

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas
UFSCar/UNESP

GABRIEL CARLOS GOULART SCARLATO

EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE O COEFICIENTE DE
CONTROLE DE FLUXO (FCC) DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL
DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATAS OVARIETOMIZADAS

SÃO CARLOS - SP

2020

GABRIEL CARLOS GOULART SCARLATO

EFEITO DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE O COEFICIENTE DE
CONTROLE DE FLUXO (FCC) DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL
DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATAS OVARIETOMIZADAS

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto

**São Carlos – SP
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Gabriel Carlos Goulart Scarlato, realizada em 03/09/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto (UFSCar)

Prof. Dr. André Vessoni Alexandrino (UNICEP)

Prof. Dr. João Paulo Botero (UNIFESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado a minha mãe Oritinéia Goulart e a minha esposa Maria Genice da Silva. O amor com que me tratam me faz superar desafios e acreditar no futuro.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de primeiramente agradecer a Deus, pela dádiva da vida, por me ouvir, me abençoar, me guardar e por ter planos para minha vida maiores que os meus sonhos!

Agradeço em especial a minha mãe Oritinéia Goulart (Néia). Pela coragem e determinação com que cuidou, educou e deu o exemplo de uma vida digna e honrada a mim e aos meus irmãos, mesmo sendo mãe solteira e diante de tempos difíceis nunca nos deixou desamparados, sempre nos ofertando gratuitamente infinitas e generosas doses de amor.

Agradeço a minha querida e amada esposa Maria Genice da Silva por sempre me apoiar, incentivar, consolar ao longo da minha vida e principalmente deste período, sendo sempre muito compreensiva com os desafios impostos pela vida acadêmica.

Agradeço ao Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto pela oportunidade que me foi dada anos atrás, pelo respeito com que sempre me tratou, pela paciência e por ensinamentos valiosos em diversas áreas, dos quais tenho a plena convicção que levarei durante toda minha vida pessoal e acadêmica.

Agradeço ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi e ao Prof. Dr. Roger Frigério Castilho por viabilizar as análises deste estudo, abrindo as portas de seus laboratórios na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Agradeço ao Prof. Me. Alyson Roberto Batista Monteiro por ser como um irmão para mim dentro e fora da vida acadêmica e por ter estado presente em todas as etapas desta dissertação.

Agradeço à minha estimada amiga Ana Laura Dutra Coelho pelo apoio, colaboração, amizade e respeito durante a realização deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o período de realização deste mestrado.

Agradeço a todos os membros do nosso grupo de pesquisa e demais colegas de laboratórios vizinhos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste estudo.

Enfim, deixo aqui o meu sincero sentimento de gratidão a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso deste trabalho, a todos vocês o meu muito obrigado!

EPÍGRAFE

“Tudo posso naquele que me fortalece (...)”

Filipenses cap. 4 vers. 13

RESUMO

Introdução: A menopausa é um processo naturalístico marcante do envelhecimento feminino, resultante da diminuição progressiva na produção dos principais hormônios sexuais ovarianos de forma permanente. A queda na produção dos estrogênios ovarianos exerce um efeito negativo no sistema muscular estriado esquelético, tornando as mulheres mais suscetíveis a desenvolver o quadro de sarcopenia. Em busca do conhecimento acerca dos fenômenos que ocorrem no período pós-menopausa e seus mecanismos de ação, modelos de retirada de ovários em ratas (OVX) são amplamente utilizados como modelo experimental de indução à menopausa, reproduzindo de maneira eficaz os efeitos deletérios observados na menopausa. É limitada a quantidade de estudos que investigaram o efeito no funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e sua relação com a expressão gênica da ANT-1 em ratas OVX, bem como dos efeitos da intervenção do treinamento resistido (TR) neste contexto. **Objetivo:** O presente estudo tem como principal objetivo avaliar os efeitos do treinamento resistido no funcionamento dos complexos proteicos da cadeia respiratória durante a respiração acoplada e desacoplada no modelo experimental de ratas ovariectomizadas, assim como a expressão gênica da ANT-1. **Materiais e Métodos:** Neste estudo, 40 ratas Wistar adultas foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos experimentais: INT-SED, INT-TR, OVX-SED e OVX-TR. A ovariectomia foi realizada na 13^o semana de vida desses animais. O modelo de TR realizado foi o de subida em escada, com duração de 22 semanas. Os tecidos corporais de interesse foram analisados após a eutanásia, que ocorreu 48 horas após a última sessão de treino. O consumo de oxigênio (O₂) e os parâmetros respiratórios mitocondriais foram realizados em biópsia tecidual do músculo Gastrocnêmio por meio da técnica de Respirometria de Alta Resolução (Oroboros®). As titulações para se estabelecer o Coeficiente de Controle de Fluxo (FCC) foram realizadas na ANT, no Trocador de Fosfato e na ATP-Sintase. **Resultados:** A ovariectomia afetou negativamente a eficiência de funcionamento da ANT-1 e da ATP-sintase no grupo sedentário (OVX-SED). Em relação ao consumo de oxigênio, no estado respiratório acoplado (E3) houve uma diminuição significativa no consumo do grupo OVX-SED comparado aos outros 3 grupos, efeito revertido pelo treinamento resistido adotado no estudo; ambos os grupos treinados obtiveram ótimos valores do FCC e no consumo de oxigênio no E3. **Conclusão:** Concluímos que a ovariectomia promove a diminuição na eficiência do FCC da ANT e ATP-Sintase do músculo gastrocnêmio de ratas OVX sedentárias, bem como promove diminuição no consumo de oxigênio no E3. Um programa de TR é potencialmente capaz de prevenir estas respostas deletérias e manter a função mitocondrial em condições fisiológicas.

Palavras-chave: Menopausa. Ovariectomia. Respiração Mitocondrial Acoplada. FCC. Treinamento Resistido.

ABSTRACT

Introduction: Menopause is a marked naturalistic process of female aging, resulting from the progressive decrease in the production of the main ovarian sex hormones permanently. The drop in the production of ovarian estrogens has a negative effect on the striated skeletal muscle system, making women more susceptible to developing sarcopenia. In search of knowledge about the phenomena that occur in the post-menopausal period and their mechanisms of action, models of ovarian removal in rats (OVX) are widely used as an experimental model of menopause induction, effectively reproducing the deleterious effects observed in menopause. The number of studies that have investigated the effect on the functioning of the electron transport chain (CTE) and its relationship with ANT-1 gene expression in OVX rats is limited, as well as the effects of resistance training (TR) intervention in this context. **Objective:** This study aims to evaluate the effects of resistance training on the functioning of protein complexes in the respiratory chain during coupled and uncoupled breathing in the experimental model of ovariectomized rats, as well as the ANT-1 gene expression. **Materials and Methods:** In this study, 40 adult Wistar rats were randomly assigned to 4 experimental groups: INT-SED, INT-TR, OVX-SED and OVX-TR. Ovariectomy was performed in the 13th week of life of these animals. The RT model performed was the stair climbing, lasting 22 weeks. The body tissues of interest were analyzed after euthanasia, which occurred 48 hours after the last training session. Oxygen consumption (O_2) and mitochondrial respiratory parameters were performed on tissue biopsy of the Gastrocnemius muscle using the High Resolution Respirometry technique (Oroboros®). The titrations to establish the Flow Control Coefficient (FCC) were performed at ANT, at the Phosphate Exchanger and at the ATP-Synthase. **Results:** Ovariectomy negatively affected the functioning efficiency of ANT-1 and ATP synthase in the sedentary group (OVX-SED). Regarding oxygen consumption, in the coupled respiratory state (E3) there was a significant decrease in the consumption of the OVX-SED group compared to the other 3 groups, an effect reversed by the resistance training adopted in the study; both trained groups obtained excellent FCC values and oxygen consumption at E3. **Conclusion:** We conclude that ovariectomy promotes a decrease in the efficiency of the FCC of ANT and ATP-Synthase of the gastrocnemius muscle of sedentary OVX rats, as well as promoting a decrease in oxygen consumption at E3. An RT program is potentially capable of preventing these harmful responses and maintaining mitochondrial function in physiological conditions.

Keywords: Menopause. Ovariectomy. Coupled Mitochondrial Respiration. FCC. Resistance Training.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Expectativa de vida da população brasileira (2018)	16
Figura 2. Alterações no tecido muscular estriado esquelético na pós-menopausa	17
Figura 3. Procedimento de remoção bilateral dos ovários de ratas	18
Figura 4. Disfunção mitocondrial como consequente causa da sarcopenia	22
Figura 5. Representação estrutural dos componentes básicos de uma mitocôndria.....	25
Figura 6. CTE em mamíferos	26
Figura 7. Representação de duas etapas do ciclo Q	29
Figura 8. Adaptações mitocondriais geradas pelo exercício físico	37
Figura 9. Organograma dos grupos experimentais	41
Figura 10. Equipamentos utilizados para a sessão de TR	42
Figura 11. Desenho experimental	43
Figura 12. Modelo de análise de respiração mitocondrial (ANT-1)	46
Figura 13. Comparação do útero de animais ovariectomizados e intactos	49
Figura 14. Medida da tíbia com paquímetro	49
Figura 15. Carga máxima de carregamento	49
Figura 16. Respirometria de Alta Resolução	50
Figura 17. FCC da ANT-1	51
Figura 18. FCC da ATP-sintase	52
Figura 19. FCC do Carreador de Fosfato	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Cronograma do TR.....	43
TABELA 2. Massa corporal (MC) e demais tecidos	48

LISTA DE SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
ANT	Adenina nucleotídeo translocase (transportador de nucleotídeos de adenina)
ANT-1	Transportador de Nucleotídeos de Adenina 1
ANT-2	Transportador de Nucleotídeos de Adenina 2
ANT-3	Transportador de Nucleotídeos de Adenina 3
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
CMC	Carga Máxima de Carregamento
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
CRM	Cadeira Respiratória Mitocondrial
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
nDNA	Ácido Desoxirribonucléico Nuclear
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
EPM	Erro Padrão da Média
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
FO	Fosforilação Oxidativa
FOXO-3	Forkhead Box O3
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INT	Animal intacto
MAPK	Mitogeno Ativado por Proteína Quinase
MME	Membrana Mitocondrial Externa
MMI	Membrana Mitocondrial Interna
MiR05	Meio de respiração número 05
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MnSOD	Superóxido dismutase mitocondrial dependente de manganês
mtDNA	Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial
MuRF-1	Muscle Ring Finger-1
NF-Kb	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NADH	Dinucleotídeo de Nicotinamida-adenina Reduzido
NFR-1	Fator de Respiração Nuclear
O ₂	Oxigênio

OVX	Ovariectomia
Q	Ubiquinona
QH•	Semiquinona
QH ₂	Ubiquinol
PGC1- α	Co-ativador-1 alfa do Receptor Ativado por Proliferador de
Peroxissoma	
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
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
SED	Sedentário
Tfam	Fatores de Transcrição Mitocondrial
TR	Treinamento Resistido
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
α	Alfa
β	Beta
μg	Micrograma
μM	Micromolar
$\Delta\psi$	Potencial Elétrico

Sumário

1. ENUNCIADO DO PROBLEMA.....	10
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. HIPÓTESE.....	14
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
4.1. Menopausa.....	15
<i>4.1.1. Menopausa e Ovariectomia.....</i>	<i>17</i>
4.2 Sarcopenia.....	18
<i>4.2.1. Menopausa e Sarcopenia.....</i>	<i>19</i>
<i>4.2.2. Sarcopenia, Menopausa e Mitocôndria.....</i>	<i>22</i>
4.3. Estrutura Mitocondrial.....	24
<i>4.3.1. Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE).....</i>	<i>25</i>
<i>4.3.2. Complexo I.....</i>	<i>27</i>
<i>4.3.3. Complexo II.....</i>	<i>27</i>
<i>4.3.4. Complexo III.....</i>	<i>28</i>
<i>4.3.5. Complexo IV.....</i>	<i>29</i>
<i>4.3.6. ATP-sintase.....</i>	<i>29</i>
<i>4.3.7. Adenina-nucleotídeo-translocase (ANT).....</i>	<i>30</i>
<i>4.3.8. Carreador de Fosfato (PiC).....</i>	<i>32</i>
4.4. Teoria Quimiosmótica de Mitchell.....	33
4.5. Músculo Esquelético: Características Funcionais.....	34
<i>4.5.1. Fibras Musculares Estriadas Esqueléticas.....</i>	<i>34</i>
<i>4.6.1. Treinamento Resistido, Menopausa, Sarcopenia e Mitocôndria.....</i>	<i>38</i>
5. OBJETIVO.....	40

5.1. Objetivo Geral	40
6.1. Animais e condições experimentais	41
6.2. Grupos Experimentais	41
6.3. Protocolo de Treinamento Resistido (TR)	42
6.4. Desenho experimental	43
6.5. Preparação cirúrgica e ovariectomia	43
6.6. Eutanásia dos animais e coleta dos tecidos	44
6.7. Preparação das amostras	44
6.8. Avaliação de parâmetros respiratórios	44
6.9. Coeficiente de Controle de Fluxo (FCC)	45
6.10. Determinação da atividade da ANT-1	45
6.11. Determinação da atividade do carreador de fosfato	46
6.12. Determinação da atividade da ATP-sintase	46
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
8. RESULTADOS	48
8.1. Análises de massas teciduais	48
8.2. Carga máxima de carregamento	49
8.3. Consumo de Oxigênio	50
8.4. FCC da ANT-1	51
8.5. FCC da ATP-sintase	52
8.6. FCC do Carreador de Fosfato	53
9. DISCUSSÃO	54
9.1 Evolução ponderal da massa corporal, tecidos e CMC	54
9.2 Estado 2 – Respiração de Repouso ou de Rotina	55
9.3 Estado 3 – Respiração estimulada por ADP ou Respiração Acoplada	56

9.4 Razão de Controle Respiratório (RCR)	58
9.5 FCC da ANT-1	59
9.6 FCC da ATP-sintase	60
9.7 FCC do Carreador de fosfato	61
10. CONCLUSÃO.....	62
10.1 Perspectivas futuras	62
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
12. ANEXOS	73
12.1. Certificado CEUA	73
12.2. Tabela nutricional (ração para roedores)	74

1. ENUNCIADO DO PROBLEMA

A menopausa é um processo naturalístico marcante do envelhecimento feminino, resultante da diminuição progressiva na produção dos principais hormônios sexuais ovarianos de forma permanente, impossibilitando a atividade folicular ovariana, ocorrendo em média por volta da quinta década de existência feminina (DE LORENZI et al., 2006; MALTAIS et al., 2009; POLOTSKY; POLOTSKY, 2010; MONTELEONE et al., 2018).

Ao longo da vida reprodutiva da mulher, a produção dos estrogênios ovarianos, sendo o mais importante o 17β estradiol (E2), é reduzida na medida em que a quantidade de folículos primordiais diminuem, marcando o fim do ciclo reprodutivo feminino (HALL, 2011). A diminuição dos estrogênios está diretamente associada com a perda da densidade mineral óssea, redistribuição da gordura subcutânea para áreas viscerais, aumento do risco de doenças cardiovasculares, alterações no perfil glicêmico sanguíneo, aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, além de dificuldades na esfera emocional e social, eventos predisõem a redução da qualidade e expectativa de vida (DE LORENZI et al., 2006; ROSANO et al., 2007; LOVEJOY et al., 2009).

Essas assertivas, além de despertar o interesse em investigar mecanismos relacionados aos efeitos secundários indesejados pós-menopausa, também são indicadores de que a mulher deverá alcançar e ultrapassar a idade de transição da menopausa e viver cerca de 1/3 de sua vida sob ação dos efeitos deletérios da menopausa, aliados ao processo natural de envelhecimento (DE LORENZI et al., 2006; MALTAIS et al., 2009; POLOTSKY; POLOTSKY, 2010; MONTELEONE et al., 2018). Além dos efeitos sistêmicos indesejados já citados, a queda na produção dos estrogênios ovarianos também exerce um efeito negativo sobre o sistema muscular esquelético, tornando as mulheres mais suscetíveis a lesões musculares, colaborando como um dos fatores causadores e agravantes da sarcopenia (MORAES et al., 2007; BROWN, 2008; MALTAIS et al., 2009).

O pioneiro a fazer uso do termo sarcopenia foi Rosenberg, no ano de 1989, descrevendo-a como a perda involuntária de massa muscular livre de gordura (ROSENBERG, 1989). O conceito atual de sarcopenia refere-se ao declínio acentuado involuntário de massa muscular associado à perda de função muscular, possuindo causa multifatorial (ROLLAND et al., 2007; BOIRIE, 2009; MALTAIS et al., 2009; CHEN et al., 2014). Após a menopausa a sarcopenia se mostra demasiadamente acelerada,

prejudicando a mobilidade com que se relaciona o aumento no sedentarismo, gerando uma possível diminuição do gasto energético e importantes alterações metabólicas subsequentes, como a obesidade e a resistência à insulina (FUKAGAWA et al., 1995; BOIRIE, 2009).

No Brasil, os resultados de uma meta-análise revelaram uma alta prevalência de sarcopenia em mulheres abaixo dos 70 anos, quando comparadas aos homens. Os autores atribuem esses valores discrepantes entre sexos justamente às alterações deletérias ocorridas durante o processo de menopausa observado nas mulheres e ressaltam que com esses resultados, quando o assunto é sarcopenia os resultados observados no Brasil seguem uma tendência internacional em que resultados semelhantes são observados (DIZ et al., 2017).

Nas últimas décadas o exercício físico tem se mostrado uma ferramenta importante na busca pela melhora na qualidade de vida, isso se dá em virtude de seus diversos benefícios agudos e crônicos e de sua fácil aplicabilidade, sendo uma alternativa eficaz na prevenção e tratamento de diversas doenças e síndromes, incluindo a sarcopenia, sendo que dentro de suas possibilidades de realização o treinamento resistido (TR) chama a atenção por estar associado principalmente a benefícios no sistema musculoesquelético (PITANGA et al., 2015). Segundo Fleck e Kraemer (2017), o TR pode ser definido como uma forma popular de exercício físico que visa melhorar o condicionamento físico e conseqüentemente a saúde. Nesta forma de treinamento, basicamente é exigido que a musculatura corporal se movimente contra uma força oposta. Alguns estudos confirmam a efetividade do TR contra os efeitos deletérios causados pela menopausa nos diversos sistemas do organismo, inclusive no sistema musculoesquelético, o que torna este tipo de treinamento altamente útil, principalmente em casos cujo tratamento farmacológico não é recomendado (FUKAGAWA et al., 1995; SHIGUEMOTO et al., 2011; PRESTES et al., 2012).

Em busca do conhecimento acerca dos fenômenos que ocorrem no período pós-menopausa e seus mecanismos de ação, modelos de intervenção cirúrgica que consistem na remoção bilateral dos ovários de ratas (ovariectomia) têm sido amplamente utilizados como modelo experimental de indução à menopausa, devido sua eficácia na reprodução dos efeitos deletérios deste período, como a redução na massa muscular e óssea, mudanças no perfil lipídico e na composição corporal (SHIGUEMOTO et al., 2007; PRESTES et al., 2009; BRINTON, 2012). Segundo Brinton (2005), a ovariectomia em

ratas com 13 semanas de vida é uma técnica que consiste na retirada bilateral dos ovários na idade reprodutiva do animal saudável. Após uma ou duas semanas da ovariectomia, as concentrações de E2 no plasma sanguíneo são quase indetectáveis, sendo esse um modelo translacional aceito para simular a menopausa humana em animais, permitindo a análise invasiva dos complexos biológicos em órgãos, sistemas celulares, moleculares e genômicos que são de difícil acesso na experimentação em humanos (BRINTON, 2012).

Neste período da vida das mulheres, a literatura indica que entre os mecanismos pelos quais a síntese das proteínas musculares passa a ser menor do que sua degradação estariam fenômenos relacionados à mitocôndria, como a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a consequente apoptose acentuada principalmente em células musculares do tipo 2 (MARZETTI, 2013). Além disso, é importante ressaltar que além de sua função protagonista no metabolismo bioenergético, a mitocôndria possui diversos papéis importantes na fisiologia celular que garantem a regulação da viabilidade celular (KOWALTOWSKI, 2000). Como exemplos, pode-se citar sua alta capacidade no armazenamento de íons de Ca^{2+} (GUNTER; GUNTER, 2001), ou por serem sítios essenciais para a biossíntese de hormônios esteroides (MILLER, 2013) e conter também enzimas fundamentais no processo de síntese da ureia e modificação de grupos heme (ATAMNA, 2002). Além disso, a CTE é o principal sítio gerador de EROs e radicais livres, que são essenciais como agentes sinalizadores e quando em excesso podem ser danosos à célula (KOWALTOWSKI et al., 2001; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). De forma geral, a cadeia respiratória mitocondrial (CRM) funcional é capaz de garantir baixas tensões de O_2 intracelular evitando oxidações não desejadas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Dada sua importância, é simples constatar que a integridade e a funcionalidade das mitocôndrias podem afetar a viabilidade celular, comprometendo tecidos e órgãos (KOWALTOWSKI, 2000).

Com base nestes fatos, é de suma importância atentar-se às mitocôndrias e em seu conteúdo proteico em busca de mecanismos intrínsecos que possam estar diretamente envolvidos na causa ou agravamento do quadro de sarcopenia, principalmente no que se refere à atuação da proteína adenina-nucleotídeo-translocase, em sua isoforma 1 (ANT-1) codificada pelo gene SLC25A4 em humanos, sendo esta encontrada em tecidos como o músculo estriado esquelético, coração e cérebro. Sua função básica se dá através do transporte ativo antiporte, realizando trocas alternadas entre uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) gerada na matriz mitocondrial pelo processo de fosforilação oxidativa,

com uma molécula de adenosina difosfato (ADP) citosólica (VOET, 2014; SIMONCINI et al., 2017).

A ANT-1 representa cerca de 10% do conteúdo proteico da membrana mitocondrial interna, sendo a proteína mitocondrial de membrana mais abundante, fato este que ressalta a sua importância e denota sua capacidade em influenciar diretamente importantes funções mitocondriais, como o vazamento basal de prótons, a regulação da abertura dos poros de permeabilidade, regulação da apoptose e a produção de EROs (ESPOSITO et al., 1999; BRAND et al., 2005; LIU; CHEN, 2013). Estudos concluíram que o comprometimento da proteína ANT-1 está intimamente relacionado com a progressão da doença de Alzheimer (BOBBA et al., 2013) progressão do diabetes tipo 2, com a predisposição a fatores de risco como obesidade e aterosclerose (KIM et al., 2010) e ao surgimento de miopatias (GRAHAM et al., 1997). Logo, com base nesta corrente de estudos a proteína ANT-1 parece relevante buscar por conhecimentos com o objetivo de otimizar o entendimento dos mecanismos de ação pelos quais se dá a sarcopenia, bem como uma possível melhora nas atuais abordagens de prevenção e tratamento da sarcopenia na pós-menopausa.

2. JUSTIFICATIVA

Desde a sua descrição clínica a sarcopenia tornou-se um importante tópico de pesquisa no mundo, em especial após a menopausa onde se mostra altamente presente, na tentativa de combatê-la. Neste sentido, o treinamento resistido tem sido proposto e utilizado por ser capaz de prevenir e combater alterações deletérias promovidas pela menopausa no sistema musculoesquelético com efeitos indesejados reduzidos (PRESTES et al., 2012) sendo este, capaz de combater a doenças como osteoporose (SHIGUEMOTO et al., 2011), Alzheimer (GARUFFI et al., 2013), diabetes e obesidade (TRESIERRAS e BALADY, 2009). Tais benefícios são extremamente desejáveis para a manutenção da saúde de mulheres pós-menopáusicas e, portanto, pesquisas que norteiem o conhecimento detalhado acerca dos mecanismos diretamente envolvidos neste processo são de suma importância.

3. HIPÓTESE

Assim, esse estudo hipotetiza que após a ovariectomia ocorram eventos que juntos são capazes de afetar diretamente a funcionalidade da proteína mitocondrial ANT-1, impedindo o aporte energético necessário, iniciando, amplificando ou regulando sinais pró-apoptóticos que podem comprometer a longevidade e a viabilidade celular uma vez que o treinamento resistido, mostrou-se capaz de promover efeito regulatório *in vivo* de importantes funções mitocondriais relacionadas à bioenergética (KOWALTOWSKI, 2000).

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Menopausa

Ao longo da vida às mulheres passam por diversos estágios biológicos, esses blocos representam momentos marcantes nos quais ocorrem mudanças expressivas de padrões fisiológicos e psicossociais (TSUKAMOTO; NUNOMURA, 2003). Entre esses marcos a menopausa serve de pedra angular, indicando pontualmente a transição entre o período reprodutivo para o período não reprodutivo (MISHRA et al., 2010).

Tal acontecimento está inserido ao longo do climatério e se dá pelo fato que ao nascer cada mulher possui aproximadamente 500 mil folículos primordiais, estes folículos primordiais se desenvolvem a folículos maduros e a partir da menarca (primeira menstruação) passam a ovular de maneira contínua a cada ciclo menstrual, entretanto, a cada ciclo, apenas um folículo maduro completará o processo completo de ovulação, enquanto isso, os demais são degenerados. A medida em que as mulheres envelhecem a quantidade de folículos primordiais estimulados pelas gonadotropinas (hormônio folículo - estimulante - FSH e hormônio luteinizante - LH) diminui, e essa diminuição é responsável pela redução da produção dos hormônios ovarianos (estrogênio e progesterona), esse ciclo de declínio progressivo avança até aproximadamente os 50 anos, quando os folículos primordiais estão presentes em níveis extremamente baixos, incapazes de manter a produção de hormônios ovarianos necessários para que haja ovulação (PICANÇO, 1995; FERNANDEZ et al., 2005; SILVERTHORN, 2010). Dessa forma, a menopausa, termo derivado do latim (*men* = mês e *pausis* = pausa), é caracterizada como sendo o período cronológico entre a última menstruação, também chamado de período menstrual final (PMF), e os doze meses seguintes de sua ausência, considerada precoce antes dos 40 anos e tardia após os 55 anos (CAMARGOS et al., 2001; NAMS et al., 2004; ALDRIGHI et al., 2005; NELSON, 2008).

No decorrer deste processo, existem os chamados estágios transitórios que antecedem e permeiam a menopausa, sendo definidos basicamente em três fases distintas: a pré-menopausa, a peri-menopausa e a pós-menopausa subdividida em 2 períodos, o período precoce que engloba os 5 anos iniciais após o PMF, e inicia-se o tardio após o fim do período precoce perdurando durante toda vida não reprodutiva da mulher (NAMS et al., 2004; FERNANDEZ et al., 2005; NELSON, 2008).

No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgados no ano de 2018, a população feminina representa mais de 50% da população total brasileira, com expectativa de vida de aproximadamente 79,6 anos. Isso significa que a população feminina brasileira deverá permanecer cerca de um terço de suas vidas na pós-menopausa (Figura 1).



Figura 1. Expectativa de vida da população brasileira (2018). Adaptada a partir de dados do IBGE, tábua de mortalidade (2018).

Notoriamente, a diminuição hormonal progressiva até o PMF seguida de sua falta na pós-menopausa causa grandes impactos fisiológicos à população feminina. Dentre os hormônios sexuais suprimidos em mulheres pós-menopáusicas o estrogênio possui protagonismo neste cenário. Basicamente esse hormônio é encontrado sob três isoformas fisiológicas distintas, sendo: estrona (E1), estradiol (E2 ou 17 β -estradiol) e estriol (E3). Embora uma quantidade pequena desses hormônios seja produzida por tecidos como a pele, glândulas adrenais, fígado, cérebro e coração, sua principal produção se dá pelos ovários, e nas gestantes pela placenta (LI et al., 2013).

Destes hormônios, o E2 é o principal biossintetizado, sendo também o mais potente durante toda vida pré-menopáusicas da mulher (LI et al., 2013). Além disso, a ausência do E2 ao longo da pós-menopausa é responsável por causar desordens na composição corporal e na distribuição de gordura (TREMOLLIÈRES et al., 1996), reduzir a densidade mineral óssea, aumentar o risco de doenças cardiovasculares e

promover desordens a nível glicêmico (MALTAIS et al., 2009). Evidências também apontam que o absentismo de E2 associa-se à redução de força muscular e função causando sarcopenia ou dinapenia (MALTAIS et al., 2009; ANAGNOSTIS et al., 2015), sendo que alguns estudos atribuem como causa a estas desordens musculoesqueléticas a disfunção mitocondrial pós-menopausa (KLINGE, 2009; KIM et al., 2010; PETERSON et al., 2012) (Figura 2).

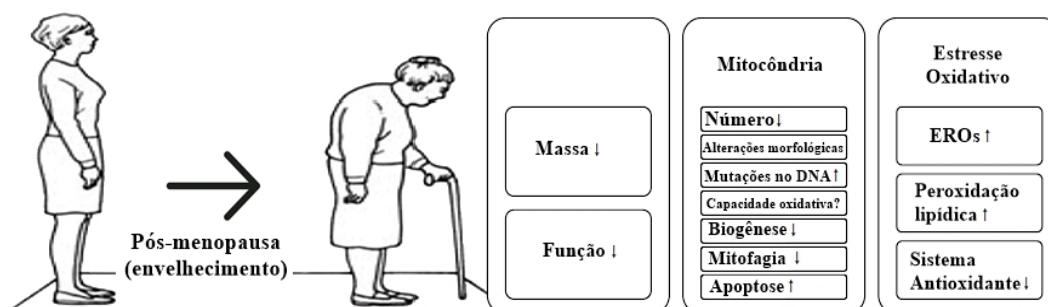


Figura 2. Alterações no tecido muscular esquelético na pós-menopausa. Ao longo dos anos na pós-menopausa massa e função muscular diminuem. Além disso, estão presentes importantes alterações mitocondriais que por fim resultam no aumento do estresse oxidativo não compensado pelo sistema antioxidante. Figura retirada e adaptada de Peterson et al. 2012.

4.1.1. Menopausa e Ovariectomia

Nas últimas décadas, descobertas científicas importantes foram feitas com base em modelos animais de pesquisa e experimentação, e tais modelos possibilitaram a investigação minuciosa de eventos a nível tecidual, celular, molecular e genômico difíceis de serem realizados em seres humanos, tornando-os modelos translacionais de suma importância no desenvolvimento de técnicas, medicamentos e abordagens terapêuticas no combate a diversas doenças e suas comorbidades (BRINTON, 2012; ZARROW, 2012).

Apesar de existirem diferenças consideráveis, estudos translacionais sobre o ciclo reprodutivo feminino se mostraram promissores por meio da utilização de ratas (ZARROW, 2012). Entre as diferenças vale destacar que ratas possuem o chamado ciclo estral com duração de 4 a 5 dias, ao invés do ciclo menstrual e, além disso ratas entram na fase não reprodutiva entre o 9º e o 12º mês de vida, momento este definido como estropausa, sendo que as mulheres entram na fase não reprodutiva por volta da quinta década de suas vidas. Por fim o revestimento da parede uterina é absorvido ao término de cada ciclo estral, enquanto que nas mulheres esse revestimento é descamado do corpo por meio da menstruação (MESSIER et al., 2011; KOEBELE, 2016).

Após analisar tais evidências e constatar sua eficácia e viabilidade, no presente estudo optou-se pela realização da ovariectomia por meio da remoção cirúrgica bilateral dos ovários de ratas jovens (Figura 3) (ZARROW et al., 2012). Tal medida se fez necessária a fim de evitar a influência de fenômenos associados ao processo de envelhecimento em nossos resultados. Cerca de duas semanas após a realização das cirurgias os animais já estão recuperados e os níveis séricos de E2 são suprimidos a valores próximos de zero. Com o passar do tempo, é possível notar algumas mudanças decorrentes da ausência do E2, como alterações expressivas na composição corporal e atrofia vaginal (LEITE et al., 2009; KOEBELE, 2016).

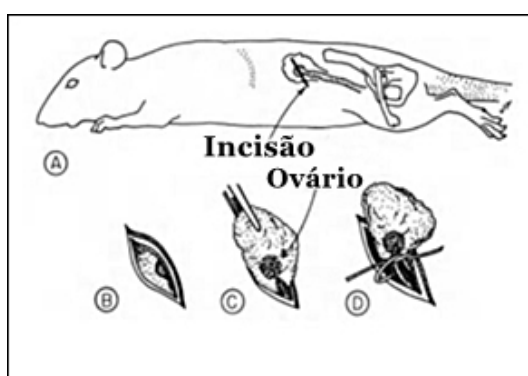


Figura 3. Procedimento de remoção bilateral dos ovários de ratas. a) Após anestesiá-lo previamente, são realizados os procedimentos antissépticos; b) Em seguida é realizada a tricotomia e posteriormente a incisão das camadas da pele e do peritônio; c) O ovário é encontrado e exposto; d) É realizada a laqueadura e posteriormente a remoção do ovário, bem como sua recolocação anatômica, são realizadas as suturas necessárias, o procedimento é realizado no lado oposto ao inicial e o animal segue para a recuperação pós-cirúrgica. Figura retirada e adaptada de Zarrow et al., 2012.

4.2 Sarcopenia

O termo “sarcopenia”, foi descrito inicialmente por Rosenberg 1988 que, após analisar resultados de estudos transversais da capacidade fisiológica funcional geral na década de 70, passou a empregá-lo para se referir à diminuição progressiva de massa muscular esquelética e de sua capacidade funcional ao longo do processo de envelhecimento (ROSENBERG, 1997). O tecido muscular esquelético, por sua vez, possui como características ser um tecido com alta capacidade de adaptação e plasticidade, possibilitando uma série de intervenções que visam aumentar ou manter seu volume e capacidade funcional (GONZALEZ et al., 2016). Segundo Rosenberg (1997), as perdas geradas neste tecido ao longo do processo de envelhecimento acabam resultando em outros prejuízos funcionais e metabólicos como a diminuição da

mobilidade e, por conseguinte da independência do indivíduo e diminuição da capacidade respiratória. (ROSENBERG, 1997). Dessa forma, o termo sarcopenia de origem da língua grega (*sarx* = carne, *penia* = perda) tem sido utilizado desde 1988 para referir-se a perda da função e massa muscular associada à idade, sendo tal evento fisiológico e/ou patológico (ROSENBERG, 1997).

4.2.1. Menopausa e Sarcopenia

Nas mais diversas espécies de mamíferos, sob condições naturais as fêmeas vivem mais do que os machos o que também ocorre com seres humanos. Contudo, o processo de sarcopenia se apresenta de maneira mais precoce no público feminino. O início precoce da diminuição de massa muscular nas mulheres é preocupante sob o contexto da saúde, visto que o tecido muscular exerce um papel central no quesito qualidade de vida (HORSTMAN et al., 2012; KRAEMER; RATAMESS; FRENCH, 2002). Alguns estudos concluem que nesses casos a sarcopenia esteja associada à diminuição dos estrogênios (E2) (KANG et al., 2017; MALTAIS et al., 2009; MESSIER et al., 2011).

Esses mesmos estudos, também sugerem que o E2 seja capaz de promover efeitos diretos no tecido muscular esquelético por meio da ativação de seus receptores de estrogênio (REs) ou ainda de maneira indireta por vias alternativas. O hormônio estrogênio sinaliza às células do tecido muscular por meio de sua interação com o receptor no citosol, cujo receptor é então translocado para o núcleo celular, ligando-se ao fator de resposta estrogênica para regular sua expressão gênica (RETTBERG et al., 2014). Existem duas classes conhecidas de REs os RE- α e os RE- β , embora haja evidências da existência de uma terceira classe em humanos, os RE- γ , os quais em modelos animais, o silenciamento ou nocaute indicou uma menor capacidade oxidativa nos animais (RETTBERG et al., 2014).

Estudos em mulheres, observaram uma diminuição acelerada na força muscular durante o período da perimenopausa (BROWN, 2008). Outros fatores podem influenciar a perda da função muscular durante o período de menopausa, como fatores extrínsecos que incluem a redução dos níveis de atividades físicas, doenças crônicas, tabagismo, fatores nutricionais e ambientais, etc. Há também os fatores intrínsecos, por meio dos quais ocorrem alterações hormonais como a diminuição abrupta do IGF, GH e da testosterona, além do aumento na produção de EROs, bem como miopatias, processos inflamatórios, entre outros (KANG et al., 2017). Sendo assim, o E2 é tido como um agente

regulador da bioenergética, sendo capaz de aumentar a captação de glicose pelas células, de melhorar a sensibilidade à insulina, estimular a atividade de enzimas das vias glicolítica e oxidativa, além de outras vias de sua sinalização as quais levam até às mitocôndrias (RETTBERG, 2014).

Aproximadamente 40% do corpo humano é constituído pela musculatura esquelética, o trabalho realizado por este sistema grandioso é altamente dependente de energia, que por sua vez é distribuída na forma de ATP (HALL, 2011). Tal fato remete aos principais sítios de biossíntese de ATP que são às mitocôndrias, contudo além de seu importante papel no metabolismo bioenergético, essas organelas também são protagonistas na integração de sinais, na regulação da produção de EROs e na apoptose celular (HEPPLE, 2014).

Estudos que envolvem a busca por conhecimentos acerca da viabilidade mitocondrial são sumariamente complexos e estão em constante aperfeiçoamento de técnicas que visam afastar possíveis erros que embora mínimos sejam capazes de comprometer o estudo investigativo. Desta forma, é preciso considerar as formas de investigação mitocondrial, a fibra muscular estudada, bem como as subpopulações mitocondriais que variam entre intermiofibrilares ou subsarcolemais, visto que cada uma possui especificidades inerentes à sua localização e função (MARZETTI et al., 2013; PICARD et al., 2011). Conforme foi descrito por Picard et al., (2011) técnicas de isolamento mitocondrial apresentam altos riscos de danificar estruturas demasiadamente delicadas que levam a alterações no funcionamento mitocondrial. Por outro lado, existem técnicas mais artesanais nas quais estruturas mitocondriais como o citoesqueleto, o retículo sarcoplasmático, e as membranas (externa e interna), etc. não são danificadas, como na técnica de permeabilização mecânica das miofibrilas (PICARD et al., 2011). Vale ressaltar que com relação à resposta das fibras musculares também existem especificidades, amostras de fibras musculares de contração rápida (glicolíticas) do músculo esquelético de roedores, apresentaram diminuição da capacidade de retenção de cálcio (Ca^{2+}) (marcador de apoptose), produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) elevada e por consequência de tais eventos, prejuízos na capacidade respiratória quando comparas a fibras de contração lenta (oxidativas) (PICARD et al., 2011).

Para entender este contexto bioenergético mitocondrial é necessário considerar que em seres vivos a todo momento a energia é transformada por meio de reações acopladas, sendo que o O_2 tem um papel central como aceptor final de elétrons e, portanto,

poderá ser utilizado como marcador indireto da funcionalidade da CTE (NELSON; COX, 2013). Assim temos, com os devidos cuidados metodológicos, informações importantes em sua medida de consumo acerca destes importantes componentes respiratórios, indicando por exemplo, problemas relacionados à bioenergética mitocondrial (MCARDLE; KATCH, 2010).

Nos seres humanos adultos, em geral, com o passar da idade o consumo de O₂ em repouso bem como o consumo máximo de O₂ diminuem, refletindo na diminuição da síntese de ATP (SHORT et al., 2005). Estudos como o de Welle et al. (2003) apontaram que biópsias do músculo esquelético humano de indivíduos na terceira idade possuíam uma massa total mitocondrial baixa, quando comparados a indivíduos mais jovens.

Tais alterações biomoleculares, talvez expliquem a dificuldade de locomoção encontrada em muitos indivíduos idosos (CRUZ-JENTOFT et al., 2010). O grupo de pesquisa de Joseph et al. (2016) propôs um círculo vicioso (Figura 4) entre a disfunção mitocondrial e a sarcopenia, propondo que no local onde há mitocôndrias disfuncionais haverá também um aumento na produção de EROs e dessa forma, maiores serão os danos no DNA mitocondrial (mtDNA), tornando a mitocôndria permanentemente menos eficiente enquanto que a célula se tornará mais suscetível a sofrer com esse déficit bioenergético, trazendo sérios prejuízos à síntese proteica, e portanto, guiando indivíduos a sarcopenia ou agravando casos no qual a sarcopenia já esteja presente. Além disso, os mesmos autores citam que outros elementos coadjuvantes são capazes de agravar ainda mais esse círculo vicioso, como o fator de transcrição FOXO-3 e o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), que desencadeiam o aumento da expressão gênica de ativos relacionados a atrofia muscular, entre eles a atrogina-1 e a MURF-1 (da língua inglesa, *Muscle Ring Finger-1*).

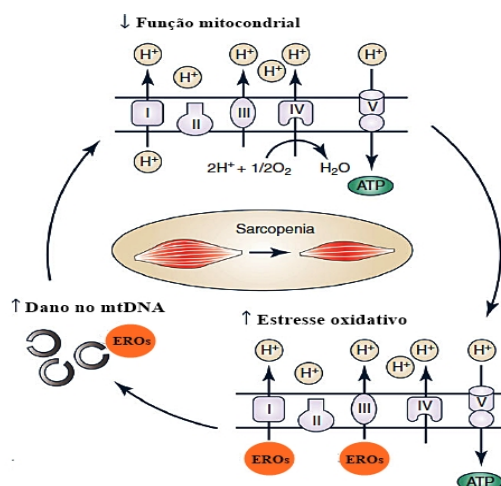


Figura 4. Disfunção mitocondrial como consequente causa da sarcopenia. Alterações negativas de maneira cíclica, justificam porque a disfunção mitocondrial leva cada vez mais ao aumento da produção de EROs, acarretando progressivamente na morte das células musculares, reduzindo sua quantidade e tamanho predispondo o início e agravamento do quadro de sarcopenia. Figura retirada e adaptada de Joseph; Adhietty; Leeuwenburgh, 2016.

4.2.2. Sarcopenia, Menopausa e Mitocôndria

A diferenciação entre sexos da mesma espécie é produto de diferentes formas de interações hormonais, genéticas e comportamentais que resultam em mudanças fisiológicas, anatômicas e cognitivas. Sendo que, por diversas vezes, é determinante para a etiologia e prevalência de algumas doenças, embora não obstante tais fatores biomoleculares que modulam essa distinção não tenham sido totalmente compreendidos (VENTURA-CLAPIER, 2017).

Quando o assunto é bioenergética e estresse oxidativo, as mitocôndrias também estão sujeitas a ação dessa diferença entre os sexos. Podemos citar por exemplo, que segundo um estudo envolvendo modelos animais, conduzido pelo grupo de Justo et al. (2005) onde verificou-se que em mitocôndrias do fígado o teor de proteínas mitocondriais e a quantidade de cardiolipina são mais elevados na população feminina, do que na masculina. Enquanto que em outro estudo realizado por Marzani et al. (2004) a ação antioxidante contra o estresse oxidativo no músculo esquelético de mulheres foi maior do que nos homens. E de acordo com Gámez-Péres et al. (2012) achados envolvendo ratos alimentados com dietas hiperlipídicas, revelaram melhor resposta antioxidante, frente ao processo inflamatório de baixo grau gerado pela obesidade, nas fêmeas, ao passo que nos machos foi observado maior biogênese mitocondrial.

Compreender a ação do E2 sob a mitocôndria e suas diferenças entre sexos da mesma espécie poderá ser de grande utilidade no combate aos quadros de disfunção mitocondrial e sarcopenia que têm sido relatados pela literatura científica na menopausa.

No momento em que o E2 se liga ao seu receptor e sofre translocação para o núcleo da célula, ele passa a interagir com genes específicos responsáveis por aumentar a transcrição da proteína co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1- α), além disso, aumenta a expressão do NFR-1 (fator de respiração nuclear), que por sua vez possui a capacidade de aumentar o fator de transcrição mitocondrial (TFAM, da língua inglesa *mitochondrial transcription factor A*); o TFAM então é conduzido até às mitocôndrias aumentando a transcrição de genes mitocondriais (KLINGE, 2009). Ademais, o E2 poderá ligar-se a receptores localizados na membrana celular acoplados a proteína G e ativar o NF- κ B, de maneira dependente de MAPK (da língua inglesa, *mitogen activated protein kinases*), que resultam no aumento da transcrição de genes de importantes enzimas antioxidantes. Sendo assim, mitocôndrias funcionais, liberam uma quantidade menor de fatores pró-apoptóticos e, por conseguinte há uma redução na morte celular, preservando tecidos, órgãos e até sistemas fisiológicos. Vale ainda ressaltar, que mitocôndrias femininas apresentam maior capacidade de armazenar Ca^{2+} , fator este que contribui para a redução da liberação dos fatores pró-apoptóticos (VENTURA-CLAPIER, 2017).

Conforme foi mencionado até aqui, existem diversas sinalizações do E2 que nos levam até a mitocôndria, portanto, não é de surpreender-se que a diminuição acentuada deste hormônio ao longo do processo de menopausa, seja capaz de ocasionar a disfunção mitocondrial com efeitos negativos para a célula ou tecido muscular esquelético, predispondo o indivíduo a sarcopenia. Neste cenário, Ha (2004) demonstrou um aumento significativo do estresse oxidativo não compensado por um aumento de enzimas antioxidantes em ratas OVX.

As causas da disfunção mitocondrial e sarcopenia estão diretamente relacionadas ao aumento da produção de EROs mitocondrial ao longo do processo de envelhecimento, sendo esta uma das teorias mais disseminadas para explicar o processo de envelhecimento geral, conhecida como a teoria do radical livre, onde EROs mitocondriais após reagir com moléculas celulares, causam lesões celulares como a peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas, inativação enzimática, danos no DNA nuclear e no mtDNA, disfunção

mitocondrial e novamente aumento na produção de EROs, consumando o círculo vicioso (MARZETTI et al., 2013).

De maneira objetiva, muitos estudos fizeram uma associação entre a disfunção mitocondrial e o aumento da sarcopenia (CALVANI et al., 2013; ROMANELLO; SANDRI, 2016). Enquanto outros estudos, sugerem que o mal funcionamento no complexo sistema de fosforilação oxidativa pode resultar na redução significativa da síntese de ATP, sendo esta última também capaz de levar a sarcopenia (GRAHAM et al., 1997; SKULACHEV, 2006). O que já é amplamente estabelecido é que o E2 é capaz de melhorar a bateria antioxidante e dessa forma, sua redução ou ausência acarreta um aumento considerável do estresse oxidativo (ZHAI et al., 2000).

4.3. Estrutura Mitocondrial

As mitocôndrias são complexas organelas celulares de herança predominantemente materna, possuem formato boleado ou alongado e são encontradas imersas no citosol de diferentes tipos de células eucariontes, sendo notadamente vistas em tecidos como o músculo cardíaco, músculo esquelético e cérebro, tecidos altamente adictos ao metabolismo aeróbio. Em sua organização celular encontramos dois tipos de membranas: a membrana mitocondrial externa (MME) que se caracteriza por ser altamente permeável com sua relativa arquitetura lisa e porosa, a fim de possibilitar processos como a difusão transmembranar de moléculas relativamente pequenas e íons advindos do citosol e do espaço intramembranoso. E também encontramos a membrana mitocondrial interna (MMI) que diferentemente da MME é altamente seletiva a passagem de íons e pequenas moléculas. Em sua arquitetura encontramos invaginações, denominadas de cristas mitocondriais, onde é possível encontrarmos uma grande quantidade de proteínas como os complexos enzimáticos da cadeia respiratória (I, II, III e IV), translocases de ADP/ATP, ATP-sintase (complexo V), translocases de fosfato, proteínas desacopladoras (UCPs), canais de Ca^{2+} , canais de K^{+} , entre outros transportadores específicos para várias moléculas (Figura 5) (NELSON; COX, 2013).

O espaço aquoso existente entre a MME e a MMI é denominado de espaço intermembranoso e sua composição química é bem similar à do citosol em razão da MME ser pouco seletiva a entrada de íons e pequenas moléculas. No interior da MMI encontramos a matriz mitocondrial, onde ocorrem processos metabólicos importantes como a β -oxidação dos ácidos graxos. Sua composição química é bem diferente do espaço

intermembranoso, isso se dá em razão da alta seletividade da MMI, impedindo que grande parte dos agentes citosólicos penetrem na matriz mitocondrial (NELSON; COX, 2013).

As mitocôndrias possuem seu próprio genoma, o chamado genoma mitocondrial, sendo ele capaz de replicar-se independentemente do genoma nuclear. Além disso, o genoma mitocondrial também é o responsável pela codificação de 13 proteínas constituintes das subunidades dos complexos I, III, IV e V da CTE. Estima-se que em cada mitocôndria exista de 2 a 10 cópias deste Ácido Desoxirribonucléico (DNA), que por sua vez, é constituído de forma circular com 16.539 pares de nucleotídeos sequenciados, com genes codificantes que realizam a tradução das proteínas mitocondriais (KANG; KIM; HAMASAKI, 2007; NELSON; COX, 2013).

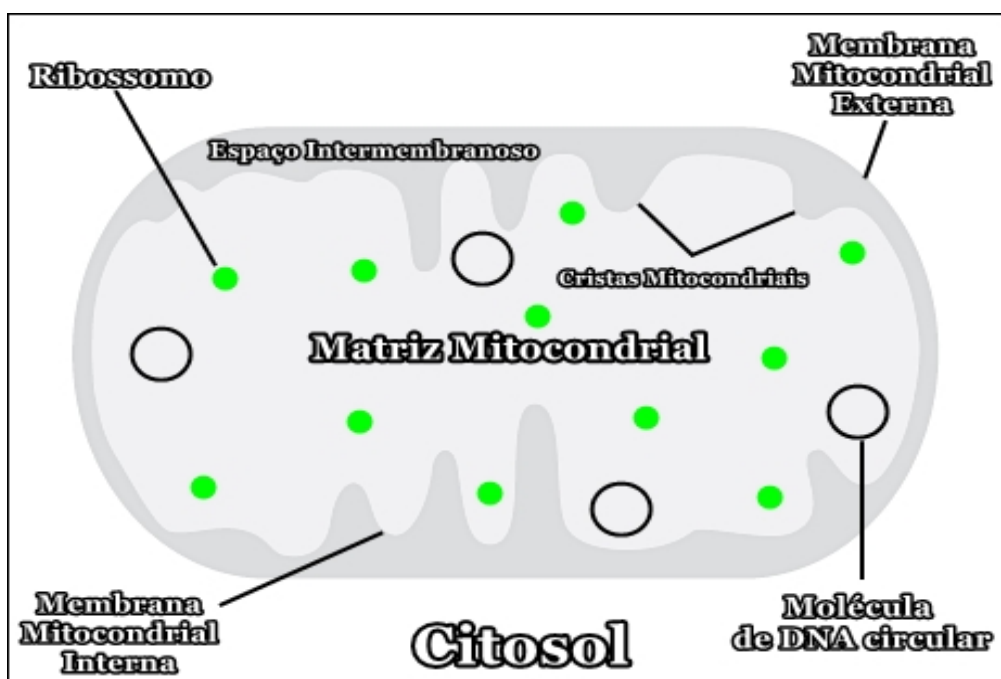


Figura 5. Representação estrutural dos componentes básicos de uma mitocôndria. O tamanho e o formato desta organela pode variar de acordo com o tipo de célula. As mitocôndrias possuem duas membranas lipoprotéicas, sendo a membrana mitocondrial externa (MME) e a membrana mitocondrial interna (MMI), o espaço aquoso entre essas duas membranas é denominado espaço intermembranoso. A MMI possui invaginações denominadas de cristas mitocondriais, que se voltam para o interior da mitocôndria, essa região central é chamada de matriz mitocondrial. Na matriz entre outras moléculas e proteínas, encontramos os ribossomos que são responsáveis por sintetizar às proteínas necessárias a mitocôndria e também é possível notar a presença de moléculas de DNA em formato circular. Figura retirada e adaptada de Nelson; Cox (2013).

4.3.1. Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE)

A CTE é meio pelo qual o processo do transporte de elétrons advindos da oxidação de fontes de energia complexas como: a glicose, os ácidos graxos e aminoácidos. Os

elétrons provenientes dos substratos citados acima, após sofrerem a ação do Ciclo do Ácido Cítrico, geram equivalentes reduzidos, que são altamente energéticos, entretanto a liberação dessa energia só ocorre quando esses equivalentes são reoxidados pelo O_2 numa chamada reação exergônica, sendo esta energia utilizada para a síntese de ATP, esse processo é conhecido fosforilação oxidativa (FO) (NELSON; COX, 2013). Neste processo, os transportadores constituídos por proteínas integrais de membrana, dispostas em série trabalham de forma sequencial, essas proteínas apresentam grupos prostéticos (grupamentos de origem não proteica) e funcionam como aceptoras e 1 ou 2 elétrons, conhecidos como carreadores de elétrons.

Para que a FO ocorra de maneira efetiva, os elétrons altamente energizados devem transitar pelos complexos proteicos e por seus grupos prostéticos, este deslocamento constante criará um fluxo energético, que por sua vez fará com que os complexos proteicos bombeiem prótons de dentro da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso formando o chamado gradiente de prótons. Dessa forma, a energia do trânsito de elétrons é convertida em trabalho, sendo que os prótons bombeados para o espaço intermembranoso retornam a favor do gradiente de concentração através da enzima ATP-sintase, tornando possível a produção de ATP por meio da FO (Figura 6) (NADEGE et al. 2009; NELSON; COX, 2013).

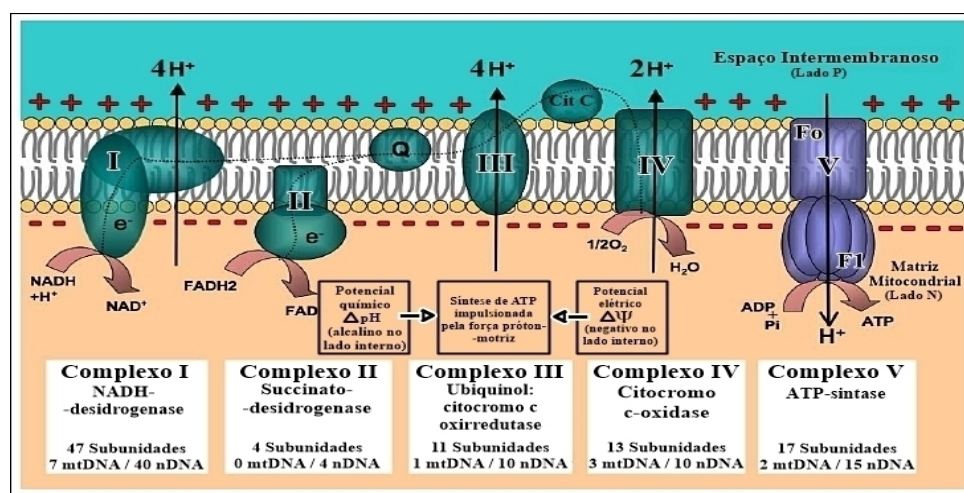


Figura 6. CTE em mamíferos. A CTE é constituída por 4 complexos enzimáticos (Complexo I, II, III e IV) e dois substratos intermediários (coenzima Q e citocromo C), por onde os elétrons fluem. Os equivalentes reduzidos dinucleotídeo de nicotinamida-adenina ($NADH+H$) e $FADH_2$ gerados pelo metabolismo, por meio de fontes de energia complexas (glicose, AG e aminoácidos) transferem os seus elétrons aos complexos mitocondriais, a passagem destes elétrons pelos complexos gera um potencial eletroquímico que conserva a energia bombeando prótons (H^+) da matriz para o espaço intermembranoso. Os prótons bombeados finalmente são utilizados pela ATP-sintase (Complexo V), que por meio de alterações conformacionais sintetiza ATP a partir de $ADP + Pi$. Figura retirada e adaptada de Nadege et al., 2009.

4.3.2. Complexo I

O complexo I é constituído por 47 subunidades diferentes de polipeptídios agrupados, incorporada a essas subunidades encontramos uma flavoproteína que contém mononucleotídeo de flavina (FMN), agindo como grupamento prostético com cerca de seis centros de ferro-enzofre. O complexo I por sua vez também é chamado de NADH: ubiquinona-oxirredutase ou NADH-desidrogenase. No complexo I, o dinucleotídeo de nitotinamida-adenina em sua forma reduzida (NADH) transfere um par de elétrons, que são captados pela FMN, em seguida esses elétrons são transferidos, um por vez, ao centro redox de ferro enxofre (Fe-S) (NADEGE et al., 2009). Estes elétrons deslocam-se por alguns conjuntos de Fe-S antes de reduzirem a ubiquinona (Q), também conhecida como coenzima Q, conduzindo estes elétrons até o complexo III (NADEGE et al., 2009; NELSON; COX, 2013).

4.3.3. Complexo II

O complexo II, é responsável pelo fornecimento de equivalentes reduzidos na forma de ubiquinol (QH₂), além de participar ativamente do sistema de lançadeiras glicerol-3-fosfato, possui 4 subunidades codificadas pelo nDNA e também é chamado de succinato-desidrogenase. Assim como o complexo I e os demais complexos enzimáticos da CTE, possui vários centros redox. Sua ação no sistema de lançadeiras se dá da seguinte maneira, os elétrons advindos do NADH citosólico são reduzidos a Q, gerando seu equivalente reduzido, o QH₂ que por sua vez tem sua quantidade regulada em função das atividades do ciclo do ácido cítrico e da β-oxidação, além de ser reoxidado pelo complexo III. Sendo que o complexo II catalisa a reação a seguir: Succinato + Q ↔ Fumarato + QH₂. É importante nos atentarmos neste ponto, pois a Q pode ser reduzida no complexo I pelo NADH ou no complexo II por meio do Flavina-adenina-dinucleotídeo em sua forma reduzida (FADH₂), sendo que sua forma oxidada o Flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) é um componente da enzima que catalisa a reação anterior. Entretanto, se os elétrons forem advindos do complexo II, existirá uma perda estequiométrica da síntese de ATP, afinal não teremos o bombeamento de prótons (NADEGE et al., 2009; NELSON; COX, 2013).

4.3.4. Complexo III

O complexo III ou ubiquinol: citocromo c oxirredutase, ou ainda citocromo bc₁. É o responsável por receber os elétrons do QH₂ e transferir esses elétrons para um outro carreador de elétrons, chamado de citocromo C. O QH₂ por sua vez tem sua funcionalidade química limitada pelos centros de Fe-S, pois o mesmo deverá doar seu par de elétrons e os referidos centros conseguem aceitar apenas um único elétron a cada transferência (NADEGE et al., 2009; NELSON; COX, 2013).

Para ilustrar a passagem de um único elétron por vez neste complexo, existe o ciclo “Q”, que a partir de estruturas presentes no complexo III chamadas de citocromos b, com duas subunidades de citocromos b₁ e b_h, e o citocromo c₁. A partir da chegada do QH₂ ao complexo III, o QH₂ realiza a doação de seus dois elétrons, sendo um para o citocromo c₁, onde está presente um centro de Fe-S, enquanto o outro elétron é doado para o citocromo b, passando primeiro pela subunidade b₁ em seguida para a subunidade b_h. Após ser totalmente oxidado, a Q muda de posição e se estabelece no sítio Q. No sítio Q, a Q recebe um elétron da subunidade b_h, essa reação a transforma em um íon de carga negativa (ânion) chamado de semiquinona (QH•). Em seguida, uma outra molécula de QH₂ irá reduzir totalmente a QH•, com seu par de elétrons, a QH₂, gerando outro ciclo, com a diferença que nesta etapa o citocromo c irá aceitar um elétron de cada e os conduzirá respectivamente até o complexo IV. Neste processo, 4 cargas positivas (prótons) são bombeadas da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso, pelo complexo III. Desta forma, o complexo III, por meio de seu ciclo Q consegue transpor suas limitações químicas (Figura 7) (HAMANAKA; CHANDEL, 2009; NELSON; COX, 2013).

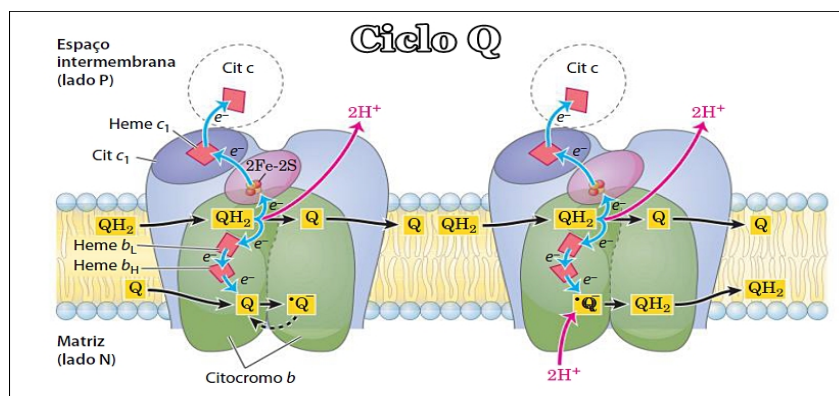


Figura 7. Representação de duas etapas do ciclo Q. Setas azuis indicam o trajeto dos elétrons pelo complexo III. Enquanto que as setas pretas apontam para a movimentação das formas de ubiquinona. Na primeira fase representada pela imagem à esquerda, no lado N Q é reduzida ao radical $\text{QH}\cdot$ e retorna à sua posição para aceitar outro elétron. Na segunda fase ilustrada à direita, o radical $\text{QH}\cdot$ é convertido a QH_2 . Enquanto que, no lado P da membrana, duas moléculas de QH_2 são oxidadas a Q, liberando dois prótons por molécula de Q, ao espaço intermembranas. Cada QH_2 doa um elétron (por meio do centro de Fe-S de Rieske) para o citocromo c_1 e um elétron (via citocromo b) para a molécula de Q adjacente ao lado N. Figura retirada e adaptada de Nelson; Cox (2013).

4.3.5. Complexo IV

O complexo IV ou citocromo c-oxidase é um complexo enzimático que possui múltiplas subunidades, onde estão presentes dois centros hemos, sendo um em cada um dos dois citocromos, três íons cobre e 13 subunidades proteicas diferentes. No complexo IV os elétrons são guiados pelo fluxo energético até o O_2 , neste momento o citocromo c transfere seus elétrons para a molécula de O_2 , em seguida, o O_2 reduzido utilizando-se de dois íons de hidrogênio (H^+) provenientes das proximidades é convertido em água (H_2O). Além disso, vale ressaltar que a remoção desses íons hidrogênio do meio circundante é extremamente importante para a manutenção do gradiente quimiosmótico (NADEGE et al., 2009; NELSON e COX, 2013).

4.3.6. 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 (NADEGE et al., 2009; NELSON; 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).

4.3.7. Adenina-nucleotídeo-translocase (ANT)

O trocador de ATP, também conhecido como translocase de nucleotídeos de adenina, ou simplesmente por sua sigla ANT é considerada a proteína da MMI mais abundante, com significativos 10% de representatividade. Esta importante proteína está localizada integralmente na MMI e possui como função principal a troca de ADP/ATP, na proporção de 1:1, através da MMI, o que lhe confere uma estrutura dimérica composta por duas subunidades idênticas com peso molecular de 32 kDa. O que confere a esta proteína dois estados conformacionais diferentes, sendo um citosólico “c” (ANT_c) e o outro matricial “m” (ANT_m). Além disso, esse carreador está envolvido em processos mitocondriais extremamente importantes como o vazamento basal de prótons e a abertura dos poros de transição e permeabilidade mitocondrial (da língua inglesa: *mitochondrial permeability transition pore - MPTP*) (BRAND et al., 2005; DIVAKARUNI; BRAND, 2011; NELSON; COX, 2013).

Para desempenhar sua principal função a ANT basicamente liga-se a uma molécula de ADP³⁻ presente no espaço intermembranoso e a transporta para a matriz mitocondrial, em troca de uma molécula de ATP⁴⁻ presente na matriz mitocondrial, concomitantemente, transportada para o espaço intermembranoso (DIVAKARUNI; BRAND, 2011; NELSON; COX, 2013).

Essa permuta é favorecida pela força próton-motriz, além disso a cada troca essa proteína antiportadora transfere quatro prótons para fora da matriz, a cada três que são transportadas para dentro. Neste caso, sua ação é favorecida em razão do gradiente eletroquímico transmembrana, visto que a matriz mitocondrial é mais eletronegativa do que o espaço intermembranoso (DIVAKARUNI; BRAND, 2011; NELSON; COX, 2013).

Em seres humanos, existem 3 isoformas conhecidas a ANT-1, ANT-2 e ANT-3, com genes 77,79% homólogos entre si (DOERNER et al., 1997), compartilhando uma sequência tripla de aproximadamente 100 aminoácidos distribuídos em 6 domínios de membrana compostos por aproximadamente 20 aminoácidos; 3 *loops* constituídos por cerca de 40 aminoácidos ficam dispostos no lado matricial, enquanto que 2 *loops* de tamanho inferior contendo respectivamente 26 e 18 aminoácidos ficam voltados para o espaço intermembranoso. As pequenas diferenças entre suas isoformas consistem em particularidades do metabolismo celular e dos mecanismos regulatórios de cada isoforma (KLINGENBERG, 1989).

A elucidação de aspectos subjacentes a propriedades e mecanismos de funcionamento dessa proteína, só foi possível graças a existência de inibidores extremamente específicos. Desses destacam-se os inibidores hidrofílicos atracilato (ATR) e carboxiatracilato (CAT), que são responsáveis por ligar-se de maneira seletiva ao lado “c” da ANT. Enquanto que, outro inibidor específico, o ácido bongkréico (BKA) consegue se ligar apenas ao lado “m” do carreador (WEIDEMANN et al., 1970).

Inicialmente Scherer; Klingenberg (1974), observaram mudanças na velocidade do consumo de O₂, onde na presença de inibidores, eram demonstradas curvas de consumo de O₂ com pouca amplitude na transição do estado respiratório 4 (repouso) para o estado 3 (ativo, após a adição de ADP). Acreditava-se que tal evento ocorria, devido ao período de transição entre estes estados respiratórios, entretanto no ano seguinte Klingenberg; Grebe; Scherer (1975) constataram que os inibidores da ANT influenciavam efetivamente tais alterações, sendo que o CAT e o ATR cessavam o aumento da atividade bioenergética mitocondrial induzida pelo ADP, por outro lado o BKA promovia um aumento discreto o efeito do ATP, corroborando esses dados com descobertas anteriores, onde foi descoberto que o ATR e o CAT inibiam imediatamente a ligação do ADP aos sítios de ligação na ANT, enquanto que o BKA promovia um aumento nesta ligação (KLINGENBERG; BUCHHOLZ, 1973).

Das isoformas mencionadas anteriormente, a ANT-1 é a mais abundante, sendo expressa em tecidos como o músculo esquelético, músculo cardíaco e cérebro. No músculo esquelético sua inativação em camundongos (Ant-1) resultou em níveis elevados de lactato, hiperproliferação de mitocôndrias, aumento de EROs e danos excessivos no mtDNA, que acabaram por causar miopatias (BRENNER et al., 2008). O grupo de Esposito et al., 1999 também obteve achados importantes, em roedores geneticamente

modificados para Ant-1, houve um aumento considerável nos níveis de EROs, tal cenário resulta no aumento do estresse oxidativo, que sob estas condições se deu em virtude da falta de ADP na matriz mitocondrial para ativar a ATP-sintase, dessa forma houve o acúmulo de prótons no espaço intermembranoso, que acabará por acrescer a diferença do potencial eletroquímico entre esses nichos mitocondriais e por fim aumentando a produção de EROs. Essas descobertas levaram a conceitos aceitos atualmente e são de suma importância para a compreensão metodológica do presente estudo.

4.3.8. Carreador de Fosfato (PiC)

O carreador de fosfato inorgânico mitocondrial (da língua inglesa: *phosphate carrier – PiC*) é uma proteína mitocondrial codificada pelo gene SLC25A3 em humanos. Está localizado na MMI e possui como função principal o transporte de fosfatos inorgânicos presentes no espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. Integra juntamente com a ANT e a ATP-sintase o grupo das proteínas que possuem papel crítico na fosforilação oxidativa e consequente produção de ATP, formando o chamado complexo ATP sintassoma. Além disso possui duas isoformas denominadas de “PiC-A” (expresso especificamente no coração, músculo liso e no músculo esquelético) e “PiC-B” (expresso nos demais tecidos) (MAYR et al, 2007; KWONG et al, 2014)

Além de seu papel no metabolismo energético mitocondrial, o carreador de fosfato tem sido associado na regulação da morte celular ao servindo como um modulador ou um componente direto do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. O MPTP é um canal não seletivo que se forma em resposta à sobrecarga de Ca^{2+} e aumento no estresse oxidativo e por sua vez permite a permeabilidade da membrana mitocondrial interna para solutos de até 1500 Dalton, levando à perda do potencial da membrana mitocondrial e, eventualmente inchaço, ruptura das membranas mitocondriais e morte celular não programada. Estruturalmente, o complexo MPTP foi proposto como sendo composto pela ATP-sintase e regulado pela ciclofilina D, ANT e por proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2 (Bax e Bak) na membrana mitocondrial externa. Além disso, o carreador de fosfato também tem sido sugerido como sendo um dos componentes da membrana interna do MPTP isso por sua capacidade de formar canais inespecíficos nas membranas lipídicas e também pelo fato de que o MPTP é ativado por Pi. E para ressaltar ainda mais sua importância o carreador de fosfato interage diretamente com a ciclofilina D na matriz

mitocondrial, sendo esta última amplamente conhecida como um regulador e componente do MPTP (KWONG et al, 2014).

4.4. Teoria Quimiosmótica de Mitchell

Para que ocorra a fosforilação oxidativa, é imprescindível a existência de um gradiente de prótons na CTE. Esse gradiente é formado a partir da passagem dos elétrons através dos complexos da cadeia respiratória possibilitando o bombeamento de íons H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso, contra o gradiente de concentração. O retorno desses prótons para a matriz é impossibilitado devido a impermeabilidade da MMI a esses íons, dessa forma o acúmulo de prótons no espaço intermembranoso gera uma força chamada de força próton-motiva ou gradiente próton-motriz, que é capaz de estimular a atividade da ATP sintase para fosforilar ADP em ATP. Esta força possui duas vertentes de explicação importantes, uma narrativa química ressaltando que devido ao aumento na concentração de íons H^+ no espaço intermembranas uma energia associada atua a fim de equilibrar as concentrações de prótons. E outra narrativa elétrica, pois a matriz é mais eletronegativa do que o espaço intermembranas, isso faz com que os prótons presentes no espaço intermembranas sejam atraídos, por cargas negativas, novamente para a matriz, tornando este gradiente conhecido como gradiente eletroquímico. O potencial elétrico ($\Delta\psi$) produzido pode chegar a valores de cerca de -180 mV em estado de repouso, já o potencial químico varia de 0 a 1 unidade de pH (MITCHELL, 1961).

Segundo Nelson e Cox. (2013), são necessários quatro prótons para a síntese de uma molécula de ATP, para tal, cada NADH promove o bombeamento de 10 prótons da matriz para o espaço intermembranoso, enquanto que, cada $FADH_2$ promove o bombeamento de seis prótons. Sendo assim, estequiometricamente é possível afirmar que cada NADH, por meio da doação de elétrons, possibilita a síntese de 2,5 moléculas de ATP e cada $FADH_2$ possibilita a síntese de 1,5 molécula de ATP, em complexos respiratórios em que o retorno desses prótons está acoplado a produção de ATP. Eventualmente o regresso desses prótons para matriz mitocondrial poderá se dar via outras proteínas que servem também como canais de vazamento de prótons, este vazamento é conhecido por promover o desacoplamento da fosforilação oxidativa e pode

ser encontrado na literatura pelo termo respiração oxidativa desacoplada da síntese de ATPs. Entre às proteínas responsáveis por promover o vazamento de prótons presentes no espaço intermembranoso para a matriz mitocondrial, através da MMI, temos às ANTs, que em virtude de sua quantidade, possui representatividade significativa nesse processo de vazamento basal de prótons (BRAND et al. 2005; NELSON; COX, 2013).

4.5. Músculo Esquelético: Características Funcionais

Nos mamíferos, fibras musculares esqueléticas são responsáveis por movimentar os ossos e produzir movimentos. Esse processo contrátil tem início milésimos de segundos antes que o movimento se inicie, quando nos centros de controle motor um estímulo é enviado, via os neurônios motores que integram o sistema nervoso somático, às fibras musculares estriadas esqueléticas, sendo essas recrutadas de forma ordenada para que seja possível executar determinado movimento (HALL, 2011).

Um único neurônio motor é capaz de inervar diversas fibras musculares, sendo esse conjunto chamado de unidade motora. O trabalho das unidades motoras dependerá exclusivamente do movimento exigido, nas contrações máximas as unidades motoras recrutadas se contraem de maneira concomitante, a fim de somar trabalho e viabilizar o movimento. Enquanto isso, em contrações de esforço submáximo, as unidades motoras se contraem de forma progressiva, sendo que a medida em que algumas fibras iniciam o ciclo de contração, outras entram no estado de relaxamento, retardando assim a fadiga muscular (FLECK; KRAEMER, 2017).

4.5.1. Fibras Musculares Estriadas Esqueléticas

Os músculos responsáveis pela realização dos movimentos respondem diferentemente às diversas tarefas motoras, isso se deve em razão da especialização das fibras musculares. O tecido muscular estriado esquelético, por sua vez, é constituído por alguns tipos de fibras que são diferentes entre si, essa singularidade pode ser notada tanto em sua composição como em sua proporção. Basicamente, em sua constituição temos fibras lentas, que são especializadas para esforços de intensidade baixa a moderada e as fibras rápidas, que são especializadas na contração de movimentos fásicos ou rápidos

(YANG et al., 1997). Sua proporção varia de acordo com a função de cada músculo, além disso dependerá de outros fatores, como a genética e o fenótipo.

Tais conhecimentos são de suma importância para compreender os fenômenos associados ao desempenho, bem como a individualidade biológica de determinado indivíduo e dessa forma analisar a capacidade muscular de adaptar-se às mais diversas atividades, exercícios e sobrecargas impostas pelo treinamento. O grupo de Gollnick et al. (1972) discorreu de maneira brilhante sobre a classificação dos tipos de fibras musculares, classificando-as em fibras do tipo I, também chamadas de fibras vermelhas, e fibras do tipo II, também conhecidas como fibras brancas, sendo essa terminologia baseada em cores utilizadas com base nas características microscópicas de cada tipo de fibra.

Na década seguinte, Staron e Pette (1987), com base em seus resultados, iniciaram o pensamento acerca de uma nova definição desses diferentes tipos de fibras. Essa nova definição levava em conta aspectos fisiológicos e bioquímicos, que levaram a seguinte classificação: fibras do tipo I – oxidativas lentas, fibras do tipo IIa – glicolíticas-oxidativas rápidas ou ainda em fibras do tipo IIb – glicolíticas.

No modelo experimental do presente estudo foram utilizadas ratas e de acordo com Schiaffino et al. (1989) as fibras musculares esqueléticas desses animais são subdivididas em fibras do tipo I, IIa, IIb e IIx, e embora existam outras definições propostas por outros autores, essa classificação é a mais utilizada atualmente. Smerdu et al. (1994) corroboram que em humanos se diferenciam as fibras do tipo I, IIa e IIb, sendo essa definição anterior a descoberta das fibras do tipo IIx, entretanto, acrescentam estudos demonstrando que partes do gene responsável por codificar fibras do tipo IIx, são expressas previamente por fibras IIb, sendo o gene responsável pela expressão de fibras do tipo IIb em humanos similar aos genes que codificam fibras do tipo IIx em ratos, viabilizando desta forma a transposição desses conhecimentos entre espécies distintas, com alto grau de confiabilidade.

Após constatar tais evidências, no presente estudo optou-se pela utilização do gastrocnêmio, sendo este, um músculo esquelético com predominância de fibras do tipo II, que por sua vez, são mais atingidas pela sarcopenia (ZHONG et al., 2007), além disso, resultados demonstrados por Monteiro (2019) sob condições metodológicas semelhantes, evidenciaram um maior consumo de O₂ no músculo em questão, sendo este diretamente

associado ao estresse oxidativo em razão do aumento da atividade proteica mitocondrial (BRAND et al., 2002).

4.6. Treinamento Resistido (TR)

Nas últimas décadas, o TR adquiriu certa notoriedade em razão dos diversos benefícios relacionados a saúde, estética ou aptidão física que são obtidos por meio de sua prática. Entre tais ganhos funcionais, destacam-se o aumento da força, potência e resistência muscular localizada, além de é claro, o aumento da área de secção transversa do músculo, ocasionada pelo aumento nos níveis de proteínas contráteis nas células musculares, sendo conhecida como hipertrofia muscular fisiológica (KRAEMER et al., 2002).

Sua execução consiste na realização de gestos motores coordenados e sucessivos, agrupados em fases de trabalho muscular que podem envolver contrações (concêntrica), alongamentos (excêntrica) ou isometria (isométrica). Tais exercícios, por sua vez, podem envolver uma única articulação (monoarticular) ou mais de uma articulação (multiarticulares). Além disso, sua eficácia dependerá da correta manipulação dos componentes da carga de treinamento: intensidade (componente qualitativo), volume (componente quantitativo), duração, densidade, complexidade e frequência. Sendo estes componentes de suma importância na prescrição correta dos programas de TR, a fim de atingir-se determinados objetivos por meio de adaptações agudas e crônicas (BARBANTI, 1994; KRAEMER et al, 2002; FLECK; KRAEMER, 2017).

Fisiologicamente, esses objetivos são atingidos graças a transdução de sinais mecânicos em sinais químicos promovidos pelo TR. Os resultados da também chamada mecanotransdução, são interações moleculares, entre o ligante e seu receptor. Essas ligações são responsáveis por disparar cascatas de sinalizações bioquímicas citosólicas e envolvem diversas vias moleculares, que após serem transcritas, podem resultar na síntese de proteínas, citocinas ou ainda na expressão e proliferação de receptores (HALL, 2011; FLECK; KRAEMER, 2017).

Em especial, a síntese de proteínas em células do tecido muscular esquelético, bem como, a consequente hipertrofia miofibrilar, são imprescindíveis para a manutenção de uma boa saúde, além disso, estudos demonstram que o TR é capaz de afetar positivamente fatores de risco, como: resistência à insulina, pressão arterial, metabolismo da glicose, densidade mineral óssea, taxa metabólica basal, atividade gastrointestinal e

nos níveis de gordura corporal. E ainda atuar no combate a doenças como: obesidade, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (WINETT; CARPINELLI, 2001).

Corroborando com essas evidências, BO et al., (2013) sugerem a existência de uma associação do metabolismo mitocondrial de redução-oxidação e os danos oxidativos, sendo que, o exercício realizado de maneira regular, promove baixos danos oxidativos, que levam a uma melhora na bateria antioxidante, por meio da ativação de importantes agentes sinalizadores como o PGC-1 α , NF κ B e MAPK. Além destas, outros agentes moleculares são capazes de influenciar positivamente em processos mitocondriais importantes como biogênese, dinâmica, mitofagia e apoptose (Figura 8). Sendo assim, evidente que o TR é uma intervenção capaz de atuar tanto na prevenção como no combate a doenças, no qual o metabolismo redox possa influenciar, como é o caso da sarcopenia.

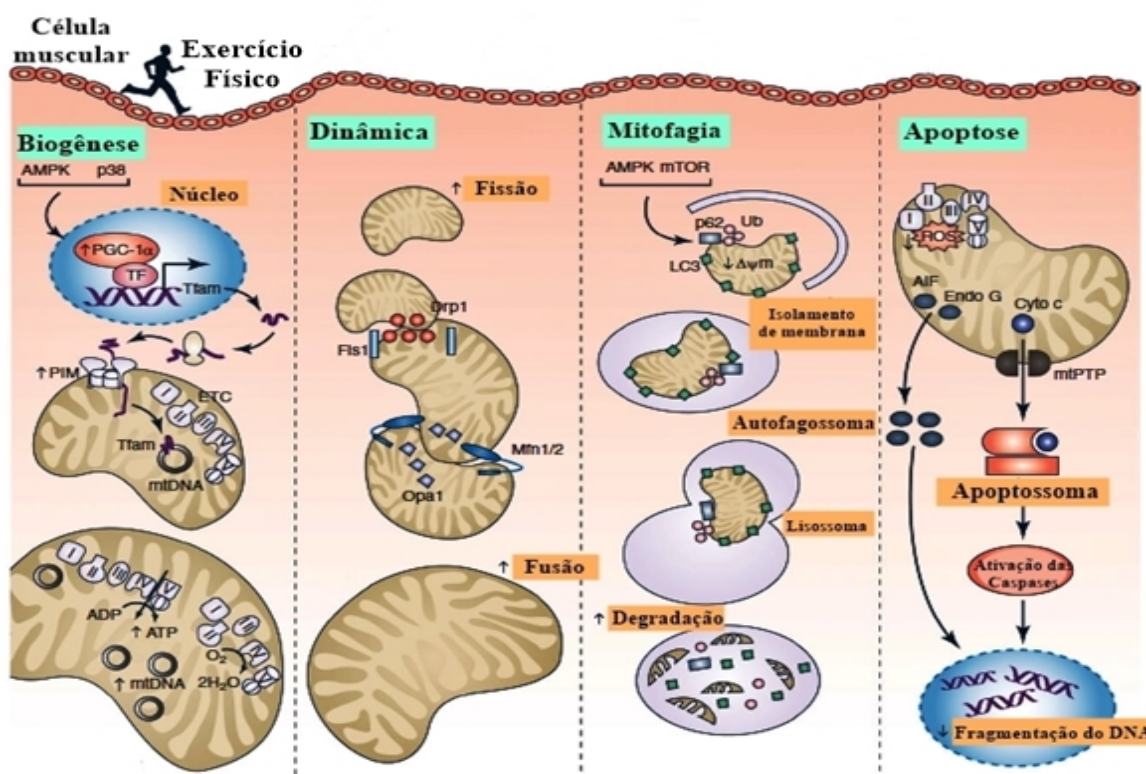


Figura 8. Adaptações mitocondriais geradas pelo exercício físico. Importantes vias de sinalização mitocondriais que são moduladas pela prática de exercício físico, sendo que as linhas tracejadas indicam a interação desses quatro processos. Figura retirada e adaptada de Joseph; Adhietty; Leeuwenburgh, 2016.

Considerando as particularidades para a efetividade do TR, Hornberger e Farrar (2004), adaptaram um protocolo de TR em animais de experimentação e observaram que o mesmo foi capaz de propiciar adaptações funcionais nos animais, semelhantes às

obtidas em humanos. Em sequência, outros estudos utilizaram o modelo translacional proposto por Hornberger e Farrar de maneira adaptada, semelhantemente ao utilizado no presente estudo, sendo que o TR se mostrou promissor na redução do conteúdo lipídico do fígado, dos músculos e do tecido visceral (LEITE

et al., 2009). Em outro estudo conduzido pelo grupo de Prestes et al, (2012) os pesquisadores concluíram que o TR promoveu a hipertrofia do músculo *soleus*, enquanto que, Shiguemoto et al, (2011) verificaram que o TR foi capaz de reverter os efeitos deletérios da ovariectomia no tecido ósseo e promoveu efeitos positivos de remodelamento do tecido ósseo de animais intactos, além desses um estudo conduzido por Monteiro et al, (2019) concluiu que o TR é capaz de prevenir a disfunção mitocondrial e a superexpressão de proteínas desacopladoras (UCP-3) dos músculos *soleus* e *gastrocnemius* de ratas OVX.

4.6.1. Treinamento Resistido, Menopausa, Sarcopenia e Mitocôndria

Atualmente, diversos estudos têm demonstrado efeitos positivos obtidos por meio da realização treinamento resistido no combate aos efeitos deletérios da menopausa (DESCHENES; KRAEMER., 2002; PRESTES et al., 2009). Embora o TR seja capaz de induzir benefícios como o aumento de força, hipertrofia muscular (PRESTES et al., 2009), diminuição dos níveis de gordura (DESCHENES; KRAEMER., 2002) e o aumento da densidade mineral óssea (SHIGUEMOTO et al., 2011). Dessa forma, nos fica evidente que muitos benefícios do TR, que estejam ocorrendo a nível celular e molecular carecem de investigação, afinal, diversas vias de sinalização interagem com hormônios suprimidos pela menopausa, influenciando diretamente e indiretamente a função das mitocôndrias, tidas como usinas bioenergéticas do corpo humano (GONZALEZ et al., 2016).

Conforme foi apresentado anteriormente, nesta dissertação, o estresse oxidativo é suficientemente capaz de causar e agravar o quadro de sarcopenia. Enzimas relacionadas ao sistema antioxidante como a glutathione oxidase e a superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), aumentam em resposta ao exercício físico. Sendo possível, que o aumento na geração de EROs em decorrência do exercício físico, promova essa regulação positiva no sistema antioxidante e por consequência beneficie a saúde (BO, 2013)

Grande parte dos estudos enfatizam problemas associados após a produção de EROs, com respectivas análises de proteínas que compõe o sistema antioxidante, sendo que um número reduzido de investigações visa o aspecto preventivo frente a formação de EROs, o grupo de Brand et al. (2005) ressaltaram um evento fisiológico importante, o vazamento basal de prótons, sendo este, responsável pelo consumo de cerca de 50% do O₂ do músculo esquelético perfundido de ratos. No músculo esquelético, a proteína mitocondrial com maior taxa de vazamento basal de prótons, é a ANT-1, isso se dá em virtude de sua alta quantidade ao longo da MMI (DIVAKARUNI; BRAND, 2011). Estimativas indicam que o vazamento basal de prótons represente cerca de 25% da taxa metabólica basal, tornando este processo custoso para às células a nível bioenergético. Além disso, tais evidências nos fazem refletir que esse sistema seja de grande utilidade, funcionando como uma possível proteção ao estresse oxidativo (BRAND et al., 2002; BRAND et al., 2005).

Buscando respostas e uma possível associação da atividade da ANT-1 e o exercício físico, um brilhante estudo foi realizado, neste estudo camundongos tiveram o gene responsável por codificar a ANT-1 nocauteado e foram submetidos a um protocolo de teste de esforço incremental em esteira, com duração de 25 minutos. Entre os achados, os pesquisadores demonstraram que as mitocôndrias do músculo esquelético desses animais mutantes exibiam uma grave diminuição no transporte de elétrons e consequente acúmulo de NADH, aumentando a relação $\text{NADH} + \text{H}^+ / \text{NAD}^+$, além disso observou-se uma intolerância severa ao exercício, impedindo a regulação positiva no sistema antioxidante, o que permitiu concluir que tais mudanças seriam suficientemente capazes de provocar o acúmulo de EROs mitocondriais que contribuíram para o surgimento de miopatias como a sarcopenia (GRAHAM et al., 1997)

Reforçando essas assertivas, o TR se mostrou efetivo na prevenção da sarcopenia, com melhora considerável na função mitocondrial de ratas OVX, quando comparadas aos grupos sedentários (MONTEIRO, 2019). Dessa forma, acreditamos ser inédita a investigação sobre uma possível relação entre os efeitos do TR na atividade mitocondrial da ANT-1 no modelo experimental de ratas OVX.

5. OBJETIVO

5.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo principal avaliar os efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido na eficiência do Coeficiente de Controle de Fluxo (FCC) e no consumo de oxigênio durante respiração acoplada na porção branca do músculo gastrocnêmio (predomínio glicolítico) de ratas jovens maduras.

6. METODOLOGIA

6.1. Animais e condições experimentais

Foram utilizadas 40 ratas *Wistar* adultas (*Rattus albinus norvegicus*), advindas do Biotério Central da UFSCar. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratas/gaiola) no biotério de experimentação do Laboratório de Fisiologia do Exercício, do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) – UFSCar, sob condições constantes de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), ruídos, 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 do Laboratório de Fisiologia do Exercício - UFSCar permaneceram por três semanas em processo de aclimação ao biotério e ao ciclo invertido. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com às legislações vigentes e com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América, sendo que os mesmos só foram iniciados após a aprovação do presente estudo pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar), aprovado sob o nº de protocolo 6331101218.

6.2. Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos randomicamente em quatro grupos experimentais: Intacto Sedentário (INT-SED), Intacto Treinamento Resistido (INT-TR), Ovariectomizado Sedentário (OVX-SED) e Ovariectomizado Treinamento Resistido (OVX-TR) (Figura 9).

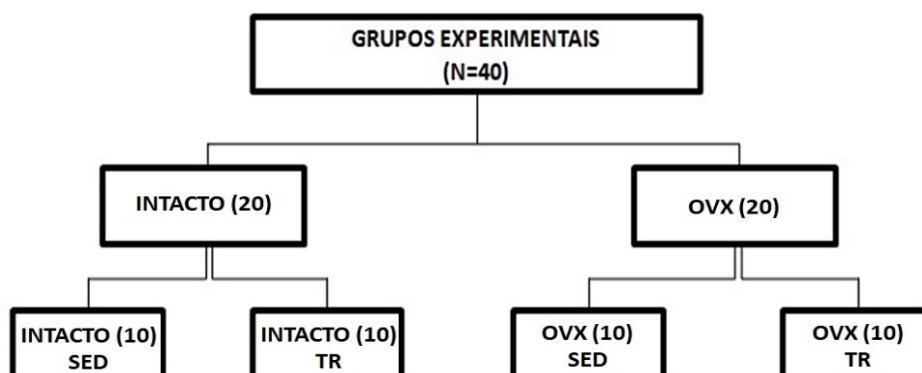


Figura 9: Organograma dos grupos experimentais, INTACTO: ratas intactas, OVX: ratas ovariectomizadas, SED: grupo sedentário e TR: grupo treinado.

6.3. Protocolo de Treinamento Resistido (TR)

O protocolo de intervenção de TR utilizado no presente estudo, foi adaptado a partir de um modelo proposto por Hornerberg e Farrar (2004), atendendo plenamente as necessidades analíticas deste trabalho. Inicialmente as ratas foram familiarizadas ao protocolo de TR conforme o descrito por Prestes et al. (2009).

Para que fosse possível a realização do protocolo de treinamento, utilizou-se uma escada vertical possuindo em seu ponto mais alto uma gaiola (20 cm²) (Figura 10). Após 15 semanas de idade completos e três sessões de familiarização realizadas, a primeira escalada consistiu em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal por meio de pesos colocados em um aparato constituído por tubos cônicos unidos por barbante e acoplados na porção proximal da cauda do animal com a utilização de uma fita adesiva. A cada subida foram adotados 60 segundos como tempo de recuperação ao animal, sendo que na segunda escalada foi realizada a adição de um peso de 30 gramas.

Este mesmo acréscimo de peso foi repetido em cada escalada até que fosse encontrada uma carga da qual a rata não consiga escalar toda a escada, mesmo após três auxílios manuais consecutivos. Dessa forma, a maior carga carregada de maneira voluntária, foi considerada como a Capacidade Máxima de Carregamento (CMC) do animal. A determinação da CMC foi repetida uma vez a cada semana, sempre na primeira sessão de treino da semana enquanto que as demais sessões de TR consistiram em 5 escaladas, com 65%, 70%, 75%, 80% e 85% da CMC do animal com intervalo de 60 segundos entre cada escalada, com frequência semanal de três vezes, contando com a determinação da CMC. Foi dado um intervalo mínimo de 48 horas entre as sessões de treino. Esta padronização de sessões de TR foi realizada ao longo de 22 semanas, totalizando 66 sessões de TR (Tabela 1).



Figura 10: Equipamentos utilizados para a sessão de TR. A) Tubos cônicos utilizados para colocar os pesos B) Pesos utilizados; C) Escada utilizada para a escalada.

Tabela 1: Cronograma do TR, dividido em Adaptação: Três primeiras sessões de familiarização dos grupos INT-TR e OVX-TR; CMC: carga máxima de carregamento, realizada na segunda sessão de treinamento de cada semana; x: período de recuperação das ratas.

<u>GRUPOS</u>	<u>SEGUNDA</u>	<u>TERÇA</u>	<u>QUARTA</u>	<u>QUINTA</u>	<u>SEXTA</u>	<u>SÁBADO</u>
<u>OVX-TR</u>	<u>ADAPTAÇÃO</u>	-	<u>ADAPTAÇÃO</u>	-	<u>ADAPTAÇÃO</u>	-
	<u>CMC</u>	-	<u>SESSÃO TREINO</u>	-	<u>SESSÃO TREINO</u>	-
<u>INT-TR</u>	<u>ADAPTAÇÃO</u>	-	<u>ADAPTAÇÃO</u>	-	<u>ADAPTAÇÃO</u>	-
	<u>CMC</u>	-	<u>SESSÃO TREINO</u>	-	<u>SESSÃO TREINO</u>	-

6.4. Desenho experimental

A Figura 11 traz de forma resumida o desenho experimental do presente estudo partindo do momento em que os animais chegam ao biotério experimental até o momento das eutanásias.

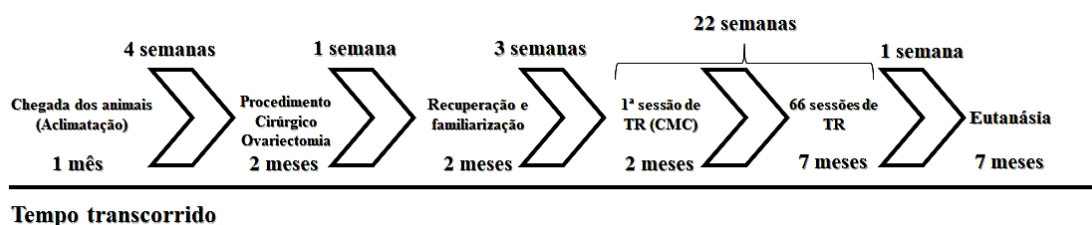


Figura 11. Desenho experimental. Cronologia das etapas realizadas até a eutanásia.

6.5. Preparação cirúrgica e ovariectomia

Todas as cirurgias foram realizadas no laboratório de experimentação da Fisiologia do Exercício/UFSCar em consonância com as normas e diretrizes (nacionais e internacionais) para pesquisas que envolvam a experimentação animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL'S, 2011). O procedimento cirúrgico para retirada dos ovários das ratas dos grupos OVX foi realizado na 13ª semana de vida segundo o modelo proposto por Kalu (1991), com anestesia intraperitoneal, associando-se 13mg/Kg de xilazina e 33mg/Kg de ketamina base. Os animais intactos não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

6.6. Eutanásia dos animais e coleta dos tecidos

Os animais foram eutanasiados após 48h da última sessão de treinamento resistido. Para a realização da eutanásia todos os animais foram previamente sedados com anestesia inalatória Isoflurano 1ml/100g de peso corporal, e após a constatação do efeito anestésico a eutanásia se deu por decapitação. Imediatamente após o procedimento foi feita a retirada do músculo gastrocnêmio da pata traseira direita para as análises respiratórias mitocondriais e da atividade da ANT-1, bem como o gastrocnêmio da pata traseira esquerda que foi armazenado em freezer -80°C.

6.7. Preparação das amostras

Imediatamente após a eutanásia, o músculo gastrocnêmio da pata traseira direita foi colocado em solução gelada de relaxamento e preservação da biópsia (BIOPS), composta por tampão Ca^{2+} -EGTA 10 mM, com 0,1 μM de cálcio livre, imidazol 20 mM, taurina 20 mM, K-MES 50 mM, 0,5 DTT mM, MgCl_2 6,56 mM, ATP 5,77 mM, 15 mM fosfocreatina, pH de 7,1, considerando um volume total do BIOPS = 1 litro. A fim de serem separadas porções idênticas e em duplicata deste músculo por biópsia (4 - 8 mg); que posteriormente foram permeabilizadas por 30 minutos em meio BIOPS contendo saponina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em agitação constante sobre gelo. Após 30 minutos, as porções em duplicata foram lavadas em “meio de respiração mitocondrial” número 5 (MiR05) por 10 minutos (pH=7,0), também em agitação constante sobre gelo (KUZNETSOV et al., 2008).

6.8. Avaliação de parâmetros respiratórios

O consumo de O_2 dos músculos permeabilizados foi mensurado em oxígrafo de alta resolução (*OROBOROS*, Innsbruck, Áustria) com MiR05, 37°C, na presença de glutamato (10 mM) e malato (5 mM) (GNAIGER et al., 2014). Seguidos de ADP 500 μM , e por titulações cumulativas que variavam entre os seguintes inibidores: CAT, oligomicina e mersalil. Para análise da atividade das proteínas de interesse, foi adicionado na cuba ADP (adenosina difosfato), para estabelecer o estado 3, então a respiração foi sucessivamente inibida por pequenas adições cumulativas (titulações) variando quantitativamente de 9 – 12 contendo 0,2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de CAT até que o estado 4 estivesse bem estabelecido. A taxa de respiração foi calculada por meio do modelo matemático de

regressão não linear, que calcula o coeficiente de controle de fluxo (FCC, da língua inglesa *flux control coefficients*) com base nos pontos máximos, intermediários e mínimos das titulações, conforme a metodologia proposta por Gellerich; Kunz; Bohnensack (1990). Os resultados foram apresentados em porcentagem (RODRIGUES-SILVA et al., 2017). Além disso, nas corridas iniciais foi utilizado o desacoplador químico Carbonil cianeto de p-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP) (RODRIGUES-SILVA et al., 2017).

6.9. Coeficiente de Controle de Fluxo (FCC)

O coeficiente de controle de fluxo (da língua inglesa *flux control coefficients*, FCC) vem sendo amplamente utilizado em investigações relativas à fosforilação oxidativa mitocondrial (GROEN et al., 1982; KUNZ et al., 1988). Foi desenvolvido após a criação da teoria de controle metabólico proposta por Kacser; Burns, (1973) e Heinrich; Rapoport, (1974). Em boa parte dessas investigações, os pesquisadores utilizaram inibidores específicos a fim de obter curvas de titulação que foram posteriormente utilizadas na determinação gráfica da concentração dos sítios de ligação do inibidor e também da inclinação primária, imprescindível no cálculo do FCC.

Dentre as diversas possibilidades de cálculo do FCC, no presente estudo optou-se pela aplicação de um modelo matemático de regressão não linear onde se relacionam o fluxo metabólico e a concentração do inibidor a ser adicionado. Sendo que, a ligação do inibidor deverá ocorrer com uma proteína especificadamente envolvida no fluxo metabólico total, neste caso a ANT-1, ATP-sintase e o carreador de fosfato, testados individualmente. Promovendo uma inibição não competitiva, vale ainda, ressaltar que tal ligação independe dos valores de concentração dos intermediários (GELLERICH et al., 1990).

6.10. Determinação da atividade da ANT-1

Conforme os passos metodológicos descritos anteriormente, a determinação da atividade da ANT-1 por meio do FCC, foi realizada por meio da utilização do inibidor específico, no caso a CAT, sendo que a dosagem de cada titulação que foi de 0,2 $\mu\text{M/mL}$ (Figura 12).

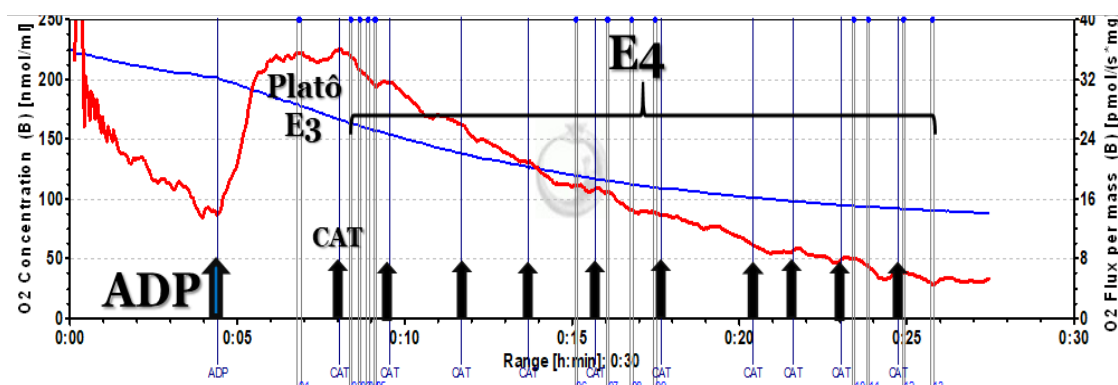


Figura 12. Modelo de análise de respiração mitocondrial (ANT-1). Respirometria de Alta Resolução realizada em biópsia muscular do Gastrocnêmio: Linha Azul: representa o consumo de oxigênio da cuba – Linha Vermelha: representa a velocidade de consumo de oxigênio do tecido. Estados Respiratórios: Estado 3 (E3) = estímulo respiratório por ADP; Estado 4 (E4) = inibição respiratória titulada por CAT (setas pretas).

6.11. Determinação da atividade do carreador de fosfato

A determinação da atividade do carreador de fosfato por meio do FCC, teve como diferença apenas o inibidor utilizado, neste caso o inibidor específico chamado mersalil (MER), bem como sua dosagem em cada titulação que foi de 2,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de MER.

6.12. Determinação da atividade da ATP-sintase

De maneira similar às anteriores, a determinação da atividade da ATP-sintase com base no FCC, foi realizada por meio de seu inibidor específico a oligomicina (OLI), sendo que cada titulação deste inibidor continha 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Após as variáveis apresentarem distribuição normal, foi aplicado o teste ANOVA de um caminho (*One-Way*), seguido do teste Post-Hoc de Tukey com o nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$). Para comparar a carga máxima de carregamento da semana 11 com a semana 1 foi utilizado o teste ANOVA dois caminhos (*Two-Way*) e da mesma forma para comparar a carga máxima de carregamento da semana 22 com a semana 11, do mesmo grupo, considerando o nível de significância de estatística de 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média \pm e erro padrão da média (EPM). Para análises estatísticas e plotagem dos gráficos foram utilizados os softwares Statistica[®], versão 7.0, e OriginPro[®], versão 9.1.

8. RESULTADOS

8.1. Análises de massas teciduais

Conforme apresentado na tabela 2:

Tabela 2: Massa Corporal (MC) e demais tecidos dos Grupos Experimentais

Grupos Experimentais	INT		OVX	
	SED	TR	SED	TR
MC Inicial (g)	320,55±10,01	301,11±4,76	338,47±9,94	326,78±10,69
MC Final (g)	365,61±*10,22	319,98±*6,57	427,70±21,71	362,17±*27,86
M. Gastrocnêmio (mg)	2076,70±90,35	2179,64±72,61	2057,46±70,24	2291,14±67,10
Útero (mg)	927,46±*121,99	1025,09±*155,38	183,37±17,86	142,17±31,76
Tíbia (mm)	39±0,2	39±0,5	39±0,5	39±0,4

Valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM), n= 10 animais por grupo. Grupos: Ovariectomizadas Sedentárias (OVX-SED) e Ovariectomizadas Treinamento Resistido (OVX-TR). Grupos Intactas Sedentárias (INT-SED) e Intactas Treinamento Resistido (INT-TR). ANOVA *One-Way* e post-hoc Teste de *Tukey*; $p < 0,05$ comparado aos grupos. *Diferença significativa comparado ao grupo OVX-SED. +Diferença significativa comparado ao grupo OVX-SED.

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 OVX-SED comparado aos outros 3 grupos ($p < 0,05$). O treinamento resistido foi capaz de prevenir o aumento de massa corporal do grupo OVX-TR quando comparado ao grupo OVX-SED. A massa do útero foi utilizada para analisar indiretamente o efeito da condição estrogênica dos animais. A massa desta variável foi menor para ao grupo OVX-SED e OVX-TR comparado ao grupo INT-SED e INT-TR ($p = 0,001$). Esta atrofia comprova a eficácia da ovariectomia (Figura 13). Não houve diferença significativa entre o tamanho da tíbia (Figura 14), mostrando que todos animais tiveram crescimento similar

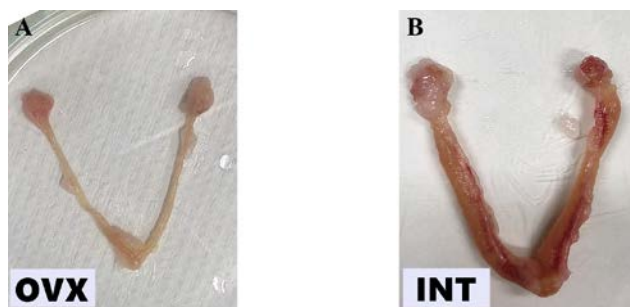


Figura 13. Comparação do útero de animais ovariectomizados e intactos; A) OVX-SED; B) INT-SED. Acervo do próprio autor

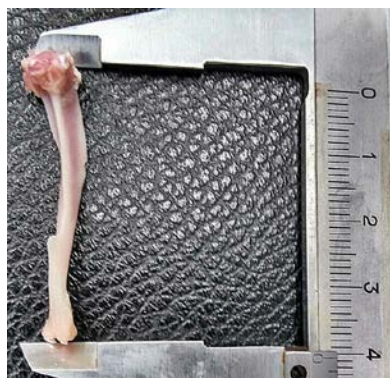


Figura 14. Medida da tíbia com paquímetro. Acervo do próprio autor.

8.2. 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 (OVX-TR e INT-TR), não havendo nenhuma diferença entre os grupos (Figura 15), 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 ($p < 0,05$).

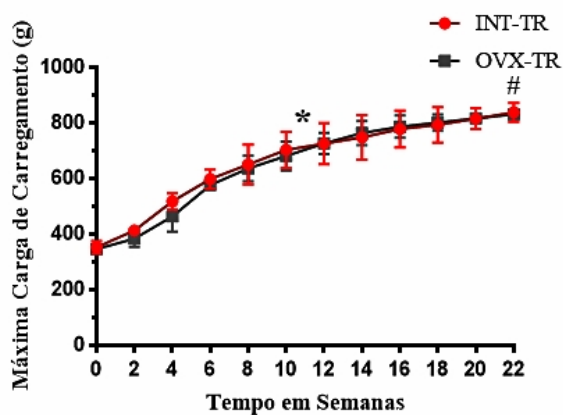


Figura 15. Carga Máxima de Carregamento. Grupos Experimentais: Ovariectomizadas Treinamento Resistido (OVX-TR) e Intactas Treinamento Resistido (INT-TR). Valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). ANOVA Two-Way e post-hoc Teste de Tukey; $p < 0,05$; *diferença significativa entre semana 11 e semana 1 ($p < 0,05$); #Diferença significativa entre a semana 22 e as semanas 11 ($p < 0,05$).

8.3. Consumo de Oxigênio

A Figura 16 apresenta os resultados do consumo de oxigênio tecidual de biópsia do músculo gastrocnêmio dos animais do presente estudo desse estudo. O consumo de oxigênio de repouso (estado 2, Figura 16A) não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os quatro grupos.

No consumo de oxigênio estimulado pela adição de ADP (estado 3, Figura 16B), é possível observar que a ovariectomia proporcionou diminuição estatística significativa no consumo de oxigênio do grupo OVX-SED ($p < 0,05$) em relação a todos os outros grupos. Além disso, também houve aumento ($p < 0,05$) para o estímulo de ADP entre os grupos INT-TR e OVX-TR, quando comparados ao grupo INT-SED.

Na eficiência respiratória mitocondrial (Figura 16C: razão estado 3/estado 2), o grupo OVX-SED apresentou eficiência respiratória menor que os demais grupos, com diferença estatisticamente significativa para os grupos INT-TR e OVX-TR. Não houve diferença ($p < 0,05$) para o controle respiratório entre os grupos OVX-TR, INT-TR e INT-SED.

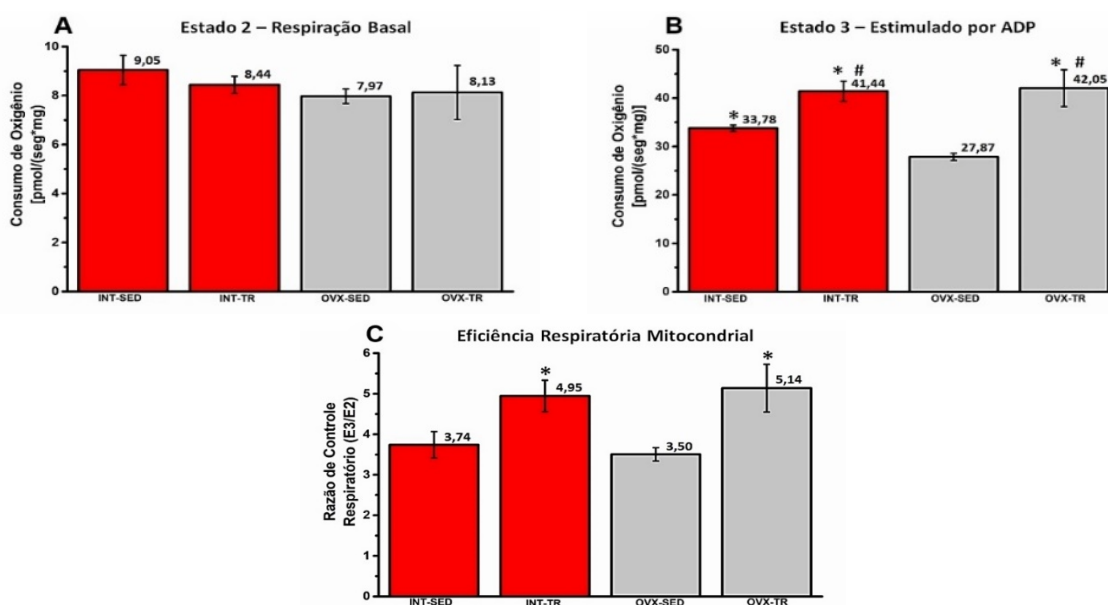


Figura 16. Respirometria de Alta Resolução: (A) Consumo de Oxigênio de Rotina ou Basal realizado em Biópsia do Músculo Gastrocnêmio (E2). (B) Consumo de Oxigênio estimulado por ADP (E3, Fosforilação Oxidativa) realizado em Biópsia do Músculo Gastrocnêmio; (C) Eficiência Respiratória Mitocondrial (E3/E2). Grupos: 1) Intactas Sedentárias (INT-SED) e Intactas Treinamento Resistido (INT-TR); 2) OVX: Ovariectomizadas Sedentárias (OVX-SED) e Ovariectomizadas Treinamento Resistido (OVX-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey, $p < 0,05$. *Diferença Significativa com relação ao grupo OVX-SED. #Diferença significativa com relação ao grupo INT-SED. Valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM), $n = 10$ por grupo.

8.4. FCC da ANT-1

O resultado mais importante do FCC da ANT-1 é a significativa redução de 48,17% observada no grupo OVX-SED, comprovando que a ovariectomia reduz potencialmente a função da ANT-1. Esses resultados são contrastados quando comparados o grupo OVX-SED ao grupo OVX-TR que não demonstrou redução significativa mantendo os valores do FCC em 70,86%, sugerindo que o TR foi responsável por manter a eficiência respiratória desta proteína elevada. Esses asserivas acerca do TR são confirmadas ao compararmos o resultado do FCC dos grupos INT-TR e INT-SED, onde novamente o TR se mostrou promissor em manter a atividade desta importante proteína mitocondrial (Figura 17E).

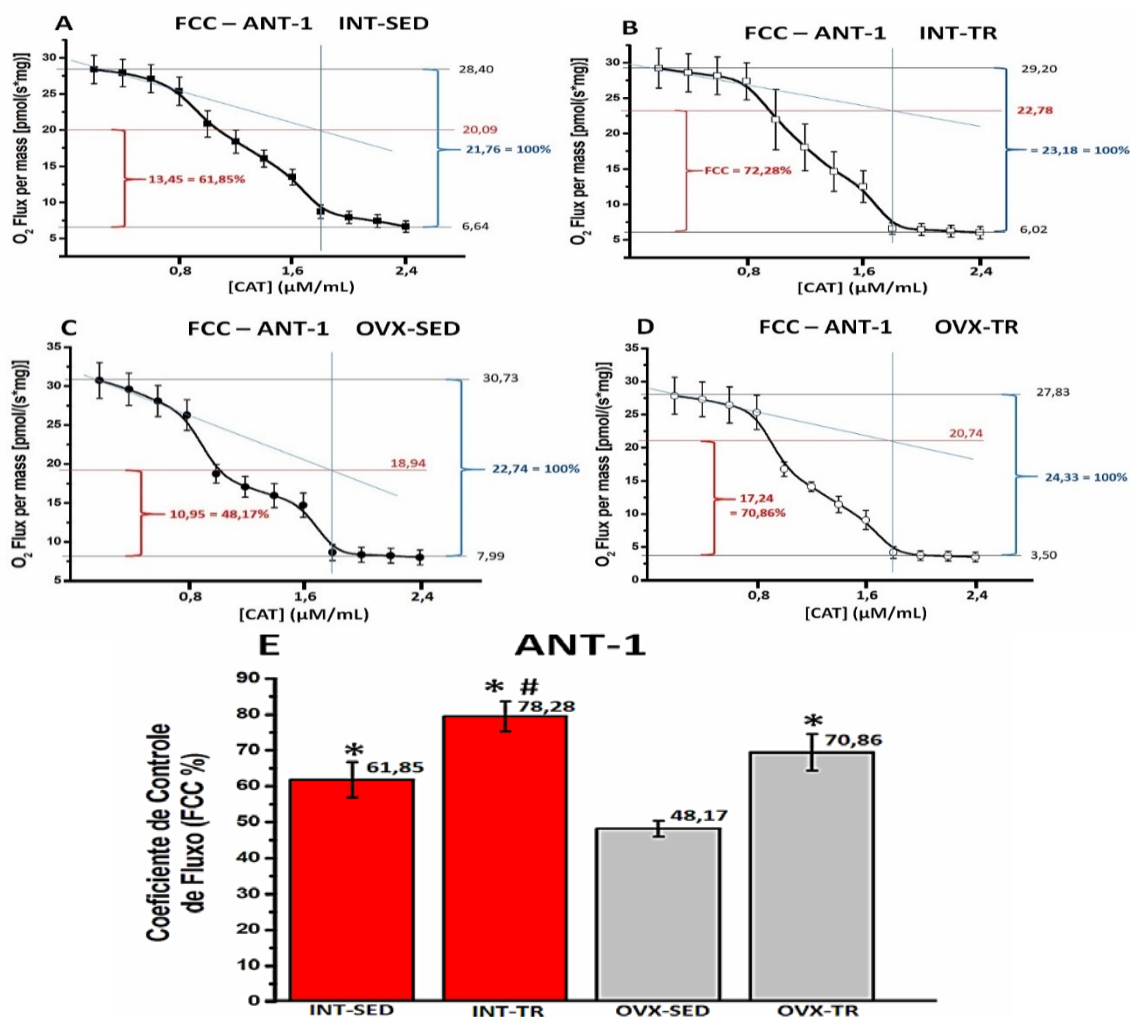


Figura 17. FCC da ANT-1. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. Grupos: 1) Intacto: Intactas Sedentárias (INT-SED) e Intactas Treinamento Resistido (INT-TR); 2) OVX: Ovariectomizadas Sedentárias (OVX-SED) e Ovariectomizadas Treinamento Resistido (OVX-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey, $p < 0,05$. *Diferença Significativa com relação ao grupo OVX-SED. #Diferença significativa com relação ao grupo INT-SED, $n = 10$ por grupo.

8.5. FCC da ATP-sintase

Neste caso, novamente observamos no FCC do grupo OVX-SED, respectivamente 54,68%, indicando novamente que a ovariectomia promoveu perda de função da ATP-sintase neste grupo quando comparado aos demais grupos. Além disso, notamos que os resultados do FCC dos grupos INT-SED 77,70%, INT-TR 78,54% e OVX-TR 76,57% foram similares, ressaltando novamente os efeitos deletérios promovidos pela ovariectomia na ATP-sintase e que a intervenção TR realizada de maneira precoce seja capaz de prevenir tal perda de função (Figura 18E).

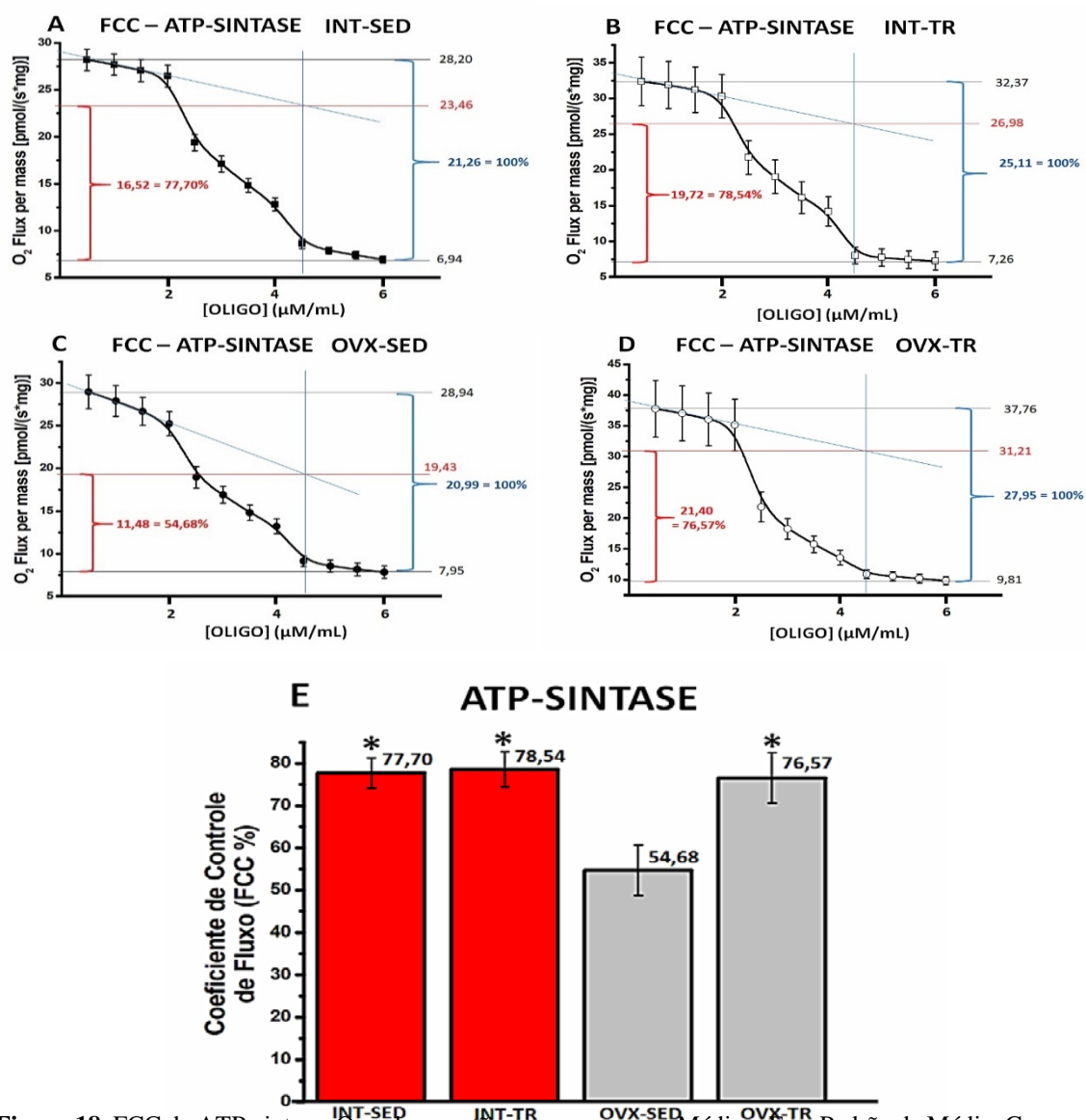


Figura 18. FCC da ATP-sintase. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. Grupos: 1) Intacto: Intactas Sedentárias (INT-SED) e Intactas Treinamento Resistido (INT-TR); 2) OVX: Ovariectomizadas Sedentárias (OVX-SED) e Ovariectomizadas Treinamento Resistido (OVX-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey, $p < 0,05$. *Diferença Significativa com relação ao grupo OVX-SED, $n = 10$ por grupo.

8.6. FCC do Carreador de Fosfato

Os resultados do FCC do carreador de fosfato não demonstraram diferença, indicando que a função desta proteína seja similar entre todos os grupos (Figura 19E).

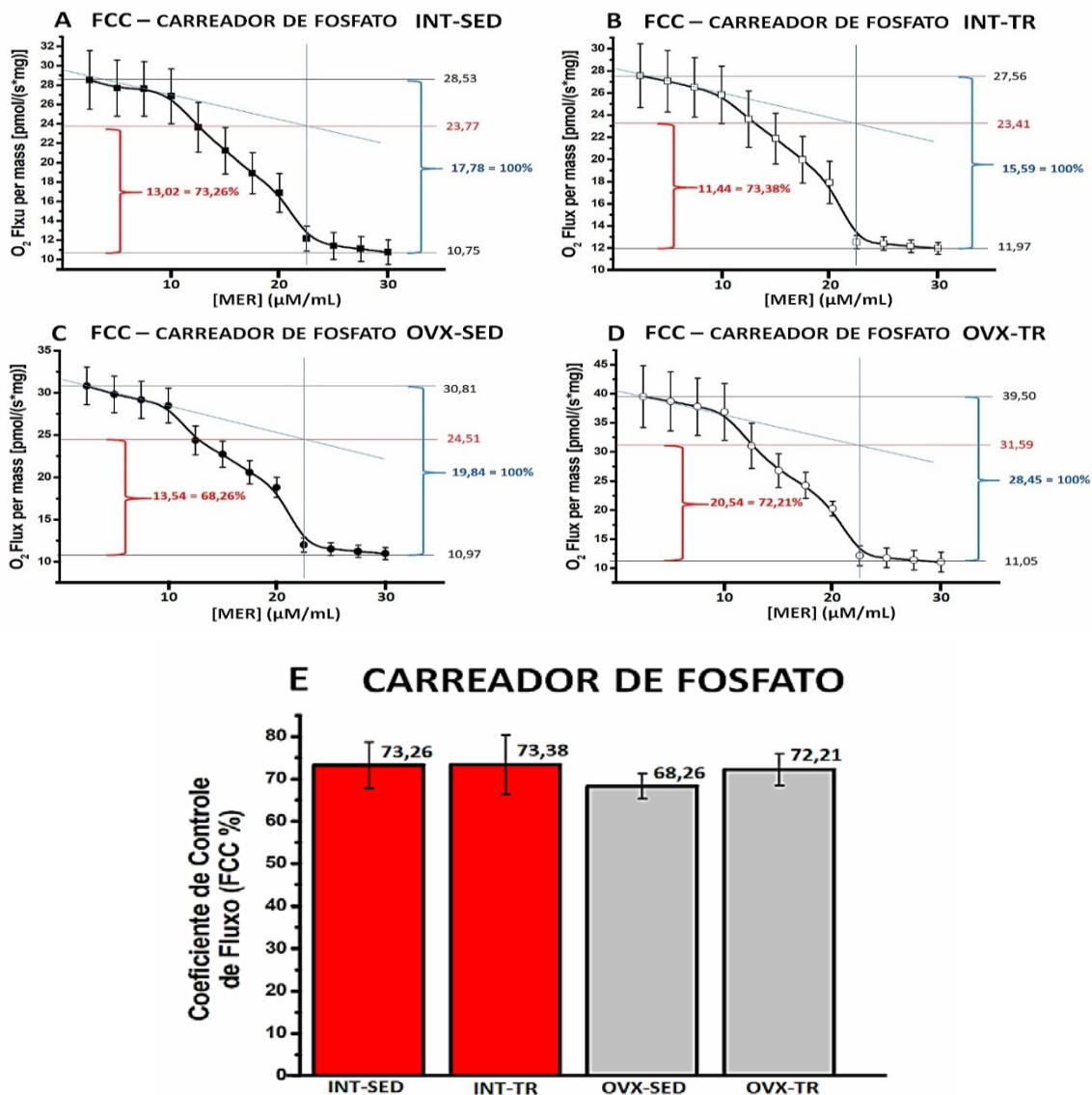


Figura 19. FCC do carreador de fosfato. Os valores estão expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Grupos: 1) Intacto: Intactas Sedentárias (INT-SED) e Intactas Treinamento Resistido (INT-TR); 2) OVX: Ovariectomizadas Sedentárias (OVX-SED) e Ovariectomizadas Treinamento Resistido (OVX-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey, $p < 0,05$. Não houveram diferenças estatisticamente significativas, $n = 10$ por grupo.

9. DISCUSSÃO

9.1 Evolução ponderal da massa corporal, tecidos e carga máxima de carregamento

A diminuição da massa livre de gordura é altamente prevalente em mulheres pós-menopáusicas e traz consigo prejuízos consideráveis como a redução do condicionamento físico associado a redução da força muscular e da capacidade aeróbia, bem como predispõe à eventos de risco e ao surgimento de doenças (FLECK; KRAEMER, 2017). Sendo o TR uma ferramenta efetiva na melhora da composição corporal e de parâmetros relacionados a fatores de risco à saúde de mulheres pós-menopáusicas (BOTERO et al., 2013).

Modelos OVX são amplamente utilizados com o intuito de investigar os efeitos relacionados a privação de hormônios como o 17β -estradiol (PRESTES et al., 2009; SHIGUEMOTO et al., 2007; BRINTON, 2012). Além disso, existem diversos estudos que demonstraram que há um aumento na massa corporal de animais ovariectomizados e que a intervenção TR é potencialmente capaz de controlar este aumento de peso exacerbado em animais OVX, inclusive evitar a presença da obesidade nestes animais, comprovando a eficácia do modelo de intervenção escolhido (SHIGUEMOTO et al., 2007; ROSSINI, 2016; MONTEIRO, 2019).

No presente estudo, o grupo OVX-SED teve um aumento de massa corporal médio de 89,23 gramas ao longo de 22 semanas, sendo este aumento estatisticamente significativo quando comparado a todos os demais grupos, que por sua vez, não tiveram diferenças significativas estatisticamente entre si. Além disso, em nosso estudo os úteros de animais OVX tiveram suas massas expressivamente reduzidas, quando comparadas aos animais INT, sendo a diferença entre estes 2 grupos estatisticamente significativa, o que confirma o sucesso da intervenção cirúrgica, considerada como padrão-ouro no campo pré-clínico, indicada para investigar os efeitos deletérios associados a privação dos hormônios sexuais, bem como de intervenções terapêuticas como o TR (KOEBELE, 2016).

Com relação ao nosso modelo de TR, vale ressaltar que princípios do treinamento em humanos que embasam todo processo de periodização como: princípio da sobrecarga

crescente, com atualização semanal da CMC; princípio da individualidade biológica e frequência (FLECK; KRAEMER, 2017).

Com relação a intensidade utilizada em TR, aplicamos percentuais da CMC divididos 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 ocorressem excessos a nível de treinamento com estes animais, que por sua vez estão associados a uma baixa recuperação, muitas vezes associada com infecções, imunossupressão e quedas no desempenho decorrentes da alta carga de trabalho, que resultam em uma diminuição na capacidade de trabalho (FLECK; KRAEMER, 2017).

Após essa série de cuidados, observamos em nossos resultados que a média da CMC de ambos grupos treinados foi estatisticamente significativo na semana 11 em relação a semana 1, e o mesmo ocorreu na semana 22 com relação a semana 11, não havendo diferenças significativas entre os grupos. Isto mostra a evolução do desempenho e a supercompensação do modelo de TR realizado. Além disso, outros trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa e de outros, já comprovaram que este modelo de TR é capaz de promover hipertrofia muscular e aumento do conteúdo de glicogênio muscular em comparação aos grupos sedentários, contudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nas massas do músculo gastrocnêmio (HORNBERGER; FARRAR, 2004; PRESTES et al., 2012).

9.2 Estado 2 – Respiração de Repouso ou de Rotina

A integridade da função mitocondrial do músculo esquelético é de suma importância para a continuidade do bom funcionamento das funções exercidas por este tecido. Sendo esta também, uma peça fundamental para a compreensão dos fenômenos associados a perda de função deste sistema, frente a processos complexos como a menopausa e o envelhecimento, responsáveis por prejuízos progressivos ao tecido muscular esquelético.

Muitos são os estudos que apontam uma associação entre a diminuição dos níveis séricos de estrogênio e disfunção mitocondrial (CHEN et al., 2014; ROSSINI, 2016;

MONTEIRO, 2019), por outro lado a intervenção mediada pelo exercício físico tem se mostrado promissor na funcionalidade mitocondrial.

Sendo assim, no presente estudo buscamos investigar os mecanismos subjacentes a disfunção mitocondrial em modelos OVX, com e sem a intervenção do TR, por meio de medidas diretas da respiração mitocondrial em biópsia do tecido muscular esquelético.

A análise inicial da função mitocondrial das amostras foi do Estado Respiratório 2 (E2), também conhecido como estado de repouso. Isso se dá pelo fato de que, no E2 não há adição de ADP, sem o ADP a ATP-sintase consegue ressintetizar o ATP. Portanto, neste estado não há fosforilação oxidativa e a força próton-motriz é aumentada, fazendo com que uma quantidade maior de energia seja utilizada pelos complexos da cadeia respiratória, para bombear os prótons presentes na matriz para o espaço intermembranoso, isso acarreta na diminuição da passagem dos elétrons pela cadeia respiratória, esses elétrons reduzem o O_2 e sua diminuição conseqüentemente diminui o fluxo de O_2 a níveis que são determinados pelo vazamento basal de prótons. Dessa forma no E2 o consumo de O_2 é determinado por uma estimativa do vazamento de prótons que regressam a matriz pela própria MMI ou por outras proteínas e reagem com o O_2 , dando condições para que os elétrons mantenham seu fluxo através dos complexos proteicos da CTE (GNAIGER, 2014).

Os resultados do E2 do presente estudo demonstraram que a velocidade de consumo de O_2 foi semelhante entre todos os grupos analisados, o que nos permite dizer que neste caso a ovariectomia e o TR não provocaram alterações no de consumo de O_2 mitocondrial no E2, tais resultados corroboram com resultados anteriores encontrados em nosso grupo para a respiração de tecido muscular esquelético (MONTEIRO, 2019). Ainda sim, observamos neste estudo um aumento no consumo de O_2 no E2 no grupo INT-SED, sendo a média de consumo deste grupo para esta variável no músculo gastrocnêmio de 9,05 (pmol/(seg*mg) vs uma média \approx 8,18 (pmol/(seg*mg) em relação aos demais grupos, contudo verificamos que esta diferença não foi estatisticamente significativa.

9.3 Estado 3 – Respiração estimulada por ADP ou Respiração Acoplada

O Estado Respiratório 3 (E3), também conhecido como estado respiratório mitocondrial acoplado é uma peça chave para o entendimento da função e do controle

respiratório mitocondrial. Tal estado se dá por meio da indução da respiração ativa, por meio da adição de doses de ADP, o ADP por sua vez é o combustível para que haja ressíntese de ATP, gerando um fluxo de prótons para a matriz mitocondrial através da MMI via ATP-sintase, e dessa forma a redução do gradiente eletroquímico da MMI.

Nossos resultados demonstraram que no E3 ocorreu redução estatisticamente significativa na velocidade de respiração do grupo OVX-SED (Figura B) comparado ao seu respectivo grupo controle positivo (INT-SED) e aos grupos treinados (OVX-TR e INT-TR), evidenciando que a ovariectomia juntamente com o sedentarismo pode vir a interferir de forma negativa no gradiente eletroquímico da MMI e na atividade de proteínas como o carreador de fosfato, ANT-1 e principalmente da ATP-sintase, evidências que podem potencialmente prejudicar o pleno funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial.

Este evento observado no funcionamento da CTE no E3 do músculo gastrocnêmio do grupo OVX-SED foi prevenido pelo TR, isso se torna visível ao observarmos os resultados do grupo OVX-TR, em que a taxa de consumo de oxigênio foi semelhante à do grupo INT-TR. Essas assertivas indicam que o TR é responsável por aumentar a capacidade respiratória mitocondrial deste tecido durante a respiração ativa. Um estudo realizado pelo grupo de Gousspillou et al., (2014) detectou uma diminuição discreta sem diferença estatisticamente significativa na respiração acoplada (E3) do músculo Vasto Lateral de idosos fisicamente ativos quando comparados a indivíduos jovens fisicamente ativos, fato este que ressalta a efetividade do TR para um bom funcionamento da cadeia respiratória.

Em outro estudo conduzido pelo grupo de Jacobs et al, (2013) envolvendo um modelo de envelhecimento em camundongos, apresentou resultados de análises respirométricas interessantes envolvendo diferentes músculos esqueléticos, entre eles o gastrocnêmio, sendo que seus resultados demonstraram um aumento na função mitocondrial do gastrocnêmio em todos os estados respiratórios, comparando-se músculos de animais jovens com músculos de animais velhos. Esta diminuição no consumo de oxigênio observada no gastrocnêmio de animais mais velhos, vai de encontro a observações realizadas em outros estudos feitos com análises do quadríceps, sóleo ou com músculos homogeneizados (SHORT et al., 2003; RASMUSSEN et al., 2003). O fluxo de acoplamento de elétrons é um preditivo do estresse oxidativo, bem como da

produção de enzimas antioxidantes, e pode estar relacionada à um aumento na eficiência do acoplamento mitocondrial durante o E3 (YIN et al., 2010).

Contudo, cabe-nos ressaltar que os estudos supracitados foram conduzidos utilizando-se mitocôndrias isoladas, sendo esta técnica questionada por aumentar os resultados que vão de encontro a disfunção mitocondrial no envelhecimento, quando comparadas a estudos em que as análises foram realizadas por meio de permeabilização das fibras (PICARD et al., 2011). Por fim, reiteramos que no modelo OVX, envolvendo análises respirométricas em fibras permeabilizadas, onde o TR foi escolhido como intervenção terapêutica, são necessários mais estudos para preencher diversas lacunas existentes.

9.4 Razão de Controle Respiratório (RCR) - Eficiência respiratória mitocondrial

Além dos importantes estados respiratórios citados anteriormente, existe ainda a razão de controle respiratório, que é responsável por fornecer um dado importante em ensaios respirométricos, a chamada eficiência da fosforilação oxidativa acoplada, esses valores são obtidos pela razão entre o E3 e o E2 (GOUSPILLOU et al., 2014). Se a fosforilação oxidativa, e por consequência a razão de controle respiratório (RCR) estiverem com seus valores baixos ou reduzidos, há um indicativo de que a fosforilação oxidativa esteja prejudicando diretamente a capacidade respiratória mitocondrial (GNAIGER, 2014).

Os resultados contidos na Figura 18C mostram a redução significativa da RCR do músculo gastrocnêmio do grupo OVX-SED com diferença estatisticamente significativa quando comparado aos grupos OVX-TR e INT-TR, cenário este similar ao que observamos no grupo INT-SED, embora o RCR deste grupo se encontre reduzido, não foram encontradas diferenças significativas estatisticamente. Dessa forma, novamente é possível notar a importância do TR, em manter o RCR em condições normais também no grupo OVX-TR. De maneira similar ao estudo do grupo de Gouspillou et al., (2014), que demonstraram redução significativa na RCR no músculo Vasto Lateral de idosos em detrimento de uma elevação na taxa de consumo de oxigênio no E2, a diminuição

significativa na RCR do músculo gastrocnêmio no presente estudo, também se deu em razão de um aumento na taxa de consumo de oxigênio no E2.

9.5 FCC da ANT-1

O principal achado de nosso trabalho é a diminuição do FCC da ANT-1 e da ATP Síntese em ratas que realizaram a ovariectomia. Com relação a ANT-1 que é considerada a proteína mais abundante na MMI há uma relação direta entre a sua função antiporte de ADP/ATP em contextos que exijam maior demanda energética como por exemplo no exercício físico (HALESTRAP; BRENNER, 2003; YIN et al., 2010).

Neste sentido a metodologia proposta neste estudo utilizou de forma inédita o FCC no modelo OVX com a intervenção TR. O FCC por sua vez, vem sendo amplamente utilizado em investigações relativas à fosforilação oxidativa mitocondrial (GELLERICH et al., 1990). Nossos resultados apresentaram uma interferência direta dos resultados do FCC quando inibidas com o CAT (inibidor específico da ANT-1) em ratas OVX-SED em relação a todos os outros grupos, indicando que a ovariectomia teve influência direta nessa resposta independente do grupo analisado.

A maior redução da curva observada nos outros grupos indica uma resposta qualitativa da função da ANT-1 nestes animais. Ainda é importante salientar que nosso protocolo de TR foi capaz de reverter esse quadro nas ratas OVX-TR, revelando nesse grupo uma capacidade aumentada em disponibilizar níveis adequados de ADP/ATP, fazendo a permuta necessária de substratos energéticos para manter a viabilidade celular. Visto que o exercício físico aumenta a demanda de ATP, e que este aumento em sua produção está diretamente associado a disponibilidade de ADP, em síntese esse sistema funciona por meio de um complexo formado entre a creatina-quinase mitocondrial (CQM) com ANT conhecido como complexo de cristas no qual a hidrólise do ATP recém-formado por meio da CQM fornece energia para a refosforilação do fosfato de alta energia, facilitando a rápida ressíntese de ATP (HALESTRAP; BRENNER, 2003; BRAND et al., 2005; NELSON; COX, 2013; CALBET et al., 2020).

Uma resposta mais eficaz da ANT-1 em todos nossos grupos treinados indica o potencial efeito regulatório que o TR pode exercer nesta importante proteína mitocondrial. Desta forma podemos concluir que efeitos adversos observados na

atividade da ANT-1 do grupo OVX-SED, podem ser prevenidos de maneira eficaz pelo TR. Outro ponto importante a ser salientado é a função da ANT-1 como reguladora da viabilidade celular e sua função na abertura do MPTP (BRAND et al., 2005; DIVAKARUNI; BRAND, 2011; NELSON; COX, 2013).

Isso deve-se ao fato desta proteína controlar a quantidade de ADP mitocondrial, sendo que baixas concentrações de ADP mitocondrial estão diretamente envolvidas na formação do MPTP. Além disso o Ca^{2+} tem grande afinidade pela ANT-1, especificamente no sítio de cardiolipinas que sofrem mudança conformacional reativa, implicando na intermediação da ANT e sua possível disfunção nesse processo de transição de abertura do MPTP, eventos estes intimamente relacionados com a apoptose (HALESTRAP; BRENNER, 2003).

Tais dados embora inéditos, sugerem que além de seu papel central no fornecimento energético, a ANT-1 desempenhe importante papel na regulação e viabilidade celular. Neste sentido, nossos resultados sugerem que o TR além de aumentar a atividade da ANT-1 modulando o sistema de fornecimento bioenergético, também pode exercer um papel modulador em quadros como a sarcopênia de acordo com sua funcionalidade.

9.6 FCC da ATP-sintase

Com relação a ATP-sintase, proteína responsável pela produção de energética mitocondrial observamos uma queda em sua atividade na resposta do FCC no grupo OVX-SED mostrando que a ovariectomia também afetou esta proteína. Além disso, nossos resultados demonstram que o TR impactou diretamente a função da ATP-sintase, o que pode ser observado ao compararmos o grupo OVX-SED e OVX-TR, onde demonstramos um valor maior do FCC para o grupo treinado. Não houve diferença estatisticamente significativa nos outros grupos revelando que a intervenção cirúrgica afetou diretamente a função dessa proteína. No contexto de obesidade, outro trabalho de nosso grupo (MONTEIRO, 2019) corrobora com os resultados observados neste estudo, evidenciando tal evento em ratas do grupo OVX-SED, isto pode estar diretamente relacionado a atividade da ATP-sintase. Em outro estudo foi observado que a obesidade foi capaz de prejudicar a síntese da ATP-sintase no músculo esquelético de humanos

obesos, reduzindo, por consequência, a capacidade de sintetizar ATP (TRAN et al., 2019). De maneira similar, nossos resultados trabalho também sugere existir essa associação. Contudo, não é de nosso conhecimento existirem outros trabalhos que realizaram a utilização da metodologia do FCC especificamente nessa conjuntura de intervenção apresentada em nosso trabalho.

9.7 FCC do Carreador de fosfato

No caso do carreador de fosfato os resultados não apresentaram diferenças com nível de significância estatístico, o que ressalta a integridade desta proteína no transporte simporte de fosfato e no vazamento basal de prótons, atividade importante para manter as tensões de O_2 , bem como de promover a manutenção do potencial eletroquímico da MMI.

10. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem-nos concluir que a ovariectomia diminui a eficiência do FCC, afetando principalmente o funcionamento da ANT e da ATP-Sintase do músculo gastrocnêmio de ratas maduras jovens. Como consequência ou causa correlata (?), a ovariectomia diminui o consumo de oxigênio na respiração acoplada. Ambas análises, associadas ou consequentes, afetam diretamente a função mitocondrial do musculo gastrocnêmio de submetidas à ovariectomia. O Protocolo de Treinamento Resistido proposto foi capaz de prevenir e melhorar a função mitocondrial dos animais treinados, tanto ovariectomizados como intactos.

Portanto, o Treinamento Resistido parece-nos ser uma ferramenta não-farmacológica importante e eficaz para a manutenção da função mitocondrial do músculo esquelético, e consequente preservação de força e função muscular de mulheres na pós-menopausa.

10.1 Perspectivas futuras

Em vista disso, deseja-se que este trabalho possa nortear dúvidas futuramente e que os conhecimentos aqui produzidos, possam ser revertidos em pesquisas envolvendo seres humanos, com enfoque na disfunção mitocondrial e seus possíveis mecanismos regulatórios, bem como o papel de importantes proteínas mitocondriais como a ANT-1 e a ATP-sintase, estas últimas responsáveis por modular de maneira direta o cenário bioenergético, estando cada vez mais presentes em estudos sobre doenças observadas no período da pós-menopausa.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRIGHI, J. M.; ALDRIGHI, C. M. S.; ALDRIGHI, A. P. S. Alterações sistêmicas no climatério. **Rev Bras Med**, v. 59, n. esp, p. 15-21, 2002.

ANAGNOSTIS, P.; DIMOPOULOU, C.; KARRAS, S.; LAMBRINOUDAKI, I.; GOULIS, D. G. Sarcopenia in post-menopausal women: Is there any role for vitamin D? **Maturitas**, v.82, p.56-64, 2015.

ATAMNA, H.; et al. The role of heme and iron-sulfur clusters in mitochondrial biogenesis, maintenance, and decay with age. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 397, n. 2, p. 345-353, 2002.

BARBANTI, V. J. **Dicionário de educação física e do esporte**. 1994.

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.

BOBBA, A.; et al. Dissecting the molecular mechanism by which NH₂tau and A β 1-42 peptides impair mitochondrial ANT-1 in Alzheimer disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1827, n. 7, p. 848-860, 2013.

BOIRIE, Y. Physiopathological mechanism of sarcopenia. **JNHA-The Journal of Nutrition, Health and Aging**, v. 13, n. 8, p. 717-723, 2009.

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. 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.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 2, p. 297-312, 2011.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios - 2018**, DF: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br>> . Acesso em: 05 jul. 2018

BRENNER, C.; et al. Adenine nucleotide translocase family: four isoforms for apoptosis modulation in cancer. **Oncogene**, v. 30, n. 8, p. 883-895, 2011.

BRINTON, R. D. Investigative Models for Determining Hormone Therapy-Induced Outcomes in Brain: Evidence in Support of a Healthy Cell Bias of Estrogen Action. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1052, n.1, p.57-74, 2005.

BRINTON, R. D. Minireview: Translational Animal Models of Human Menopause: Challenges and Emerging Opportunities. **Endocrinology**, v.8, n153, p.3571-3578, 2012.

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

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

CALBET, J. A. L.; et al. An integrative approach to the regulation of mitochondrial respiration during exercise: Focus on high-intensity exercise. **Redox Biology**, p. 101478, 2020.

CALVANI, R.; et al. Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. **Biological Chemistry**, v. 394, n. 3, p. 393–414, 2013.

CAMARGOS, A. F.; et al. Ginecologia ambulatorial. **Belo Horizonte: Coopmed**, 2001.

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.

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.

CRUZ-JENTOFT, A. J.; et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People A. J. Cruz-Gentoft et al. **Age and ageing**, v. 39, n. 4, p. 412-423, 2010.

DE LORENZI, D. R. S.; et al. Fatores associados à qualidade de vida após menopausa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 5, p. 312-7, 2006.

DESCHENES, M. R.; KRAEMER, W. J. Performance and physiologic adaptations to resistance training. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 81, n. 11, p. S3-S16, 2002.

DIVAKARUNI, A. S.; BRAND, M. D. The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. **Physiology**, v. 26, n. 3, p. 192–205, 2011.

DIZ, J. B. M.; et al. Prevalence of sarcopenia in older Brazilians: A systematic review and meta-analysis. **Geriatrics & gerontology international**, v. 17, n. 1, p. 5-16, 2017.

DOERNER, A.; et al. Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. **FEBS letters**, v. 414, n. 2, p. 258-262, 1997.

ESPOSITO, L. A.; et al. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, n.9, p.4820-4825, 1999.

FERNANDEZ, M. R.; GIR, E.; HAYASHIDA, M. Sexualidade no período climatérico: situações vivenciadas pela mulher. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 39, n. 2, p. 129-135, 2005.

FLECK, S. J.; KRAEMER, W. J. **Fundamentos do treinamento de força muscular**. 4ed. São Paulo: Artmed, 2017.

FUKAGAWA, N. K.; et al. Sarcopenia in aging humans: the impact of menopause and disease. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v.50, n. Special Issue, p.73-77, 1995.

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.

GARLAND J. R. T. Quantitative genetics of locomotor behavior and physiology in a garter snake. **Quantitative genetic studies of behavioral evolution**, p. 251-277, 1994.

GARUFFI, M.; et al. Effects of resistance training on the performance of activities of daily living in patients with Alzheimer's disease. **Geriatrics & gerontology international**, v. 13, n. 2, p. 322-328, 2013.

GELLERICH, F. N.; KUNZ, W. S.; BOHNENSACK, R. Estimation of flux control coefficients from inhibitor titrations by non-linear regression. **FEBS letters**, v. 274, n. 1-2, p. 167-170, 1990.

GELLERICH, F. N.; BOHNENSACK, R.; KUNZ, W. Control of mitochondrial respiration. The contribution of the adenine nucleotide translocator depends on the ATP-and ADP-consuming enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 722, n. 2, p. 381-391, 1983.

GNAIGER, E. Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis. **Mitochondr Physiol Network 19.12**. OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, 2014.

GOLLNICK, P. D.; et al. Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. **Journal of applied physiology**, v. 33, n. 3, p. 312-319, 1972.

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

GRAHAM, B. H.; et al. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. **Nature genetics**, v. 16, n. 3, p. 226, 1997.

GUNTER, T. E.; GUNTER, K. K. Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. **IUBMB life**, v. 52, n. 3-5, p. 197-204, 2001.

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.

HALESTRAP, A. P.; BRENNER, C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 16, p. 1507-1525, 2003.

HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. MC. **Free radicals in biology and medicine**, 5ª edição. Oxford University Press, USA, 2015.

HAMANAKA, R. B.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 6, p. 894-899, 2009.

HEINRICH, R.; RAPOPORT, T. A. A linear steady-state treatment of enzymatic chains: general properties, control and effector strength. **European journal of biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 89-95, 1974.

HEPPLE, R. T. Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. SEP, p. 1–13, 2014.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–226, 1976.

HORNBERGER, T. A. JR.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, 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, R. 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.
- JOSEPH, A. M.; ADHIHETTY, P. J.; LEEUWENBURGH, C. Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 594, n. 18, p. 5105-5123, 2016.
- 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.
- KACSER, H.; BURNS, J. A. Rate control of biological processes. In: **Symp. Soc. Exp. Biol**, p. 65-104, 1973.
- KALU, D. N.; et al. Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17 beta-estradiol. **Bone Miner**, v.14, n.3, p.175-87, 1991.
- KANG, S.Y.; 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. **Journal of bone metabolism**, v. 24, n. 1, p. 9-14, 2017.
- 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.
- KIM, E. H.; et al. Adenine nucleotide translocator as a regulator of mitochondrial function: implication in the pathogenesis of metabolic syndrome. **Korean diabetes journal**, v. 34, n. 3, p. 146-153, 2010.
- KIM, S. Y.; et al. Risk of osteoporotic fracture in a large population-based cohort of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 12, n. 4, p. R154, 2010.
- KLINGE, C. M. NIH Public Access. **Cell**, v. 105, n. 6, p. 1342-1351, 2009.
- KLINGENBERG, M. Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. In: *Anion carriers of mitochondrial membranes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1989. p. 169-181.
- KLINGENBERG, M.; BUCHHOLZ, M. On the Mechanism of Bongkrekate Effect on the Mitochondrial Adenine-Nucleotide Carrier as Studied through the Binding of ADP. **European journal of biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 346-358, 1973.
- KLINGENBERG, M.; GREBE, K.; SCHERER, B. The Binding of Atractylate and Carboxy-atractylate to Mitochondria. **European journal of biochemistry**, v. 52, n. 2, p. 351-363, 1975.

- KOEBELE, S. V.; BIMONTE-NELSON, H. A. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. **Maturitas**, v. 87, p. 5-17, 2016.
- KORSHUNOV, S. S.; et al. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Letters**, v. 416, n. 1, p. 15–18, 1997.
- KOWALTOWSKI, A. J.; et al. Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N - ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca²⁺ : Correlation with mitochondrial permeability transition. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1318, n. 3, p. 395–402, 1997.
- KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS letters**, v. 495, n. 1-2, p. 12-15, 2001.
- KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E.; FISKUM, G. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. **Cell death and differentiation**, v. 7, n. 10, p. 903, 2000.
- 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.
- 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.
- KWONG, J. Q.; et al. Genetic deletion of the mitochondrial phosphate carrier desensitizes the mitochondrial permeability transition pore and causes cardiomyopathy. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 8, p. 1209-1217, 2014.
- 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.
- LI, J.; et al. Electrochemical immunosensor based on graphene–polyaniline composites and carboxylated graphene oxide for estradiol detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 188, p. 99-105, 2013.
- LIU, Y.; CHEN, X. J. Adenine nucleotide translocase, mitochondrial stress, and degenerative cell death. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.
- LOVEJOY, J. C.; et al. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. **International journal of obesity**, v.32, n.6, p.949, 2008.
- MALTAIS, M. L.; et al. Changes in muscle mass and strength after menopause. **J. Musculo eskelet Neuronal Interact**, v.9, n.4, p.186-197, 2009.

- MARZANI, B.; PANSARASA, O.; MARZATICO, F. 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 path ways to clinical trials. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v.45, n.10, p.2288-2301, 2013.
- MAYR, J. A.; et al. Mitochondrial Phosphate–Carrier Deficiency: A Novel Disorder of Oxidative Phosphorylation. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 3, p. 478-484, 2007.
- MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Exercise physiology: nutrition, energy, and human performance**. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
- MESSIER, V.; et al. Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones. *Maturitas*, v. 68, n. 4, p. 331–336, 2011.
- MILLER, W. L. Steroid hormone synthesis in mitochondria. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 379, n. 1-2, p. 62-73, 2013.
- MISHRA, G. D.; CARDOZO, L.; KUH, D. Menopausal transition and the risk of urinary incontinence: results from a British prospective cohort. **BJU international**, v. 106, n. 8, p. 1170-1175, 2010.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, n. 4784, p. 144-148, 1961.
- MONTELEONE, P.; et al. Symptoms of menopause global prevalence, physiology and implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 4, p. 199, 2018.
- MONTEIRO, A. R. B. Efeito do Treinamento Resistido na Função Mitocondrial e na Expressão Gênica da UCP-3 no Músculo de Ratas Ovariectomizadas. 2019.
- MORAES, V. M.; et al. Humor, atenção concentrada e qualidade de vida no climatério: um estudo no Brasil Central. **Psicologia, Saúde & Doenças**, v.8, n.2, 2007.
- MUTHUSAMI, S.; et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidante system in adult rats. **Clinica Chimica Acta**, v. 360, n. 1–2, p. 81–86, 2005.
- NADEGE, B.; PATRICK, L.; RODRIGUE, R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. **Frontiers in bioscience**, v. 14, n. 11, p. 4015-4034, 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY et al. Recommendations for estrogen and progestogen use in peri-and postmenopausal women: October 2004 position

statement of the North American Menopause Society. **Menopause (New York, NY)**, v. 11, n. 6 Pt 1, p. 589, 2004.

NELSON, H. D. Menopause. **The Lancet**, v. 371, n. 9614, p. 760-770, 2008.

PETERSON, C. M.; JOHANSEN, D. L.; RAVUSSIN, E. Skeletal muscle mitochondria and aging: a review. **Journal of aging research**, v. 2012, 2012.

PICARD, M.; et al. Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber typespecific and do not explain differential atrophy between muscles. **Aging Cell**, v. 10, n. 6, p. 1047–1055, 2011a.

PICANÇO, M. R. A.; et al. **A idade da menarca da menina brasileira: Os fatores sócio-econômicos e as diferenças regionais**. 1995. Tese de Doutorado. Instituto Fernandes Figueira.

PITANGA C. P. S.; et al. Associação e poder discriminatório da atividade física para a prevenção da sarcopenia em mulheres pós-menopáusicas. **Motricidade**, v.11, n.3, 2015.

POLOTSKY, H. N.; POLOTSKY, A. J. Metabolic implications of menopause. In: Seminars in reproductive medicine. **Thieme Medical Publishers**, v.28, n.5, p.426-434, 2010.

PRESTES, J.; et al. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metabol**, v.34, n.4, p.700-706, 2009.

PRESTES, J.; et al. Resistance training and glycogen content in ovariectomized rats. **International journal of sports medicine**, v. 33, n. 07, p. 550-554, 2012.

RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 8-30, 2014

RODRIGUES-SILVA, E.; et al. Evaluation of mitochondrial respiratory function in highly glycolytic glioma cells reveals low ADP phosphorylation in relation to oxidative capacity. **Journal of neuro-oncology**, v. 133, n. 3, p. 519-529, 2017.

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.

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

ROSENBERG, I. H. Sarcopenia: origins and clinical relevance. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 5, p. 990S-991S, 1997.

ROSENBERG, I. H. Sarcopenia: origins and clinical relevance. **Clinic. Geriatr. Med.**, v.27, n.3, p.337-339, 2011.

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

SCHIAFFINO, S.; et al. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. **Journal of Muscle Research & Cell Motility**, v. 10, n. 3, p. 197-205, 1989.

SHEPHERD, D.; GARLAND, P. B. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 114, n. 3, p. 597-610, 1969.

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 & science in sports**, v. 22, n.5, p.607-617, 2011.

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.

SILVERTHORN, D. U.; et al. **Human physiology: an integrated approach**. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2010.

SIMONCINI, C.; et al. Mitochondrial ANT-1 related adPEO leading to cognitive impairment: is there a link? **Acta Myologica**, v. 36, n. 1, p. 25, 2017.

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

SMERDU, V. I. K. A.; et al. Type IIX myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 267, n. 6, p. C1723-C1728, 1994.

SUN, Y. I.; et al. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.

STARON, R. S.; PETTE, D. The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibres. Rabbit tibialis anterior muscle. **Biochemical Journal**, v. 243, n. 3, p. 695-699, 1987.

TRAN, L.; et al. Mitochondrial ATP synthase β -subunit production rate and ATP synthase specific activity are reduced in skeletal muscle of humans with obesity. **Experimental physiology**, v. 104, n. 1, p. 126-135, 2019.

- TREMOLLIÈRES, F. A.; POUILLES, J. M.; RIBOT, C. A. Relative influence of age and menopause on total and regional body composition changes in postmenopausal women. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 175, n. 6, p. 1594-1600, 1996.
- TRESIERRAS, M. A.; BALADY, G. J. Resistance training in the treatment of diabetes and obesity: mechanisms and outcomes. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention**, v. 29, n. 2, p. 67-75, 2009.
- TSUKAMOTO, M. H. C.; NUNOMURA, M. Aspectos maturacionais em atletas de ginástica olímpica do sexo feminino. Motriz. **Journal of Physical Education**. UNESP, p. 111-116, 2003.
- VENTURA-CLAPIER, R.; et al. Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. **Clinical science**, v. 131, n. 9, p. 803-822, 2017.
- VOET, D.; et al. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.
- WEIDEMANN, M. J.; ERDELT, H.; KLINGENBERG, M. Adenine nucleotide translocation of mitochondria: identification of carrier sites. **European journal of biochemistry**, v. 16, n. 2, p. 313-335, 1970.
- 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.
- WINETT, R. A.; CARPINELLI, R. N. Potential health-related benefits of resistance training. **Preventive medicine**, v. 33, n. 5, p. 503-513, 2001.
- YANG, S.; et al. Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. **The Journal of Anatomy**, v. 190, n. 4, p. 613-622, 1997.
- YIN, Y.; 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.
- ZARROW, M. X. **Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques**. Elsevier, 2012.
- 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.
- ZHONG S.; CHEN C. N.; THOMPSON L. V. Sarcopenia of ageing: functional, structural and biochemical alterations. **Rev Bras Fisioter**. 2007;11(2):91-7.

12. ANEXOS

12.1. Certificado CEUA

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "MENOPAUSA E BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL: EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO (TR) SOBRE A BIOGÊNESE, FUNÇÃO E DINÂMICA MITOCONDRIAL EM RATAS OVARIETOMIZADAS O TR pode proteger a disfunção mitocondrial promovida pela OVX?", protocolada sob o CEUA nº 6331101218 (ID 001130), sob a responsabilidade de **Gilberto Eiji Shigemoto e equipe; José de Castro Souza Neto Júnior; Alyson Roberto Batista Monteiro; Ana Laura Dutra Coelho; Diego Felipe Cavalini; Gabriel Carlos Goulart Scarlato; Katiany Thays Lopes Zangrando; Stéfanie Hansen Paes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 07/03/2019.

We certify that the proposal "MENOPAUSE AND MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS: EFFECTS OF RESISTANCE TRAINING ON MITOCHONDRIAL BIOGENESIS, FUNCTION AND DYNAMICS IN OVARIETOMIZED RATS Can TR protect mitochondrial dysfunction promoted by OVX?", utilizing 80 isogenic rats (80 females), protocol number CEUA 6331101218 (ID 001130), under the responsibility of **Gilberto Eiji Shigemoto and team; José de Castro Souza Neto Júnior; Alyson Roberto Batista Monteiro; Ana Laura Dutra Coelho; Diego Felipe Cavalini; Gabriel Carlos Goulart Scarlato; Katiany Thays Lopes Zangrando; Stéfanie Hansen Paes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 03/07/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 01/2019 a 03/2020 Área: Ciências Fisiológicas

Origem: [Biotério Central da UFSCAR](#)

Espécie: [Ratos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [8 a 12 semanas](#) N: [80](#)

Linhagem: [rattus / wistar](#)

Peso: [200 a 260 g](#)

Local do experimento: Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia do Exercício Experimental

São Carlos, 11 de março de 2019

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

12.2. Tabela nutricional (ração para roedores)

TABELA NUTRICIONAL	
Umidade (Máx)	13%
Proteína Bruta (Mín)	23%
Extrato Etéreo (Mín)	4,5%
Matéria Fibrosa (Máx)	5%
Matéria Mineral (Máx)	10%
Cálcio (Mín)	12g/Kg
Cálcio (Máx)	13g/Kg
Fósforo (Mín)	8,5g/Kg
Sódio (Mín)	0,27%
Lisina (Mín)	12,5g/Kg
Metionina (Mín)	25,5g/Kg