização de TC

A TAC plasmática (Fig. 9a) e o AU (Fig. 9b) não apresentaram diferença significativa. Vários agentes de baixo peso molecular são capazes de eliminar EROs, como GSH, que demonstrou aumento no plasma de ratas senis após intervenção com TC (Fig. 9c). O gastrocnêmio das ratas submetidas ao TC demonstrou aumento significativo de TAC (Fig. 9d), porém não apresentou diferença de AU (Fig. 9e) e GSH (Fig. 9f).

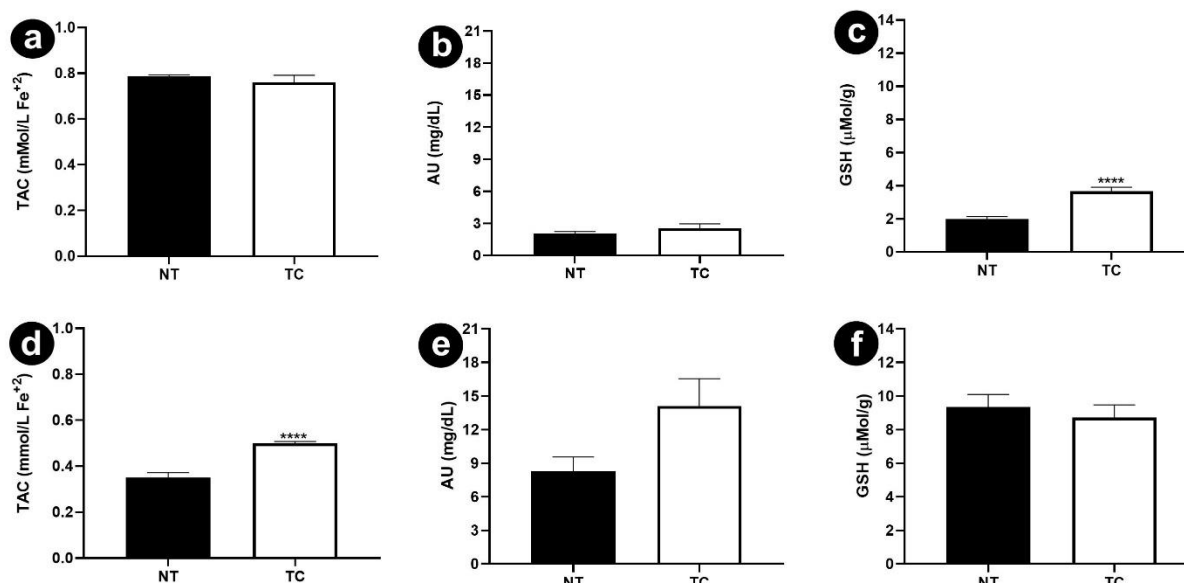


Figura 9 - Defesa antioxidante não-enzimática. Análise da defesa antioxidante não-enzimática no plasma (a, b, c) e no gastrocnêmio (d, e, f) de ratos com 21 meses que não realizaram treinamento (NT) e ratos que realizaram treinamento físico (TC – 120 dias/3x/semana). Os dados foram analisados pelo teste *t* não pareado e estão apresentados pela média ± erro padrão da média, significância mínima de $p < 0,05$. TAC = Capacidade Antioxidante Total; AU = ácido úrico; GSH = glutatona; NT = não treinadas; TC = treinamento combinado. c; d: **** = $p < 0,0001$. Número de animais = 7 – 10/grupo.

4.7 Defesa antioxidante enzimática após a realização de TC

As principais enzimas de defesa antioxidante são SOD, CAT e GPx. O antioxidante enzimático SOD que transforma os radicais superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), apresentou aumento significativo no plasma (Fig. 10a) e no músculo esquelético (Fig. 10d) dos animais senescentes submetidos ao TC. A CAT converte EROs em moléculas menos ativas, prevenindo a transformação dessas moléculas em formas mais deletérias e no grupo TC após a intervenção, esse antioxidante enzimático demonstrou aumento significativo no plasma (Fig. 10b), entretanto não apresentou resultado significativo no gastrocnêmio (Fig. 10e). A GPx catalisa a redução de H_2O_2 em água (H_2O) com o auxílio de GSH, isso torna a GPx importante antioxidante intracelular para proteger contra danos causados por EROs, porém não encontramos resultado significativo em nenhum tecido (Fig. 10c, f).

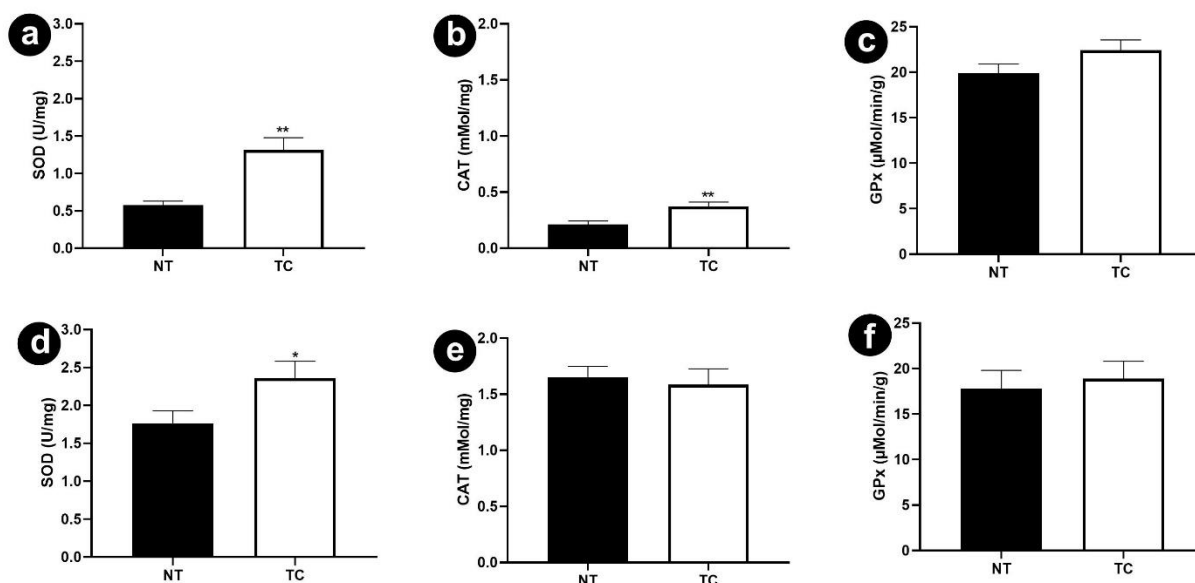


Figura 10 - Defesa antioxidante enzimática. Análise da defesa antioxidante enzimática no plasma (a, b, c) e no gastrocnêmio (d, e, f) de ratas com 21 meses que não realizaram treinamento (NT) e ratas que realizaram treinamento combinado (TC – 120 dias/3x/semana). Os dados foram analisados pelo teste *t* não pareado e estão apresentados pela média ± erro padrão da média, significância mínima de $p < 0,05$. SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GPx = glutathione peroxidase; NT = não treinadas; TC = treinamento combinado; a; b: ** = $p < 0,0012$; d: * = $p < 0,0498$. Número de animais = 7 - 10/grupo.

4.8 Avaliação funcional da marcha de roedores e indicativo do estado da função muscular esquelética

O teste funcional de deambulação demonstrou resultado significativo na largura (Fig. 11a) e no comprimento (Fig. 11b) da passada de roedores após 120 dias de treinamento. A análise da largura nas passadas dos animais ao final do período experimental (21 meses) mostrou aumento significativo no grupo TC comparado ao NT (Fig. 11a). As ratas do grupo NT apresentaram diminuição significativa do comprimento da passada após 120 dias. Em contrapartida, as ratas do grupo TC demonstraram aumento significativo do comprimento da passada após o período experimental. Ao analisarmos o comprimento de passada entre os grupos e ao final do período de intervenção (21 meses), as ratas TC apresentaram diferença significativa em relação as ratas NT.

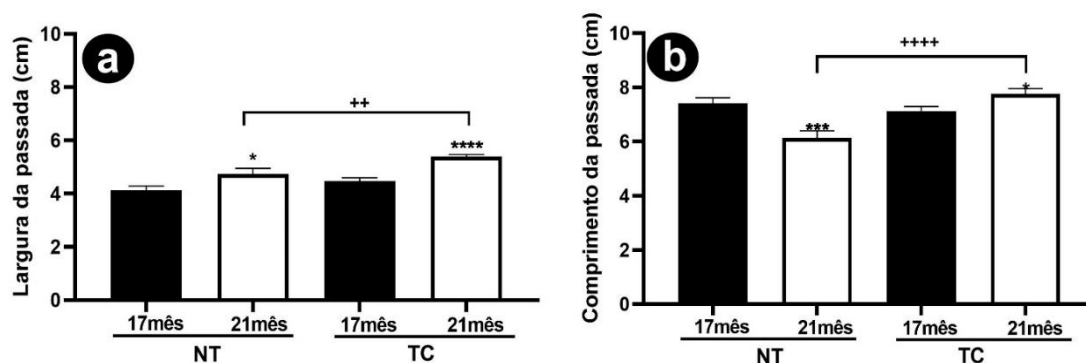


Figura 11 - Análise funcional de deambulação de ratas incluídas no período experimental. Teste para análise da largura da passada (a) e do comprimento da passada (b) das fêmeas de roedores senescentes aderentes ao exercício físico, no início (17 meses) e ao final do período experimental (21 meses), que não realizaram treinamento físico (NT) e submetidas ao treinamento combinado (TC) 3x/ semana no período de 120 dias. Os dados foram analisados pelo teste *t* pareado (17 meses vs 21 meses/NT; 17 meses vs 21 meses/TC) e teste *t* não pareado (21 meses/NT vs 21 meses/TC); resultados apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média, significância mínima de $p < 0,05$. NT = não treinadas; TC = treinamento combinado. a: * $p = 0,0372$; **** $p < 0,0001$ vs 17 meses; ** $p = 0,0081$ vs 21 meses/NT. b: *** $p = 0,0009$; * $p = 0,0188$ vs 17 meses; **** $p < 0,0001$ vs 21 meses/NT. Número de animais por grupo = 11.

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do TC no músculo gastrocnêmio, imunomarcção de irisina, no estado redox (sangue e gastrocnêmio) e o impacto na deambulação de ratas Wistar no período de periostropausa. Nossos resultados mostraram maior AST, sem alteração significativa na imunomarcção de irisina, melhor estado redox e no teste funcional após a realização do TC quando comparado com as ratas de mesma idade e que não realizaram o treinamento físico. Notavelmente, os animais que realizaram TC apresentaram melhor histomorfometria na região central do gastrocnêmio, menor dano oxidativo lipídico e maior atividade antioxidativa, e essa melhora se expressou com melhor qualidade de marcha, o que não ocorreu nos animais NT. Esse conjunto de resultados sugerem que estratégia, como o TC, visando proteger a massa muscular de ocorrências como a sarcopenia, frequente no período de envelhecimento, pode ser abordagem preventiva importante. Nesse sentido, os efeitos positivos do TC evidenciados durante a senescência são de grande importância e sugerem a necessidade da realização de ensaios controlados de longo prazo com humanos.

O exercício físico tem muitos efeitos em todos os tecidos e órgãos e quanto mais adequado ao indivíduo em relação ao tipo, intensidade e volume, maior é a resposta. Portanto, em condições adequadas a magnitude da resposta desencadeada pela prática do exercício físico, é maior. No entanto, a forma como o desempenho do exercício físico pode afetar a condição em cada período da vida é ambígua. Importante destacar que diferentes tipos de exercício afetam de maneiras diferentes a homeostase e consequentemente a resposta adaptativa (KIRK et al., 2020; MCLAUGHLIN & JACOBS, 2017). Portanto, atenção adicional é necessária ao prescrever exercícios para o indivíduo. A adaptação ao exercício físico abrange a integração de respostas mecânicas, endócrinas, metabólicas e inflamatórias, cada tecido específico. Também deve ser considerado a periodicidade do exercício físico, em agudo e crônico, considerando que a adaptação a longo prazo implica em mudanças nas funções celulares (KIRK et al., 2020; LOMBARDI et al., 2019).

É de conhecimento que o exercício físico regular melhora massa e força muscular aumentando síntese de proteínas, número de miofibrilas e AST da fibra (GOMES et al., 2017; ATHERTON & SMITH, 2012). Sendo assim, as análises de força, AST e peso muscular evidenciaram ganho de massa e força muscular após 4 meses de TC no período da peri menopausa, prevenindo assim quadro sarcopênico. Portanto, nossos resultados sugerem que fatores endógenos e exógenos atuaram juntos para regular a estrutura, função e o metabolismo muscular em prol do equilíbrio entre a síntese e degradação proteica. Além disso, estudos evidenciam que os estímulos anabólicos propiciam a miogênese, permitindo a proliferação e diferenciação de mioblastos em miócitos, originando as fibras musculares enquanto que a inatividade física resulta na perda de massa e função muscular aumentando o risco de sarcopenia (KIRK et al., 2019; 2020; LAURENT et al., 2019).

Estudo com a participação de homens e mulheres com idades entre 60 e 79 anos que realizaram TC demonstrou ganho de força de membros superiores e inferiores (AGNER et al., 2018). Shirai e colaboradores (2020), analisaram o peso do gastrocnêmio de camundongos com 7 - 8 semanas de vida, após serem submetidos ao TC durante três semanas e não encontraram diferença do peso muscular para o grupo controle sedentário. De acordo com Cadore (2013), explicação para tais resultados pode ser a ordem dos exercícios físicos realizados (resistido seguido de aeróbio) e a quantidade de sessões semanais. Deve-se levar em conta também, o sexo e a idade dos animais nos diferentes estudos.

O treinamento físico modula organelas das células musculares, como as mitocôndrias, impedindo a diminuição do conteúdo e a função mitocondrial durante o envelhecimento. Assim, as mitocôndrias complementam vários sinais celulares, como fornecimento de energia, geração de EROs e apoptose (GOMES et al., 2017; CARTER et al., 2015; KANG et al., 2013). Importante destacar que, em concentrações fisiológicas, as EROs desempenham funções importantes na sinalização redox e na sobrevivência celular (GOMES et al., 2017; BAUMMAN et al., 2016), porém concentrações elevadas de EROs acarretam alterações ou danos ao DNA, proteínas e lipídeos e até mesmo morte celular (GOMES et al., 2017). O exercício físico regular aumenta formação de EROs que podem induzir adaptações benéficas regulando os sistemas antioxidantes celulares e estimulando os sistemas de reparo do dano oxidativo (GOMES et al., 2017; RADÁK et al., 2005). Segundo Choi e colaboradores (2016), a produção aguda de EROs em indivíduos saudáveis é necessária para que o músculo se adapte ao exercício físico. E o exercício físico crônico está associado a concentrações diminuídas de marcadores de estresse oxidativo e aumento da capacidade antioxidante enzimática e não-enzimática (GOMES et al., 2017). Como observado no estudo com mulheres entre 45 e 55 anos, que analisou

biomarcadores de estresse oxidativo séricos após exercício físico agudo e constatou aumento da concentração de TBARs nos grupos TF e TA, imediatamente após o esforço e diminuição dessa concentração após a recuperação (CARDOSO, 2012).

Neste estudo, as ratas senis submetidas a TC por 120 dias, apresentaram significativa alteração na concentração de TBARs no músculo esquelético e no plasma desses animais, nos mostrando que o exercício físico foi capaz de diminuir marcador de dano oxidativo lipídico. Foi observado também aumento de TAC e SOD no gastrocnêmio e de GSH, SOD e CAT plasmático em resposta ao tipo de treinamento em ratas no período da periostropausa, caracterizando aumento da capacidade antioxidante enzimática e não-enzimática. Nossos resultados nos mostram que o exercício físico regular e crônico melhorou o estado redox das células do músculo esquelético, uma vez que o acúmulo de EROs no envelhecimento deste tecido leva à degradação, atrofia e disfunção (HEO et al., 2017). As alterações na atividade da SOD podem ser moduladas pela intensidade e duração do exercício físico e as concentrações de CAT são mais altas em fibras musculares altamente oxidativas e diminuídas em fibras com capacidade oxidativa baixa (POWERS & JACKSON, 2008). Camundongos machos de 2 a 3 meses de idade, submetidos a corrida em esteira durante 08 semanas, apresentaram diminuição nas concentrações de TBARs no músculo quadríceps comparado ao grupo não treinado (SILVA, 2009). Estudo com ratos machos de 8 semanas de vida que foram submetidos a treinamento aeróbio e divididos em dois grupos, treinamento contínuo de intensidade moderada e treinamento intervalado de alta intensidade, ambos na esteira durante 10 semanas, mostrou aumento da SOD no gastrocnêmio nos dois grupos comparado aos ratos sedentários, mas não apresentou resultado significativo para TAC (GROUSSARD, 2019). Ratos machos tiveram diminuição plasmática de GSH após intervenção com treinamento aeróbio em esteira durante 08 semanas (EMAMI, 2016). Estudos indicam que as fibras musculares esqueléticas se

adaptam a sessões regulares de TA de alta intensidade aumentando as concentrações de GSH (POWERS & JACKSON, 2008). Porém, essa diminuição de GSH pode ocorrer devido ao aumento da utilização de GSH como antioxidante na neutralização dos radicais livres e essa redução de GSH leva a produção de GSH oxidado (GSSG) diminuindo a proporção de GSH/GSSG em tecidos de ratos, sendo indicativo para estresse oxidativo. Outra explicação para diminuição de GSH plasmático é que o GSH é sintetizado em células do fígado e então distribuído através do plasma para outros tecidos, se a reserva de GSH no fígado é diminuída, conseqüentemente pode diminuir a concentração plasmática (EMAMI, 2016).

O gene FNDC5 é um dos genes-alvo do coativador 1α do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PGC- 1α), que por sua vez é coativador transcricional induzido no músculo esquelético pelo exercício físico (MAAK et al., 2021; BOSTROM et al., 2012), capaz de modular a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1), controlar o escurecimento do tecido adiposo e metabolismo oxidativo em muitos tipos de células, além de estimular angiogênese e mudança na distribuição de fibras (BOSTROM et al., 2012). Durante ou após o exercício físico, os miócitos secretam miocinas que regulam diversos processos metabólicos em vários tecidos e órgãos por meio de vias de sinalização endócrinas, parácrinas e autócrinas (KORTA et al., 2019; DI RAIMONDO et al., 2017; JOHNSON et al., 2014). Quando clivado, o FNDC5 produz irisina, cujos os efeitos biológicos anti-inflamatórios, antimetastáticos, melhor captação da glicose em células musculares, facilitar a proliferação de células endoteliais, reduzir pressão arterial e promover hipertrofia cardíaca, ocorrem principalmente através de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) (RABIEE et al., 2020). Investigação *in vitro* do efeito da irisina em miócitos constatou aumento do metabolismo oxidativo e proteínas de desacoplamento mitocondrial, assim como aumento de PGC- 1α , mRNA de GLUT4 e

concentrações de proteínas subsequentes (ABDI et al., 2020; VAUGHAN et al., 2014). Essas adaptações metabólicas sugerem alça de controle de retroalimentação positiva em que o aumento da irisina circulante eleve as concentrações de PGC-1 α , resultando em aumento da secreção de irisina (ABDI et al., 2020; SHARMA et al., 2014). Estudo realizado em 2012 demonstrou aumento de 65% na concentração de irisina no sangue em camundongos submetidos a corrida por três semanas. Também foi observado aumento na irisina circulante de indivíduos saudáveis após dez semanas de treinamento físico (KORTA et al., 2019; BOSTROM et al., 2012). Além disso, o tipo de exercício físico (aeróbio ou resistido), o tempo de exercício físico (agudo ou crônico), a intensidade do exercício físico e o condicionamento físico são fatores que podem determinar a concentração de irisina circulante (RASHTI et al., 2019; TSUCHIYA et al., 2018; QIU et al., 2018; ARCHUNDIA-HERRERA et al., 2017). Outro trabalho envolvendo vários protocolos de treinamento (TA, TR, TC e treino intervalado de alta intensidade – HIIT) concluiu que o grupo de mulheres com idades entre 45-65 anos que praticaram TR e TA em sessões diferentes com HIIT obteve melhora relativa na irisina sanguínea, os autores atribuem esse resultado ao tipo de treinamento ter maior capacidade oxidativa e funções mitocondriais, quando comparado ao outro grupo de praticou TR e TA na mesma sessão (RASHTI et al., 2019). Dois estudos demonstraram que a massa muscular é bom preditor de irisina circulante em humanos (STENGEL et al., 2013; HUH et al., 2012). Kurdiova e colaboradores (2014) observaram que a irisina circulante estava positivamente associada ao volume muscular da panturrilha, força muscular e contratilidade em indivíduos sedentários com sobrepeso e obesidade. Desta forma, alguns estudos estão sugerindo a irisina circulante como biomarcador de sarcopenia (PARK et al. 2019; CHANG et al., 2017) em que correlacionam a massa, força e função muscular e as concentrações menores dessa miocina, classificando os estados como pré-sarcopênico e sarcopênico (HUH et al., 2012).

Este estudo mostrou alteração na concentração de irisina no músculo esquelético de ratas senis após intervenção com TC, embora não significativa em relação as ratas que não realizaram exercício físico. O conjunto de resultados mostra que a realização do TC foi benéfica na manutenção da saúde muscular e na condição de deambulação das ratas no período da senescência. Alterações nos padrões da marcha são evidenciados em humanos e também em ratos (DORNER et al., 1996), a análise da marcha está associada ao risco de quedas em humanos (CADORE et al., 2013). O declínio precoce da mobilidade, avaliado como lentidão da marcha e o comprimento da passada, está relacionado com declínio cognitivo (MONTERO-ODASSO et al., 2012). O exercício físico tem influência positiva na função neuromuscular alterando as características da marcha (DORNER et al., 1996). O TC em ratas senis demonstrou efeitos positivos na marcha desses animais, podendo ser explicado pela qualidade muscular melhorada após intervenção. Chen e colaboradores (2018), afirmaram que o exercício físico regular, principalmente o TA, é capaz de melhorar déficits da marcha.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos com o presente estudo, verificamos que após 120 de TC, as ratas que estavam passando pelo período da periostropausa, período este que se caracteriza por flutuações hormonais, deixando o organismo mais susceptível a comorbidades, apresentaram melhora na defesa antioxidante e diminuição de dano oxidativo, além de hipertrofia muscular, confirmado pelo peso do gastrocnêmio e AST, ganho de força, melhora na marcha e aumento da capacidade aeróbia dos animais submetidos ao TC quando comparados aos animais sedentários, sugerindo que o TC foi capaz de prevenir o aparecimento de sarcopenia. Observamos também ligeiro aumento de células imumarcadas com irisina no grupo de animais submetidos ao exercício físico,

mostrando que o TC contribuiu para controlar o comprometimento do tecido muscular no período da senescência feminina. Os resultados obtidos nesse estudo evidenciam a necessidade de análises biológicas mais específicas, como mTOR; PGC-1 α ; BDNF, bem como a intensidade e duração de cada sessão e a dinâmica do treinamento físico.

7. REFERÊNCIAS

- ABDI, A.; MEHRABANI, J.; NORDVALL, M.; WONG, A.; FALLAH, A.; BAGHERI, R. Effects of concurrent training on irisin and fibronectin type-III domain containing 5 (FNDC5) expression in visceral adipose tissue in type-2 diabetic rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**. 2020. DOI: 10.1080/13813455.2020.1716018.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGNER, V.F.C.; GARCIA, M.C.; TAFFAREL, A.A.; MOURÃO, C.B.; SILVA, I.P.; SILVA, S.P.; PECCIN, M.S.; LOMBARDI JR, I. Effects of concurrent training on muscle strength in older adults with metabolic syndrome: A randomized controlled clinical trial. **Archives of Gerontology and Geriatrics**. v. 75, p. 158-164, 2018.
- AKERBOOM, T.P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods in Enzymology**. v. 77, p. 373-382, 1981.
- ALCAZAR, J.; LOSA-REYNA, J.; RODRIGUEZ-LOPEZ, C. Effects of concurrent exercise training on muscle dysfunction and systemic oxidative stress in older people with COPD. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**. v. 29, n. 10, p. 1591-1603, 2019.
- ALTENHÖFER, S.; RADERMACHER, K.A.; KLEIKERS, P.M.W.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H.H.H.W. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 23, n. 5, p. 406-427, 2015.
- ANTUNES, S.; MARCELINO, O.; AGUIAR, T. Fisiopatologia da menopausa. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**. v. 19, n. 4, p. 353-357, 2003.
- ARCHUNDIA-HERRERA, C.; MACIAS-CERVANTES, M.; RUIZ-MUÑOZ, B.; VARGAS-ORTIZ, K.; KORNHAUSER, C.; PEREZ-VAZQUEZ, V. Muscle irisin response to aerobic vs HIIT in overweight female adolescents. **Diabetology & Metabolic Syndrome**. 2017. DOI: 10.1186/s13098-017-0302-5.
- ASGHARI, M.; MIRGHAFORVAND, M.; MOHAMMADALIZADEH-CHARANDABI, S.; MALAKOUTI, J.; NEDJAT, S. Effect of Aerobic Exercise and Nutrition Education on Quality of Life and Early Menopause Symptoms: A Randomized Controlled Trial. **Women and Health**. V. 57, n. 2, p. 173-188, 2017.

ATHERTON, P.J.; SMITH, K. Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise. **The Journal of Physiology**. v. 590, p. 1049-1057, 2012.

AYATI, S.; KADKHODAEIAN, S.; FATEMEH, V.R.; SHAKERI, M.T. Evaluation Of Background And Environmental Factors On Menopausal Related Symptom. **Journal of Babol University of Medical Sciences**. v. 10, n. 1, p. 40-45, 2008.

BAUMMAN, C.W.; KWAK, D.; LIU, H.M.; THOMPSON, L.V. Age-induced oxidative stress: how does it influence skeletal muscle quantity and quality? **Journal of Applied Physiology**. v. 121, n. 5, p. 1047-1052, 2016.

BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**. v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BILSKI, J.; PIERZCHALSKI, P.; SZCZEPANIK, M.; BONIOR, J.; ZOLADZ, J.A. Multifactorial Mechanism of Sarcopenia and Sarcopenic Obesity. Role of Physical Exercise, Microbiota and Myokines. **Cells**. v. 11, n. 1, 2022. DOI: 10.3390/cells11010160.

BOSTRÖM, P.; WU, J.; JEDRYCHOWSKI, M.P.; KORDE, A.; YE, L.; LO, J.C.; RASBACH, K.A.; BOSTRÖM, E.A.; CHOI, J.H.; LONG, J.Z.; KAJIMURA, S.; ZINGARETTI, M.C.; VIND, B.F.; TU, H.; CINTI, S.; HØJLUND, K.; GYGI, S.P.; SPIEGELMAN, B.M. A PGC1 α -dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis. **Nature**. v. 481, n. 7382, p. 463-468, 2012.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. v.52, p. 302-310, 1978.

BRINTON, R.D.; YAO, J.; YIN, F.; MACK, W.J.; CADENAS, E. Perimenopause as a neurological transition state. **Nature Reviews. Endocrinology**. v. 11, n. 7, p. 393-405, 2015.

CADORE, E.L.; IZQUIERDO, M.; PINTO, S.S.; ALBERTON, C.L.; PINTO, R.S.; BARONI, B.M.; VAZ, M.A.; LANFERDINI, F.J.; RADAELLI, R.; GONZÁLEZ-IZAL, M.; BOTTARO, M.; KRUEL, L.F.M. Neuromuscular adaptations to concurrent training in the elderly: effects of intrasession exercise sequence. **Age**. v. 35, n. 3, p. 891-903, 2013.

CARDOSO, A.M.; BAGATINI, M.D.; ROTH, M.A.; MARTINS, C.C.; REZER, J.F.P.; MELLO, F.F.; LOPES, L.F.D.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Acute effects of resistance exercise and intermittent intense aerobic exercise on blood cell count and oxidative stress in trained middle-aged women. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 45, n. 12, p. 1172-1182, 2012.

CARTER, H.N.; CHEN, C.C.W.; HOOD, D.A. Mitochondria, Muscle Health, and Exercise with Advancing Age. **Physiology**. v. 30, n. 3, p. 208-223, 2015.

CASTOLDI, R.C.; CAMARGO, R.C.T.; MAGALHÃES, A.J.B.; OZAKI, G.A.T.; KODAMA, F.Y.; OIKAWA, S.M.; PAPOTI, M.; CAMARGO FILHO, J.C.S. Concurrent training effect on muscle fibers in Wistar rats. **Motriz: Revista de Educação Física**. V. 19, n. 4, p. 717-723, 2013.

CASTOLDI, R.C.; ALEIXO, P.H.; PEREIRA, A.C.J.; FERREIRA, S.R.; GARCIA, T.A.; OZAKI, G.A.T.; KOIKE, T.E.; PINTO JR., D.A.C.; SERAPHIM, P.M.; BELANGERO, W.D.; CAMARGO FILHO, J.C.S. Effects of Concurrent Training on Muscle Fibers of Wistar Rats Submitted to Standard and Hypercaloric Diets. **International Journal of Morphology**. V. 35, n. 2, p. 637-643, 2017.

CHANG, J.S.; KIM, T.H.; NGUYEN, T.T.; PARK, K.S.; KIM, N.; KONG, I.D. Circulating irisin levels as a predictive biomarker for sarcopenia: A cross-sectional community-based study. **Geriatrics & Gerontology International**. v. 17, n. 11, p. 2266-2273, 2017.

CHEN, Y.H.; KUO, T.T.; KAO, J.H.; HUANG, E.Y.K.; HSIEH, T.H.; CHOU, Y.C.; HOFFER, B.J. Exercise Ameliorates Motor Deficits and Improves Dopaminergic Functions in the Rat Hemi-Parkinson's Model. **Scientific Reports**. v. 8, n. 3973, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22462-y>.

CHERBUIN, N.; WALSH, E.; BAUNE, B.T.; ANSTEY, K.J. Oxidative stress, inflammation and risk of neurodegeneration in a population sample. **European Journal of Neurology**. v. 26, n. 11, p. 1347-1354, 2019.

CHOI, M.H.; OW, J.R.; YANG, N.D.; TANEJA, R. Oxidative stress-mediated skeletal muscle degeneration: molecules, mechanisms, and therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016. DOI: 10.1155/2016/6842568.

CRUZ-JENTOFT, A.J.; BAHAT, G.; BAUER, J.; BOIRIE, Y.; BRUYÈRE, O.; CEDERHOLM, T.; COOPER, C.; LANDI, F.; ROLLAND, Y.; SAYER, A.A.; SCHNEIDER, S.M.; SIEBER, C.C.; TOPINKOVA, E.; VANDEWOUDE, M.; VISSER, M.; ZAMBONI, M. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. **Age and Ageing**. v. 48, n. 1, p. 16-31, 2019.

DANI, C.; DIAS, K.M.; TREVIZOL, L.; BASSÔA, L.; FRAGA, I.; PROENÇA, I.C.T.; POCHMANN, D.; ELSNER, V.R. The impact of red grape juice (*Vitis labrusca*) consumption associated with physical training on oxidative stress, inflammatory and epigenetic modulation in healthy elderly women. **Physiology & Behavior**. 2020. DOI: 10.1016/j.physbeh.2020.113215.

D'AVILA, J.C.; SIQUEIRA, L.D.; MAZERAUD, A.; AZEVEDO E.P.; FOGUEL, D.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; SHARSHAR, T.; CHRÉTIEN, F.; BOZZA, F.A. Age-related cognitive impairment is associated with long-term neuroinflammation and oxidative stress in a mouse model of episodic systemic inflammation. **Journal of Neuroinflammation**. v. 15, n. 1, 2018. DOI: 10.1186/s12974-018-1059-y.

DELAMATER, L.; SANTORO, N. Management of the Perimenopause. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. v. 61, n. 3, p. 419-432, 2018.

DI RAIMONDO, D.; MICELI, G.; MUSIARI, G.; TUTTOLOMONDO, A.; PINTO, A. New insights about the putative role of myokines in the context of cardiac rehabilitation and secondary cardiovascular prevention. **Annals of Translational Medicine**. v. 5, n. 15, 2017. doi: 10.21037/atm.2017.07.30.

DISHMAN, R.K.; BERTHOUD, H.R.; BOOTH, F.W.; COTMAN, C.W.; EDGERTON, V.R.; FLESHNER, M.R.; GANDEVIA, S.C.; GOMEZ-PINILLA, F.; GREENWOOD, B.N.; HILLMAN, C.H.; KRAMER, A.F.; LEVIN, B.E.; MORAN, T.H.; RUSSO-NEUSTADT, A.A.; SALAMONE, J.D.; VAN HOOMISSEN, J.D.; WADE, C.E.; YORK, D.A.; ZIGMOND, M.J. Neurobiology of exercise. **Obesity**. v. 14, n. 3, p. 345-356, 2006.

DORNER, H.; OTTE, P.; PLATT, D. Training influence on age-dependent changes in the gait of rats. **Gerontology**. v. 42, p. 7-13, 1996.

DUDA, K.; MAJERCZAK, J.; NIECKARZ, Z.; HEYMSFIELD, S.B.; ZOLADZ, J.A. Chapter 1 - Human Body Composition and Muscle Mass. **Muscle and Exercise Physiology**. p. 3-26, 2019. DOI: 10.1016/b978-0-12-814593-7.00001-3.

ELAVSKY, S.; MCAULEY, E. Physical activity and mental health outcomes during menopause: a randomized controlled trial. **Annals of Behavioral Medicine: A Publication of the Society of Behavioral Medicine**. v. 33, n. 2, p. 132-142, 2007.

EMAMI, S.R.; JAFARI, M.; HAGHSHENAS, R.; RAVASI, A. Impact of eight weeks endurance training on biochemical parameters and obesity-induced oxidative stress in high fat diet-fed rats. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**. v. 20, n. 1, p. 29-35, 2016.

ERVOLINO, E.; STATKIEVICZ, C.; TORO, L.F.; MELLO-NETO, J.M., CAVAZANA, T.P.; ISSA, J.P.M.; DORNELLES, R.C.M.; ALMEIDA, J.M.; NAGATA, M.J.H.; OKAMOTO, R.; CASATTI, C.A.; GARCIA, V.G.; THEODORO, L.H. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. **Bone**. v. 120, p. 101-113, 2019.

FARSHBAF, M.J.; ALVIÑA, K. Multiple Roles in Neuroprotection for the Exercise Derived Myokine Irisin. **Frontiers in Aging Neuroscience**. 2021. DOI: 10.3389/fnagi.2021.649929.

FATOUROS, I.G.; JAMURTAS, A.Z.; VILLIOTOU, V.; POULIOPOULOU, S.; FOTINAKIS, P.; TAXILDARIS, K.; DELICONSTANTINOS, G. Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 36, n. 12, p. 2065-2072, 2004.

FERNANDES, F.; Stringhetta-Garcia, C.T.; PERES-UENO, M.J.; FERNANDES, F.; NICOLA, A.C.; CASTOLDI, R.C.; OZAKI, G.; LOUZADA, M.J.Q.; CHAVES-NETO, A.H.; ERVOLINO, E.; DORNELLES, R.C.M. Oxytocin and bone quality in the femoral neck of rats

in periostropause. **Scientific Reports**. v. 10, n. 7937, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64683-0>.

FERREIRA, L.B.; NICOLA, A.C.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; DORNELLES, R.C.M. Activity of neurons in the preoptic area and 43 their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. **Experimental Gerontology**. v. 72, p. 157-161, 2015.

FRANZKE, B.; HALPER, B.; HOFMANN, M.; OESEN, S.; JANDRASITS, W.; BAIERL, A.; TOSEVSKA, A.; STRASSER, E.M.; WESSNER, B.; WAGNER, K.A. The impact of six months strength training, nutritional supplementation or cognitive training on DNA damage in institutionalised elderly. **Mutagenesis**. v. 30, n. 1, p. 147-153, 2014.

GOMES, M.J.; MARTINEZ, P.F.; PAGAN, L.U.; DAMATTO, R.L.; CEZAR, M.D.M.; LIMA, A.R.R.; OKOSHI, K.; OKOSHI, M.P. Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. **Oncotarget**. v. 8, n. 12, p. 20428-20440, 2017.

GONZALEZ-FREIRE, M.; DE CABO, R.; STUDENSKI, A.S.; FERRUCCI, L. The neuromuscular junction: aging at the crossroad between nerves and muscle. **Frontiers in Aging Neuroscience**. 2014. DOI: 10.3389/fnagi.2014.00208.

GRECO, E.A.; PIETSCHMANN, P.; MIGLIACCIO, S. Osteoporosis and Sarcopenia Increase Frailty Syndrome in the Elderly. **Frontiers in Endocrinology**. 2019. DOI: 10.3389/fendo.2019.00255.

GROUSSARD, C.; MAILLARD, F.; VAZEILLE, E.; BARNICH, N.; SIRVENT, P.; OTERO, Y.F.; COMBARET, L.; MADEUF, E.; SOURDRILLE, A.; DELCROS, G.; ETIENNE, M.; TEIXEIRA, A.; SAUVANET, P.; PIALOUX, V.; BOISSEAU, N. Tissue-Specific Oxidative Stress Modulation by Exercise: A Comparison between MICT and HIIT in an Obese Rat Model. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2019. DOI: 10.1155/2019/1965364.

HAAK, J.L.; BUETTNER, G.R.; SPITZ, D.R.; KREGEL, K.C. Aging augments mitochondrial susceptibility to heat stress. **American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and Comparative Physiology**. v. 296, n. 3, p. R812-R820, 2009.

HAO, S.; TAN, S.; LI, J.; LI, W.; LI, J.; CAI, X.; HONG, Z. Dietary and Exercise Interventions for Perimenopausal Women: A Health Status Impact Study. **Frontiers in Nutrition**. v. 8, 2022. DOI: 10.3389/fnut.2021.752500.

HARLOW, S.D.; GASS, M.; HALL, J. E.; LOBO, R.; MAKI, P.; REBAR, R. W.; SHERMAN, S.; SLUSS, P.M.; VILLIERS, T.J. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **Menopause**. v. 19, n. 4, p. 387-395, 2012.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**. v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956.

HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**. v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HAWLEY, J.A. Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**. v. 34, n. 3, p. 355-361, 2009.

HENRIQUE, J.S.; FRANÇA, E.F.; CARDOSO, F.S.; SERRA, F.T.; ALMEIDA, A.A.; FERNANDES, J.; ARIDA, R.M.; SILVA, S.G. Cortical and hippocampal expression of inflammatory and intracellular signaling proteins in aged rats submitted to aerobic and resistance physical training. **Experimental Gerontology**. v. 110, p. 284-290, 2018.

HEO, J.W.; NO, M.H.; MIN, D.H.; KANG, J.H.; KWAK, H.B. Aging-induced Sarcopenia and Exercise. **The Asian Journal of Kinesiology**. v. 19, n. 2, p. 43-59, 2017.

HORNBEGGER, 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.

HUH, J.Y.; PANAGIOTOU, G.; MOUGIOS, V.; BRINKOETTER, M.; VAMVINI, M.T.; SCHNEIDER, B.E.; MANTZOROS, C.S. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. **Metabolism: Clinical and Experimental**. v. 61, n. 12, p. 1725-1738, 2012.

IKEDA, K.; HORIE-INOUE, K.; INOUE, S. Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 2019. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105375.

JOHNSON, R.W.; WHITE, J.D.; WALKER, E.C.; MARTIN, T.J.; SIMS, N.A. Myokines (muscle-derived cytokines and chemokines) including ciliary neurotrophic factor (CNTF) inhibit osteoblast differentiation. **Bone**. v. 64, p. 47-56, 2014. doi: 10.1016/j.bone.2014.03.053.

JUPPI, H.K.; SIPILÄ, S.; CRONIN, N.J.; KARVINEN, S.; KARPPINEN, J.E.; TAMMELIN, T.H.; AUKEE, P.; KOVANEN, V.; KUJALA, U.M.; LAAKKONEN, E.K. Role of Menopausal Transition and Physical Activity in Loss of Lean and Muscle Mass: A Follow-Up Study in Middle-Aged Finnish Women. **Journal of Clinical Medicine**. v. 9, n. 5, 2020. DOI: 10.3390/jcm9051588.

KANG, C.; CHUNG, E.; DIFEE, G.; JI, L.L. Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle: Role of PGC-1 α . **Experimental Gerontology**. v. 48, n. 11, p. 1343-1350, 2013.

KENNEL, P.F.; FONTENEAU, P.; MARTIN, E.; SCHMIDT, J.M.; AZZOUZ, M.; BORG, J.; GUENET, J.L.; SCHMALBRUCH, H.; WARTER, J.M.; POINDRON, P. Electromyographical

and motor performance studies in the pmn mouse model of neurodegenerative disease. **Neurobiology of Disease**. v. 3, n. 2, p. 137-147, 1996.

KIRK, B.; SAEDI, A.A.; DUQUE, G. Osteosarcopenia: A case of geroscience. **Aging Medicine**. v. 2, n. 3, p. 147-156, 2019.

KIRK, B.; FEEHAN, J.; LOMBARDI, G.; DUQUE, G. Muscle, Bone, and Fat Crosstalk: the Biological Role of Myokines, Osteokines, and Adipokines. **Current Osteoporosis Reports**. v. 18, n. 4, p. 388-400, 2020.

KORTA, P.; POCHEC, E.; MAZUR-BIAŁY, A. Irisin as a Multifunctional Protein: Implications for Health and Certain Diseases. **Medicina**. v. 55, n. 8, 2019. DOI: 10.3390/medicina55080485.

KURDIOVA T.; BALAZ, M.; VICIAN, M.; MADEROVA, D.; VLCEK, M.; VALKOVIC, L.; SRBECKY, M.; IMRICH, R.; KYSELOVICOVA, O.; BELAN, V.; JELOK, I.; WOLFRUM, C.; KLIMES, I.; KRSSAK, M.; ZEMKOVA, E.; GASPERIKOVA, D.; UKROPEC, J.; UKROPCOVA, B. Effects of obesity, diabetes and exercise on Fndc5 gene expression and irisin release in human skeletal muscle and adipose tissue: in vivo and in vitro studies. **The Journal of Physiology**. v. 592, n. 5, p. 1091-1107, 2014.

KUSTER, O.C.; LAPTINSKAYA, D.; FISSLER, P.; SCHNACK, C.; ZÜGEL, M.; NOLD, V.; THURM, F.; PLEINER, S.; KARABATSIKIS, A.; VON EINEM, B.; WEYDT, P.; LIESENER, A.; BORTA, A.; WOLL, A.; HENGERER, B.; KOLASSA, I.T.; VON ARNIM, C.A.F. Novel Blood-Based Biomarkers of Cognition, Stress, and Physical or Cognitive Training in Older Adults at Risk of Dementia: Preliminary Evidence for a Role of BDNF, Irisin, and the Kynurenine Pathway. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 59, n. 3, p. 1097-1111, 2017.

LAFOREST, S.; ST-PIERRE, D.M.M.; CYR, J.; GAYTON, D. Effects of age and regular exercise on muscle strength and endurance. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**. v. 60, n.2, p. 104-111, 1990.

LAURENS, C.; BERGOUIGNAN, A.; MORO, C. Exercise-Released Myokines in the Control of Energy Metabolism. **Frontiers in Physiology**. 2020. DOI: 10.3389/fphys.2020.00091.

LAURENT, M.R.; DEDEYNE, L.; DUPONT, J.; MELLAERTS, B.; DEJAEGER, M.; GIELEN, E. Age-related bone loss and sarcopenia in men. **Maturitas**. v. 122, p. 51-56, 2019. DOI: 10.1016/j.maturitas.2019.01.006.

LI, X.; DUAN, H.; LIU, Q.; UMAR, M.; LUO, W.; YANG, X.; ZHU, J.; LI, M. Construction of a *Pichia pastoris* strain efficiently secreting irisin and assessment of its bioactivity in HepG2 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 124, p. 60-70, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.092.

LOMBARDI, G.; ZIEMANN, E.; BANFI, G. Physical Activity and Bone Health: What Is the Role of Immune System? A Narrative Review of the Third Way. **Frontiers in Endocrinology**. 2019. DOI: 10.3389/fendo.2019.00060.

LONG, J.A.; EVANS, H.M. The oestrous cycle in the rats and its associated phenomena. **Memoirs of the University of California**. v. 6, 1922.

LOURENÇO, M.V.; FROZZA, R.L.; FREITAS, G.B.; ZHANG, H.; KINCHESKI, G.C.; RIBEIRO, F.C.; GONÇALVES, R.A.; CLARKE, J.R.; BECKMAN, D.; STANISZEWSKI, A.; BERMAN, H.; GUERRA, L.A.; FORNY-GERMANO, L.; MEIER, S.; WILCOCK, D.M.; SOUZA, J.M.; ALVES-LEON, S.; PRADO, V.F.; PRADO, M.A.M.; ABISAMBRA, J.F.; TOVAR-MOLL, F.; MATTOS, P.; ARANCIO, O.; FERREIRA, S.T.; FELICE, F.G. Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. **Nature Medicine**. v. 25, n. 1, p. 165-175, 2019.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
 MAAK, S.; NORHEIM, F.; DREVON, C.A.; ERICKSON, H.P. Progress and Challenges in the Biology of FNDC5 and Irisin. **Endocrine Reviews**. v.42, n. 4, p. 436-456, 2021.

MANCINELLI, R.; CHECCAGLINI, F.; COSCIA, F.; GIGLIOTTI, P.; FULLE, S.; FANÒ-ILLIC, G. Biological Aspects of Selected Myokines in Skeletal Muscle: Focus on Aging. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 16, 2021. DOI: 10.3390/ijms22168520.

MANSIKKAMÄKI, K.; RAITANEN, J.; NYGARD, C.H.; TOMÁS, E.; RUTANEN, R.; LUOTO, R. Long-term effect of physical activity on health-related quality of life among menopausal women: a 4-year follow-up study to a randomised controlled trial. **BMJ Open**. v. 5, n. 9, 2015. DOI: 10.1136/bmjopen-2015-008232.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**. v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MCLAUGHLIN, M.; JACOBS, I. Exercise Is Medicine, But Does It Interfere With Medicine? **Exercise and Sports Sciences Reviews**. v. 45, n. 3, p. 127-135, 2017.

MESQUITA, C.S.; OLIVEIRA, R.; BENTO, F.; GERALDO, D.; RODRIGUES, J.V.; MARCOS, J.C. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Analytical Biochemistry**. v. 458, p. 69-71, 2014.

MIRANOWICZ-DZIERZAWSKA, K. A comparative study of using free radical generators in the testing of chosen oxidative stress parameters in the different types of cells. **Toxicology and Industrial Health**. v. 34, n. 4, p. 237-252, 2018.

MONTERO-ODASSO, M.; VERGHESE, J.; BEAUCHET, O.; HAUSDORFF, J.M. Gait and Cognition: A Complementary Approach to Understanding Brain Function and the Risk of Falling. **Journal of the American Geriatrics Society**. v. 60, n. 11, p. 2127-2136, 2012.

MORAIS, S.R.L. **Influência da terapêutica hormonal estrogênica e do treinamento de força sobre o tecido muscular esquelético de ratas senis**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” (UNESP) - Faculdade De Odontologia De Araçatuba (FOA), Araçatuba, 2016.

MURACH, K.A.; BAGLEY, J.R. Skeletal Muscle Hypertrophy with Concurrent Exercise Training: Contrary Evidence for an Interference Effect. **Sports Medicine**. v. 46, n. 8, p. 1029-1039, 2016.

NICOLA, A.C.; LEITE, C.M.; NISHIKAVA, M.M.B.; CASTRO, J.C.B.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; DORNELLES, R.C.M. 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. DOI: 10.1016/j.exger.2016.04.015.

NOKIA, M.S.; LENSU, S.; AHTIAINEN, J.P.; JOHANSSON, P.P.; KOCH, L.G.; BRITTON, S.L.; KAINULAINEN, H. Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. **The Journal of Physiology**. v. 594, n. 7, p. 1855–1873, 2016.

PARK, H.S.; KIM, H.C.; ZHANG, D.; YEOM, H.; LIM, S.K. The novel myokine irisin: clinical implications and potential role as a biomarker for sarcopenia in postmenopausal women. **Endocrine**. v. 64, n. 2, p. 341-348, 2019.

PASCUAL-FERNÁNDEZ, J.; FERNÁNDEZ-MONTERO, A.; CÓRDOVA-MARTÍNEZ, A.; PASTOR, D.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.; ROCHE, E. Sarcopenia: Molecular Pathways and Potential Targets for Intervention. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 21, n. 22, 2020. DOI: 10.3390/ijms21228844.

PERES-UENO, M.J.; FERNANDES, F.; BRITO, V.G.B.; NICOLA, A.C.; STRINGHETTA-GARCIA, C.T.; CASTOLDI, R.C.; MENEZES, A.P.; CIARLINI, P.C.; LOUZADA, M.J.Q.; OLIVEIRA, S.H.P.; ERVOLINO, E.; CHAVES-NETO, A.H.; DORNELLES, R.C.M. Effect of pre-treatment of strength training and raloxifene in perimenopause on bone healing. **Bone**. v. 134, n. 115285, 2020. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115285.

PICOLI, C.C.; ROMERO, P.V.D.S.; GILIO, G.R.; GUARIGLIA, D.A.; TÓFOLO, L.P.; MORAES, S.M.F.; MACHADO, F.A.; PERES, S.B. Peak velocity as an alternative method for training prescription in mice. **Frontier in Physiology**. v. 9, n. 42, 2018. DOI: 10.3389/fphys.2018.00042.

POSTU, P.A.; SADIKI, F.A.; EL IDRISSE, M.; CIOANCA, O.; TRIFAN, A.; HANCIANU, K.; HRITCU, L. Pinus halepensis essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108673.

POWERS, S.K.; JACKSON, M.J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. **Physiological Reviews**. v. 88, n. 4, p. 1243-1276, 2008.

QIU, S.; BOSNYÁK, E.; TREFF, G.; STEINACKER, J.M.; NIEß, A.M.; KRÜGER, K.; MOOREN, F.C.; ZÜGEL, M.; SCHUMANN, U. Acute exercise-induced irisin release in healthy adults: Associations with training status and exercise mode. **European Journal of Sport Science**. v. 18, n. 9, p. 1226-1233, 2018.

RABIEE, F.; LACHINANI, L.; GHAEDI, S.; NASR-ESFAHANI, M.H.; MEGRAW, T.L.; GHAEDI, K. New insights into the cellular activities of Fndc5/Irisin and its signaling pathways. **Cell & Bioscience**. 2020. DOI: 10.1186/s13578-020-00413-3.

RADÁK, Z.; CHUNG, H.Y.; GOTO, S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. **Biogerontology**. v. 6, n. 1, p. 71-75, 2005.

RASHTI, B.A.; MEHRABANI, J.; DAMIRCHI, A.; BABAEI, P. The influence of concurrent training intensity on serum irisin and abdominal fat in postmenopausal women. **Menopause**. v. 18, n. 3, p. 166-173, 2019.

REZA, M.M.; SUBRAMANIAM, N.; SIM, C.M.; GE, X.; SATHIAKUMAR, D.; MCFARLANE, C.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Irisin is a pro-myogenic factor that induces skeletal muscle hypertrophy and rescues denervation-induced atrophy. **Nature Communications**. v. 8, n. 1, 2017. doi: 10.1038/s41467-017-01131-0.

ROBERTSON, D.M.; BURGER, H. G. Reproductive hormones: ageing and the perimenopause. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**. v. 81, n. 7, p. 612-616, 2002.

ROSENBERG, I.H. Sarcopenia: origins and clinical relevance. **The Journal of Nutrition**. v. 127, n. 5, p. 990S-991S, 1997. DOI: 10.1093/jn/127.5.990S.

SANTORO, N.; TAYLOR, E.S.; SUTTON-TYRRELL, K. The SWAN Song: Study of Women's Health Across the Nation's Recurring Themes. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**. v. 38, n. 3, p. 417-423, 2011.

SCHEYER, O.; RAHMAN, A.; HRISTOV, H.; BERKOWITZ, C.; ISAACSON, R.S.; BRINTON, R.D.; MOSCONI, L. Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection. **The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease**. v. 5, n. 4, p. 225-230, 2018.

SERVIENTE, C.; TROY, L.M.; JONGE, M.; SHILL, D.D.; JENKINS, N.T.; WITKOWSKI, S. Endothelial and inflammatory responses to acute exercise in perimenopausal and late postmenopausal women. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 311, n. 5, p. R841-R850, 2016.

SHARMA, B.K.; PATIL, M.; SATYANARAYANA, A. Negative Regulators of Brown Adipose Tissue (BAT)-Mediated Thermogenesis. **Journal of Cellular Physiology**. v. 229, n. 12, p. 1901-1907, 2014.

SHIRAI, T.; AOKI, Y.; TAKEDA, K.; TAKEMASA, T. The order of concurrent training affects mTOR signaling but not mitochondrial biogenesis in mouse skeletal muscle. **Physiological Reports**. v. 8, n. 7, 2020. DOI: 10.14814/phy2.14411.

SILVA, L.A.; PINHO, C.A.; SCARABELLOT, K.S.; FRAGA, D.B.; VOLPATO, A.M.J.; BOECK, C.R.; SOUZA, C.T.; STRECK, E.L.; PINHO, R.A. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**. v. 105, n. 6, p. 861-867, 2009.

STENGEL, A.; HOFMANN, T.; GOEBEL-STENGEL, M.; ELBELT, U.; KOBELT, P.; KLAPP, B.F. Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity--correlation with body mass index. **Peptides**. v. 39, p. 125-130, 2013.

STREIT, W.J.; XUE, Q.S.; TISCHER, J.; BECHMANN, I. Microglial pathology. **Acta Neuropathologica Communications**. 2014. DOI: 10.1186/s40478-014-0142-6.

STRINGHETTA-GARCIA, C.T.; SINGULANI, M.P.; SANTOS, L.F.; LOUZADA, M.J.Q.; NAKAMUNE, A.C.S.; CHAVES-NETO, A.H.; ROSSI, A.C.; ERVOLINO, E.; DORNELLES, R.C.M. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. **Bone**. V. 85, p. 45-54, 2016. DOI: 10.1016/j.bone.2015.11.023.

STRINGHETTA-GARCIA, C.M.; MORAIS, S.R.L.; FERNANDES, F.; PEREZ-UENO, M.J.; ALMEIDA, R.P.; LOUZADA, M.J.Q.; CHAVES-NETO, A.H.; ERVOLINO, E.; DORNELLES, R.C.M. Effects of strength training and raloxifene on femoral neck metabolism and microarchitecture of aging female Wistar rats. **Scientific Reports**. 2017. DOI:10.1038/s41598-017-13098-5.

TAKAHASHI, M.; MIYASHITA, M.; KAWANISHI, N.; PARK, J.H.; HAYASHIDA, H.; KIM, H.S.; NAKAMURA, Y.; SAKAMOTO, S.; SUZUKI, K. Low-volume exercise training attenuates oxidative stress and 96 neutrophils activation in older adults. **European Journal of Applied Physiology**. v. 113, n. 5, p. 1117-1126, 2013.

TEPPER, P.G.; RANDOLPH JR., J.F.; MCCONNELL, D.S.; CRAWFORD, S.L.; EL KHOUDARY, S.R.; JOFFE, H.; GOLD, E.B.; ZHENG, H.; BROMBERGER, J. T.; SUTTON-TYRRELL, K. Trajectory clustering of estradiol and follicle-stimulating hormone during the menopausal transition among women in the Study of Women's Health across the Nation (SWAN). **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 97, n. 8, p. 2872-2880, 2012.

THIRUPATHI, A.; PINHO, R.A.; CHANG, Y.Z. Physical exercise: An inducer of positive oxidative stress in skeletal muscle aging. **Life Science**. 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117630.

TRIVEDI, R.C.; REBAR, L.; BERTA, E.; STONG, L. New enzymatic method for serum uric acid at 500 nm. **Clinical Chemistry**. v. 24, n. 11, p. 1908-1911, 1978.

TSUCHIYA, Y.; MIZUNO, S.; GOTO, K.; Irisin response to downhill running exercise in humans. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**. v. 22, n. 2, p. 12-17, 2018.

VAUGHAN, R.A.; GANNON, N.P.; BARBERENA, M.A.; GARCIA-SMITH, R.; BISOFFI, M.; MERMIER, C.M.; CONN, C.A.; TRUJILLO, K.A. Characterization of the metabolic effects of irisin on skeletal muscle in vitro. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v. 16, n. 8, p. 711-718, 2014.

WANAGAT, J.; CAO, Z.; PATHARE, P.; AIKEN, J.M. Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. v. 15, n. 2, p. 322-332, 2001.

WASEEM, R.; SHAMSI, A.; MOHAMMAD, T.; HASSAN, I.; KAZIM, S.N.; CHAUDHARY, A.A.; RUDAYNI, H.A.; AL-ZHARANI, M.; AHMAD, F.; ISLAM, A. FNDC5/Irisin: Physiology and Pathophysiology. **Molecules**. v. 27, n. 3, 2022. doi: 10.3390/molecules27031118.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. v. 77, p. 325-333, 1981.

WOHLE, E.S.; DELPECH, J.C. Dynamic cross-talk between microglia and peripheral monocytes underlies stress⁸⁶ induced neuroinflammation and behavioral consequences. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 79, p. 40-48, 2017. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2016.04.013.

XIN, T.; LU, C. Irisin activates Opa1-induced mitophagy to protect cardiomyocytes against apoptosis following myocardial infarction. **Aging**. v. 12, n. 5, p. 4474-4488, 2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeitos do treinamento concorrente em biomarcadores oxidativos e neurotróficos de ratas no período da periestrofpausa"**, Processo FOA nº 00567-2019, sob responsabilidade de Rita Cássia Menegati Dornelles apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 27 de Agosto de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 26 de Agosto de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 26 de Setembro de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effects of concurrent training in oxidative and neurotrophic biomarkers of rats in periestrofpausa period"**, Protocol FOA nº 00567-2019, under the supervision of Rita Cássia Menegati Dornelles presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 27, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: Augsut 26, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 26, 2021.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br