

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

ALYSON ROBERTO BATISTA MONTEIRO

**EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO NA FUNÇÃO
MITOCONDRIAL E NA EXPRESSÃO GÊNICA DA UCP-3 NO
MÚSCULO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

SÃO CARLOS-SP

2019

ALYSON ROBERTO BATISTA MONTEIRO

**EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO NA FUNÇÃO
MITOCONDRIAL E NA EXPRESSÃO GÊNICA DA UCP-3 NO
MÚSCULO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisioterapia – PPG-FT da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto

SÃO CARLOS-SP

2019

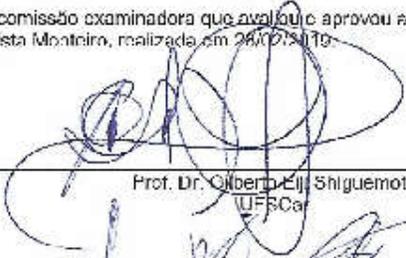


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

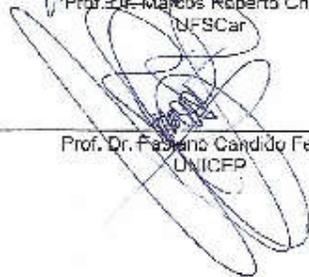
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Alyson Roberto Batista Monteiro, realizada em 26/07/2019.



Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto
UFSCar



Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti
UFSCar



Prof. Dr. Fabiano Candido Ferreira
UNICFP

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado à minha mãe Marli Batista. Os valores morais e éticos por ela fornecido me fizeram uma pessoa melhor, confiante e determinada. Seus ensinamentos e amor me perpetuaram de uma força capaz de superar adversidades e acreditar no futuro.

Ao meu pai Luiz Alberto Bastos Monteiro pelo exemplo de trabalho, honestidade e racionalidade que me fizeram uma pessoa mais coerente e resiliente.

A minha esposa Cícera Cristina dos Santos Souza por entender minha ausência e me dar suporte em casa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Marli Batista e Luiz Alberto Bastos Monteiro. Em especial a minha mãe, pois tudo que sou reflete suas orações que com abundante amor me guiou no trilho correto da vida.

Agradeço a minha esposa Cícera Cristina dos Santos por acreditar em meu potencial e fornecer apoio no lar.

Agradeço ao meu orientador Gilberto Eiji Shiguemoto pelo acolhimento na vida acadêmica e por acreditar em meu potencial, ensinando-me o valor da perseverança, despertando em mim a curiosidade científica e o pensamento crítico. Por respeitar meu processo de aprendizado e guiar meus passos rumo a um propósito sólido.

Agradeço ao professor Anibal Eugênio Vercesi por abrir as portas da Unicamp para que as análises deste estudo fossem viáveis.

Agradeço ao irmão acadêmico Gabriel Carlos Goulart Scarlato por sempre estar presente em minha pesquisa, fornecendo-me ajuda em todas etapas deste trabalho.

Agradeço a Uliana Sbeguen Stotzer por guiar meus passos nas análises laboratoriais.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

Agradeço a todos de nosso grupo de pesquisa que de alguma maneira contribuíram para que este estudo fosse realizado.

MUITO OBRIGADO!!

EPÍGRAFE

“A mente...deve se desviar do mundo da mudança (e dos sentidos) até que seus olhos possam...encarar diretamente a realidade”.
(Platão, A República)

RESUMO

Introdução: A menopausa é definida como a interrupção da menstruação, resultante da perda da atividade dos folículos ovarianos. Um dos principais efeitos deletérios desta fase é a sarcopenia, resultando em perda de força e massa muscular. Na expectativa de melhor elucidar aspectos relacionados a este período, modelos de retirada dos ovários em ratas (OVX) têm sido usados para mimetizar a menopausa, sendo eficaz em reproduzir efeitos deletérios relacionados com a menopausa. Poucos estudos investigaram o efeito no funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e sua relação com a expressão gênica das UCP-3 em ratas OVX, assim como os efeitos da intervenção do treinamento resistido (TR) neste cenário.

Objetivo: O presente estudo tem como principal objetivo investigar os efeitos da OVX e da intervenção do TR no funcionamento dos complexos da CTE durante a respiração acoplada e desacoplada, assim como a expressão gênica das UCP-3. **Materiais e Métodos:** Foram utilizadas 40 ratas Wistar adultas, distribuídas em 4 grupos experimentais (ShamSed, ShamTR, OVXSed e OVXTR). A ovariectomia foi realizada na 13ª semana de vida. O TR realizado foi o modelo de subida em escada, realizado por 22 semanas. As massas corporais de interesse foram analisadas após o sacrifício, que aconteceu 48h após o último treino. O consumo de oxigênio (O₂) e os parâmetros respiratórios mitocondriais foram realizados em biópsia tecidual do músculo Gastrocnêmio e Sóleo por meio da técnica de Respirometria de Alta Resolução (Oroboros®). Os mesmos músculos da pata contralateral foram armazenados a -80°C para análise da expressão gênica da UCP-3. Para tratamento estatístico foi utilizado o teste de normalidade e homogeneidade seguido de ANOVA e teste Post-Hoc de *Tukey* ($p < 0,05$).

Resultados: A ovariectomia aumentou a expressão gênica das UCP-3 e um programa de TR foi capaz de reduzir este aumento. No estado desacoplado (E4, inibição da ATP-sintase) houve aumento do consumo de oxigênio no grupo OVXSed, quadro revertido pelo TR. Na respiração acoplada (E3, estimulada por ADP) ocorreu redução significativa na velocidade de respiração do grupo OVXSed para ambos músculos comparado aos outros 3 grupos, sendo este mesmo comportamento observado para o controle respiratório, índice obtido pela razão entre o E3 e o E2. **Conclusão:** Concluímos que a ovariectomia afeta a função mitocondrial no músculo sóleo e gastrocnêmio de ratas OVX sedentárias, assim como aumenta a expressão gênica da UCP-3 e que um programa de TR é capaz de prevenir estas respostas.

Palavras-chave: Menopausa. Ovariectomia. EROs. Respiração Mitocondrial. UCPs. Treinamento Resistido.

ABSTRACT

Introduction: Menopause is defined as an interruption of menstruation resulting from loss of activity of ovarian follicles. One of the main deleterious effects of this phase is sarcopenia, resulting in loss of strength and muscle mass. In the expectation of better elucidating the aspects related to this period, the models of ovarian removal in rats (OVX) were used to mimic the menopause, being effective in reproducing deleterious effects related to this period. Few studies have investigated the effect on the electron transport chain (ETC) and its relation with the gene expression of UCP-3 in OVX rats, as well as the effects of resistance training (RT) in the scenario. **Objective:** The present study has as main objective to investigate the effects of OVX and the intervention of the RT in the functioning ETC during the coupled respiration and the decoupled respiration as well as in the gene expression of UCP-3. **Materials and Methods:** We used 40 rats adults, distributed in 4 experimental groups (ShamSed, ShamRT, OVXSed and OVXRT). Ovariectomy was performed at 13 weeks. The RT realized was the stair climbing model, performed for 22 weeks. The body mass of interest was analyzed after the sacrifice, which happened 48 hours after the last training. The oxygen consumption and the mitochondrial respiratory parameters were realized in tissue biopsy of the Gastrocnemius muscle and Soleus muscle by the technique the High Resolution Respirometry (Oroboros®). The same muscle of opposite leg was frozen at -80°C for analysis of the UCP-3 gene expression. Statistical treatment was used test of homogeneous and homogeneity followed normality test in ANOVA and Tukey Post-Hoc test ($p < 0.05$). **Results:** Ovariectomy increased the gene expression of UCP-3 and RT program was able revert this increase. In addition, no decoupled state (E4, inhibition of ATP-synthase) there was an increase in oxygen consumption in the OXSed group, reversed by TR. The coupled respiration (E3, stimulated by ADP) showed a significant reduction in the respiration velocity of the OVXSed group for both muscles than other 3 groups, and the same action was observed for respiratory control, indicated by the ratio of E3 and E2. **Conclusion:** We results allow us concluded that an ovariectomy affects a mitochondrial function in the muscle and the gene expression of UCP-3 in rats OVX sedentary and that the RT program is able to prevent these responses.

Keywords: Menopause. Ovariectomy. ROS. Mitochondrial Respiration. UCPs. Resistance Training.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Expectativa de vida do brasileiro (2016).....	17
Figura 2. Uma ilustração e comparação do modelo OVX.....	20
Figura 3. Registros mundiais de supino para mulheres	22
Figura 4. Disfunção mitocondrial.....	24
Figura 5. Influência do estrogênio na função mitocondrial	26
Figura 6. Complexos da Cadeia Transportadora de elétrons	28
Figura 7. O ciclo Q apresentado em dois estágios.....	30
Figura 8. Esquema de geração e consumo da força próton-motiva mitocondrial	33
Figura 9. Regulação da abundância e atividade da UCP1 no tecido adiposo marrom	35
Figura 10. Localização cromossomal para UCP-3	37
Figura 11. Organograma dos grupos experimentais	42
Figura 12. Equipamentos utilizados para o treinamento resistido.....	43
Figura 13. Apresentação esquemática das cargas de carregamento por sessão de treinamento e por sessão de CMC.....	44
Figura 14. Delineamento experimental.....	44
Figura 15. Exemplo de Gel de RNAs	45
Figura 16. Validação da amplificação específica para o produto de PCR em curva de melting e em gel de agarose.....	47
Figura 17. Modelo de análise de respiração mitocondrial	49
Figura 18. Comparação tamanho do útero OVXSed e ShamSed.....	50
Figura 19. Medida da tíbia por paquímetro.....	51
Figura 20. Carga Máxima de Carregamento	52
Figura 21. Expressão de RNAm da UCP-3 no músculo Sóleo de ratas	53
Figura 22. Expressão de RNAm da UCP-3 no músculo Gastrocnêmio de ratas.....	54
Figura 23 Respirimetria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do Músculo Sóleo Análise em repouso (E2) (A) e Inibida por Oligomicina (E4) (B).....	55
Figura 24. Respirimetria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio estimulado por ADP realizado em Biópsia do Músculo Sóleo (A) e Razão do Controle Respiratório (RQR) ADP/E2 (B).	56
Figura 25. Respirimetria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio estimulado por FCCP realizado em de Biópsia do Músculo Sóleo (A) e Razão de Controle Respiratório (RQR) FCCP/E2.....	57

Figura 26. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do Músculo Gastrocnêmio - Análise em repouso (E2) (A) e Inibida por Oligomicina (E4) (B)..	58
Figura 27. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio estimulado por ADP realizado em Biópsia do Músculo Gastrocnêmio (A) e Razão do Controle Respiratório (RQR) ADP/E2 (B).	59
Figura 28 . Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio estimulado por FCCP realizado em de Biópsia do Músculo Gastrocnêmio (A) e Razão de Controle Respiratório (RQR) FCCP/E2.	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Cronograma do treinamento resistido	44
TABELA 2. Primer utilizado para amplificação do gene UCP-3 por qRT-PCR.....	46
TABELA 3. Evolução Ponderal da Massa Corporal e Tecidual dos Grupos Experimentais...	51

LISTA DE SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
AG	Ácidos Graxos
ANOVA	Análise de variância simples
cAMP	Segundo Mensageiro Adenosina 3',5'-monofosfato Cíclico
ANT	Transportador de Nucleotídeo de Adenina (adenine nucleotide translocase)
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina soro bovino
Ca	Cálcio
CaK2EGTA	Tampão de Cálcio/EGTA/Hidróxido de Potássio
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório
CMC	Carga Máxima de Carregamento
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
CR	Controle Respiratório
CRM	Cadeira Respiratória Mitocondrial
DEPC	Água Ultrapura tratada (diethylpyrocarbonate)
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
DHPR	Dihidropiridina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
DPM	Desvio Padrão da Média
DVC	Doenças Cardiovasculares
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
EGTA	Etileno glicol-bis (β -aminoetil éter)-N'-ácido tetracético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	Flavina-adenina-dinucleotídeo forma oxidada
FADH ₂	Flavina-adenina-dinucleotídeo Forma Reduzida
FCCP	Carbonil cianeto de p-trifluorometoxifenil-hidrazona
Fe-S	Centro redox Ferro Enxofre
FMN	Mononucleotídeo de Flavina
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante
FOXO	Forkhead Box O3
GAPDH	Glicerol-3-fosfato Desidrogenase
GDP	Guanina Difosfato
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-6	Interleucina 6
KH ₂ PO ₄	Fosfato Monopotássico
MAPK	Mitogeno Ativado por Proteína Quinase
MEM	Membrana Externa Mitocondrial
MET	Equivalente Metabólico da Tarefa (Metabolic Equivalent of Task)
MIM	Membrana Interna Mitocondrial
MiR05	Meio de respiração número 05
mL	Mililitro

mM	Milimolar
Mmol/L	Milimol por litro
MnSOD	Enzima superóxido dismutase de manganês mitocondrial
mtDNA	Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial
MuRF-1	Muscle Ring Finger-1
NF-K β	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NADH	Dinucleotídeo de Nicotinamida-adenina Reduzido
NFR-1	Fator de Respiração Nuclear
O ₂	Oxigênio Molar
O ₂ [•]	Ânion Superóxido
OH [•]	Radical Hidroxila
OVX	Ovariectomia
Q	Ubiquinona
QH [•]	Semiquinona
QH ₂	Ubiquinol
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia (polymerase chain reaction)
PGC1- α	Co-ativador-1 alfa do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma
Pi	Fosfato inorgânico
PKA	Proteína Quinases Dependente de AMP-cíclico
PMF	Período Menstrual Final
PPAR	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomos
REs	Receptores de Estrogênio
RE α	Receptor de Estrogênio alfa
RE β	Receptor de Estrogênio beta
RE γ	Receptor de Estrogênio gama
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real (Real Time polymerase chain reaction)
SED	Sedentário
Sham	Animal intacto
SHBG	Globulina Ligadora de Hormônios Sexuais (Sex Hormone-binding Globulina)
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido Adiposo Marrom
Tfam	Fatores de Transcrição Mitocondrial
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral
TR	Treinamento Resistido
UCPs	Proteínas Desacopladoras de ATP
UCP-1	Proteínas Desacopladoras de ATP 1
UCP-2	Proteínas Desacopladoras de ATP 2
UCP-3	Proteínas Desacopladoras de ATP 3
UCPH	Proteínas Desacopladoras Homóloga
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
4-HNE	4-hidroxinonenal
α	Alfa
β	Beta
μ g	Micrograma

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Menopausa	17
2.1.1. <i>Menopausa e Ovariectomia</i>	19
2.2. Sarcopenia	20
2.2.1. <i>Sarcopênia e Menopausa</i>	21
2.2.2. <i>Sarcopenia e Mitocôndria</i>	22
2.2.3. <i>Sarcopenia, Menopausa e Mitocôndria</i>	24
2.3. Estrutura Mitocondrial	27
2.3.1. <i>Cadeia transportadora de Elétrons (CTE)</i>	28
2.3.2. <i>Complexos I</i>	28
2.3.3. <i>Complexo II</i>	29
2.3.4. <i>Complexo III</i>	29
2.3.5. <i>Complexo IV</i>	30
2.3.6. <i>ATP-sintase</i>	31
2.4. Teoria Quimiosmótica	31
2.5. Proteínas desacopladoras de ATP (UCPs)	32
2.5.1. <i>Regulação da expressão e atividade das UCPs</i>	34
2.5.2. <i>Funções da UCP-3</i>	35
2.6. Exercício Físico, Menopausa, Sarcopênia e Mitocôndria	37
2.7. Treinamento Resistido (TR)	39
3. HIPÓTESE	41
4. OBJETIVOS	41
4.1. Objetivo Geral	41
4.2. Objetivos Específicos	41
5. MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1. Animais e Condições experimentais	42
5.2. Grupos Experimentais	42
5.3. Protocolo de Treinamento Resistido (TR)	43
5.4. Desenho experimental	44
5.5. Ovariectomia e Sham	45
5.6. Eutanásia Dos Animais e Coleta Dos Tecidos	45
5.7. Extração do RNA total e controle de qualidade	45

5.7.1.	<i>Tratamento com DNase e transcrição reversa</i>	46
5.7.2.	<i>PCR em tempo Real</i>	46
5.8.	Análise da Função Mitocondrial - Consumo de Oxigênio por meio da Técnica de Respirometria Mitocondrial em Biópsia Tecidual:	47
5.8.1.	<i>Retirada e preparação das amostras</i>	47
5.8.2.	<i>Permeabilização Mecânica e Química</i>	47
5.8.3.	<i>Avaliação de Parâmetros Respiratórios</i>	48
5.8.4.	<i>Estados Respiratórios e Titulações analisadas na Respirometria de Alta Resolução de biópsia muscular</i>	48
5.9.	Tratamento Estatístico	49
6.	RESULTADOS	50
6.1.	Análise da evolução ponderal da massa corporal e de massas teciduais de	50
6.2.	Carga máxima de carregamento	51
6.3.	Expressão Gênica UCP-3 Sóleo	52
6.4.	Expressão Gênica UCP-3 Gastrocnêmio	53
6.5.	Consumo de Oxigênio	54
6.6.	<i>Consumo de oxigênio tecidual de biópsia do músculo sóleo</i>	54
6.6.	Consumo de Oxigênio Gastrocnêmio	57
7.	DISCUSSÃO	61
7.1.	Evolução ponderal da massa corporal e massas teciduais de interesse do estudo das ratas do experimento, e carga máxima de carregamento.	61
7.2.	Expressão Gênica de UCP-3 no músculo Sóleo e Gastrocnêmio	63
7.3.	Respiração Mitocondrial dos Músculos Sóleo e Gastrocnêmio	67
7.3.1.	<i>Estado 2</i>	67
7.3.2.	<i>Estado 4 (E4)</i>	68
7.3.3.	Estado 3 e Controle Respiratório	69
7.3.4.	<i>V_{máx}</i>	72
8.	CONCLUSÃO	73
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

A menopausa é definida como a interrupção da menstruação, resultante da perda da atividade dos folículos ovarianos, marcando o fim do ciclo reprodutivo feminino e envolve mudanças ao longo do tempo nas funções fisiológicas e hormonais incluindo o aumento do hormônio folículo-estimulante (FSH), diminuição do 17β -estradiol (E2) e mudanças na duração do ciclo menstrual (MESSIER et al., 2011; POLOTSKY; POLOTSKY, 2010).

Visto que a redução de E2 ocorre por volta da quinta década de existência feminina e a expectativa de vida de mulheres no Brasil é de aproximadamente 79 anos, boa parte de suas vidas será na pós-menopausa, o que aumenta o interesse em melhor elucidar aspectos de saúde relacionados com esta fase (MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; IBGE, 2016).

Existem evidências correlacionando a menopausa com diminuição de força muscular, aumento de deposição de gordura visceral e de fatores pró-apoptóticos, aumento do risco de doenças cardiovasculares (DCV) e de síndrome metabólica (BROWN, 2008; CARR, 2003; MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013; ROSANO et al., 2007).

Com relação a perda de massa e força muscular, mulheres de fato têm um acelerado prejuízo após a menopausa, provavelmente devido as alterações hormonais (BO; ZHANG; JI, 2010; CARVILLE; RUTHERFORD; NEWHAM, 2006; MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; ROLLAND et al., 2007). Este quadro de perda de massa e função muscular é conhecida como sarcopenia e pode conduzir a diversos efeitos deletérios na saúde, como DCV, quedas, alterações no metabolismo da glicose, diminuição da densidade mineral óssea e mortalidade (CHEN et al., 2014; LANG et al., 2010; LIM et al., 2011; NEWMAN AB VISSER M, et al., 2006). Entretanto, no século atual, o termo “dinapenia” foi proposto por Clark e Manini (2008), no qual os autores explicam que tais eventos de perda de força e massa muscular devem ser definidos separadamente, sendo a “dinapenia” um termo que explica melhor a perda de força muscular independente da perda de massa muscular no envelhecimento, levando em conta outras alterações como alterações nas funções contrateis e neurológicas.

Quando tratamos desse assunto de sarcopenia e “dinapenia”, existe uma diferença entre homens e mulheres. Mulheres tem uma taxa e magnitude de perda dessas variáveis mais precoce que homens (HORSTMAN et al., 2012). Apesar da importância do tecido muscular para parâmetros relacionados a saúde, paradoxalmente, a expectativa de vida de mulheres é maior que a de homens em diferentes locais do mundo onde esta variável é mensurada (CLAPIER et al., 2017). Esta diferença na expectativa de vida tem sido atribuída a efeitos protetores do E2

ao longo da vida em mulheres pré-menopausa, não apenas na espécie *Homo Sapiens* mas em diversas espécies de mamíferos, sendo esta diferença atribuída a características peculiares de cada sexo (VIÑA et al., 2005).

Independente do sexo, há estimativas de que em 2050 haverá 2,1 bilhões de pessoas com mais de 60 anos, um aumento expressivo com relação aos 901 milhões de pessoas levantados em pesquisa de 2015. Esta transição demográfica vem acompanhada da ascensão de doenças crônicas degenerativas, não transmissíveis. Neste cenário uma questão crucial é dar clareza a um futuro imediato de desafios que podem mudar nossa forma de prevenir, tratar e enfrentar as consequências destas doenças, como declínio funcional (físico ou cognitivo). No que tange ao declínio físico, reduzir a sarcopenia e “dinapenia” pode prevenir a incapacidade motora e é uma esperança frente a este crescente ciclo deletério (ANGULO; EL ASSAR; RODRÍGUEZ-MAÑAS, 2016). Além disso, retardar a perda e força muscular pode aumentar a eficiência de muitos tratamentos terapêuticos e reduzir a mortalidade (ROMANELLO; SANDRI, 2016).

Na expectativa de melhor elucidar aspectos relacionados a este período, modelos de retirada dos ovários em ratas (ovariectomia) têm sido usados para mimetizar a menopausa, sendo eficaz em reproduzir redução na massa muscular e óssea, mudanças no perfil lipídico e na composição corporal (PRESTES et al., 2009; SHIGUEMOTO et al., 2007; WALLEN; BELANGER; WITTNICH, 2001). Este modelo experimental permite elaborar um estudo dos complexos biológicos, moleculares e genômicos que não são facilmente assecíveis na investigação com humanos, trazendo novas oportunidades translacionais (BRINTON, 2012).

Na busca de novos tratamentos terapêuticos é necessário compreender aspectos celulares subjacentes relacionados com o quadro de sarcopenia e menopausa, o que levanta o importante papel da mitocôndria (HEPPLE, 2014). Dados recentes sugerem que a rede mitocondrial se comunica com as fibras musculares para adaptar a função muscular a demandas fisiológicas e/ou patológicas (ROMANELLO; SANDRI, 2016). Ademais, as funções exercidas por estas organelas como bioenergética e controle do estresse oxidativo envolvem diferenças entre sexos, o qual se refere a diferenças biológicas (CLAPIER et al., 2017). De fato, esta organela também regula diversas funções como produção de energia, apoptose e estado redox celular, sendo o principal sítio de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CALVANI et al., 2013; MARZETTI et al., 2013). Além disso, E2 exerce efeito direto ou indireto nesta organela em diferentes tecidos e os mecanismos fisiológicos pelo qual ele atua não são completamente elucidados (KLINGE, 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Menopausa

No início da vida reprodutiva feminina, cada mulher apresenta cerca de 500 mil ovócitos primários. Ao longo dos ciclos reprodutivos, apenas um folículo dominante se desenvolve até a ovulação e os outros folículos passam por atresia, perdendo sua função. De fato cerca de apenas 400 folículos primordiais crescem em folículos maduros e ovulam, o que explica o início da menopausa (KUBOTA et al., 2016, SILVERTON, 2016).

A menopausa ocorre por volta da quinta década de existência feminina e a expectativa de vida de mulheres no Brasil em 2016 é de 79,4 anos. Isso significa que aproximadamente 30 anos da vida das mulheres acontece na pós-menopausa (Figura 1), (IBGE, 2010; Portal Brasil, 2019). Isto revela a importância de uma melhor compreensão de possíveis aspectos deletérios provenientes da diminuição dos níveis circulantes de E2 neste período (MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; IBGE, 2010).



Figura 1. Expectativa de vida do brasileiro (2016). Adaptada a partir de dados do IBGE, estatísticas sociais (2016).

Para se evitar confusão ao se tratar deste tema, as fases deste período foram divididas em estágios, sendo: menopausa (ponto definido após um período de 12 meses de amenorréia) do período menstrual final (PMF); transição menopausal (caracterizada por alterações na duração do ciclo menstrual, aumento do FSH que culmina com PMF); perimenopausa (começa com 2 meses e termina com 12 meses após PMF); pós-menopausa (dividido em 2 estágios, sendo um

precoce e um tardio). O precoce é definido como 5 anos após o PMF e o tardio é definido como posterior ao período precoce até o fenecimento da mulher (SOULES et al., 2001).

Estas fases são melhor compreendidas se pensadas como um processo dinâmico e fisiológico, que ocorre ao longo de vários anos na vida da mulher. Elas envolvem mudanças hormonais como aumento do hormônio FSH, mudanças na duração do ciclo menstrual, diminuição da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG, do inglês *sex hormone-binding globulina*) e interrupção permanente da secreção de hormônios esteroides ovarianos. (POLOTSKY; POLOTSKY, 2010).

Para poder entender os principais efeitos associados a privação hormonal no período pós-menopausal é preciso entender as ações fisiológicas deste hormônio. Existem três isoformas de estrogênio: estrona (E1), estriol (E3) e estradiol (E2). O E2 é o principal e mais potente estrogênio circulatório nos anos reprodutivos femininos. Em humanos, o E2 é produzido nos ovários, glândulas adrenais e em casos de gestação pela placenta (RETTBERG et al., 2014; SILVERTON, 2016). A principal função atribuída ao E2 é a de promover as características sexuais femininas; entretanto, ele também possui outras funções, como aumentar a atividade de osteoblastos no osso, promover um balanço nitrogenado positivo com um ligeiro aumento na síntese de proteína total, aumentar o metabolismo total do corpo e promover deposição de gordura subcutânea (GUYTON e HALL, 2010).

Na fase pós-menopausa a deficiência de E2 resulta em diminuição da atividade dos osteoblastos e redução da matriz óssea, redução da deposição de Cálcio (Ca) e fosfatos no osso podendo causar osteoporose (GUYTON e HALL, 2010). Além disso, mulheres na transição da menopausa não obesas apresentam aumento da gordura visceral (ABDULNOUR et al., 2012). Outro estudo mostrou uma forte relação entre obesidade associado com sarcopenia em mulheres na pós-menopausa em relação ao grupo jovem (KANG et al., 2017). A falta de estrogênio também apresenta relação com a sarcopenia ou diapenia (MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; MESSIER et al., 2011). Alguns ensaios também tem estabelecido uma disfunção mitocondrial na ausência de E2 (CAMPBELL; FEBBRAIO, 2001; HA, 2004; KLINGE, 2009; SCHREIBER et al., 2004). Visto a necessidade de entender aspectos subjacente aos processos dos quadros citados acima, a ovariectomia (OVX) é o modelo experimental que tem sido utilizado para mimetizar a menopausa.

2.1.1. Menopausa e Ovariectomia

Ao longo da história, estudos de ratos representam um bom modelo animal para estudos translacionais do ciclo reprodutivo humano (LONG, 1922). Este modelo abre possibilidades de investigar fenômenos celulares, moleculares e genômicos que são de difícil acesso em humanos, sendo esta forma de estudo uma importante ferramenta para descobrir mecanismos de doenças humanas e propor novas abordagens terapêuticas (BRINTON, 2012).

Ao se investigar efeitos da menopausa a partir de modelos animais, é importante sublinhar algumas diferenças básicas entre o ciclo reprodutivo humano e animal. Ratas apresentam ciclo estral ao invés de ciclo menstrual. Em ratas o revestimento superficial uterino é absorvido, e em humanos, ele é expelido do corpo pela menstruação. O envelhecimento do sistema reprodutivo de ratas ocorre por volta de 9 a 12 meses de idade, com irregularidades do ciclo estral, termo chamado de estropausa, enquanto em mulheres o envelhecimento reprodutivo ocorre por volta da quinta década de vida (MESSIER et al., 2011; KOEBELE, 2016).

Em nosso modelo de estudo, nós buscamos separar possíveis fatores ambíguos relacionados ao envelhecimento de nossas análises, por isso optamos pela técnica de ovariectomia (OVX). Apesar deste modelo sofrer algumas críticas, pois a retirada abrupta dos hormônios ovarianos não são comparáveis a real condição de anos de transição experimentada na menopausa humana, a OVX é uma técnica clássica, que merece muitos elogios por sua utilidade na avaliação de novos fenômenos no contexto do envelhecimento e da pesquisa da menopausa (BRINTON, 2012; KOEBELE, 2016). Este modelo foi utilizado amplamente em outros estudos, como modelo translacional que mimetiza a menopausa humana (BARBOSA et al., 2016; CONTI et al., 2015; HA, 2004; LEITE et al., 2009; MUTHUSAMI et al., 2005; ROSSINI, 2016; SHIGUEMOTO et al., 2007).

O modelo de OVX, consiste na remoção cirúrgica de ambos ovários, geralmente realizada em ratas jovens, sendo que as intervenções de interesse que se desejam estudar ocorrem após uma ou duas semanas da cirurgia, fase em que a concentração de E2 no plasma sanguíneo é indetectável e a recuperação pós-cirúrgica é completa. As principais alterações derivadas desta cirurgia nos órgãos reprodutivos são redução da bifurcação uterina devido à falta de estimulação hormonal, baixo para indetectável nível de esteroides ovarianos, mudanças na composição corporal e atrofia vaginal (Figura 2) (LEITE et al., 2009; KOEBELE, 2016).

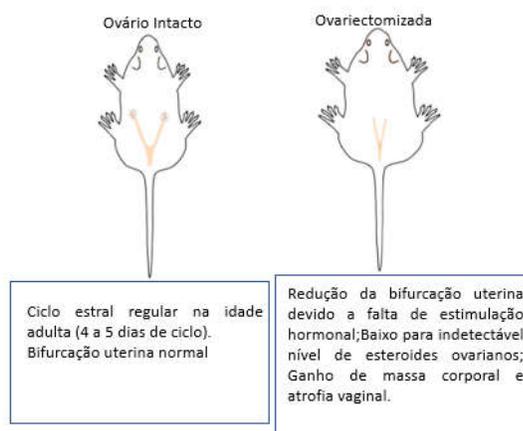


Figura 2. Uma ilustração e comparação do modelo OVX validado de roedores para mimetizar menopausa (figura adaptada de KOEBELE, 2016).

2.2. Sarcopenia

No intento de refletir o termo sarcopenia, um elegante artigo de Rosenberg (1997) iniciou seu texto contextualizando o leitor sobre o termo de perda da capacidade funcional relatada ao envelhecimento, que envolve resultados de medidas de estudos transversais realizadas na década de 70, pelo médico Nathan Shock, em parâmetros de capacidade fisiológica funcional como queda no metabolismo basal, função renal, capacidade pulmonar entre outras. O autor (ROSENBERG, 1997) destaca que após este período de análise da perda de capacidade funcional dos idosos, as pesquisas se voltaram a questões mais complexas, questionando saber se este declínio funcional é inerente ao processo de envelhecimento ou se este declínio está relacionado a mudanças que podem ser influenciadas ou manipuladas.

O tecido muscular é um tecido altamente plástico e adaptável, passível de intervenções que busquem manter seu volume e qualidade (GONZALEZ et al., 2016). Este tecido no envelhecimento sofre uma redução substancial, sendo a raiz de outras perdas funcionais, como da mobilidade, independência, respiratória, metabólica, entre outras (ROSENBERG, 1997). Dado a importância do tema, pesquisadores reunidos em 1988 chegaram a um consenso terminológico para este quadro de perda de massa magra, sendo o termo definido como sarcopenia, (do grego, *sarx*=carne, *penia*=perda), que atribui importância independente a esses eventos fisiológicos e/ou patológicos. Este termo ficou sendo denominado como a perda da função e massa muscular relacionados à idade (ROSENBERG, 1997).

2.2.1. Sarcopênia e Menopausa

Fêmeas vivem mais que machos em diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos. Porém mulheres apresentam processo de sarcopenia mais precoce que homens. Visto a importância da manutenção de massa magra para a saúde, essas informações são antagônicas (HORSTMAN et al., 2012; KRAEMER; RATAMESS; FRENCH, 2002; VIÑA et al., 2005). Entretanto muitos estudos sugerem haver uma relação entre a sarcopenia e a falta de E2 (KANG et al., 2017; MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; MESSIER et al., 2011; SØRENSEN et al., 2001).

Acredita-se que o E2 exerça efeitos diretos na massa muscular através da ativação de seus receptores de estrogênio (REs) ou através de outras vias. Existem duas classes de REs, RE- α e RE- β . A sinalização clássica do estrogênio ocorre como resultado da interação do ligante com o receptor, e este sofre translocação para o núcleo, onde se liga ao elemento de resposta estrogênica para regular a expressão gênica (RETTBERG et al., 2014). Há evidências de uma terceira classe de REs em humanos, o RE γ . Seu silenciamento ou *nocaut* em modelos animais tem indicado que esses animais têm uma menor capacidade oxidativa (RANGWALA et al., 2010; WIJK et al., 2009). Além disso, dados mostram que mulheres apresentam uma taxa mais rápida de perda de força durante a perimenopausa (Figura 3) (BROWN, 2008).

Fatores adicionais podem modular a taxa de perda da qualidade da fibra muscular associados ao período de menopausa, e são descritos como fatores extrínsecos, como redução da atividade física, alterações nutricionais, doenças, tabagismo, fatores ambientais entre outros. Entre os fatores intrínsecos, pode-se elencar as alterações hormonais, como queda de IGF, testosterona e GH, o aumento da produção de EROs, bem como doenças que afetam o metabolismo muscular e processos inflamatórios, entre outros (KANG et al., 2017). Ademais, o E2 é visto como um possível regulador da bioenergética, aumentando o transporte de glicose para a célula, melhorando a sensibilidade a insulina, estimulando a atividade de enzimas glicolíticas e oxidativas e diversas vias de sua sinalização convergem para a mitocôndria (RETTBERG, 2014).

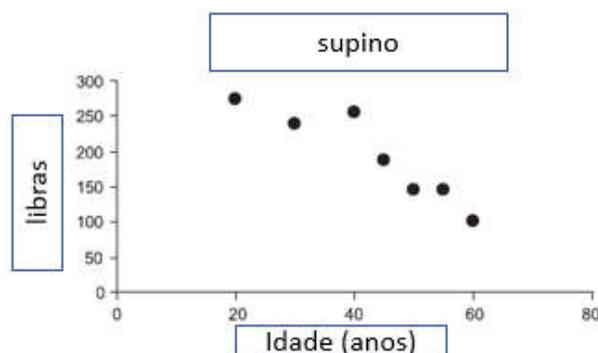


Figura 3. Registros mundiais de supino para mulheres testadas em antidoping na categoria de peso de 148 lb. Observe a taxa acelerada de perda de força que ocorre durante os anos da menopausa, mesmo em mulheres altamente treinadas. Associação Americana de Levantamento de Peso, adaptada de Brow (2008).

2.2.2. Sarcopenia e Mitocôndria

Cerca de 40% do corpo são constituídos por músculos esqueléticos e aproximadamente 10% representam o músculo liso e cardíaco, para todos os eventos que envolvem trabalho realizado por esse enorme sistema é preciso energia, que será fornecida na forma de adenosina trifosfato (ATP) (GUYTON E HALL, 2010). Isso nos traz à mente o importante papel da mitocôndria como o principal local de síntese de ATP, porém, além desta função, esta interessante organela exerce um papel central de integração de sinais e participa de diversos outros eventos celulares como regulação da produção de EROs e apoptose celular (HEPPLE, 2014).

O estudo da viabilidade mitocondrial é complexo e exige constante melhoramento das técnicas disponíveis para se evitar possíveis artefatos de investigação. Neste contexto deve ser considerado os meios de investigação mitocondrial e até mesmo as subpopulações mitocondriais (intermiofibrilar ou subsarcolemal), bem como o tipo de fibra muscular estudada (MARZETTI et al., 2013; PICARD et al., 2011a). Técnicas de investigação mecânica e isolamento mitocondrial podem danificar suas estruturas e induzir alterações funcionais, o que não acontece em estudos nos quais as estruturas mitocôndrias são preservadas, como na permeabilização mecânica das miofibrilas, que preserva a arquitetura mitocondrial e outras importantes estruturas como retículo sarcoplasmático, citoesqueleto entre outros (PICARD et al., 2011b). Também há especificidade de resposta das fibras musculares. Por exemplo, fibras musculares glicolíticas ou rápidas, em amostras de músculos de roedores, apresentam prejuízo da capacidade respiratória, elevada produção de peróxido de hidrogênio e prejuízo na capacidade de retenção de cálcio (um marcador de apoptose) em relação a fibras oxidativas ou lentas (PICARD et al., 2011a).

Muitos estudos têm associado sarcopenia à disfunção mitocondrial, destacando alterações na bioenergética mitocondrial. Devemos lembrar que este termo “bioenergética” refere-se ao estudo da transformação de energia em sistemas vivos, e é o meio através do qual a energia do metabolismo energético é acoplada a reações que utilizam essa energia (NELSON e COX, 2013). Visto que o oxigênio (O_2) é o acceptor final de elétrons e pode ser utilizado como uma medida indireta da capacidade funcional de captar, transportar, e em última instância, ser utilizado em vias finais na cadeia transportadora de elétrons (CTE), sua medida de consumo pode fornecer importantes parâmetros dessas engrenagens (MCARDLE E KATCH, 2010). Com as devidas ponderações, podemos usar o consumo de O_2 como indicador de uma possível disfunção mitocondrial em sua utilização. Neste contexto, o consumo máximo de O_2 e o de repouso reduzem com a idade, assim como a síntese de ATP, independente da massa livre de gordura (SHORT et al., 2005). Além disso, estudos em amostras musculares humanas apontaram que sujeitos mais velhos têm uma queda na massa total mitocondrial (WELLE et al., 2003). Estas alterações moleculares podem fazer com que idosos optem por caminhar em velocidade mais lenta, quadro que tem sido adotado como critério de sarcopenia (CRUZ-JENTOFT et al., 2010).

Marzetti et al. (2013) propuseram um interessante ciclo vicioso envolvendo disfunção mitocondrial e sarcopenia, onde em mitocôndrias disfuncionais há maior produção de EROs, danos e depleção do ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA), predispondo a célula a déficit bioenergético que pode culminar com a queda do fornecimento de energia e prejuízo do turnover proteico, conduzindo a sarcopenia. Estes autores sugerem que na disfunção mitocondrial ocorra um desequilíbrio da dinâmica mitocondrial entre os processos de fusão e fissão, alterações morfológicas que reduzem a mitofagia e a eficiência de fornecer ATP. Aumento na produção de EROs pode ativar fatores de transcrição como FOXO3 (do inglês *forkhead box O3*) e o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), que aumentam a expressão de genes relacionados com atrofia muscular, como a atrogina-1 e a MURF-1 (do inglês, *Muscle Ring Finger-1*) (Figura 4).

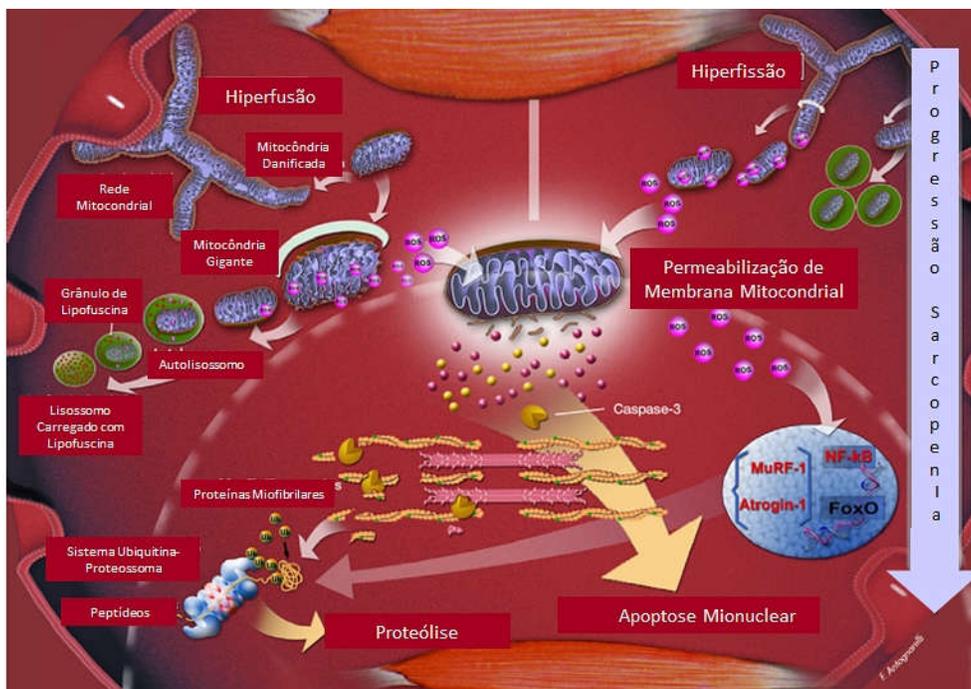


Figura 4. Disfunção Mitocondrial. Cenários possíveis resultantes da falha do controle de qualidade mitocondrial durante a progressão da sarcopenia. Um desequilíbrio na dinâmica mitocondrial em direção à fusão está associado ao aparecimento de mitocôndrias gigantes, caracterizadas por redes altamente interconectadas, morfologia aberrante, eficiência bioenergética reduzida e aumento da produção de EROs, adaptada de Marzetti et al. (2013).

2.2.3. Sarcopenia, Menopausa e Mitocôndria

Dimorfismo sexual em características anatômicas, fisiológicas e comportamentais é comum entre espécies de mamíferos, e resultam de complexas interações hormonais, genéticas, epigenéticas e comportamentais. Além disso, determinantes de prevalência de doenças diferem entre os sexos, embora sua compreensão e fatores biológicos estão longe de serem compreendidos (VENTURA-CLAPIER, 2017).

As mitocôndrias também estão envolvidas em dimorfismo sexual na bioenergética e no estresse oxidativo. Por exemplo, em mitocôndrias do fígado, a respiração estimulada pelo adenosina difosfato (ADP), o teor de proteína mitocondriais e os níveis de cardiolipina são mais altos nas mitocôndrias femininas do que nas masculinas em modelos animais (JUSTO et al., 2005). Além disso, a proteção contra estresse oxidativo no músculo esquelético de mulheres é maior do que em homens (MARZINI et al., 2005) e ratos alimentados com dietas ricas em gordura, há maior biogênese em machos, ao passo que a mesma dieta nas fêmeas promoveu melhor resposta antioxidante (GÁMEZ-PÉREZ et al., 2012).

Entender como o E2 age na mitocôndria em termos de dimorfismo sexual pode fornecer poderosas ferramentas para entender o quadro de disfunção mitocondrial e sarcopenia, ambos

relatados na menopausa. Ao se ligar a seu receptor, o complexo REs/E2 sofre translocação para o núcleo celular onde ele interage com genes específicos que aumentam a transcrição da proteína co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1- α) e a expressão do fator de respiração nuclear (NFR-1, do inglês *nuclear respiratory factor*), que aumenta o fator de transcrição mitocondrial (TFAM, do inglês *mitochondrial transcription factor A*); TFAM se desloca até a mitocôndria aumentando a transcrição de genes mitocondriais (KLINGE, 2009). O E2 também pode se ligar a receptores de membrana acoplados a proteína G na membrana plasmática, ativando NF- κ B de uma forma dependente de MAPK (do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*), resultando em aumento da transcrição de ácidos ribonucleicos (RNAs) de enzimas antioxidantes. Portanto, ao preservar a integridade das mitocôndrias, ocorre menor liberação dos fatores pró-apoptóticos por essas organelas, assegurando diminuição da morte celular e preservação das funções dos órgãos e tecidos. As maiores capacidades de retenção de cálcio geralmente observadas nas mitocôndrias femininas também contribuem para a menor liberação de fatores pró-apoptóticos (Figura 5) (VENTURA-CLAPIER, 2017).

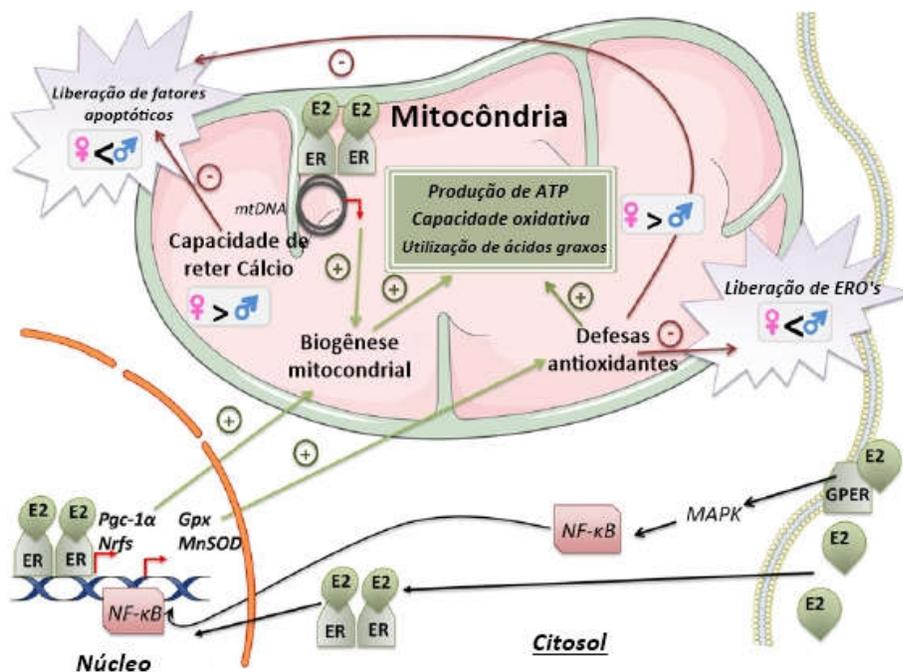


Figura 5. Influência do estrogênio na função mitocondrial. A ligação dos estrogênios (E2) aos seus receptores citosólicos induz a translocação do complexo estrogênio / RE para o núcleo. A interação deste complexo com DNA nuclear resulta na transcrição de PGC-1 α e NRFs que estimulam a biogênese mitocondrial e defesas antioxidantes. Os estrogênios também interagem com receptores estrogênicos ligados ao mtDNA, levando à transcrição e replicação do mtDNA. A biogênese mitocondrial favorece a utilização de ácidos graxos, a capacidade oxidativa e a produção de ATP. Os estrogênios também podem se ligar a receptores da membrana plasmática, ativando o NF- κ B de maneira dependente da MAPK. Isso resulta na transcrição de genes codificadores de enzimas antioxidantes, reforçando em particular as defesas antioxidantes das mitocôndrias, reduzindo danos e, conseqüentemente, exibem maior utilização de ácidos graxos, capacidade oxidativa e produção de ATP. Na medida em que o sistema de defesa antioxidante preservar a integridade das mitocôndrias, a liberação dos fatores pró-apoptóticos por essas organelas é reduzida, assegurando menor morte celular e preservação das funções dos órgãos figura adaptada de Ventura-Clapier (2017).

Como descrito nos parágrafos anteriores, múltiplas sinalizações do E2 convergem para a mitocôndria, então, não é surpresa que a falta de E2 promova um quadro de disfunção mitocondrial com conseqüências prejudiciais para a célula ou tecido muscular como sarcopenia. Neste contexto, Ha (2004) mostrou aumento do estresse oxidativo e baixos níveis de enzimas antioxidantes em ratas OVX. Outros estudo encontrou redução de enzimas mitocondriais chave do metabolismo das gorduras em ratas OVX (CAMPBELL; FEBBRAIO, 2001). Em outro estudo, no teste de isquemia seguido de reperfusão, camundongos machos com o gene silenciado para RE- α , apresentaram mitocôndrias com morfologia anormal, redução da matriz

mitocondrial e rupturas das cristas mitocondriais em comparação ao tipo silvestre (ZHAI et al., 2000).

Alguns dos motivos de disfunção mitocondrial e sarcopenia envolvem aumento da geração de EROs mitocondrial. Este aumento pode levar a um ciclo que ficou conhecido como teoria do radical livre mitocondrial e envelhecimento, onde EROs reagem com moléculas celulares e teciduais, causando lesões celulares como a peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas, inativação enzimática, danos no DNA nuclear e mitocondrial, disfunção mitocondrial e mais uma vez aumento na produção de EROs repetindo o ciclo (MARZETTI et al., 2013). De fato, diversos estudos fizeram esta ligação entre disfunção mitocondrial e aumento da sarcopenia (CALVANI et al., 2013; CHABI et al., 2008; ROMANELLO; SANDRI, 2016). Como vimos no parágrafo acima, o E2 melhora a defesa antioxidante, portanto, sua privação pode conduzir a aumento do estresse oxidativo. Outros estudos, apontam que defeitos no complexo sistema de fosforilação oxidativa podem acarretar diminuição na síntese de ATP, condição que resulta em sarcopenia (NAVARRO; BOVERIS, 2007; KUMARAN et al., 2005; SKULACHEV, 2006).

2.3. Estrutura Mitocondrial

A mitocôndria é uma organela celular de origem materna, possui forma arredondada ou alongada e existe em praticamente todos os tipos de células eucariontes dependentes do metabolismo aeróbio. É constituída por 2 membranas: a membrana externa mitocondrial (MEM) é lisa e permeável, análoga à membrana externa de algumas bactérias, relativamente porosa devido a presença de proteínas semelhantes à porina, o que permite a difusão transmembranar de pequenas moléculas e íons que revestem o espaço citosólico ou intramembranoso; a membrana interna mitocondrial (MIM) possui invaginações, conhecidas como cristas mitocondriais, é impermeável à maior parte de moléculas pequenas e íons, é rica em proteínas. É nesta membrana que se encontram os complexos enzimáticos da cadeia respiratória e também transportadores específicos para várias moléculas (RONCHI, 2010).

O espaço delimitado por essas duas membranas é chamado de espaço intermembranas e é considerado ser equivalente em termos de composição química ao citosol, devido à alta permeabilidade da MEM. Delimitado pela membrana interna está a matriz mitocondrial, com composição química diferente devido a impermeabilidade da MIM, sendo um local de grande atividade metabólica como a β -oxidação (NELSON e COX, 2013).

A mitocôndria também possui seu próprio genoma, uma molécula de DNA circular, e considera-se que cada mitocôndria pode conter de 2 a 10 cópias deste DNA com 16.539 pares de bases nitrogenadas já completamente sequenciadas. Esta molécula é desprovida de intróns e

possui 37 genes codificantes, sendo codificadas 13 proteínas pertencentes ao complexo I, III, IV e V da cadeia transportadora de elétrons (CTE), também conhecido como cadeia respiratória, 2 RNAs ribossomais e 22 RNAs transportadores utilizados na tradução das proteínas mitocondriais (AL-FLEESY, 2017; KANG; KIM; HAMASAKI, 2007).

2.3.1. Cadeia transportadora de Elétrons (CTE)

A CTE também é o local onde ocorre o fluxo de elétrons por uma série de proteínas complexas. Esses elétrons são provenientes da oxidação de fontes de energia mais complexas, como glicose, ácidos graxos e aminoácidos, que geram equivalentes reduzidos, formas de moedas energéticas, pois sua reoxidação pelo O_2 libera grandes quantidades de energia (reação exergônica), e esta energia pode ser utilizada para sintetizar ATP, fenômeno conhecido como fosforilação oxidativa, pois há consumo de O_2 e fosforilação do ADP (PRAT e CORNELLY, 2006; BUSIELLO; SAVARESE; LOMBARDI, 2015).

Para conseguir gerar energia, os elétrons ricos em energia, devem deslocar-se por uma série de complexos proteicos e carreadores de elétrons que inclui pequenas moléculas e grupamentos prostéticos (grupamentos de origem não proteica) de grandes proteínas; neste deslocamento as proteínas bombeiam prótons de dentro para fora da mitocôndria, convertendo a energia do fluxo de elétrons em trabalho útil (Figura 6) (PRAT e CORNELLY, 2006).

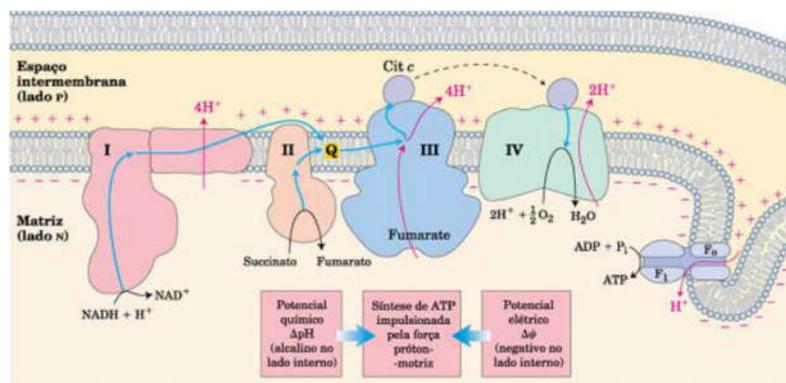


Figura 6. Complexos da Cadeia Transportadora de elétrons. Figura retirada e adaptada de Nelson e Cox (2013).

2.3.2. Complexos I

Os carregadores de elétrons da cadeia respiratória são organizados em complexos supramoleculares inseridos dentro da MIM. O primeiro e maior deste complexo sistema de carreadores de elétrons é o complexo I, também conhecido como NADH: ubiquinona-oxidoreductase ou NADH-desidrogenase, composto por 42 cadeias diferentes de polipeptídeos, incluindo uma flavoproteína contendo mononucleotídeo de flavina (FMN), que funciona como

um grupamento prostético e pelo menos seis centros de ferro-enxofre. Este complexo recebe um par de elétrons do dinucleotídeo de nicotinamida-adenina na sua forma reduzida (NADH), captados pela FMN, que transfere posteriormente estes elétrons, um de cada vez, a um centro redox de ferro enxofre (Fe-S) (PRAT e CORNELLY, 2006). Os elétrons passam por vários destes aglomerados de Fe-S antes de reduzirem a ubiquinona (Q), também chamada de coenzima Q, um carregador de dois elétrons que aceita um elétron de cada vez, conduzindo-os até o complexo III (NELSON e COX, 2013) (Figura 6).

2.3.3. *Complexo II*

O complexo II, também chamado de succinato-desidrogenase, é a única enzima do ciclo do ácido cítrico ligada à membrana interna mitocondrial. Como os outros complexos enzimáticos da CTE, ela contém diversos centros redox. Este complexo fornece equivalentes reduzidos na forma de ubiquinol (QH₂), e também participa do importante sistema de lançadeiras glicerol-3-fosfato, onde elétrons provenientes do NADH citosólico reduzem a Q, formando seu equivalente reduzido, o QH₂. A quantidade de QH₂ também aumenta devido ao aumento da atividade do ciclo do ácido cítrico e da β-oxidação. Este complexo catalisa a seguinte reação: Succinato + Q ↔ Fumarato + QH₂. Note, portanto, que a Q pode ser reduzida no complexo I pelo NADH ou no II através do Flavina-adenina-dinucleotídeo em sua forma reduzida (FADH₂), pois o Flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) em sua forma oxidada faz parte da enzima que catalisa a reação anterior. Contudo, quando os elétrons são provenientes do complexo II, há uma perda estequiométrica da síntese de ATP, pois não temos o bombeamento de prótons. O QH₂ é reoxidado pelo complexo III (PRATT e CORNELLY, 2006; NELSON e COX, 2013).

2.3.4. *Complexo III*

O complexo III também é chamado de ubiquinol: citocromo c oxirredutase, ou citocromo bc₁. Ele recebe os elétrons do carreador de membrana, o QH₂, e transfere esses elétrons para outro carreador de elétrons, o citocromo C. A passagem de elétrons por este complexo é complicada, em parte, devido ao fato que QH₂ deve doar seus dois elétrons, um de cada vez, a centros de Fe-S, e estes centros aceitam apenas um elétron por vez (NELSON e COX 2013).

O complexo III possui 2 citocromos conhecidos como citocromos b, que contém as subunidades de citocromos bl e bh, e o citocromo c₁. Ambos são importantes para o “ciclo Q”, que explica como o complexo III contorna a desproporcionalidade entre o número de elétrons

das reações redox neste local. O ciclo Q (Figura 7) foi proposto para explicar a passagem de um elétron por vez neste complexo. Como este evento é um ciclo, pode-se escolher o local de início, por isso adota-se nessa dissertação como o primeiro estágio, a chegada do QH₂ ao complexo III. Neste momento, o QH₂ doa seus dois elétrons, um para o citocromo c₁ por meio de um centro de Fe-S conhecido como centro Fe-S de Rieske, e outro para o citocromo b, sendo primeiro para a subunidade b_L e depois para b_H. Uma vez completamente oxidado, a Q se desloca para ocupar um local próximo do lado da matriz mitocondrial conhecida como sítio Q. Neste local Q aceita um elétron da subunidade b_H, transformando-se em um íon aniônico (carga negativa), conhecido como semiquinona (QH[•]). Outra molécula de QH₂ chega com seus elétrons, o processo se repete, e a QH[•] é completamente reduzida a QH₂, repetindo-se outro ciclo. Neste estágio o citocromo c recebe um elétron por vez, e os conduz até o complexo IV. Embora a via de elétrons por esse segmento da cadeia respiratória seja complicada, os efeitos resultantes da transferência podem ser simplificados como: QH₂ é oxidado a Q, duas moléculas de citocromo c são reduzidas, e quatro prótons são movidos do lado da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana (Figura 6) (NELSON e COX, 2013; PRATT e CORNELLY, 2006 RONCHI, 2010).

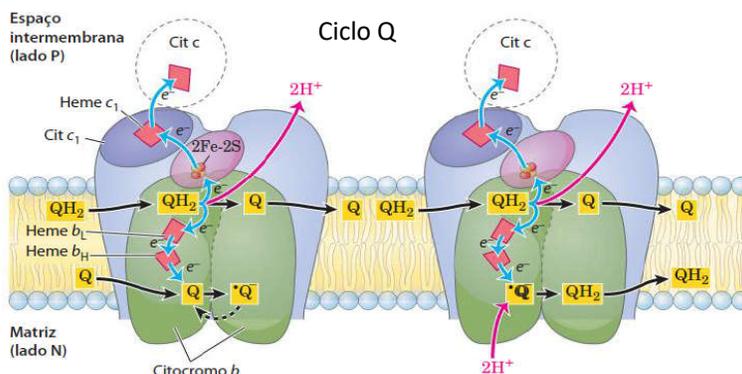


Figura 7. O ciclo Q apresentado em dois estágios. A via de elétrons pelo complexo III é mostrada por setas azuis. O movimento de várias formas de ubiquinona é ilustrado com setas pretas. No primeiro estágio (à esquerda), Q no lado N é reduzida ao radical semiquinona, que retorna à sua posição para aceitar outro elétron. No segundo estágio (à direita), o radical semiquinona é convertido a QH₂. Enquanto isto, no lado P da membrana, duas moléculas de QH₂ são oxidadas a Q, liberando dois prótons por molécula de Q (quatro prótons ao todo) para o espaço intermembrana. Cada QH₂ doa um elétron (por meio do centro de Fe-S de Rieske) para o citocromo c₁ e um elétron (via citocromo b) para a molécula de Q próxima ao lado do matiz mitocondrial (n). Figura retirada e adaptada de Nelson e Cox (2013).

2.3.5. Complexo IV

O complexo IV, também chamado de citocromo c-oxidase, transfere elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, portanto, este complexo é o último que entra em contato

com os elétrons derivados da oxidação de alimentos metabólicos, reduzindo O_2 a água (H_2O). Este complexo possui 13 subunidades contendo centros hemo e íons cobre, onde os elétrons seguem um fluxo rumo ao aceptor final de elétrons, o O_2 . Esta reação produz $2H_2O$ a partir de quatro elétrons utilizados. Esta redução do O_2 por quatro elétrons envolve centros redox que carregam apenas um elétron por vez, os intermediários dessa reação permanecem fortemente ligados aos complexos, até serem completamente convertidos em água.

2.3.6. *ATP-sintase*

Esse grande complexo enzimático da membrana mitocondrial interna catalisa a formação de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Pi), impulsionada pelo fluxo de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial. Este complexo também é chamado de complexo V ou F1-Fo-ATPase, e é constituído por 10-15 subunidades distintas. A subunidade F1, periférica de membrana, e Fo (“o” indica sensível à oligomicina), integral à membrana. A maioria do ATP celular nos eucariotas é sintetizada por estas duas subunidades durante a fosforilação oxidativa (NAVARRO; BOVERIS, 2007; NELSON e COX, 2013).

Em condições fisiológicas, a produção de energia mitocondrial pode alternar entre dois estados de energia: basicamente, o estado 4, caracterizado por uma respiração lenta e em que há baixa produção de ATP (potencial elétrico elevado), enquanto que o estado 3 é caracterizado por uma respiração rápida com elevada produção de ATP (BENARD; ROSSIGNOL, 2008).

2.4. Teoria Quimiosmótica

De acordo com Mitchell (1961), a atividade de translocação de prótons dos complexos transportadores de elétrons gera um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial. Os prótons não podem retornar para a matriz mitocondrial pois esta é impermeável, evento que gera um gradiente de força chamado gradiente próton-motriz ou força próton-motiva, que pode impulsionar a atividade da ATP sintase. Isto é possível, pois o aumento da concentração de prótons no espaço intermembrana tem uma energia associada de forma a reestabelecer o equilíbrio das concentrações de prótons. Esta força apresenta tanto uma explicação química, como a relatada anteriormente, como uma explicação de carga elétrica, pois os prótons também são atraídos pelas cargas negativas do lado da matriz mitocondrial; por esta razão este gradiente é conhecido como gradiente eletroquímico. Este potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial interna é de aproximadamente -220 mV, que fornece energia para a atividade da ATP sintase, elo de ligação entre a energia próton-motriz proveniente da oxidação de substratos e fosforilação do ADP para ATP (PRATT e CORNELLY, 2006; RONCHI, 2010).

Os valores experimentais atuais para o número de prótons bombeados para o espaço intermembrana são de 10 para NADH e 6 para FADH₂. Valores requeridos de prótons para possibilitar a síntese de uma molécula de ATP é 4. Desta forma, a estequiometria mais aceita (ou razão P/O) para a síntese de ATP com base em prótons é 2,5 ATPs para NADH como doador de elétrons e 1,5 para FADH₂, em sistemas onde o retorno de prótons é acoplado a síntese de ATP. Ocasionalmente estes prótons podem retornar para a matriz mitocondrial por outros canais, sendo este estado descrito como “respiração oxidativa desacoplada da síntese de ATP” (figura 8). Uma das principais proteínas que medeiam este processo são as proteínas desacopladoras de ATP, as UCPs (NELSON e COX, 2013).

2.5. Proteínas desacopladoras de ATP (UCPs)

As UCPs pertencem a família de transportadores de íons mitocondriais. A primeira desta série de proteínas (UCP-1) foi descoberta na década de setenta por Ricquier e Kader (1976). Neste trabalho pioneiro os autores tinham conhecimento que expor animais ao frio aumentava a massa mitocondrial do tecido adiposo marrom (TAM). Além disso, eles observaram aumento no conteúdo proteico dessas mitocôndrias com concomitante aumento da MIM. Ao comparar animais expostos ao frio (6°C) com animais controle (22°C), e analisar o conteúdo das proteínas mitocondriais por eletroforese, eles observaram aumento de um polipeptídeo com peso molecular de aproximadamente 32,000 daltons. O mecanismo adaptativo desta intervenção refere-se ao processo termogênico de dissipação de calor, resultante do desacoplamento da síntese de ATP através do vazamento de prótons na membrana mitocondrial interna, conhecido como termogênese sem tremor (BUSIELLO; SAVARESE; LOMBARDI, 2015; RICQUIER; KADER, 1976).

Como a quantidade de TAM é limitada em humanos adultos, a investigação de proteínas homologas a UCP-1 em outros tecidos aumentou. Mais de 20 anos se passaram, e finalmente no final da década de 90, este intento foi alcançado por um grupo de pesquisadores liderados por Gimeno et al. (1997), que na época chamaram esta proteína de UCPH (H de homóloga), encontrada no tecido adiposo branco e músculo esquelético. Os autores também tinham evidências que está UCPH diminuía o potencial da MIM, sugerindo que esta proteína também desacoplava a respiração oxidativa da síntese de ATP.

Este fluxo de elétrons com concomitante redução do O₂, permite que a oxidação do substrato continue sem fornecer a força próton-motriz necessária para a síntese acoplada de ATP. Este mesmo efeito é conseguido com desacopladores químicos artificiais, sendo o mais

utilizado em experimentos o FCCP (Carbonil cianeto de p-trifluorometoxifenil-hidrazona) (BRAND, 2000; BRAND et al., 2005; ROSSINI, 2016).

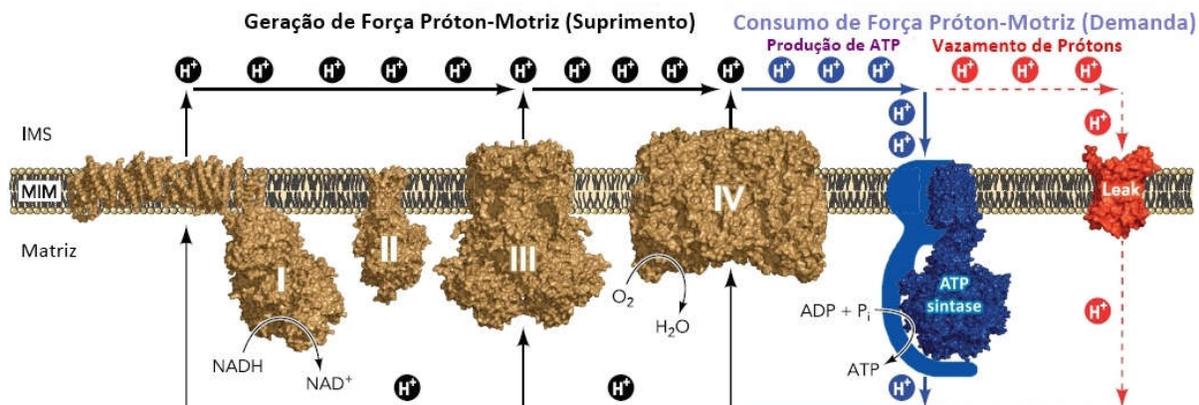


Figura 8. Esquema de geração e consumo da força próton-motriz mitocondrial. Elétrons são arrancados de substratos oxidáveis e são entregues a cadeia respiratória em um processo exergônico que impulsiona o bombeamento de prótons por vias respiratórias (consumem O₂). Este gradiente de prótons eletroquímico resultante pode ser dissipado de duas maneiras: 1) através da síntese de ATP, ou via o vazamento de prótons, que não gera ATP, mas é capaz de regular processos fisiológicos, incluindo a termogênese sem tremores. As vias de fuga de prótons são estruturalmente representadas pela transportador de nucleotídeo de adenina ou proteínas desacopladoras (UCPs). Figura retirada e adaptada de Divakaruni e Brand (2010).

Para evitar confusão, deve-se distinguir a existência de dois tipos de vazamento de prótons, um basal e outro que pode ser induzido, como a exposição ao frio. A condutância de prótons basal se dá em pequena quantidade pelo retorno dos elétrons para a matriz mitocondrial diretamente através da MIM, mas esta porcentagem é de aproximadamente 5% (FONSLOW et al., 2013). A maior taxa do vazamento de prótons basal é atribuída a quantidade, mas não a atividade do transportador de nucleotídeo de adenina, a ANT (do inglês, *adenine nucleotide translocase*) (DIVAKARUNI; BRAND, 2011). Já a condutância de prótons induzida é controlada principalmente pelas UCPs, e sua atividade pode ser controlada em diversos níveis moleculares (EROs, substrato energético, hormonal), ou por fatores transcricionais, de tradução e proteólise (FONSLOW et al., 2013).

Estima-se que o vazamento de prótons contribui com ~ 25% da taxa metabólica basal, mostrando ser este um processo altamente dispendioso para a célula. Visto o alto custo energético deste sistema de vazamento de prótons, especula-se que sua função deva ser extremamente importante, sendo a proteção contra degeneração celular a mais significativa (BRAND, 2000; ESTEVES; BRAND, 2005).

2.5.1. Regulação da expressão e atividade das UCPs

Os modelos que melhor explicam a concentração e atividade das UCPs são construídos através de pesquisas com a UCP-1, portanto, esta será utilizada como base para este subitem. Como foi discutido no subitem anterior, exposição ao frio aumenta o conteúdo e atividade da UCP-1. Uma explicação para este fenômeno é uma maior atividade simpática, através da liberação de catecolaminas dos nervos simpáticos que inervam o TAM, e se ligam a receptores β_3 adrenérgicos, estimulando o aumento da atividade do segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP). Isto aumenta a atividade da proteína quinase dependente de AMP-cíclico (PKA), que acelera vias catabólicas como a lipólise, levando ao aumento da atividade das UCPs. Paralelamente, o cAMP também aumenta a atividade de regiões gênicas responsivas ao cAMP, como o Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomos (PPAR, do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor*) e região de ligação do hormônio receptor da tireoide; ambos aumentam a transcrição das UCPs (KOZAK et al., 1994; MAZZATTI et al., 2008). A resposta adrenérgica, portanto, regula níveis de ativação molecular e expressão proteica da UCP-1 (Figura 9) (DIVAKARUNI; BRAND, 2011).

Com relação a atividade da UCP-1, trabalho clássico de Nicholls (1970) já mostrava que a taxa de vazamento de prótons era dependente de controle molecular, sendo estimulada por ácidos graxos (AG) e inibida por albumina e nucleotídeos de purina, como a guanina difosfato (GDP) (NICHOLLS, 1976). A forma como os nucleotídeos de purina inibem as UCPs não são bem esclarecidas (AFFOURTIT, 2007).

A partir desses experimentos, alguns modelos propositivos foram criados para explicar estes acontecimentos. No primeiro modelo, os AG atuam como cofatores das UCPs, seu grupamento terminal carboxílico negativo atuaria como um carreador de prótons, que por ser positivo seria atraído por esta carga negativa. Em um segundo modelo, o transporte se daria pela atividade halogênica da UCP e transporte de cátion pela ANT, via protonação no espaço intermembrana e desprotonação do AG na matriz mitocondrial. O terceiro modelo refere-se a uma possível ligação alósterica do AG na UCP para sobrepor a inibição de GDP (Figura 9) (DIVAKARUNI; BRAND, 2011).

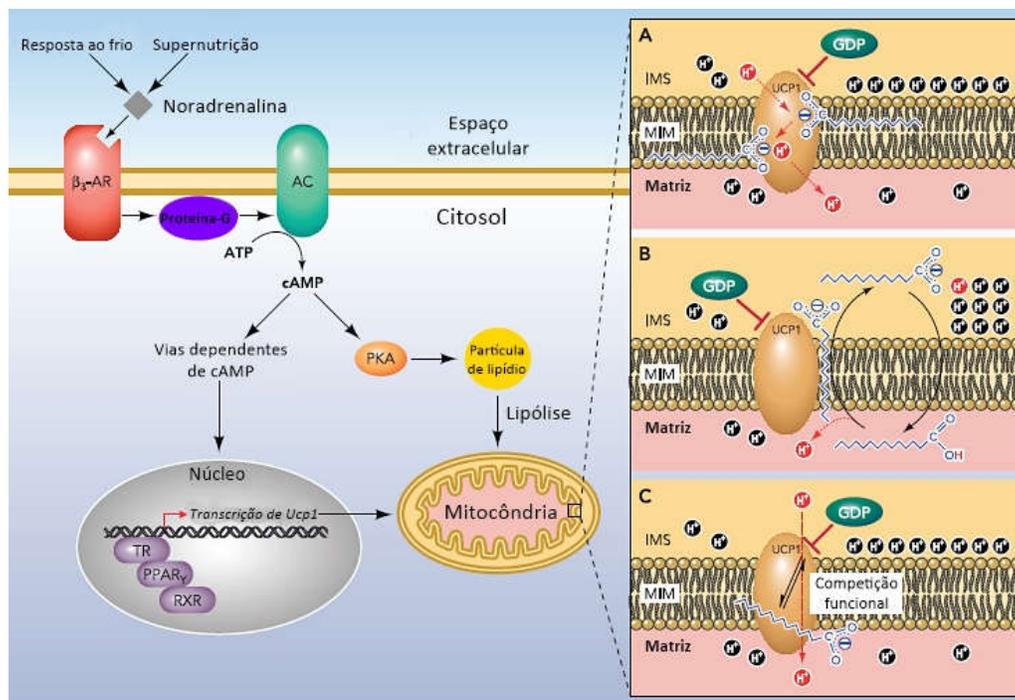


Figura 9. Regulação da abundância e atividade da UCP1 no tecido adiposo marrom. Adaptada divakaruni, 2010. A estimulação noradrenérgica dos receptores β_3 -adrenérgicos desencadeia vias responsivas ao AMPc que agem de duas formas: 1) aumentando a transcrição da UCP1 e 2) iniciar a lipólise dependente de PKA para libertar ácidos graxos que ativam a UCP1. Três modelos procuram explicar este mecanismo A: UCP1-catalisa a condutância de prótons incorporando seus grupos carboxílicos no núcleo da UCP1, para fornecer os grupos funcionais necessários para o transporte de prótons. B: os ânions de ácidos graxos são protonados no espaço intermembrana e desprotonados na matriz mitocondrial, levando ao fluxo de prótons. C: ácidos graxos não são necessários utilizados diretamente para a condutância de prótons, mas superam a inibição fisiológica de nucleotídeos, induzindo alostericamente uma alteração física na UCP1. Receptor 3-AR, β_3 -adrenérgico; AC, adenilil ciclase; PKA, dependente de AMP cíclico proteína quinase A; PPAR, receptor ativado por proliferador de peroxissoma; TR, receptor de hormona tireóide; RXR, receptor do ácido 9-cis retinóico; IMS, intermembrana espaço; MIM, membrana interna mitocondrial.

2.5.2. Funções da UCP-3

UCP-3 é a única proteína desacopladora expressa no músculo esquelético. Visto que o músculo esquelético é um grande tecido corporal, essas proteínas tornaram-se candidatas a agirem de forma análoga as UCP-1 no TAM. Entretanto, não houve confirmação destas expectativas. Ratos com genes silenciados para UCP-3 não são obesos, são normofágicos, não são sensíveis a exposição ao frio, e possuem gasto energético normal comparado a população normal (HARPER; HIMMS-HAGEN, 2001). Contrariando a visão de conservação de energia, jejum aumenta sua expressão, o que é paradoxal, pois este é um ciclo fútil de energia (AFFOURTIT, 2007). Parece que as UCP-3 não contribuem para o metabolismo basal ou termogênese de exposição ao frio. No entanto, sob certas condições, como por exemplo no tratamento com metilendioximetanfetamina (MDMA, popularmente *ecstasy*), a ativação das UCP-3 pode contribuir significativamente para a termogênese (MILLS et al., 2003).

Entretanto, a função primária mais aceita atualmente para a função das UCP-3 é a atenuação de formação de EROs, principalmente durante a oxidação de AG. Outro ponto seria a exportação do excesso de AG da mitocôndria em quadros em que este substrato energético esteja alto (SIMOPOULOS, 2010). As UCP-3 medeiam o vazamento de prótons induzidas por ácidos graxos, da mesma forma que as UCP-1, entretanto, elas também aumentam sua atividade estimuladas por produtos de EROs como o 4-hidroxinonenal (4-HNE), produto da peroxidação lipídica, reduzindo a sua formação; este pode ser um mecanismo para reduzir EROs (AFFOURTIT, 2007; ECHTAY et al., 2002).

Corroborando este raciocínio protetor contra estresse oxidativo, evidências surgiram através da manipulação genética de ratos (BRAND, 2000). Animais modificados geneticamente para ANT tiveram um aumento dos níveis de EROs em mitocôndrias do músculo esquelético, coração e cérebro. Os autores argumentam que o aumento do estresse oxidativo observado nestas condições pode ser devido ao aumento da diferença do potencial eletroquímico entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial, em virtude da falta de ADP para ativar a ATP-sintase, o que gera acúmulo de prótons no espaço intermembrana, com conseqüente aumento de EROs (ESPOSITO et al., 1999).

Em outro estudo, Brand et al. (2002) utilizaram dois modelos animais, e analisaram respostas de danos oxidativos na musculatura esquelética posterior da pata traseira, em um grupo que superexpressava UCP-3 e outro com deficiência desta proteína. Seus resultados mostraram que animais com pouca UCP-3 tiveram aumento do estresse oxidativo com relação ao grupo controle, o que já era esperado. Contudo os animais com aumento dos níveis de UCP-3 não tiveram redução do dano oxidativo em relação ao grupo controle. Os autores sugeriram que níveis acima do desacoplamento médio *in vivo* não oferecem vantagens contra danos oxidativos, o que refutou a hipótese inicial. Em outro estudo, Miwa e Brand (2003), encontraram que uma pequena redução do potencial de membrana mitocondrial em moscas drosófilas reduzem em 70% a formação de EROs no complexo I.

As famílias da UCP-3 são codificadas em uma área gênica conhecida como cromossomo 11q13 (porção distal), o que significa que a região gênica que codifica esta proteína está localizada no cromossomo 11 humano, no braço q (longo), na região 1 e banda 3 (SOLANES et al., 1997) (Figura 10). Estudos sugerem que variação genética nesta região pode estar envolvida com mecanismos que aumentam níveis séricos de lipídios e índices de obesidade abdominal, contribuindo desta forma para alterações metabólicas observadas na obesidade, diabetes mellitus tipo II, na ovariectomia e menopausa (LEITE et al., 2009; SALOPURO et al., 2009; SOLORZANO, 1997).

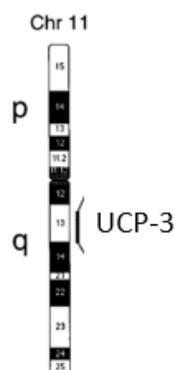


Figura 10. Localização cromossomal para UCP-3. *Figura retirada e adaptada de Solanes (1997).*

2.6. Exercício Físico, Menopausa, Sarcopenia e Mitocôndria

Antes de se iniciar a descrição sobre exercício físico, é de suma importância que alguns termos chaves sejam definidos. O termo atividade física é definido como um movimento corporal que é produzido pela contração do músculo esquelético que eleva substancialmente o dispêndio energético. Já o exercício físico, é definido como movimento corporal planejado, estruturado e repetitivo, que é praticado com o intuito de melhorar ou manter um ou mais componentes da aptidão física (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2007).

A maioria dos protocolos de grandes institutos preconizam ou recomendam níveis de atividade física (entenda como exercício físico) de atividade aeróbia moderada de no mínimo 30 minutos com frequência de 5 vezes na semana, ou atividade aeróbia com intensidade vigorosa por no mínimo 20 minutos com frequência de 3 vezes na semana, para manutenção e melhora da saúde para a população em geral (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2007; CHURCH et al., 2007). A intensidade destas atividades deve estar relacionada com algum equivalente fisiológico, como frequência cardíaca, equivalente metabólico da tarefa (MET, do inglês *Metabolic Equivalent of Task*), percentual da máxima captação de O₂, ou com relação a algum parâmetro da tarefa motora como velocidade, tempo, etc.

Apesar dos benefícios do exercício físico serem bastante investigados na população saudável, não é claro seus efeitos na fase pós-menopausa (DINIZ et al., 2017). Com o intuito de investigar melhor os efeitos dose-reposta do exercício físico aeróbio em um grupo heterogêneo de mulheres, foi encontrado um forte efeito dose-resposta nas mulheres pós-menopausa com melhora da captação e utilização de O₂. Esses resultados mostram que mulheres nesta fase são responsivas as adaptações do treinamento (CHURCH et al., 2007). Em um

elegante estudo longitudinal, Kemmler et al. (2007) analisaram os efeitos de um longo período (4 anos) de exercício combinado (aeróbico e resistido) em fatores de risco de doenças coronarianas, osteoporose e parâmetros de capacidade física em mulheres na pós-menopausa. Os autores acharam melhoras no grupo exercitado no perfil lipídico, redução da massa gorda e circunferência de cintura. Além disso houve aumento em parâmetros de força no grupo exercitado.

Com relação a força muscular, outro estudo longitudinal de Botero et al. (2013), investigou o efeito do treinamento resistido (TR) nesta variável. Além deste aspecto, os autores investigaram efeito do TR na composição corporal, níveis plasmáticos de resistina e leptina. Seus resultados mostraram aumento da força e da massa muscular magra após 12 meses de treinamento com concomitante redução da massa corporal, massa gorda, níveis de resistina e leptina. Muitos benefícios do exercício físico são pensados ocorrerem em níveis subcelulares, principalmente em vias de sinalização que envolvem fatores hormonais, transdução de sinais e melhora da função mitocondrial (GONZALEZ et al., 2016).

Como vimos na revisão acima no subtópico sarcopenia e mitocôndria, um desbalanço na produção de EROs pode levar a um quadro de sarcopenia. Estudos mostraram que a superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), uma enzima relacionada com a defesa antioxidante, aumenta sua atividade com o exercício físico de uma maneira dose-resposta relacionada a intensidade, assim como a glutatona oxidase também aumenta a atividade em resposta ao exercício aeróbico (BO et al., 2013). Entretanto, algumas questões com relação a este assunto ainda são questionáveis, como por exemplo, o aumento da produção de EROs durante o exercício, pode estar envolvido no benefício à saúde (BO et al., 2013).

Estas investigações clássicas focam a problemática em etapas pós formação de EROs, com análise de enzimas antioxidantes, enquanto menor número de trabalhos investigaram o efeito preventivo na formação destes elementos, um passo que estaria antes da defesa, como a redução do potencial de membrana mitocondrial que promove menor formação de EROS, efeito que pode ser exercido pelas UCPs (BRAND, 2016). Na busca de um melhor entendimento da resposta das UCPs frente ao exercício, Pederson et al. (2001) encontraram aumento dos níveis da expressão de transcrição de RNAm para UCP-3 após estimulação elétrica *in vitro*. Outros autores encontraram resultados similares de aumento na expressão de UCP-3 em humanos após 5 dias de intervenção de exercício, sendo o resultado mais significativo com a coleta realizada 1 hora após o final (PILEGAARD et al., 2011).

O TR também foi capaz de prevenir sarcopenia e melhorar a função mitocondrial em ratas OVX em relação ao grupo sedentário (ROSSINI, 2016). Com relação a expressão de UCP-

3, poucos estudos avaliaram a relação das UCPs, TR e menopausa/OVX. Um estudo de Nagai et al. (2016) investigou a expressão de RNAm de UCP-3 em um protocolo de treinamento aeróbio em ratas OVX, e encontrou aumento de seus valores no grupo OVX sem reposição hormonal, quadro que foi revertido pela reposição hormonal. Em outro estudo realizado por Jeong e Yoon (2012), foi investigado se o treinamento de natação era capaz de atenuar o ganho de massa corporal induzido em ratas OVX. Além deste aspecto, os autores investigaram os possíveis mecanismos subjacentes deste resultado através da análise da UCP-3. Os autores concluíram que a natação foi capaz de prevenir o ganho de peso, e que este efeito pode ser, ao menos em parte, atribuído ao aumento da expressão de RNAm de UCP-3 no músculo esquelético gastrocnêmio do grupo treinado, sendo que no grupo OVX sedentário não houve aumento. Não é de nosso conhecimento estudos que investigaram a relação que existe entre TR na atividade mitocondrial da UCP-3 em modelos OVX.

2.7. Treinamento Resistido (TR)

O TR é amplamente utilizado como uma importante ferramenta para o aumento de força e massa muscular. A procura por sua prática tem diversos objetivos, como melhorar a saúde e condicionamento físico, reabilitação após lesões, melhoras estéticas, ou apenas pelo prazer do exercício (FRY, 2004; CREWETHER et al., 2006). Atualmente, a recomendação de TR tornou-se um alicerce em programas que preconizam essas melhoras (KRAEMER et al., 2002; KRAEMER; FRAGALA, 2006; ACSM 2009; GARBER et al., 2011).

Este tipo de treinamento enfatiza ações musculares dinâmicas envolvendo ações musculares concêntricas (encurtamento) e excêntricas (alongamento), executadas através de diversas articulações ou apenas uma (GARBER et al., 2011). Com relação a carga de treino, devemos lembrar que este termo refere-se a solicitação funcional global imposta ao organismo pelos estímulos de treino (intensidade, volume, densidade, frequência), provocando desvios no estado funcional de diferentes sistemas e órgãos, gerando adaptações agudas e crônicas (DANTAS et al., 2011).

Hipertrofia muscular pode ser definida como um aumento no tamanho do sarcômero ou miofibrilas musculares, que resultam em aumento da área de secção transversa do músculo, devido a um maior acúmulo de proteínas contráteis no interior da fibra muscular, que também conduz a um aumento da força (TOIGO; BOUTELLIER, 2006; TRICOLI, 2014). Estes resultados são atingidos através da transdução de sinal mecano-química em respostas moleculares e celulares específicas a demanda imposta pela tarefa da atividade (TOIGO; BOUTELLIER, 2006). Essas vias moleculares e celulares envolvem mecanismos complexos

de transdução de sinais e interações que envolvem controle pós-transcricional através da fosforilação de enzimas alvos (GONZALEZ et al., 2016).

O aumento de massa muscular alcançado neste tipo de treinamento é de interesse imprescindível para saúde, sendo capaz de promover redução de gordura corporal, aumento da taxa metabólica basal, redução da pressão arterial, melhora do perfil lipídico, melhora da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, redução da sarcopenia e do câncer de colo e manutenção da capacidade funcional (KRAEMER et al., 2002; GARBER et al., 2011). Particularmente, o aumento de força muscular é uma poderosa ferramenta para prevenir, reduzir e até mesmo reverter a perda de massa óssea, quadro comum na pós-menopausa (GARBER et al., 2011).

Em modelos animais, muitos protocolos de TR foram adaptados do estudo clássico de Hornberger e Farrar (2004), que mimetizou adaptações fisiológicas observada em TR em humanos, em um modelo translacional para animais. Estudos anteriores utilizando este método translacional concluíram que o TR foi capaz de aumentar a área do músculo sóleo (PRESTES et al., 2011), reduzir o conteúdo de lipídios no fígado, músculos e depósitos de gordura visceral (LEITE et al., 2009), reestabelecer a atividade de proteínas da matriz celular de músculos da pata traseira e do tendão do calcâneo (PRESTES et al., 2009; PEREIRA *et al.*, 2010), aumentar marcadores da biogênese mitocondrial (BARBOSA et al., 2016) e prevenir disfunção mitocondrial (ROSSINI, 2016).

3. HIPÓTESE

Nossa hipótese principal está direcionada para a disfunção da cadeia respiratória mitocondrial do músculo esquelético promovida pela ovariectomia, e a consequente relação da sarcopenia como um distúrbio bioenergético mitocondrial. Somando-se a hipótese principal, hipotetizamos também que a sarcopenia observada na menopausa e/ou ovariectomia pode estar relacionada com alterações na expressão gênica da UCP-3 (KANG et al., 2017; MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013), fator que também pode influenciar direta e negativamente o funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial e a eficiência energética.

Como hipótese adjuvante ao modelo de estudo proposto (ovariectomia mimetizando a menopausa), espera-se que a intervenção proposta (Treinamento Resistido) seja um agente eficaz na prevenção da disfunção mitocondrial, agindo tanto na bioenergética mitocondrial como na expressão gênica da UCP-3.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem como principal objetivo investigar os efeitos da ovariectomia e da intervenção do TR no funcionamento dos complexos da cadeia transportadora de elétrons durante a respiração acoplada e a respiração desacoplada.

4.2. Objetivos Específicos

Investigar os efeitos da ovariectomia e do TR no modelo animal sobre:

- a) Análise e comparação do funcionamento dos complexos da cadeia transportadora de elétrons em ensaios respiratórios acoplados (função mitocondrial fisiológica) no músculo sóleo (predomínio oxidativo) e na porção branca do músculo gastrocnêmio (predomínio glicolítico);
- b) Análise e comparação do funcionamento dos complexos da cadeia transportadora de elétrons em ensaios respiratórios desacoplados no músculo sóleo (predomínio oxidativo) e na porção branca do músculo gastrocnêmio (predomínio glicolítico);
- c) Analisar o efeito sobre a expressão gênica da UCP-3 no músculo sóleo (predomínio oxidativo) e na porção branca do músculo gastrocnêmio (predomínio glicolítico).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais e Condições experimentais

Foram utilizadas 40 ratas Wistar adultas (*ratus albinus norvegicus*), obtidas do CEMIB - UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratas/gaiola) no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício, do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) – UFSCar, sob condições constantes de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade e iluminação em ciclo invertido (18:30-6:30h: claro; 6:30-18:30h: escuro) e com oferta de água e dieta *ad libitum*. Todos os animais, após chegada ao biotério, permaneceram por três semanas em condição de aclimação ao biotério e ao ciclo invertido. Após este período, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais.

O presente estudo apresentou aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP sob protocolo CEMIB número 2534-1/2011, sendo conduzido de acordo com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América (NATIONAL RESEARCH COUNCIL'S, 2011).

5.2. Grupos Experimentais

Os animais foram randomicamente distribuídos em quatro grupos experimentais, a saber: 1) Sham Sedentário (ShamSed), Sham Treinamento Resistido (ShamTR), Ovariectomizado Sedentário (OVXSed) e Ovariectomizado Treinamento Resistido (OVXTR) (Figura 11).

Grupos Sedentários: As ratas dos grupos sedentário foram mantidas em suas gaiolas por 22 semanas sem realizar nenhum exercício. Grupos Treinados: Os grupos treinados realizaram 22 semanas de treinamento resistido. O treinamento começou no mesmo período para ambos os grupos.

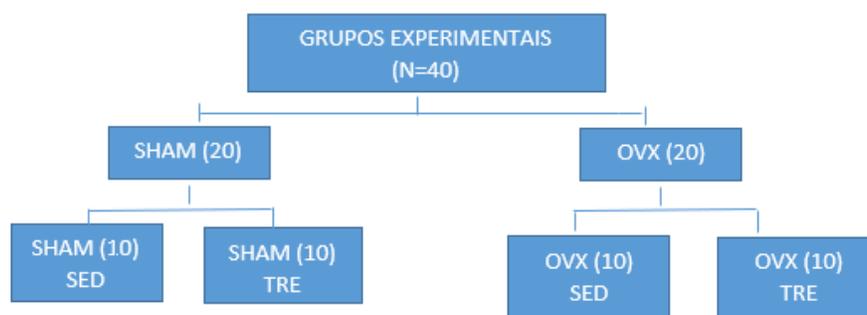


Figura 11. Organograma dos grupos experimentais. Sham: ratas intactas; OVX: ratas ovariectomizadas; SED: grupo sedentário; TR: grupo treinado.

5.3. Protocolo de Treinamento Resistido (TR)

O protocolo de TR é adaptado de Hornerberg e Farrar (2004), de acordo com as necessidades do presente estudo. Inicialmente as ratas foram familiarizadas ao protocolo de TR conforme descrito por Prestes et al. (2009). Para a realização do protocolo de treinamento, foi utilizada uma escada vertical (110cm x 18cm, degrau de 2cm e 80° de inclinação) que possui uma gaiola (20 x 20 x 20cm) em sua altura final (Figura 12A). Após completar 15 semanas de idade e três sessões de familiarização, a primeira escalada foi realizada com uma carga de 75% da massa corporal do animal através de pesos colocado em um aparato constituído por tubos *falcon* unidos por barbante (Figura 12B) e acoplados na porção proximal da cauda do animal com a utilização de uma fita adesiva (Figura 12C). Após 2 minutos de recuperação, a segunda escalada foi realizada com a adição de um peso de 30g. Este acréscimo de carga (+ 30g) foi repetido consecutivamente (no máximo 4 acréscimos) em cada escalada, até uma carga com a qual a rata não conseguiu escalar toda a escada após três estímulos manuais consecutivos. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a Capacidade Máxima de Carregamento (CMC) da rata (Figura 13). A determinação da CMC foi realizada uma vez por semana, sempre na segunda sessão da semana e as sessões do TR consistiram de 5 escaladas, com 65%, 70%, 75%, 80% e 85% da CMC do animal com intervalo de 60" entre cada escalada e ocorreu com periodicidade semanal de duas vezes por semana, sendo a determinação da CMC considerada uma sessão de treino. Foi dado um intervalo mínimo de 48 horas (tabela 1) entre cada sessão de treino. Esta padronização de sessões de treinamento foi realizada durante 22 semanas, totalizando 66 sessões de TR.

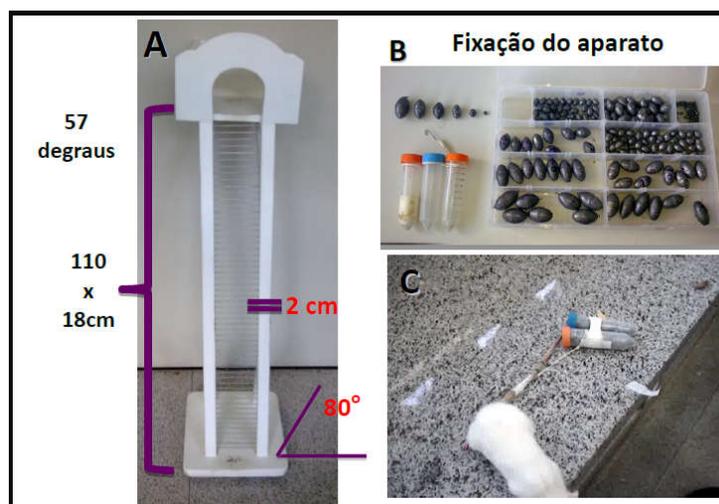


Figura 52. Equipamentos utilizados para o treinamento resistido. A) Escada utilizada para a escalada com 57 degraus; B) Pesos utilizados com carga em tubos falcon; C) Fixação do aparato contendo pesos à cauda do animal.

GRUPOS	SEGUNDA	TERÇA	QUARTA	QUINTA	SEXTA	SÁBADO
OVXTR	ADAPTAÇÃO	X	ADAPTAÇÃO	X	ADAPTAÇÃO	X
	SESSÃO TREINO	X	CMC	X	SESSÃO TREINO	X
ShamTR	ADAPTAÇÃO	X	ADAPTAÇÃO	X	ADAPTAÇÃO	X
	SESSÃO TREINO	X	CMC	X	SESSÃO TREINO	X

Tabela 1. Cronograma de Treinamento Resistido. Adaptação: Três primeiras sessões de familiarização dos grupos ShamTR e OVXTR; CMC: carga máxima de carregamento, realizada na segunda sessão de treinamento de cada semana; x: período de recuperação das ratas.

5.4. Desenho experimental

Abaixo um resumo do desenho experimental desse estudo desde a chegada das ratas ao biotério até o momento do sacrifício, representado pela Figura 14.

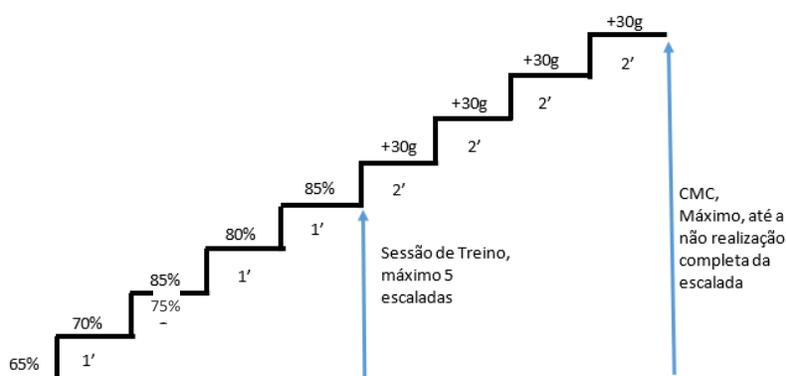


Figura 6. Apresentação esquemática das cargas de carregamento por sessão de treinamento e por sessão de CMC.

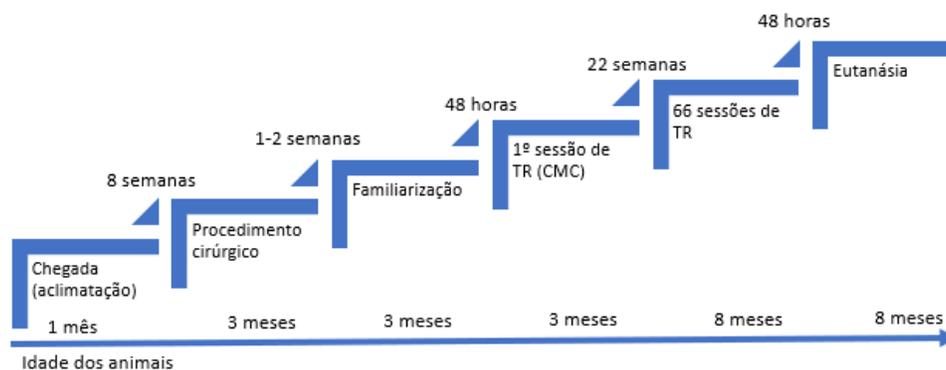


Figura 74. Delineamento experimental. Linha do tempo dos procedimentos realizados. CMC: Carga máxima de carregamento; TR: Treinamento resistido; OVX: Animal ovariectomizado.

5.5. Ovariectomia e Sham

As ratas dos grupos Ovx foram submetidas à cirurgia para a retirada dos ovários na 13^a semana de vida segundo o modelo proposto por Kalu (1991). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados posteriormente a anestesia das ratas com uma associação de 13mg/Kg de xilazina e 33mg/Kg de ketamina base, via intraperitoneal. O TR foi iniciado após 2 semanas dos procedimentos cirúrgicos. Os animais Sham não sofreram procedimento cirúrgico.

5.6. Eutanásia Dos Animais e Coleta Dos Tecidos

Os animais foram eutanasiados após 48h da última sessão de treinamento resistido. A eutanásia ocorreu por decapitação sob efeito anestésico leve. Imediatamente após a decapitação, foi realizada a retirada dos músculos gastrocnêmio e sóleo da pata traseira direita para as análises respiratórias mitocondriais; em seguida, os músculos gastrocnêmio e sóleo da pata traseira esquerda foram retirados, pesados e congelados em nitrogênio líquido, para subsequente armazenamento em freezer -80°C, ou tratados conforme metodologia específica de análise.

5.7. Extração do RNA total e controle de qualidade

Inicialmente o tecido muscular foi lisado com Trizol (1mL para cada 100mg de tecido) com homogeneizador Power Gen 1000. O RNA total foi extraído de acordo com o método descrito pelo fabricante, quantificado por leitura (260nm) e realizada espectrofotometria para verificar o grau de pureza. Todas as amostras utilizadas obtiveram a razão 260nm/280nm acima de 1,8. A integridade do RNA foi visualizada com brometo de etídeo por eletroforese em gel de agarose (Figura 15).

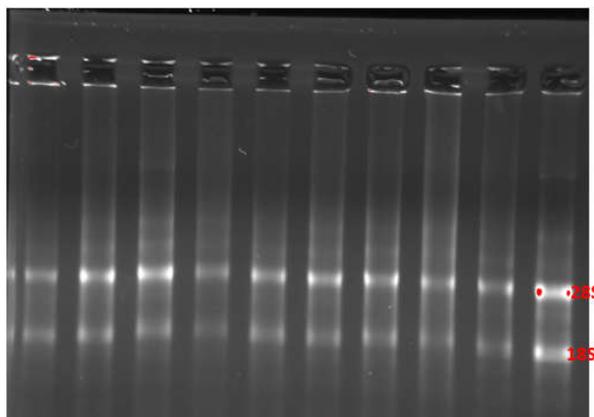


Figura 85. Exemplo de Gel de RNAs, visualizar a integridade das bandas ribossômicas 18S e 28S (acervo do próprio autor).

5.7.1. Tratamento com DNase e transcrição reversa

Para remover contaminações, 2µg de RNA total de cada amostra foram tratados com Dnase I, *Amplification Grade* seguindo as orientações do fabricante. O RNA total tratado foi reversamente transcrito em DNA complementar (cDNA) usando a seguinte mistura de reagentes: tampão, dNTP em H₂O-DEPC e enzima transcriptase reversa de acordo com o método descrito pelo fabricante. O cDNA obtido foi armazenado a -80°C para posterior realização da reação de polimerização em cadeia (PCR) em tempo real.

5.7.2. PCR em tempo Real

A quantificação do RNAm UCP-3 das amostras de todos os grupos experimentais foi realizada em duplicata no sistema de detecção RT-PCR, utilizando o aparelho CFX 96 (*Bio-Rad, San Francisco, USA*) a partir de aproximadamente 20ng de cDNAe o reagente SYBR Green como marcador fluorescente. As condições do PCR em tempo real foram previamente estabelecidas. Foi utilizado o *primer* apropriado listado na tabela 2. O programa de ciclos térmicos utilizado foi 95°C durante 30 segundos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 30 segundos a 60,2 (temperatura específica de anelamento) e 72° durante 30 segundos.

Tabela 2 Primer utilizado para amplificação do gene UCP-3 por qRT-PCR

Gene	Sence Primer (5'-3')	Antisence Primer (5'-3')	NCBI RefSeq
UCP-3	CTTCTACAAAGGATTCATGCC	TGTTCAAATGGAGATTCCC	NM_013167

A especificidade dos produtos da amplificação foi confirmada tanto pela formação de apenas 1 pico da curva de *Melting* (Figura 16b), quanto pela amplificação de apenas uma banda de tamanho específico do produto de PCR visualizada em gel de agarose a 2%. Como gene constitutivo foi utilizado GAPDH, que se mostrou estável nos testes de padronização (Figura 16a).

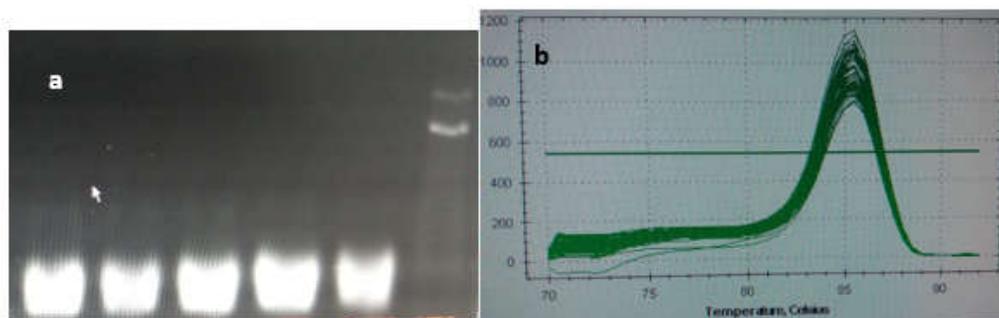


Figura 96. Validação da amplificação específica para o produto de PCR em curva de *Melting* e em gel de agarose. Validação da amplificação específica para o produto de PCR (a: apenas um pico da curva de melting); (b) Exemplo de confirmação de amplificação das amostras do produto do qPCR aplicadas no gel de agarose, identificado pela formação de apenas uma banda. Acervo próprio autor.

5.8. Análise da Função Mitochondrial - Consumo de Oxigênio por meio da Técnica de Respirometria Mitochondrial em Biópsia Tecidual:

5.8.1. Retirada e preparação das amostras

Imediatamente após o sacrifício, os músculos sóleo e gastrocnêmio da pata traseira direita foram coletados por meio da técnica de biópsia, e colocados em solução gelada de relaxamento e preservação da biópsia [BIOPS: (10mM Ca-EGTA - 2,77mM de CaK₂EGTA + 7,23 mM K₂EGTA) 20mM/L imidazol, 50mM/L K⁺/4-morfolinoetano ácido sulfônico, 0,5 mM/L ditiotretitol, 7mM/L MgCl₂, 5mM/L ATP, 15mM/L fosfocreatina, pH=7,1]. Em sequência ao procedimento de biópsia, foram separadas porções idênticas e em duplicata de ambos músculos, com massa úmida de aproximadamente 4-8mg; posteriormente foram permeabilizadas por 30min em meio BIOPS contendo saponina (50µg/mL), em agitação constante em gelo. Depois foram lavadas em “meio de respiração mitochondrial” número 5 (MiR05) por 10min (pH=7,0), em agitação constante em gelo (KUZNETSOV et al., 2008).

5.8.2. Permeabilização Mecânica e Química

As amostras sofreram processo de “permeabilização mecânica” com auxílio de uma pinça histológica e uma agulha de procedimento. Logo em seguida, as amostras permeabilizadas mecanicamente sofreram processo de “permeabilização química” por 30min em BIOPS contendo saponina (50µg/mL), gentilmente agitadas nesse período; na sequência, ainda em leve agitação, as amostras foram lavadas por 10min em “Meio de Respiração Mitochondrial” número 5 (MiR05: 60mmol/L lactiobionato de potássio, 0,5mmol/L EGTA, 3mmol/L MgCl₂,

20mmol/L taurina, 10mmol/L KH_2PO_4 , 20mmol/L HEPES, 110mmol/L sacarose, 1g/L BSA, pH=7.0) (KUZNETSOV *et al.*, 2008).

5.8.3. Avaliação de Parâmetros Respiratórios

O consumo de oxigênio dos músculos permeabilizados foi realizado por meio da “*Técnica de Respirimetria Mitocondrial*” no oxígrafo OROBOROS® (Innsbruck, Áustria). As amostras foram colocadas em cubas separadas do equipamento (cubas A e B) em meio de análise respiratória mitocondrial contendo 2mL de MiR05, de 10mM de glutamato e 5mM de malato, com temperatura da cuba a 37°C. As titulações que foram realizadas para análise da respiração mitocondrial seguiram protocolo proposto por Pesta *et al.* (2011), com as seguintes adições: adição inicial de ADP (1mM) para estímulo da cadeia respiratória mitocondrial; após o alcance do limiar máximo de estímulo e estabilização, adição de oligomicina (3µg/mL) para inibição do complexo V da cadeia respiratória; para finalizar a análise do protocolo, adição de FCCP (0,35µM) que apresenta como objetivo principal estimular o “desacoplamento da cadeia respiratória” (GNAIGER *et al.*, 2012).

5.8.4. Estados Respiratórios e Titulações analisadas na Respirimetria de Alta Resolução de biópsia muscular

A Figura 17 mostra o modelo de análise de respiração mitocondrial de biópsia utilizado no músculo gastrocnêmio de uma rata treinada (ShamTR). A linha azul do gráfico representa o consumo de oxigênio da cuba (nM/mL), enquanto a linha vermelha representa a velocidade de consumo de oxigênio do tecido (músculo gastrocnêmio) corrigida por massa (pM/seg/mg). No protocolo adotado nesse projeto, utilizou-se malato (0,5mM) e glutamato (1mM) como substratos energéticos. O Estado 2 (E2) representa a respiração de repouso da amostra em ausência de ADP. O Estado 3 (E3), respiração ativa, é consequência do estímulo proporcionado pela adição de ADP na ATP-sintase, e, em condições normais, apresenta um platô de consumo. Esse platô pode ser inibido pela adição da Oligomicina, que leva ao Estado 4 (E4), onde novamente a mitocôndria consome oxigênio em níveis de consumo de basal. A capacidade máxima da cadeia respiratória ($V_{\text{máx}}$) é avaliada pela adição do FCCP [carbonil cianeto-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona].

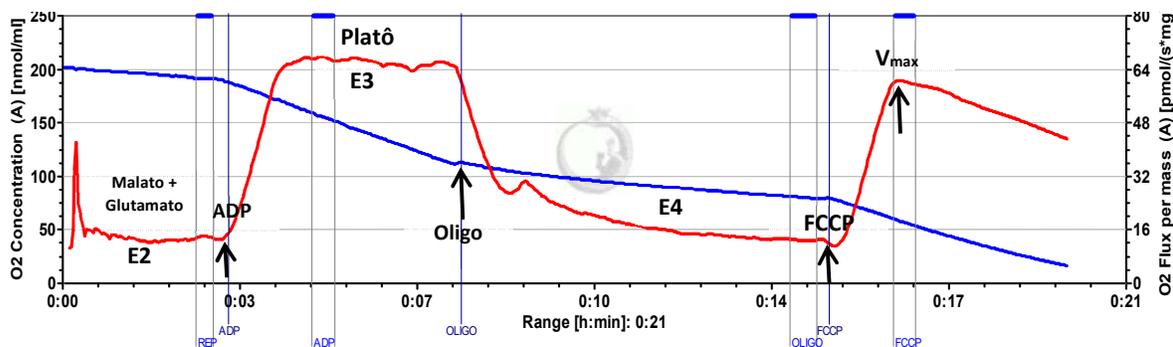


Figura 17. Modelo de análise de respiração mitocondrial. Respirometria de Alta Resolução realizada em biópsia muscular do Gastrocnêmio: Linha Azul: representa o consumo de oxigênio da cuba – Linha Vermelha: representa a velocidade de consumo de oxigênio do tecido. Estados Respiratórios: Estado 2 (E2) = repouso; Estado 3 (E3) = estímulo respiratório por ADP; Estado 4 (E4) = inibição respiratória por Oligomicina; V_{máx} = estímulo respiratório por FCCP.

5.9. Tratamento Estatístico

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade dos dados e o de Levene para analisar a homogeneidade. Com as variáveis apresentando distribuição normal e homocedasticidade, foi aplicado o teste ANOVA de um caminho, seguido do teste Post-Hoc de *Tukey* com o nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste ANOVA dois caminhos para comparar a carga máxima de carregamento da semana 11 *VS* semana 1 e semana 22 *VS* semana 11, do mesmo grupo, também com nível de significância de estatística de 5% ($p < 0,05$). Além disso, foi utilizado o *t* de *student* para comparar a média dos dois grupos sedentários (ShamSed e OVXSed). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para análises estatísticas foi utilizado o programa de estatística software IBM SPSS® Statistics, versão 19 para Macintosh.

6. RESULTADOS

6.1. Análise da evolução ponderal da massa corporal e de massas teciduais de interesse do estudo das ratas do experimento.

Conforme apresentado na tabela 3, no início do período experimental, as massas corporais iniciais dos animais foram similares demonstrando homogeneidade dos grupos. Contudo, após 22 semanas de período experimental, foi observado aumento significativo no grupo OVXSed comparado aos outros 3 grupos ($p < 0,05$). O treinamento resistido foi capaz de prevenir o aumento de massa corporal do grupo OVXTR quando comparado ao grupo OVXSed.

A massa do útero foi utilizada para analisar indiretamente o efeito da condição estrogênica dos animais. A massa desta variável foi menor para o grupo OVXSed e OVXTR comparado ao grupo ShamSed e ShamTR ($p = 0,001$). Esta atrofia comprova a eficácia do processo de retirada dos ovários (Figura 18).

Não houve diferença significativa entre o tamanho da tíbia (Figura 19), mostrando que todos animais tiveram crescimento similar.



Figura 108. Comparação tamanho do útero OVXSed e ShamSed. Acervo próprio autor.



Figura 119. Medida da tíbia por paquímetro. A cervo próprio autor.

Tabela 3: Evolução Ponderal da Massa Corporal e tecidos dos Grupos Experimentais (gramas)

	Grupos Experimentais			
	Sham		OVX	
	SED	TR	SED	TR
MC Inicial (g)	294±3,2	293±4,1	295±5,1	295±4,1
MC Final (g)	350*±8,2	331*±8,1	420±13,1	363*±11,7
Útero (g)	0,98 [#] ±0,02	0,98 [#] ±0,01	0,14	0,12±0,07
Tíbia (mm)	40,0±0,6	40,0 ±0,6	39,7 ±0,1	40±0,3

Valores estão expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM), n = 10 por grupo. Grupos: Ovariectomia Sedentário (OVXSed) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVXTR). Grupos Sham Sedentário (ShamSed) e Sham Treinamento Resistido (ShamTR). ANOVA *One-Way* e post-hoc Teste de *Tukey*; $p < 0,05$ comparado aos grupos. *Diferença significativa comparado ao grupo OVXSed. [#]Diferença significativa comparado ao grupo OVXTR.

6.2. Carga máxima de carregamento

A carga máxima de carregamento durante as 22 semanas de treinamento resistido evoluiu de maneira similar para ambos os grupos treinados (OVXTR e ShamTR), não havendo nenhuma interação entre os grupos (Figura 20). Desta forma, não houve nenhuma diferença entre os grupos (OVXTR e ShamTR), porém este aumento foi significativo ($p < 0,05$) comparando a semana 11 com a semana 1 e comparando a semana 22 com a semana 11 ($p < 0,05$). Isto indica eficiência do treinamento resistido no decorrer das semanas.

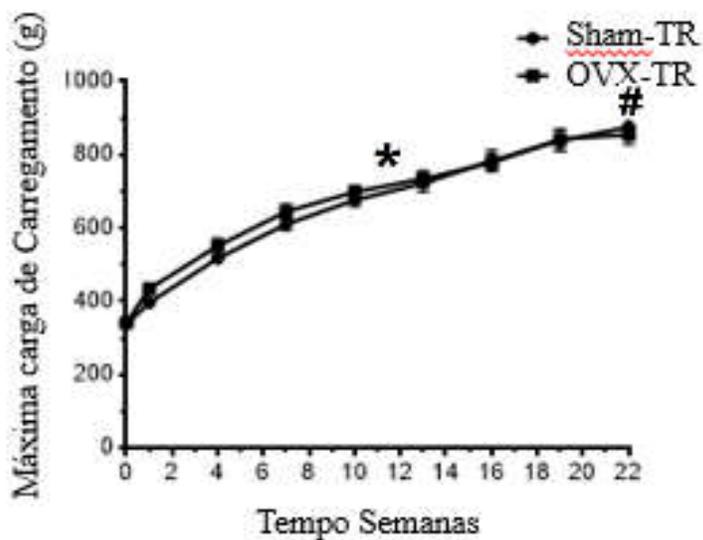


Figura 20. Carga Máxima de Carregamento. Grupos Experimentais: Grupos: Ovariectomia Sedentário (OVXSed) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVXTR). Grupos Sham Sedentário (ShamSed) e Sham Treinamento Resistido (ShamTR) Valores apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). ANOVA Two-Way e post-hoc Teste de Tukey; $p < 0,05$; *diferença significativa entre semana 11 e semana 1 ($p < 0,05$); #Diferença significativa entre a semana 22 e as semanas 11 ($p < 0,05$).

6.3. Expressão Gênica UCP-3 Sóleo

O grupo OVXSed aumentou a expressão gênica de UCP-3, principal regulador do desacoplamento mitocondrial induzido, no músculo sóleo em relação a todos os outros grupos ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa na expressão do gene UCP-3 entre os outros grupos (Figura 21).

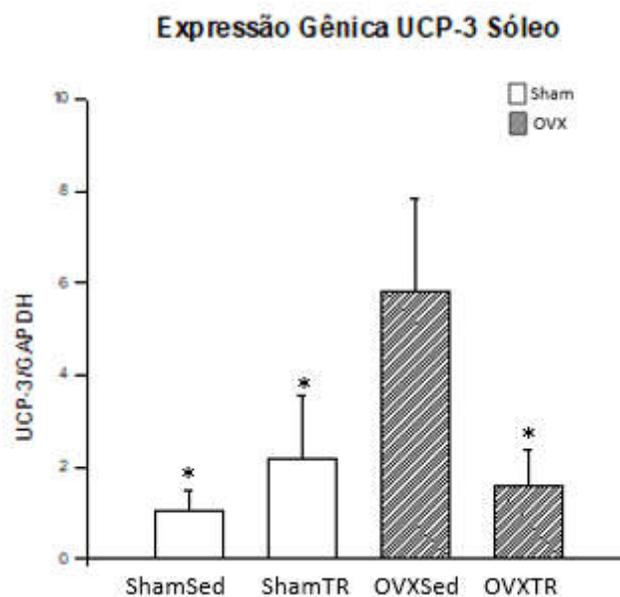


Figura 21. Expressão de RNAm da UCP-3 no músculo Sóleo de ratas. Valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM), $n=10$ por grupo. Grupo Ovariectomia Sedentário (OVXSed) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVXTR). Grupo Sham Sedentário (ShamSed) e Sham Treinamento Resistido (ShamTR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey, $p<0,05$. *Diferença Significativa com relação ao grupo OVXSed. Não houve diferença significativa entre os outros grupos.

6.4. Expressão Gênica UCP-3 Gastrocnêmio

O grupo OVXSed aumentou a expressão gênica da UCP-3, principal regulador do desacoplamento mitocondrial induzido, em comparação a todos os grupos ($p<0,001$). O TR evitou esse aumento no grupo OVXTR. As intervenções de TR (ShamTR e OVXTR) aumentaram a expressão gênica de UCP-3 com relação ao grupo ShamSed ($p<0,001$). Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos treinados (Figura 22).

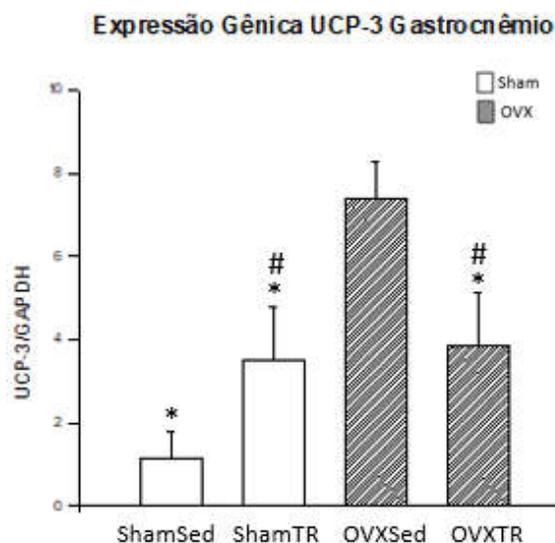


Figura 122. Expressão de RNAm da UCP-3 no músculo Gastrocnêmio de ratas. Valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM), n=10 por grupo. Grupo Ovariectomia Sedentário (OVXSed) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVXTR). Grupo Sham Sedentário (ShamSed) e Sham Treinamento Resistido (ShamTR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey, $p < 0,05$. *Diferença Significativa com relação ao grupo OVXSed. #Diferença significativa com relação ao grupo ShamSed.

6.5. Consumo de Oxigênio

Consumo de oxigênio tecidual de biópsia do músculo sóleo

As Figuras 23, 24 e 25 apresentam os resultados do consumo de oxigênio tecidual de biópsia do músculo sóleo das ratas desse estudo. O consumo de oxigênio de repouso (estado 2, Figura 23A) não apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os quatro grupos, entretanto podemos observar uma tendência de maior consumo médio para o grupo OVXSed. O consumo de oxigênio induzido pela inibição da Oligomicina (estado 4, Figura 23B), demonstra que houve interferência da ovariectomia e do TR nesta variável, sendo que o grupo OVXSed apresentou maior consumo de oxigênio neste estado ($p < 0,05$) com relação a todos outros grupos, situação que foi revertida pelo TR.

Sóleo

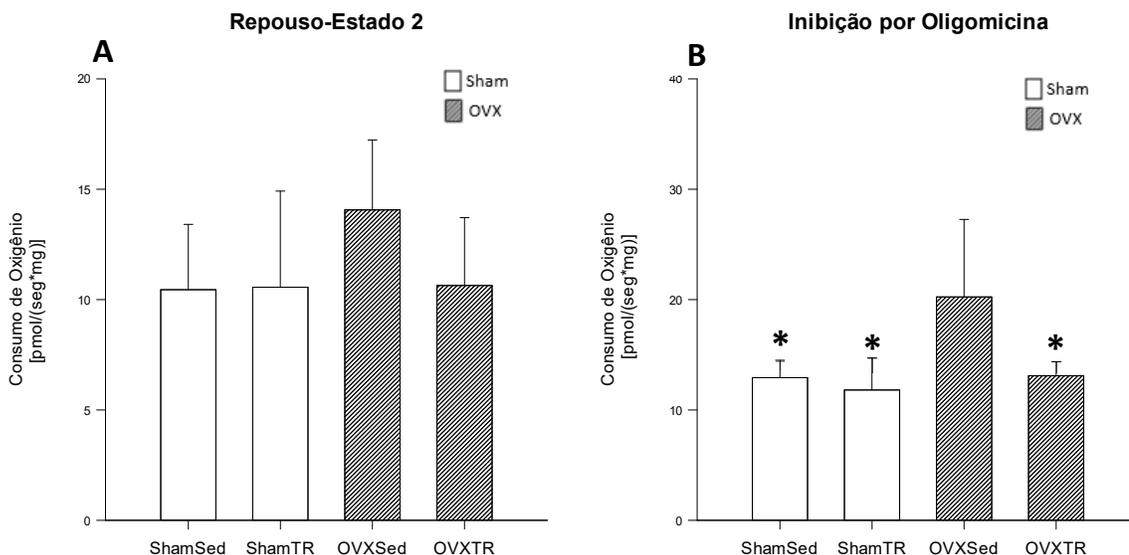


Figura 133 Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do Músculo Sóleo Análise em repouso (E2) (A) e Inibida por Oligomicina (E4) (B). Valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM), n=10 por grupo. Grupo Ovariectomia Sedentário (OVXSed) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVXTR). Grupo Sham Sedentário (Sham-Sed) e Sham Treinamento Resistido (ShamTR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey, $p < 0,05$ e comparação com teste t entre os dois grupos sedentários. Não houve diferença significativa entre os grupos no estado de repouso. *Diferença Significativa com relação ao grupo OVXSed.

No consumo de oxigênio estimulado pela adição de ADP (Figura 24A), é possível observar que a ovariectomia proporcionou diminuição estatística significativa no consumo de oxigênio do grupo OVXSed ($p < 0,05$) em relação a todos os outros grupos. Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para o estímulo de ADP entre os grupos OVXTR, ShamTR e ShamSed.

No controle respiratório (Figura 24B: razão ADP/repouso), o grupo OVXSed apresentou eficiência respiratória menor que todos os outros grupos (Anova, Teste de Tukey $p < 0,05$ e teste de t de *student* comparando os grupos sedentários). Estes resultados mostram que esta variável dependente é influenciada de forma negativa pela ovariectomia (OVXSed *VS* ShamSed) e que o TR é capaz de melhorar esta variável (OVXTR *VS* OVXSed). Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para o controle respiratório entre os grupos OVXTR, ShamTR e ShamSed.

Sóleo

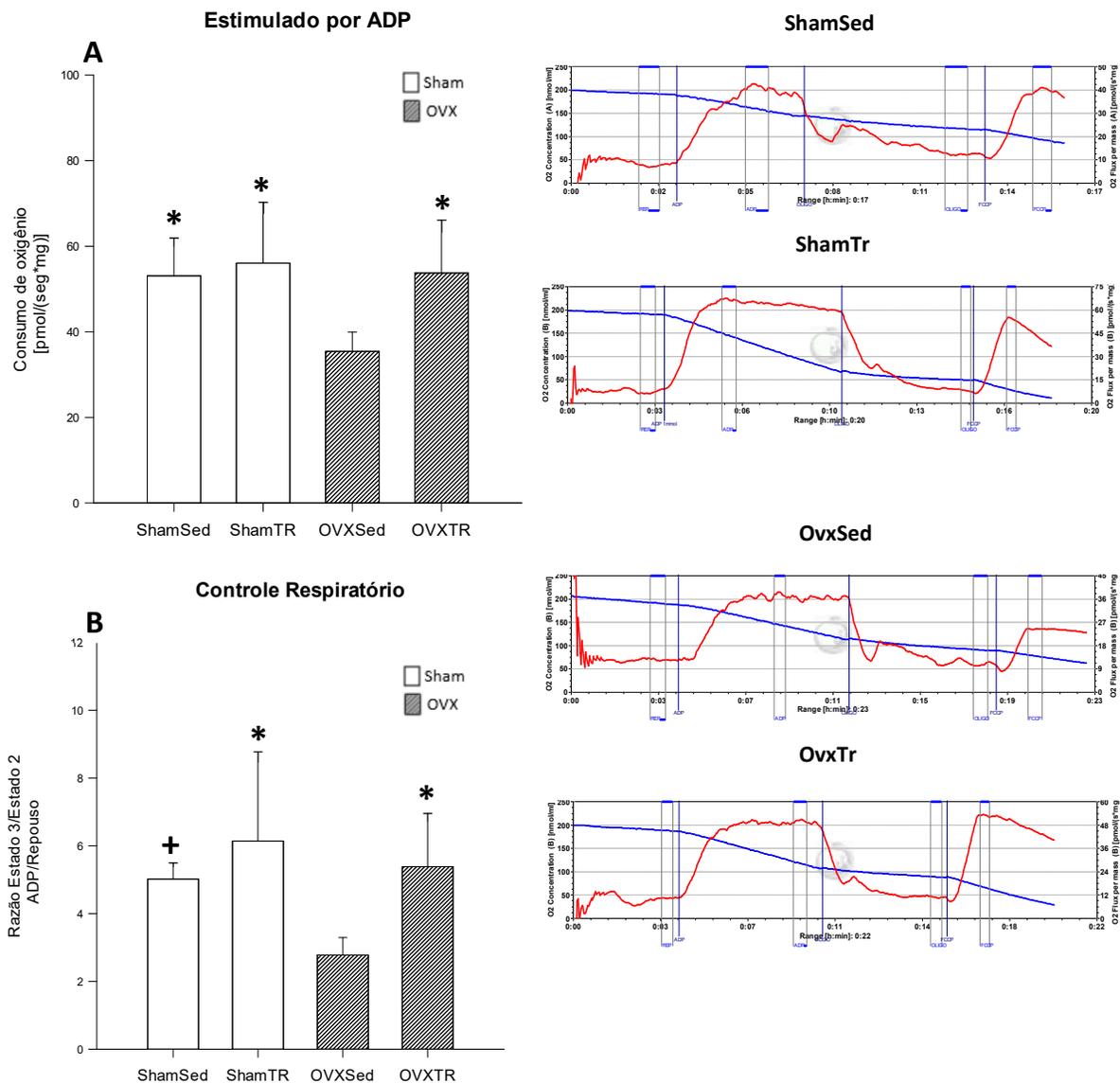


Figura 144. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio estimulado por ADP realizado em Biópsia do Músculo Sóleo (A) e Razão do Controle Respiratório (RQR) ADP/E2 (B). Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio estimulado por ADP realizado em Biópsia do Músculo Sóleo (A) e Razão do Controle Respiratório (RCR) ADP/E2 (B). Valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM), $n=10$ por grupo. Grupo Ovariectomia Sedentário (OVXSed) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVXTR). Grupo Sham Sedentário (ShamSed) e Sham Treinamento Resistido (ShamTR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey, $p<0,05$ e comparação com teste t entre os dois grupos sedentários. *Diferença Significativa com relação ao grupo OVXSed. +Diferença significativa com relação ao grupo OVXSed (Teste T).

No consumo de oxigênio estimulado pela adição de FCCP (Figura 25A) na biópsia do músculo sóleo ($V_{m\acute{a}x}$), novamente o grupo OVXSed mostrou efeito deletério, pois o esse grupo apresentou consumo menor que todos os outros grupos (Anova e Teste de *Tukey* $p < 0,05$ e teste de *t* de *student* comparando os grupos Sedentários), bem como no controle respiratório (Figura 25B, $p < 0,05$). O treinamento resistido proposto foi eficiente em reverter os efeitos deletérios da ovariectomia, tanto na $V_{m\acute{a}x}$ como no controle respiratório (OVXTR *VS* OVXSed). Outro aspecto importante a se ressaltar foi que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para estas duas variáveis entre os grupos OVXTR, ShamTR e ShamSed.

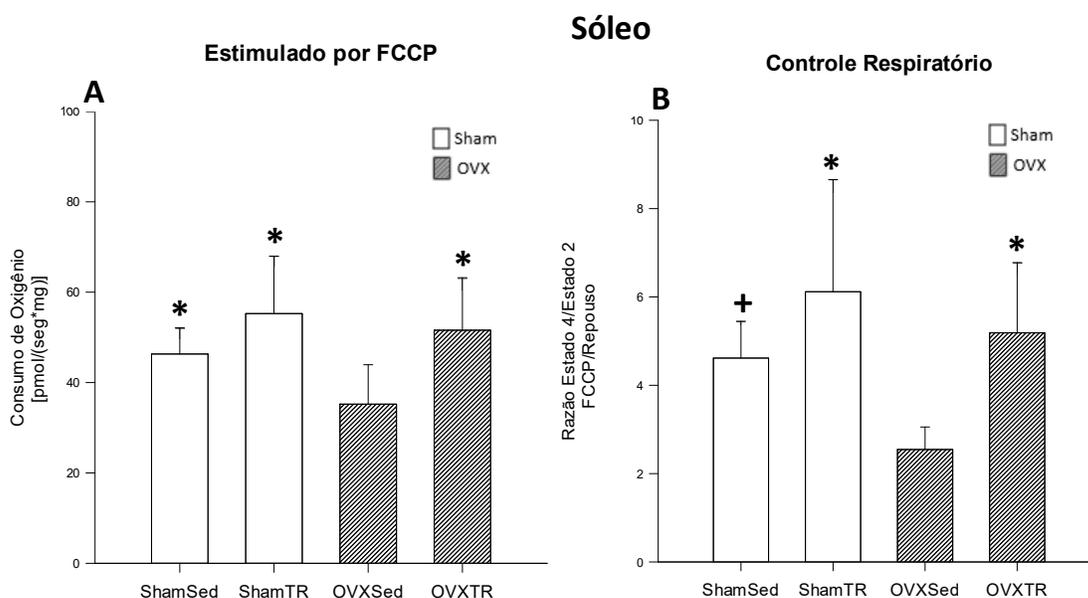


Figura 155. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio estimulado por FCCP realizado em de Biópsia do Músculo Sóleo (A) e Razão de Controle Respiratório (RCR) FCCP/E2. (B). Valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM), $n=10$ por grupo. Grupo Ovariectomia Sedentário (OVXSed) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVXTR). Grupo Sham Sedentário (ShamSed) e Sham Treinamento Resistido (ShamTR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de *Tukey*, $p < 0,05$ e comparação com teste *t* entre os dois grupos sedentários. *Diferença Significativa com relação ao grupo OVXSed. +Diferença significativa com relação ao grupo OVXSed (Teste T).

6.6. Consumo de Oxigênio Gastrocnêmio

As Figuras 26, 27 e 28 apresentam os resultados do consumo de oxigênio tecidual de biópsia do músculo gastrocnêmio das ratas desse estudo. O consumo de oxigênio de repouso (estado 2, Figura 26A) não apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os quatro grupos, entretanto podemos observar uma tendência de maior consumo médio para o grupo OVXSed. O consumo de oxigênio induzido pela inibição da Oligomicina (estado 4, Figura 26B), demonstra que houve interferência da ovariectomia e do TR nesta variável, sendo

que o grupo OVXSed apresentou maior consumo de oxigênio neste estado ($p < 0,05$) com relação a todos outros grupos, situação que foi revertida pelo TR.

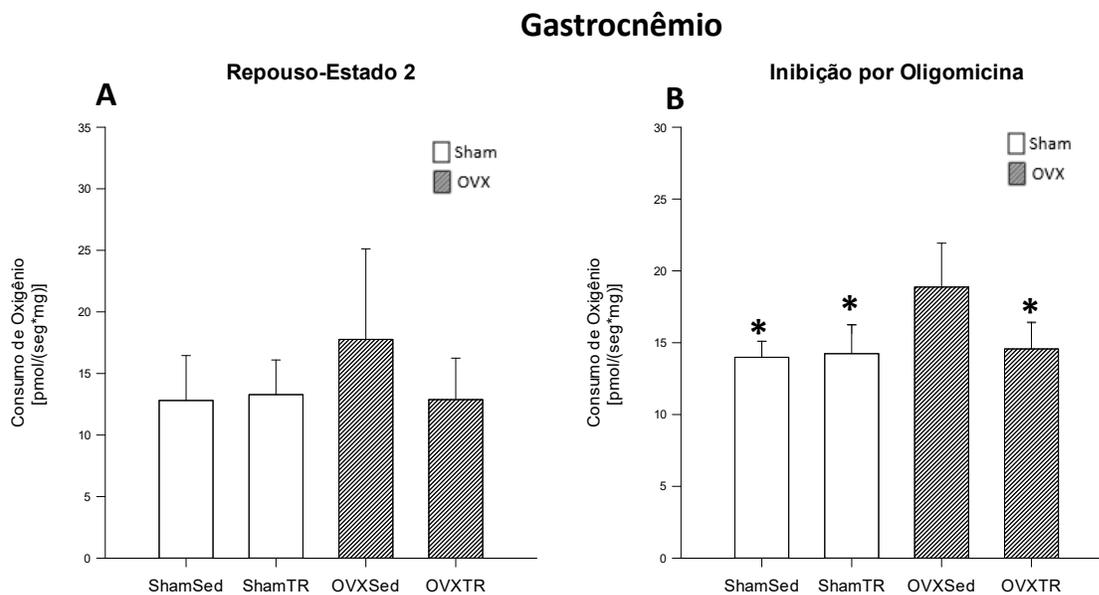


Figura 166. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do Músculo Gastrocnêmio - Análise em repouso (E2) (A) e Inibida por Oligomicina (E4) (B) Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado através de Biópsia do Músculo Gastrocnêmio- Análise em repouso (A) e Inibida por Oligomicina (B). Valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM), $n=10$ por grupo. Grupo Ovariectomia Sedentário (OVXSed) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVXTR). Grupo Sham Sedentário (ShamSed) e Sham Treinamento Resistido (ShamTR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey, $p < 0,05$ e comparação com teste t entre os dois grupos sedentários. Não houve diferença significativa entre os grupos no estado de repouso. *Diferença Significativa com relação ao grupo OVXSed.

No consumo de oxigênio estimulado pela adição de ADP (Figura 27A), é possível observar que o grupo ShamTR apresentou maior consumo de oxigênio estimulado pelo ADP com relação aos outros três grupos ($p < 0,05$). Além disso a ovariectomia reduziu o estímulo do ADP no consumo de oxigênio do grupo OVXSed em relação aos outros três grupos, o que foi revertido pelo TR. Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para o estímulo de ADP ente os grupos ShamSed e OVXTR.

Gastrocnêmio

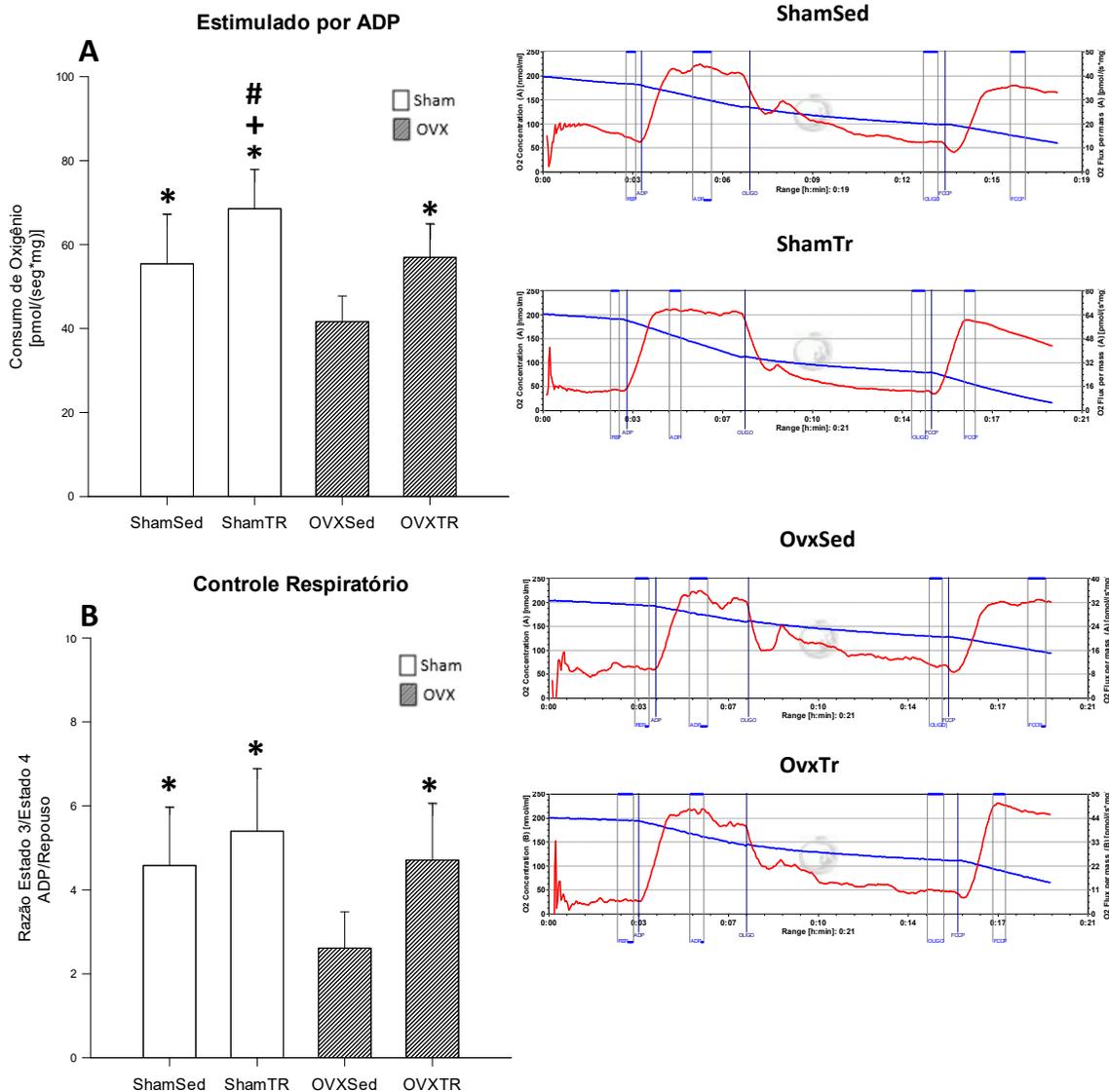


Figura 27. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio estimulado por ADP realizado em Biópsia do Músculo Gastrocnêmio (A) e Razão do Controle Respiratório (RCR) ADP/E2 (B). Valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM), $n=10$ por grupo. Grupo Ovariectomia Sedentário (OVXSed) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVXTR). Grupo Sham Sedentário (ShamSed) e Sham Treinamento Resistido (ShamTR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey, $p<0,05$ e comparação com teste t entre os dois grupos sedentários. *Diferença Significativa com relação ao grupo OVXSed. †Diferença significativa com relação ao grupo ShamSed. #Diferença significativa com relação ao grupo OVXTR.

No consumo de oxigênio estimulado pela adição de FCCP ($V_{m\acute{a}x}$) na biópsia do músculo gastrocnêmio (Figura 28A), houve menor consumo de oxigênio no do grupo OVXSed com relação ao grupo ShamTR e OVXTR ($p < 0,05$). O TR influenciou positivamente esta variável, visto uma melhor resposta com diferença estatística significativa para os dois grupos treinados, ShamTR *VS* ShamSed ($p < 0,037$) e OVXTR *VS* OVXSed ($p < 0,022$). Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos treinados

Com relação ao controle respiratório (FCCP/Repouso, Figura 28B), o grupo OVXSed apresentou menor eficiência respiratória com relação ao grupo OVXTR e ShamTR ($p < 0,05$). Desta forma o TR melhora a resposta nesta variável no grupo OVX (OVXTR *VS* OVXSed, $p < 0,001$). Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para o controle respiratório ente os grupos OVXTR, ShamTR e ShamSed e entre o grupo sedentário (ShamSed e OVXSed).

Gastrocnêmio

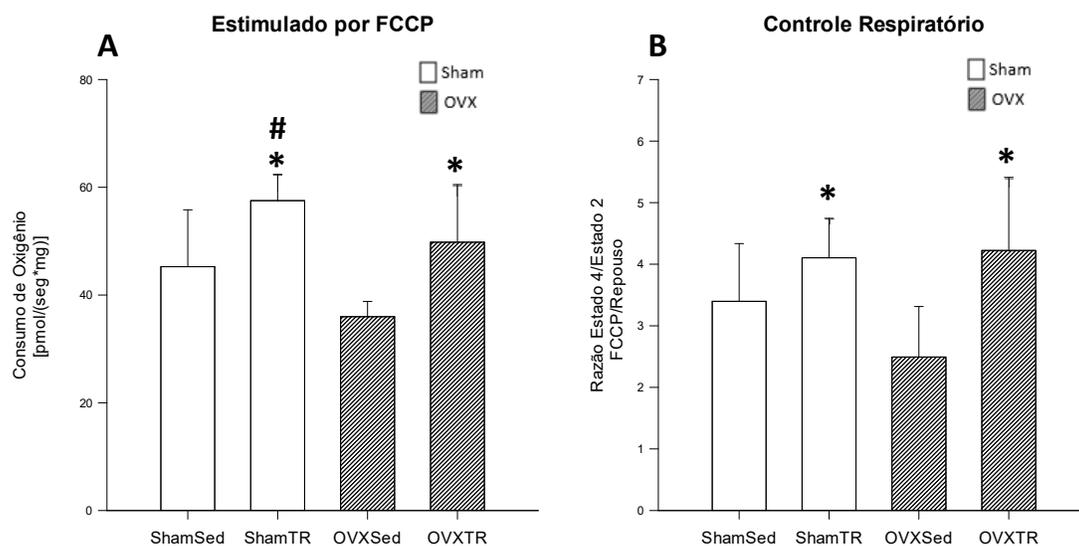


Figura 178. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio estimulado por FCCP realizado em de Biópsia do Músculo Gastrocnêmio (A) e Razão de Controle Respiratório (RCR) FCCP/E2. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado através de Biópsia do Músculo Gastrocnêmio estimulado por FCCP (A) e Controle Respiratório FCCP/Repouso (B). Valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM), $n=10$ por grupo. Grupo Ovariectomia Sedentário (OVXSed) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVXTR). Grupo Sham Sedentário (ShamSed) e Sham Treinamento Resistido (ShamTR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey, $p < 0,05$ e comparação com teste t entre os dois grupos sedentários. *Diferença Significativa com relação ao grupo OVXSed. #Diferença significativa com relação ao grupo ShamSed.

7. DISCUSSÃO

7.1. Evolução ponderal da massa corporal e massas teciduais de interesse do estudo das ratas do experimento, e carga máxima de carregamento.

O aumento da obesidade e redução da massa livre de gordura é conhecida como obesidade sarcopênica, e é uma característica comum em mulheres na pós-menopausa levando a uma queda na aptidão física relacionada a componentes da saúde como alteração da composição corporal, redução de força muscular e da capacidade aeróbia (OLIVEIRA et al., 2011; GALLAHUE e GOODWAY, 2012). Também neste período ocorre aumento de riscos de DCV (ABDULNOUR et al., 2012), e o TR é capaz de melhorar parâmetros da composição corporal relacionados ao aumento de riscos à saúde em mulheres pós-menopausa (BOTERO et al., 2013).

Modelos translacionais em ratas OVX são frequentemente utilizados para mimetizar e investigar os efeitos deletérios relacionados com a redução dos níveis circulantes de estrogênio em humanos PRESTES et al., 2009; SHIGUEMOTO et al., 2007; WALLEN; BELANGER; WITTNICH, 2001; BRINTON, 2012). Há diversos estudos que mostraram aumento de massa corporal em modelos OVX (DOMINGOS et al., 2012; JEONG; YOON, 2012; SHIGUEMOTO et al., 2007; FERESIN et al., 2014), e que a intervenção de TR é capaz de evitar este aumento de massa corporal, fato que demonstra a efetividade deste modelo de exercício (BARBOSA et al., 2016; ROSSINI, 2016; SHIGUEMOTO et al., 2012).

Em nosso estudo, o grupo OVXSed teve um aumento de massa corporal 18% maior que o grupo ShamSed, e o TR foi capaz de prevenir este aumento, não havendo diferença significativa entre o grupo OVXTR e ShamSed. Desta forma, pode-se pensar em utilizar o TR como estratégia não farmacológica para reduzir a obesidade sarcopênica, bem como riscos relacionados a mudanças na composição corporal relacionados a este período.

No presente estudo, a massa do útero foi consideravelmente reduzida nas ratas OVX, confirmando o sucesso da ovariectomia. Esta técnica é considerada o padrão-ouro no campo pré-clínico, e ideal para avaliar os efeitos específicos da privação dos hormônios sexuais e subseqüente intervenções como o TR (KOEBELE, 2016).

Para que nossa intervenção (TR) seja válida, ela deve mimetizar protocolos utilizados em humanos, e manipular de forma planejada os componentes da carga do TR (periodização) como: volume, intensidade, densidade, frequência e método de treino, os quais podem resultar em diferentes respostas na composição corporal e perfil metabólico de mulheres pós-menopausa (DINIZ et al., 2017).

Neste sentido, nosso modelo de TR respeitou alguns princípios do treinamento que norteiam todo processo de periodização (TUBINO, 1984) como: princípio da sobrecarga crescente, no qual houve atualização semanal da CMC; princípio da individualidade biológica, com os testes de carga sendo feito de forma individual; princípio da continuidade no qual os grupos treinados realizaram o TR por 22 semanas. Não é de nosso conhecimento um protocolo em modelos animais que realizou TR por um período tão longo.

Com relação a intensidade utilizada em TR, ela pode ser expressa como percentual de 1RM (%1RM), número de repetições em séries máximas (por ex., 6RM, 12RM), ou ainda zonas de séries máximas, com incremento ou diminuição do peso para ficar na faixa estipulada (ex. 8-12RM) (FLECK, 1999). Nosso modelo de treino utilizou percentuais da CMC em 5 séries de escaladas (65%, 70%, 75%, 80% e 85%), trabalhando 2 vezes na semana com estes pesos submáximos, e um dia da semana com pesos máximos, com subsequente ajuste de uma nova CMC. Isto permitiu que não ocorresse um sobre-treinamento (*overtraining*), que é uma recuperação incompleta, muitas vezes associada com infecções e quedas no desempenho decorrentes de treinamento árduo, provocando um declínio da capacidade de trabalho (BUDGETT, 1998).

De acordo com um modelo que se propôs a permitir a correta adaptação e recuperação dos sistemas fisiológicos envolvidos no treino, os dois grupos de TR apresentaram um aumento linear na CMC. Além disso a média da CMC apresentou-se maior que o dobro na semana 11 em relação a semana 1, e aumentou em média 20% na semana 22 com relação a semana 11. De acordo com os limites impostos pelos sistemas biológicos e pelo treinamento, sabe-se que quanto mais treinado é o indivíduo menos treinável ele é, e quanto menos treinado mais treinável (COLANTONIO et al., 2008). Isto mostra progressão do desempenho e supercompensação do modelo de TR aplicado (Figura 20). Além disso, trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa e de outros, já mostraram que este modelo de TR promove hipertrofia e aumento do conteúdo de glicogênio muscular em comparação ao grupo sedentário (HORNBERGER; FARRAR, 2004; PRESTES et al., 2012).

7.2. Expressão Gênica de UCP-3 no músculo Sóleo e Gastrocnêmio

A disfunção mitocondrial na condição pós-menopausa está bem documentada na literatura, entretanto, as principais estruturas disfuncionais desta organela devido à redução nos níveis circulantes de estrogênio permanecem sobre intensa investigação (CAMPBELL; FEBBRAIO, 2001; HA, 2004; ZHAI et al., 2000).

As UCPs pertencem a família de transportadores de íons mitocondriais, e apresentam função de desacoplar a síntese de ATP da respiração, por isso são conhecidas como proteínas desacopladoras da síntese de ATP ou simplesmente proteínas desacopladoras (do inglês, *uncoupling proteins*), sendo a UCP-3 a única proteína das famílias das UCPs expressa no músculo esquelético (FONSLOW et al., 2013).

Muitas pesquisas vêm relacionando disfunções das UCPs à doenças, como resistência ao tratamento de quimioterápicos em células cancerígenas que super expressam a UCP-2, (BAFFY, 2017; DERDAK et al., 2009), diabetes mellitus em células pancreáticas com superatividade das UCP-2 (BRAND et al., 2004; WHEELER et al., 2007), obesidade, dislipidemia, hipertensão e arteriosclerose em variações gênicas da UCP-2 e UCP-3 (KAMP et al., 2018), e diabetes tipo 2 com redução da expressão de UCP-3 no músculo esquelético (SCHRAUWEN et al., 2006). Apesar de muitos ensaios estabelecerem disfunção mitocondrial na ausência de E2 (CAMPBELL; FEBBRAIO, 2001; HA, 2004; KLINGE, 2009; SCHREIBER et al., 2004), poucos investigaram a relação que existe entre as UCPs e redução dos níveis circulantes de estrogênio.

Com o intuito de estabelecer uma linha de raciocínio entre a sarcopenia que acontece na pós-menopausa (MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; MESSIER et al., 2011), expressão gênica de UCP-3 e o efeito da intervenção de TR, desenhamos o presente estudo. O principal resultado do presente estudo com relação a expressão gênica é que a ovariectomia aumenta a expressão da UCP-3 em ambos músculos, gastrocnêmio (porção branca) e sóleo (predomínio vermelho) no grupo OVXSed, e que um programa de TR é capaz de reduzir este aumento.

Estes resultados (Figura 21 e 22) estão de acordo com os achados de Nagai et al. (2016), no qual a expressão de UCP-3 no músculo sóleo foi maior no grupo OVX sem reposição hormonal, porém, neste estudo o autor não investigou o efeito do exercício (esteira) de forma isolada, e este aumento na expressão de UCP-3 foi revertido pela terapia hormonal. Em outro estudo realizado por Jeong e Yoon (2012) houve aumento da expressão de UCP-3 em um protocolo de natação no músculo esquelético gastrocnêmio do grupo OVX treinado, sendo que no grupo OVX sedentário não houve aumento.

Nossos resultados corroboram os achados de Nagai et al. (2016), entretanto ao contrário do resultado de Jeong e Yoon (2012), o TR reduziu a expressão de UCP-3 no músculo sóleo e gastrocnêmio em relação ao grupo OVXSed. Além disso, nossos resultados mostraram que o TR aumentou a expressão de UCP-3 no músculo gastrocnêmio do grupo OVXTR e ShamTR em relação ao ShamSed, e há uma tendência de uma resposta similar no músculo sóleo, porém esse aumento não foi significativo estatisticamente. Alguns fatores podem estar relacionados com nossos achados e serão discutidos nos parágrafos seguintes.

Em humanos, a UCP-3 é transcrita pelo cromossomo 11 (SOLANES et al., 1997), enquanto que em ratas utilizada em nosso modelo (*ratus albinus norvegicus*), é transcrita pelo cromossomo 1 (CRESCENZO et al., 2014), e exerce funções similares em ambas espécies como discutido na revisão de literatura.

Seu aumento de expressão no grupo OVXSed pode estar relacionado com aumento de marcadores inflamatórios que acompanham a condição de redução dos níveis circulantes de estrogênio (JUN et al., 2014; KIM et al., 2013; RODRIGUES, 2016), principalmente do TNF- α , que aumenta a expressão da UCP-3 em outras condições inflamatórias (BUSQUETS et al., 1998). Este quadro de inflamação pode ser revertido pelo TR, tanto em humanos (BOTERO, et al., 2013) como em modelos de ratas OVX (RODRIGUES, 2016), o que pode explicar a menor expressão de UCP-3 no grupo OVXTR.

Outro possível fator contribuinte para o aumento da expressão de UCP-3 no grupo OVXSed é a dislipidemia, comum em quadros de obesidade que acompanha o quadro de redução dos níveis circulantes de estrogênio, tanto em modelos animais (LEITE et al., 2009) como em humanos (CARR, 2003; LOBO, 2008; ROSANO et al., 2007). O aumento dos ácidos graxos elevam a expressão de UCP-3 (DIVAKARUNI; BRAND, 2011). Novamente este quadro de dislipidemia pode sofrer influência do TR, melhorando este quadro (GARBER et al., 2011), o que pode explicar sua menor expressão no grupo OVXTR.

Flexibilidade metabólica é a capacidade do organismo em se adaptar a oxidação de combustíveis de acordo com a disponibilidade dos mesmos, sendo capaz de utilizar gordura no jejum e carboidratos durante a hiperinsulinemia para fornecer energia ao corpo (GALGANI et al., 2008). Atividade da LPL (lipoproteína lipase) muscular, uma das responsáveis pela flexibilidade metabólica, está reduzida durante o jejum em mulheres com sobrepeso e obesas na pós-menopausa (RYAN; ORTMAYER, 2019). Nosso modelo OVX, induz ao aumento do conteúdo de gordura ectópica (LEITE et al., 2009) e redução de enzimas relacionadas com a oxidação de gordura (DOMINGOS et al., 2011), assim como mulheres na pós-menopausa têm aumento da síndrome metabólica (SALPETER et al., 2006); estes quadros citados são

associados com resistência à insulina e aumento dos níveis circulatórios de AG, ambos conduzem à inflexibilidade metabólica. Uma das funções das UCP-3 é a exportação do excesso de AG da matriz mitocondrial em quadros em que este substrato energético esteja alto (SIMOPOULOS, 2010). Sua expressão tende a se correlacionar com o aumento de ácidos graxos de cadeia longa (AFFOURTIT E BRAND, 2008), o que pode explicar o aumento da expressão gênica de UCP-3 em nosso modelo OVXSed. Um programa de treinamento físico foi capaz de melhorar a inflexibilidade metabólica em mulheres com este quadro (ORTMEYER; GOLDBERG; RYAN, 2017), o que pode minimizar a lipotoxicidade dos AG e reduzir a expressão das UCP-3, como observamos em nosso modelo OVX-TR.

Outra função primária aceita atualmente para a função das UCP-3 é a atenuação de formação de EROs. Isso se dá através do desacoplamento médio da síntese de ATP, reduzindo parcialmente a diferença de potencial elétrico entre o espaço da matriz mitocondrial e espaço intermembrana mitocondrial (BRAND et al., 2004; DIVAKARUNI; BRAND, 2011; ECHTAY et al., 2002), e desta forma aumentar sua expressão pode exercer um efeito protetor. Entretanto, Brand et al. (2002) mostraram que animais que superexpressavam UCP-3 não tiveram redução do dano oxidativo em relação ao grupo controle. Os autores sugeriram que níveis acima do desacoplamento médio *in vivo* não oferece vantagens contra danos oxidativo.

Nosso modelo OVXSed aumenta o estresse oxidativo (RODRIGUES , 2016; HA, 2004; MUTHUSAMI et al., 2005), e a UCP-3 tem sua atividade e expressão aumentada por produtos do estresse oxidativo (KAMP et al., 2018). Desta forma, o aumento na expressão de UCP-3 em nosso modelo OVXSed pode ser devido ao aumento do estresse oxidativo. Um programa de TR com frequência de 2 dias por semana melhorou o estresse oxidativo em mulheres idosas (FLECK et al., 2015). Este quadro de redução no estresse oxidativo mediado pelo exercício pode explicar nossos achados para menor expressão das UCP-3 no grupo OVXTR.

Nosso estudo também mostrou especificidade dos achados quanto ao tipo de fibra muscular. Encontramos aumento da expressão de UCP-3 apenas no músculo gastrocnêmio no grupo ShamTR e OVXTR em relação ao grupo ShamSed. Esta diferença na resposta pode estar relacionada à carga de trabalho imposta pelo protocolo de TR, exigindo demandas específicas para diferentes tipos de fibras musculares de acordo com o princípio do tamanho (HENNEMAN, 1965). Hipóxia e exercício em esteira aumentam a expressão gênica da UCP-3 em ratos e fibras musculares tratadas com um composto que ativa a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), uma enzima conhecida por ser estimulada durante o exercício, que aumenta tanto o mRNA UCP-3 quanto a proteína UCP-3 no músculo, sugerindo uma relação entre o exercício físico e aumento da UCP-3 (ZHOU et al., 2000). Ainda mais interessante, a AMPK

ativa PGC1- α , um regulador da biogênese mitocondrial (THIRUPATHI; DE SOUZA, 2017; (VENTURA-CLAPIER, 2017), que também aumenta a expressão das UCPs (MIWA; BRAND, 2003). Um trabalho recente de nosso grupo já mostrou que o TR em ratas OVX aumenta a expressão gênica de PGC1- α em relação ao grupo controle (BARBOSA et al., 2016), podendo ser esta uma via que explique o aumento da expressão de UCP-3 no músculo gastrocnêmio do grupo OVXTR em relação ao grupo ShamSed para o músculo gastrocnêmio.

Outra explicação plausível para este achado específico do músculo gastrocnêmio, diz respeito à diferença de respostas ao estresse entre os tipos de fibras musculares. Um estudo mostrou maior produção de peróxido de hidrogênio na respiração do estado III (alta demanda metabólica) apenas em fibras musculares brancas do músculo gastrocnêmio de ratos idosos (PICARD et al., 2011a). Como os níveis de UCP-3 são regulados positivamente em quadros de estresse oxidativo (KAMP et al., 2018), e esta resposta é maior em fibras musculares glicolíticas (PICARD et al., 2011a), isto pode explicar o aumento de sua expressão no músculo gastrocnêmio dos grupos TR de nosso estudo.

Em resumo, podemos dizer que em nosso estudo o grupo OVXSed apresentou aumento da expressão de UCP-3, e esta resposta pode estar envolvida com efeitos deletérios provocados pela redução dos níveis circulantes de estrogênio, como inflexibilidade metabólica, lipotoxicidade, aumento do estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios, que juntos podem contribuir para o aumento significativo da expressão de UCP-3. Este aumento na expressão de UCP-3 pode reduzir a capacidade do músculo sintetizar ATP, gerando um ciclo fútil de energia, que junto a outros fatores deletérios associados ao quadro de redução dos níveis circulantes de estrogênio, pode conduzir a sarcopenia. Por outro lado, um programa de TR é capaz de reduzir este aumento de expressão de UCP-3, pois melhora diversos quadros adversos relacionados a pós-menopausa. Além disso, o aumento dos níveis de UCP-3, específico para o músculo gastrocnêmio do grupo treinado em relação ao grupo ShamSed, pode indicar uma resposta adaptativa do TR ao estresse do exercício, como aumento dos níveis de AMPK, PGC1- α , hipóxia, Eros. Devem ser melhores estudadas as possíveis diferenças metabólicas desta resposta com relação ao tipo de fibra muscular (oxidativa e glicolítica), pois trabalhos mostram diferenças adaptativas entre os tipos de fibras musculares (PICARD et al., 2008).

7.3. Respiração Mitocondrial dos Músculos Sóleo e Gastrocnêmio

7.3.1. Estado 2

A compreensão da função mitocondrial do músculo esquelético é o componente crítico para o delineamento dos mecanismos que norteiam as adaptações musculares saudáveis, e que mantém cronicamente a integridade desse tecido (SPANGENBURG et al., 2011). Em contrapartida, a disfunção mitocondrial pode ser também o componente chave para o entendimento da deterioração do músculo esquelético no envelhecimento e menopausa (VENTURA-CLAPIER, 2017), que leva à fraqueza e prejuízo na mobilidade, bem como ao aumento no risco de quedas e à fragilidade física (CRUZ-JENTOFT et al., 2010).

Um dos efetores do PGC1- α , que é considerado o principal regulador dos genes envolvidos com a biogênese e atividade mitocondrial, é o REs- α que é ativado pelo estrogênio. Entre os alvos de transcrição nuclear do PGC1- α temos o NFR-1, NFR-2, membros da família do PPAR, todos envolvidos com aumento de proteínas que regulam ou fazem parte da estrutura mitocondrial (JI; KANG, 2015; MAZZATTI et al., 2008).

Diversos estudos têm associado a redução dos níveis de estrogênio a disfunções mitocondriais (CAMPBELL; FEBBRAIO, 2001; CHEN; YAGER; RUSSO, 2005; GAIGNARD et al., 2017; ROSSINI, 2016), em contrapartida, estudos com exercício físico vêm demonstrando efeitos benéficos na função mitocondrial (BO et al., 2013; FARHAT et al., 2017).

Desta forma buscamos entender os possíveis mecanismos de disfunção mitocondrial em modelos OVX, associados ou não a intervenção de TR, através da análise da respiração mitocondrial, sendo esta uma das formas mais apropriadas para se determinar a função mitocondrial (SCHUH et al., 2011).

A primeira análise da função mitocondrial dos músculos deve ser direcionada para o Estado de Repouso (E2). Na ausência de ADP, a ATP-sintase não tem substrato para a síntese de ATP (NELSON e COX, 2013). Neste estado de repouso não fosforilante, a força próton-motiva é mantida máxima, exigindo que maior energia seja gasta para bombear prótons para o espaço intermembrana, diminuindo o fluxo de elétrons através da CTE que reduzem o O₂, deprimindo o fluxo de oxigênio a um nível determinado pelo vazamento de prótons (GANAIGER, 2014). Neste estado de máxima força próton-motiva, o consumo de O₂ representa uma estimativa do vazamento de prótons, que retornam para a matriz mitocondrial por outros canais ou pela própria membrana permitindo que continue ocorrendo o fluxo de elétrons através da CTE e subsequente consumo de O₂ (GANAIGER, 2014).

A condutância de prótons basal não é totalmente compreendida, e pode ocorrer diretamente através da MIM dependendo da composição fosfolipídica, contudo essa contribuição é baixa (FONSLOW et al., 2013). Grande parte do vazamento de prótons é realizado pelas UCPs, que têm sua atividade controlada (vazamento induzido) em diversos níveis, como metabólismo, transcrição, EROs, produtos de peroxidação lipídica ou pela quantidade, mas não atividade da ANT (DIVAKARUNI; BRAND, 2011), que troca o ADP por ATP através da MIM (BRAND et al., 2005). Este retorno de prótons é fisiologicamente importante e pode responder por 20%-25% da taxa metabólica basal (FONSLOW et al., 2013).

Nesse estado respiratório (E2), nosso estudo observou velocidade de consumo semelhante entre todos os grupos analisados, demonstrando que tanto a ovariectomia como o TR não provocam alterações na função de consumo de O₂ mitocondrial no E2, e estes dados estão de acordo com resultados encontrados em nosso grupo para a respiração de tecido do córtex pré-frontal (ROSSINI, 2016). Observamos em nosso estudo uma tendência de aumento do consumo de O₂ no E2 no grupo OVXSed, sendo a média de consumo deste grupo para esta variável no músculo sóleo de 14 (pmol/(seg*mg) *VS* ≈ 10 (pmol/(seg*mg) em relação aos outros grupos e de 17 (pmol/(seg*mg) *VS* ≈ 13 (pmol/(seg*mg) em relação aos outros grupos no músculo gastrocnêmio, entretanto esta diferença não foi significativa estatisticamente.

7.3.2. Estado 4 (E4)

A respiração ativa no estado 3 (descrita no subitem materiais e métodos) pode ser inibida pela adição da oligomicina (1µg/mL), um antibiótico que inibe a subunidade F₀ (o, indica sensível a oligmicina) da ATP-Sintase (NELSON e COX, 2013), evento que leva a respiração mitocondrial a um nível mínimo (estado 4 = E4) (LARDY *et al.*, 1958). Este estado é outra forma de avaliar o vazamento prótons, pois similar ao estado 2 onde a ATP-Sintase não possui substrato para a sua atividade (ADP), no estado 4 ela está inibida pela oligomicina, e este estado pode ser utilizado como uma medida do vazamento de prótons na presença de substratos como, dissipando a energia de translocação de prótons (fluxo para matriz mitocondrial) da síntese de ATP (DIVAKARUNI; BRAND, 2011; GNAIGER, 2014), deprimindo o fluxo de oxigênio a um nível determinado principalmente pelo vazamento de prótons (MAKRECKA-KUKA; KRUMSCHNABEL; GNAIGER, 2015).

Em nosso estudo encontramos uma diferença estatística neste estado respiratório (E4), com aumento do consumo médio de O₂ nos dois músculos (sóleo e gastrocnêmio) para o grupo OVXSed em relação aos outros três grupos. Este aumento de consumo de O₂ no E4 pode refletir um aumento no estado de vazamento de prótons, bem como pode decorrer do aumento da

atividade das UCPs, quantidade de ANT ou composição fosfolipídica da MIM (DIVAKARUNI; BRAND, 2011).

O E4 respiratório aumenta a diferença de potencial elétrico com concomitante aumento na produção de EROs mitocondrial (ESPOSITO et al., 1999), e o vazamento de prótons diminui a diferença de potencial eletroquímico e a taxa de produção de EROs, sendo este um dos principais mecanismos de prevenção do estresse oxidativo mediados pelas UCP-3 (BRAND et al., 1994, 2004; DIVAKARUNI; BRAND, 2011).

Interessante que nosso estudo também encontrou aumento da expressão de UCP-3 no grupo OVXSed, o que pode explicar parcialmente este aumento na taxa de vazamento de prótons. Este aumento de consumo de O₂ no E4 pode ser uma tentativa de reduzir estresse oxidativo, comum em quadros de redução dos níveis de estrogênio circulante (RODRIGUES, 2016; HA, 2004; MUTHUSAMI et al., 2005)

Apesar desta resposta parecer exercer um efeito protetor, reduzindo a produção de EROS, Brand et al. (2002) mostraram que em animais geneticamente modificados, super-expressão das UCP-3 não gerou proteção contra estresse oxidativo, e os autores concluíram que níveis acima do desacoplamento médio oferece pouca proteção contra estresse oxidativo.

Além disso, o TR foi capaz de reduzir esta resposta no grupo OVXTR, e isto pode ser devido a uma redução da atividade das UCP-3 observada em alguns ensaios em animais OVX com exercício aeróbio (BOSS et al., 1998; NAGAI et al., 2016) e melhor eficiência energética.

7.3.3. Estado 3 e Controle Respiratório

O estado respiratório mitocondrial acoplado (estado 3 = E3) é um componente chave do controle respiratório e da função mitocondrial (GNAIGER, 2012). A adição de uma pequena, mas saturada concentração de ADP (1mM) induz a respiração ativa, ou E3, estado no qual a respiração é proporcionada pelo fluxo reverso de prótons para a matriz mitocondrial através da ATP sintase (complexo V) e a concomitante queda parcial do gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial interna (HÜTTER et al., 2006).

Na respiração ativa (E3) ocorreu redução significativa na velocidade de respiração do grupo OVX-SED para ambos músculos (sóleo, Figura 24, e gastrocnêmio, Figura 27) comparado ao seu respectivo controle positivo (ShamSed) e aos grupos treinados (OVXTR e ShamTR), indicando que a ovariectomia associada ao sedentarismo possivelmente apresenta interferência negativa na atividade da ATP sintase (complexo V) e no gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial interna, fato que prejudica o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons e a respiração mitocondrial (GNAIGER, 2012). Cavalcante-de-

Albuquerque et al. (2014), em trabalho realizado em ratas ovariectomizadas e com a mesma metodologia de avaliação respirométrica em fibras permeabilizadas, observaram também redução na taxa de consumo de oxigênio dos músculos sóleo e gastrocnêmio branco; entretanto, quando normalizada pela atividade da enzima citrato sintase, essa redução no consumo de oxigênio desapareceu, mas somente para o músculo sóleo. Picard et al. (2011) realizaram análises respirométricas nos músculos sóleo e gastrocnêmio em modelo de ratos envelhecidos, e também observaram diminuição da respiração, mas apenas para o músculo sóleo; a normalização por meio da atividade da enzima citrato sintase anulou o resultado inicial.

Esse problema observado no funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial no E3 para os músculos sóleo e gastrocnêmio do grupo OVXSed foi prevenido pelo TR, como pode ser constatado nos resultados do grupo OVX-TR (Fig. 24 e Fig. 27), em que a taxa de consumo de oxigênio ficou próxima ao grupo controle (ShamSed); somente para o músculo gastrocnêmio, a taxa de consumo de oxigênio foi maior para o grupo intacto treinado (ShamTR), indicando que o TR aumenta a capacidade respiratória desse músculo no E3, ou respiração acoplada. Estudo realizado por Gouspillou et al., (2014) detectou modesto prejuízo na respiração ativa (E3) do músculo Vasto Lateral de idosos fisicamente ativos quando comparados com sujeitos jovens ativos; novamente, quando os resultados foram normalizados pela atividade da enzima citrato sintase, nenhuma diferença foi detectada entre ambos grupos.

Prejuízos na capacidade respiratória mitocondrial do músculo esquelético promovidos pelo envelhecimento e menopausa (PICARD et al., 2011; MARZETTI et al., 2013) ainda são controversos na literatura, com redução apresentada em alguns estudos (COOPER et al., 1992; BOFFOLI et al., 1994), mas não em outros um pouco mais atuais (HUTTER et al., 2007; CHABI et al., 2008).

Estudo de Jacobs et al. (2013), realizado em modelo de envelhecimento com camundongos, demonstrou resultados interessantes e também controversos, agora entre os músculos observados nas análises respirométricas; nesse estudo foi observado diminuição no consumo de oxigênio dos músculos sóleo e quadríceps, e aumento na capacidade respiratória do gastrocnêmio em todos os estados respiratórios, comparando-se músculos jovens e músculos velhos. A diminuição no consumo de oxigênio encontrada nos músculos velhos desse estudo corrobora a outros estudos realizados com análises do quadríceps ou com mix de músculos homogeneizados (SHORT et al., 2003; RASMUSSEN et al., 2003). O aumento no consumo de oxigênio e capacidade respiratória encontrada no estudo de Jacobs et al. (2014) para o músculo gastrocnêmio envelhecido corrobora a outros estudos realizados previamente (LANZA et al., 2005; LANZA et al., 2007), mas contrasta com os resultados obtidos em nosso estudo, pois,

também para o gastrocnêmio, a ovariectomia reduziu o consumo de oxigênio no E3 para o grupo sedentário (OVXSed). O controle de acoplamento de elétrons é um indicativo da produção oxidante, tal qual a produção de enzimas antioxidantes (produção da SOD, por exemplo), e está diretamente relacionada à eficiência do acoplamento mitocondrial durante a respiração ativa (E3) (YIN et al., 2010). Além disso, o aumento da capacidade respiratória mitocondrial pode também aumentar o dano oxidativo e diminuir o tempo de vida útil desse tecido (KOKOSZKA et al., 2001).

Porém, é importante salientar que todos os estudos citados foram realizados com mitocôndrias isoladas, técnica já conhecida por exacerbar o grau de disfunção mitocondrial com o envelhecimento quando comparada à técnica de permeabilização da fibra muscular (PICARD et al., 2010). Em modelo de ratas ovariectomizadas, respirometria em fibras permeabilizadas, e o TR como intervenção terapêutica, há ainda um abismo a ser preenchido por mais estudos.

Uma das avaliações mais importantes em ensaios respirométricos é a avaliação da eficiência da fosforilação oxidativa acoplada, índice obtido pela razão entre o E3 e o E2, razão do controle respiratório (RCR) (GOUSPILLOU et al., 2014). Se a fosforilação oxidativa (não relacionada com desacoplamento), e conseqüentemente a RCR estiverem baixas e/ou diminuídas, é indicativo de que a fosforilação oxidativa do sistema está prejudicando diretamente a capacidade respiratória mitocondrial (GNAIGER, 2012).

Os resultados apresentados nas Figuras 24 e 27 demonstraram que a ovariectomia reduziu significativamente a RCR dos músculos sóleo e gastrocnêmio do grupo OVXSed. Novamente aparece o papel importante do TR, mantendo o RCR em condições normais também no grupo OVXTR. Assim como no estudo de Gouspillou et al., (2014), que demonstrou redução significativa na RCR do Vasto Lateral dos idosos devido a maior taxa de consumo de oxigênio no E2 (respiração de repouso), a diminuição significativa na RCR dos músculos sóleo e gastrocnêmio encontrada em nosso estudo, também foi creditada principalmente a maior taxa de consumo de oxigênio no E2. Essa diminuição na RCR sugere um acoplamento moderado na fosforilação oxidativa mitocondrial do músculo envelhecido (GOUSPILLOU et al., 2014). Em contraste com nossos resultados, estudo de Cavalcante-de-Albuquerque et al. (2014) não encontrou diferenças na RCR dos músculos sóleo e gastrocnêmio em ratas ovariectomizadas, devido a não diferença da taxa de consumo de oxigênio no E2. Convém ressaltar que esse estudo não realizou intervenção com exercício físico.

7.3.4. *V_{máx}*

A velocidade máxima de consumo ($V_{máx}$ – estado desacoplado) é obtida pela adição de FCCP (ionóforo), que causa a ruptura do gradiente de concentração iônica transmembrana, com o objetivo de se reproduzir experimentalmente um estado respiratório máximo com a redução do potencial de membrana mitocondrial, para avaliar a capacidade respiratória e integridade do sistema através da CTE (BRAND et al., 2005; NAIGER, 2014). Ainda mais importante, o E4 reflete a eficiência da CTE, e apesar de não ser um estado fisiológico, reflete se a fosforilação de ADP no E3 (acréscimo de ADP) não foi limitado pelo transportador de nucleotídeos (ANT) através na MIM, e o esperado é que se alcance valores próximos do E3 (JUSTO et al., 2005).

Em nosso estudo, no grupo ovariectomizado, o TR aumentou o consumo de O_2 fornecido pelo FCCP em ambos músculos (Figura 25 e 27). Entretanto, ao observarmos os músculos separadamente, podemos identificar algumas diferenças neste ensaio.

O músculo sóleo apresentou menor resposta ao FCCP para o grupo OVXsed em relação a todos outros grupos. Porém, no músculo gastrocnêmio não houve diferença significativa entre o grupo OVXsed e seu controle positivo (ShamSed). Além disso, neste músculo houve diferença significativa entre o grupo ShamTR e ShamSed, sendo maior o consumo no grupo SHAMTR, o que não aconteceu no músculo sóleo, e pode representar uma melhor resposta adaptativa deste tipo de fibra muscular ao nosso protocolo de treino e maior integridade da CTE par o grupo ShamTR em relação ao grupo ShamSed.

A partir do exposto nesse capítulo, é importante salientar que uma falha importante em nosso estudo está na não determinação da atividade da citrato sintase, análise que deverá ser realizada para se obter a normalização dos resultados respirométricos. Também em curso, análises da expressão gênica dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e análises da atividade das enzimas antioxidantes, resultados que complementarão os dados obtidos até o presente momento.

8. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados em nosso trabalho permitem-nos concluir que a ovariectomia afeta a função mitocondrial no músculo sóleo e gastrocnêmio de ratas avaliadas de forma direta e precisa pelo consumo de oxigênio em biópsia tecidual, assim como aumenta a expressão gênica da UCP-3.

A princípio, parece-nos que a redução nos níveis circulantes de estrogênio e o TR afeta a expressão de UCP-3, sendo que ratas OVXSed apresentaram aumento na expressão de UCP-3, quadro que foi parcialmente revertido pelo TR. Também, a ovariectomia pode influenciar o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons durante a respiração acoplada (E3) e a respiração desacoplada (E4), e que treinamento resistido crônico proposto em nosso protocolo é uma ferramenta terapêutica interessante e eficaz na prevenção dos distúrbios que afetam a cadeia respiratória mitocondrial, e conseqüentemente, a função mitocondrial de ratas ovariectomizadas, além de reduzir um possível aumento desproporcional na expressão gênica de UCP-3, que pode conduzir a um ciclo fútil de energia.

Espera-se, portanto, que nosso estudo apresente caráter translacional, e que alguns conhecimentos gerados possam ser transpostos em um futuro próximo para estudos com seres humanos, apresentando como foco a disfunção mitocondrial e possíveis mecanismos intrínsecos que modulam a sua atividade, como as UCPs, que estão sendo investigadas em fisiopatologia de doenças cada vez mais presentes no período pós-menopáusicas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULNOUR, J. et al. The effect of the menopausal transition on body composition and cardiometabolic risk factors. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, v. 19, n. 7, p. 760–767, 2012.
- AL-FLEESY, O. S. H. The Mitochondrion : The Prisoner of a False Origin and The Victim of Wrong Theories. v. 4, n. 2, p. 1–4, 2017.
- ANGULO, J.; EL ASSAR, M.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Frailty and sarcopenia as the basis for the phenotypic manifestation of chronic diseases in older adults. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 50, p. 1–32, 2016.
- AFFOURTIT, Charles et al. Novel uncoupling proteins. In: **Novartis Foundation Symposium**. Chichester; New York; John Wiley; 1999, 2007. p. 70.
- BAFFY, G. Mitochondrial uncoupling in cancer cells: Liabilities and opportunities. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1858, n. 8, p. 655–664, 2017.
- BARBOSA, M. R. et al. Resistance Training and Ovariectomy: Antagonistic Effects in Mitochondrial Biogenesis Markers in Rat Skeletal Muscle. **International Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 11, p. 841–848, 2016.
- BENARD, G.; ROSSIGNOL, R. Ultrastructure of the Mitochondrion and Its Bearing on Function and Bioenergetics. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 8, p. 1313–1342, 2008.
- BO, H. et al. Mitochondrial redox metabolism in aging: Effect of exercise interventions. **Journal of Sport and Health Science**, v. 2, n. 2, p. 67–74, 2013.
- BO, H.; ZHANG, Y.; JI, L. L. Redefining the role of mitochondria in exercise: A dynamic remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1201, p. 121–128, 2010.
- BRAND, M. D. et al. The causes and functions of mitochondrial proton leak. **BBA - Bioenergetics**, v. 1187, n. 2, p. 132–139, 1994.
- BRAND, M. D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. **Experimental Gerontology**, v. 35, n. 6–7, p. 811–820, 2000.
- BRAND, M. D. et al. Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. **The Biochemical journal**, v. 368, n. Pt 2, p. 597–603, 2002.
- BRAND, M. D. et al. Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 6, p. 755–767, 2004.
- BRAND, M. D. et al. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. **Biochemical Journal**, v. 392, n. 2, p. 353–362, 2005.
- BRAND, M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 100, n. September, p. 14–31, 2016.
- BRINTON, R. D. Minireview: Translational animal models of human menopause: Challenges and emerging opportunities. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3571–3578, 2012.

- BROWN, M. Skeletal muscle and bone : effect of sex steroids and aging. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 65211, n. 4, p. 120–126, 2008.
- BUSIELLO, R. A.; SAVARESE, S.; LOMBARDI, A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. FEB, p. 36, 2015.
- BUSQUETS, S. et al. In the rat, tumor necrosis factor α administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNAs in skeletal muscle: A possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis? **FEBS Letters**, v. 440, n. 3, p. 348–350, 1998.
- CALVANI, R. et al. Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. **Biological Chemistry**, v. 394, n. 3, p. 393–414, 2013.
- CAMPBELL, S. E.; FEBBRAIO, M. A. Effect of ovarian hormones on mitochondrial enzyme activity in the fat oxidation pathway of skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 281, n. 4, p. E803–E808, 2001.
- CARR, M. C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 6, p. 2404–2411, 2003.
- CARVILLE, S. F.; RUTHERFORD, O. M.; NEWHAM, D. J. Power output, isometric strength and steadiness in the leg muscles of pre- and postmenopausal women; the effects of hormone replacement therapy. **European Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 3, p. 292–298, 2006.
- CHABI, B. et al. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. **Ageing Cell**, v. 7, n. 1, p. 2–12, 2008.
- CHEN, J. Q.; YAGER, J. D.; RUSSO, J. Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1746, n. 1, p. 1–17, 2005.
- CHEN, L. K. et al. Sarcopenia in Asia: Consensus report of the Asian working group for sarcopenia. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 15, n. 2, p. 95–101, 2014.
- CHURCH, T. S. et al. Effects of Different Doses of Physical Activity. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 297, n. 19, p. 2081–2091, 2007.
- CLARK, B. C.; MANINI, T. M. Sarcopenia 6¼ Dynapenia. v. 63, n. 8, p. 829–834, 2008.
- CONTI, F. F. et al. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluations. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 12, p. R1532–R1539, 2015.
- CRICK, F. H. C. © 1961 Nature Publishing Group. 1961.
- CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. **Age and Ageing**, v. 39, n. 4, p. 412–423, 2010.
- DERDAK, Z. et al. NIH Public Access. **Cancer Res.**, v. 68, n. 8, p. 2813–2819, 2009.
- DINIZ, T. A. et al. Exercício físico como tratamento não farmacológico para a melhora da saúde pós-menopausa. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 23, n. 4, p. 322–327, 2017.

- DIVAKARUNI, A. S.; BRAND, M. D. The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. **Physiology**, v. 26, n. 3, p. 192–205, 2011.
- DOMINGOS, M. M. et al. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 4, p. 1437–1444, 2011.
- ECHTAY, K. S. et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 96–9, 2002.
- ELAM, M. L. et al. Effects of Obesity on Bone Mass and Quality in Ovariectomized Female Zucker Rats. **Journal of Obesity**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- ESPOSITO, L. A et al. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 9, p. 4820–4825, 1999.
- ESTEVEZ, T. C.; BRAND, M. D. The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1709, n. 1, p. 35–44, 2005.
- FARHAT, F. et al. Gender-dependent differences of mitochondrial function and oxidative stress in rat skeletal muscle at rest and after exercise training. **Redox Report**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2017.
- FERNANDA, M.; RODRIGUES, C. Inflamação Do Tecido Adiposo Visceral Em Ratas Ovariectomizadas : Efeitos Do Treinamento Resistido E Inflamação No Tecido Adiposo Visceral Em Ratas Ovariectomizadas : Efeitos Do Treinamento Resistido E. 2016.
- FLECK, S. J. et al. Effect of resistance training with different frequencies and detraining on muscular strength and oxidative stress biomarkers in older women. **Age**, v. 37, n. 5, 2015.
- FONSLow, B. R. et al. The on/off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. v. 10, n. 1, p. 54–56, 2013.
- GALLAHUE, David L.; OZMUN, John C.; GOODWAY, Jackie D. **Compreendendo o desenvolvimento motor-: bebês, crianças, adolescentes e adultos**. AMGH Editora, 2013.
- GALGANI, Jose E.; CEDRIC, M. O. R. O.; RAVUSSIN, Eric. Metabolic flexibility and insulin resistance. **American journal of physiology-endocrinology and metabolism**, 2008.
- GAIGNARD, P. et al. Role of sex hormones on brain mitochondrial function, with special reference to aging and neurodegenerative diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. DEC, p. 1–18, 2017.
- GÁMEZ-PÉREZ, Y. et al. Long-term high-fat-diet feeding induces skeletal muscle mitochondrial biogenesis in rats in a sex-dependent and muscle-type specific manner. **Nutrition and Metabolism**, v. 9, p. 1–10, 2012.
- GARBER, C. E. et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 7, p. 1334–1359, 2011.
- GIMENO, R. E. et al. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: A potential molecular mediator of human thermogenesis. **Diabetes**, v. 46, n. 5, p. 900–906, 1997.

GONZALEZ, A. M. et al. Intramuscular Anabolic Signaling and Endocrine Response Following Resistance Exercise: Implications for Muscle Hypertrophy. **Sports Medicine**, v. 46, n. 5, p. 671–685, 2016.

GOUSPILLOU, G. et al. Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans. **FASEB Journal**, v. 28, n. 4, p. 1621–1633, 2014.

HA, B. J. Oxidative stress in ovariectomy menopause and role of chondroitin sulfate. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 8, p. 867–872, 2004.

HAWKINS, P. et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. **Laboratory animals**, v. 45, n. 1, p. 1-13, 2011

HARPER, M. E.; HIMMS-HAGEN, J. Mitochondrial efficiency: Lessons learned from transgenic mice. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1504, n. 1, p. 159–172, 2001.

HENNEMAN, Elwood; SOMJEN, George; CARPENTER, David O. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. **Journal of neurophysiology**, v. 28, n. 3, p. 560-580, 1965.
HEPPLE, R. T. Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. SEP, p. 1–13, 2014.

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

HORSTMAN, A. M. et al. The role of androgens and estrogens on healthy aging and longevity. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 67, n. 11, p. 1140–1152, 2012.

JACOBS, Robert A. et al. Fast-twitch glycolytic skeletal muscle is predisposed to age-induced impairments in mitochondrial function. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 68, n. 9, p. 1010-1022, 2013

JEONG, S.; YOON, M. Swimming's prevention of ovariectomy-induced obesity through activation of skeletal-muscle PPAR?? **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 1–10, 2012.

JI, L. L.; KANG, C. Role of PGC-1 α in sarcopenia: Etiology and potential intervention - A mini-review. **Gerontology**, v. 61, n. 2, p. 139–148, 2015.

JUSTO, R. et al. Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v. 289, n. 2, p. C372-8, 2005.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner.**, v. 15, n. 0169–6009 (Print), p. 175–191, 1991.

KAMP, F. et al. **Uncoupling proteins: Martin Klingenberg's contributions for 40 years.** [s.l.] Elsevier Inc., 2018. v. 657

KANG, D.; KIM, S. H.; HAMASAKI, N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. **Mitochondrion**, v. 7, n. 1–2, p. 39–44, 2007.

KANG, S. et al. Association between Sarcopenic Obesity and Metabolic Syndrome in Postmenopausal Women : A Cross-sectional Study Based on the Korean National Health and Nutritional Examination Surveys from 2008 to 2011. p. 9–14, 2017.

KEMMLER, W. et al. Long-term four-year exercise has a positive effect on menopausal risk factors: The erlangen fitness osteoporosis prevention study. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 21, n. 1, p. 232–239, 2007.

KLINGE, C. M. NIH Public Access. **Cell**, v. 105, n. 6, p. 1342–1351, 2009.

KOEBELE, Stephanie V.; BIMONTE-NELSON, Heather A. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. **Maturitas**, v. 87, p. 5–17, 2016

KOKOSZKA, Jason E. et al. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 5, p. 2278–2283, 2001

KOZAK, U. C. et al. An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 1, p. 59–67, 1994.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A.; FRENCH, D. N. Resistance Training for Health and Performance. **Current Sports Medicine Reports**, v. 1, n. 3, p. 165–171, 2002.

KUBOTA, K. et al. Rethinking progesterone regulation of female reproductive cyclicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 15, p. 4212–4217, 2016.

KUZNETSOV, A. V et al. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 965–976, 2008.

LANG, T. et al. Sarcopenia: Etiology, clinical consequences, intervention, and assessment. **Osteoporosis International**, v. 21, n. 4, p. 543–559, 2010.

LANZA, Ian R.; BEFROY, Douglas E.; KENT-BRAUN, Jane A. Age-related changes in ATP-producing pathways in human skeletal muscle in vivo. **Journal of applied physiology**, 2005.

LEITE, R. D. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, 2009.

LIM, S. et al. Association Between Body Composition and Pulmonary Function in Elderly People: The Korean Longitudinal Study on Health and Aging. **Obesity**, v. 19, n. 3, p. 631–638, 2011.

LOBO, R. A. Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. **Maturitas**, v. 60, n. 1, p. 10–18, 2008.

MAKRECKA-KUKA, M.; KRUMSCHNABEL, G.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry for simultaneous measurement of oxygen and hydrogen peroxide fluxes in permeabilized cells, tissue homogenate and isolated mitochondria. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1319–1338, 2015.

MALTAIS, M. L.; DESROCHES, J.; DIONNE, I. J. Changes in muscle mass and strength after menopause. v. 9, n. October, p. 186–197, 2009.

- MARZANI, Barbara; PANSARASA, Orietta; MARZATICO, Fulvio. Oxidative stress” and muscle aging: influence of age, sex, fiber composition and function. In: **Basic and Applied Myology**. 2004.
- MARZETTI, E. et al. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: From signaling pathways to clinical trials. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2288–2301, 2013.
- MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 3, p. 309–338, 2013.
- MAZZATTI, D. J. et al. Muscle unloading-induced metabolic remodeling is associated with acute alterations in PPAR δ and UCP-3 expression. **Physiological Genomics**, v. 34, n. 2, p. 149–161, 2008.
- MESSIER, V. et al. Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones. **Maturitas**, v. 68, n. 4, p. 331–336, 2011.
- MILLS, E. M. et al. Pharmacology: Uncoupling the agony from ecstasy. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 403–404, 2003.
- MIWA, S.; BRAND, M. D. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 6, p. 1300–1301, 2003.
- MUTHUSAMI, S. et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. **Clinica Chimica Acta**, v. 360, n. 1–2, p. 81–86, 2005.
- NAGAI, S. et al. Estrogen modulates exercise endurance along with mitochondrial uncoupling protein 3 downregulation in skeletal muscle of female mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 480, n. 4, p. 758–764, 2016.
- NAVARRO, A.; BOVERIS, A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. **American journal of physiology Cell physiology**, v. 292, n. 2, p. C670-86, 2007.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Principios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- NEWMAN AB VISSER M, ET AL., K. V. Strength, but not muscle mass, is associated with mortality in the health, aging and body composition study cohort. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 61, n. 1, p. 72–77, 2006.
- NICHOLLS, David G. Hamster Brown-Adipose-Tissue Mitochondria: Purine Nucleotide Control of the Ion Conductance of the Inner Membrane, the Nature of the Nucleotide Binding Site. **European Journal of Biochemistry**, v. 62, n. 2, p. 223-228, 1976.
- LONG, Joseph Abraham; EVANS, Herbert McLean. **The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena**. University of California Press, 1922
- OLIVEIRA, R. J. et al. Identification of sarcopenic obesity in postmenopausal women: A cutoff proposal. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 11, p. 1171–1176, 2011.
- ORTMEYER, H. K.; GOLDBERG, A. P.; RYAN, A. S. Exercise with weight loss improves adipose tissue and skeletal muscle markers of fatty acid metabolism in postmenopausal women. **Obesity**, v. 25, n. 7, p. 1246–1253, 2017.
- PANDOLF, K. B. Experimental Aging Research : An International Journal Devoted to the

- Scientific Study of the Aging Process Aging and human heat tolerance. n. August 2015, p. 37–41, 2007.
- PEDERSEN, S. B. et al. Insulin and contraction directly stimulate UCP2 and UCP3 mRNA expression in rat skeletal muscle in vitro. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 283, n. 1, p. 19–25, 2001.
- PICARD, M. et al. Resistance to Ca²⁺-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 2, p. R659–R668, 2008.
- PICARD, M. et al. Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. **Aging Cell**, v. 10, n. 6, p. 1047–1055, 2011a.
- PICARD, M. et al. Mitochondrial structure and function are disrupted by standard Isolation methods. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011b.
- PILEGAARD, H. et al. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. v. 06519, p. 806–814, 2011.
- PRESTES, J. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. **Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme**, v. 34, n. 4, p. 700–6, 2009.
- PRESTES, J. et al. Resistance training and glycogen content in ovariectomized rats. **Int J Sports Med**, v. 33, n. 7, p. 550–554, 2012.
- R, S. S. et al. Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women (Structured abstract). **Diabetes Obesity and Metabolism**, v. 8, n. 5, p. 538–554, 2006.
- RASMUSSEN, Ulla F. et al. Experimental evidence against the mitochondrial theory of aging A study of isolated human skeletal muscle mitochondria. **Experimental gerontology**, v. 38, n. 8, p. 877–886, 2003.
- RANGWALA, S. M. et al. Estrogen-related receptor γ is a key regulator of muscle mitochondrial activity and oxidative capacity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 22619–22629, 2010.
- RETTBERG, Jamaica R.; YAO, Jia; BRINTON, Roberta Diaz. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 8–30, 2014
- RICQUIER, D.; KADER, J.-C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 73, n. 3, p. 577–583, 1976.
- ROLLAND, Y. M. et al. Loss of appendicular muscle mass and loss of muscle strength in young postmenopausal women. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 62, n. 3, p. 330–335, 2007.
- ROMANELLO, V.; SANDRI, M. Mitochondrial quality control and muscle mass maintenance. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. JAN, p. 1–21, 2016.
- RONCHI, J. A. Transição de permeabilidade mitocondrial em mitoplastos de fígado de rato.

2010.

ROSANO, G. M. C. et al. Menopause and cardiovascular disease: The evidence. **Climacteric**, v. 10, n. SUPPL. 1, p. 19–24, 2007.

ROSENBERG, I. H. Symposium: Sarcopenia: Diagnosis and Mechanisms Sarcopenia: Origins and Clinical Relevance 1. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 990–991, 1997.

ROSSINI, J. O Treinamento Resistido Previne a Disfunção Mitocondrial no Córtex Pré-Frontal e no Músculo Vasto Lateral de Ratas Ovariectomizadas. 2016.

RYAN, A. S.; ORTMEYER, H. K. Insulin suppression of fatty acid skeletal muscle enzyme activity in postmenopausal women, and improvements in metabolic flexibility and lipoprotein lipase with aerobic exercise and weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 43, n. 2, p. 276–284, 2019.

SALOPURO, T. et al. Variation in the UCP2 and UCP3 genes associates with abdominal obesity and serum lipids: The Finnish diabetes prevention study. **BMC Medical Genetics**, v. 10, p. 94, 2009.

SCHAPIRA, A. H. V.; COOPER, J. M. Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing. **Mutation Research/DNAging**, v. 275, n. 3-6, p. 133-143, 1992.

SCHOENAU, E.; FRICKE, O. Interaction between muscle and bone. **Hormone Research**, v. 66, n. SUPPL. 1, p. 73–78, 2007.

SCHRAUWEN, P. et al. Reduced skeletal muscle uncoupling protein-3 content in prediabetic subjects and type 2 diabetic patients: Restoration by rosiglitazone treatment. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 4, p. 1520–1525, 2006.

SCHREIBER, S. N. et al. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 17, p. 6472–7, 2004.

SHIGUEMOTO, G. E. et al. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. **Maturitas**, v. 57, n. 3, p. 261–270, 2007.

SHIGUEMOTO, G. E. et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 22, n. 5, p. 607–617, 2012.

SHORT, K. R. et al. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 15, p. 5618–5623, 2005.

SIMOPOULOS, A. P. Experimental Biology and Medicine Minireview. **Experimental Biology and Medicine**, n. May, 2010.

SKULACHEV, V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis**, v. 11, n. 4, p. 473–485, 2006.

SOLANES, G. et al. The Human Uncoupling Protein-3 Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 41, p. 25433–25436, 1997.

SOLORZANO, C. M. B. Metabolic implications of breastfeeding. [s.d.].

SØRENSEN, M. B. et al. Obesity and Sarcopenia after Menopause Are Reversed by Sex

- Hormone Replacement Therapy. **Obesity Research**, v. 9, n. 10, p. 622–626, 2001.
- SOULES, M. R. et al. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). **Climacteric**, v. 4, n. 4, p. 267–272, 2001.
- SPANGENBURG, E. E. et al. Measuring mitochondrial respiration in intact single muscle fibers. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 6, p. R712–R719, 2011.
- THIRUPATHI, A.; DE SOUZA, C. T. Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 73, n. 4, p. 487–494, 2017.
- TOIGO, M.; BOUTELLIER, U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. **European Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 6, p. 643–663, 2006.
- TRICOLI, V. Papel das ações musculares excêntricas nos ganhos de força e de massa muscular. **Revista da Biologia**, v. 11, n. 1, p. 38–42, 2014.
- VIÑA, J. et al. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. **FEBS Letters**, v. 579, n. 12, p. 2541–2545, 2005.
- WALLEN, W. J.; BELANGER, M. P.; WITTNICH, C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 9, p. 2351–2357, 2001.
- WELLE, S. et al. Reduced amount of mitochondrial DNA in aged human muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 4, p. 1479–1484, 2003.
- WHEELER, M. B. et al. Increased Uncoupling Protein-2 Levels in β -cells Are Associated With Impaired Glucose-Stimulated Insulin Secretion: Mechanism of Action. **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1302–1310, 2007.
- WIJK, A.; EKMAN, M.; JOHANSSON, O.; JANSSON, E.; ESBJORNSSON, M. Expression of Both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. **Histochem Cell Biol**, v.131, p.181-9, 2009.
- ZHAI, P. et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice. **Amer J Physiol Heart Circ Phy**, v. 278, n. 5, p. H1640–H1647, 2000.
- ZHOU, M. et al. UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 279, n. 3, p. E622-9, 2000.
- YIN, Ying et al. Reaction mechanism of superoxide generation during ubiquinol oxidation by the cytochrome bc1 complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 22, p. 17038-17045, 2010.