

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPG-CF UFSCar/UNESP

CHRISTOPHER BARSAQUE GARCIA

**EFEITOS DA OVARECTOMIA E DO TREINAMENTO RESISTIDO NA FUNÇÃO E NO  
BIOMARCADOR MITOCONDRIAL MOTS-c DO FÍGADO E MÚSCULO ESQUELÉTICO  
DE RATAS: PAPEL DA MITOCÔNDRIA NO *CROSSTALK* ENTRE FÍGADO E  
MÚSCULO**

SÃO CARLOS - SP

2024

CHRISTOPHER BARSAQUE GARCIA

**EFEITOS DA OVARECTOMIA E DO TREINAMENTO RESISTIDO NA FUNÇÃO E NO BIOMARCADOR MITOCONDRIAL MOTS-c DO FÍGADO E MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS: PAPEL DA MITOCÔNDRIA NO *CROSSTALK* ENTRE FÍGADO E MÚSCULO**

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

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto

SÃO CARLOS - SP

2024

Barsaque Garcia, Christopher

Efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido na função e no biomarcador mitocondrial MOTS-c do fígado e músculo esquelético de ratas: papel da mitocôndria no crosstalk entre fígado e músculo / Christopher Barsaque Garcia -- 2024.  
130f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos  
Orientador (a): Gilberto Eiji Shiguemoto  
Banca Examinadora: Gilberto Eiji Shiguemoto, Cynthia Aparecida de Castro, Natália Mayumi Inada  
Bibliografia

1. Disfunção mitocondrial. 2. Crosstalk fígado e músculo.  
3. Treinamento resistido. I. Barsaque Garcia, Christopher. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180



## 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 Christopher Barsaque Garcia, realizada em 06/09/2024.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto (UFSCar)

Profa. Dra. Cynthia Aparecida de Castro (UFSCar)

Profa. Dra. Natália Mayumi Inada (IFSC/USP)

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

Dedico esta dissertação aos meus pais, Robson dos  
S. Garcia e Adriana Barsaque, e à minha  
companheira, Amanda Caroline.

## AGRADECIMENTOS

Expresso primeiramente minha gratidão a Deus, por todas as oportunidades, coragem e força que ele me concedeu para superar todos os desafios dia após dia ao longo dessa jornada.

À minha base familiar, meus pais Robson dos S. Garcia e Adriana Barsaque, que me proporcionaram uma formação sólida em caráter e valores. Aos meus sogros, Marcos A. Gonçalves e Helena Pereira da S. Gonçalves pelo apoio e acima de tudo, por sempre acreditarem em mim. À minha companheira Amanda Caroline, que sempre esteve ao meu lado me incentivando e nunca me deixando desanimar diante das dificuldades.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto, pela oportunidade concedida em seu laboratório, pelos valiosos ensinamentos, por sua enorme dedicação e orientação ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por acreditar no meu potencial e me motivar a superar os desafios com confiança e determinação. Seu apoio não apenas enriqueceu meu conhecimento científico, mas também me proporcionou um crescimento pessoal significativo, que levarei por toda a vida.

Agradeço a todos os amigos e companheiros de laboratório - Theodora Brandão, Luciana Kawakami, Regiane Alves, Iara Dinik, Jose Carlos, Gabriel Albuquerque e João Pedro. Suas contribuições foram fundamentais para o meu crescimento, compartilhando seus conhecimentos, alegrias e desafios ao longo dessa trajetória. Também gostaria de deixar meu agradecimento especial à Carla Nascimento, que não apenas me acolheu como um irmão, mas ofereceu conselhos valiosos e me ajudou a sempre enxergar o lado bom de todas as coisas.

Gostaria de estender meus agradecimentos ao Prof. Dr. Anibal E. Vercesi e Prof. Dr. Roger F. Castilho, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, à Prof. Dra. Heloisa Sobreiro S. de Araujo, do Lab. de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Prof. Dr. Anderson F. da Cunha, do Lab. de Bioquímica e Genética Aplicada ambos da UFSCar, por abrirem as portas de seus laboratórios viabilizando e contribuindo para as análises realizadas neste projeto.

E a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram durante minha caminhada até aqui. A todos vocês, o meu mais sincero obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq por meio da bolsa de estudos concedida.

“A mente é o limite. Você pode fazer o que quiser,  
desde que acredite 100% nisso.”  
(Arnold Schwarzenegger)

## RESUMO

**Contextualização:** O declínio hormonal presente na menopausa pode levar a disfunção mitocondrial, predispondo a mulher a doenças musculoesqueléticas e metabólicas incluindo sarcopenia e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Evidências indicam que há uma comunicação (*crosstalk*) entre o fígado e músculo esquelético, atualmente direcionada para biomarcadores mitocondriais. O MOTS-c, molécula mitocondrial liberada pelas mitocôndrias em situação de estresse representa um desses marcadores, desempenhando papel na regulação da captação de glicose e metabolismo lipídico, atuando no *crosstalk* entre os dois tecidos. Neste contexto, o treinamento resistido (TR) tem mostrado eficácia, na melhora da função mitocondrial e na prevenção / tratamento da sarcopenia e DHGNA em mulheres na menopausa. **Objetivo:** Investigar os efeitos da ovariectomia e do TR sobre a função mitocondrial e a expressão do biomarcador MOTS-c, envolvido no *crosstalk* entre fígado e músculo esquelético. **Metodologia:** 20 ratas Wistar adultas jovens, foram distribuídas em 4 grupos (INT-SED, INT-TR, OVX-SED e OVX-TR). A ovariectomia foi realizada após 13 semanas de vida. O TR foi realizado em escada (3x/semana) por 20 semanas. A eutanásia e coleta dos tecidos ocorreu 48h após a última sessão de TR. As análises foram realizadas em biópsia tecidual de fígado e músculo gastrocnêmio: 1) Expressão gênica (RT-qPCR) da cadeia transportadora de elétrons (CTE: CI, CII, CIII, CIV e CV) e MOTS-c; 2) Consumo de Oxigênio por Respirometria de Alta Resolução; 3) Atividade da citrato sintase. A análise estatística foi realizada por ANOVA *One-Way* seguida do teste Post-hoc de Fisher ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** Massa corporal: grupo OVX-SED ( $357,4 \pm 18,1$  g) foi significativamente maior que os outros grupos; Carga Máxima de Carregamento: ambos os grupos TR aumentaram significativamente a CMC, INT-TR ( $771,6 \pm 3,1$  g) e OVX-TR ( $772,2 \pm 0,8$  g) ao final do experimento; Respirometria do fígado: diminuição no consumo de oxigênio do grupo OVX-SED no S3 (CI + CII) ( $40,5 \pm 13,3$  pmol/seg\*mg) em relação aos outros grupos, e aumento no consumo de oxigênio nos grupos TR (OVX-TR =  $75,6 \pm 23,6$ ; INT-TR =  $81,8 \pm 37,6$  pmol/seg\*mg); Respirometria do gastrocnêmio: diminuição no consumo de oxigênio do grupo OVX-SED no S3 (CI + CII) ( $36,3 \pm 4,5$  pmol/seg\*mg) em relação aos outros grupos, e aumento no consumo de oxigênio nos grupos TR (OVX-TR =  $49,1 \pm 6,7$ ; INT-TR =  $50,5 \pm 7,5$  pmol/seg\*mg); RT-qPCR no fígado: redução na expressão gênica do CIV e ATPS no grupo OVX-SED ( $0,71 \pm 0,0$  e  $0,71 \pm 0,0$  UA) em relação ao INT-SED, e aumento na expressão gênica do CII em ambos os grupos TR (OVX-TR =  $1,20 \pm 0,0$ ; INT-TR =  $1,30 \pm 0,3$  UA), o TR aumentou a expressão gênica da MOTS-c em ambos os grupos treinados (OVX-TR =  $2,29 \pm 0,6$ ; INT-TR =  $2,19 \pm 1,0$  UA); RT-qPCR no gastrocnêmio: redução na expressão gênica do CIII e CIV no grupo OVX-SED ( $0,87 \pm 0,4$  e  $0,59 \pm 0,2$  UA) em relação ao INT-SED, e aumento na expressão gênica do CIV em ambos os grupos TR (OVX-TR =  $1,49 \pm 0,6$ ; INT-TR =  $1,62 \pm 0,5$  UA), o TR aumentou a expressão gênica da MOTS-c no grupo OVX-TR ( $1,26 \pm 0,4$  UA) comparado ao OVX-SED. **Conclusão:** A ovariectomia produziu disfunção mitocondrial no fígado e gastrocnêmio, reduzindo a expressão gênica das proteínas da CTE e MOTS-c. No entanto, o TR como intervenção não farmacológica, foi eficaz na prevenção desses danos. O aumento da expressão do gene MOTS-c nos grupos TR indica a presença de biomarcadores mitocondriais que confirmam o *crosstalk* entre os tecidos hepático e muscular promovido pelo exercício.

**Palavras-chave:** ovariectomia; menopausa; disfunção mitocondrial; MOTS-c; DHGNA; sarcopenia; *crosstalk*; treinamento resistido; expressão gênica.

## ABSTRACT

**Background:** The hormonal decline present in menopause can lead to mitochondrial dysfunction, predisposing women to musculoskeletal and metabolic diseases including sarcopenia and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Evidence indicates that there is a crosstalk between the liver and skeletal muscle, currently targeting mitochondrial biomarkers. MOTS-c, a mitochondrial molecule released by mitochondria under stress, represents one of these markers, playing a role in regulating glucose uptake and lipid metabolism, acting in the crosstalk between the two tissues. In this context, resistance training (RT) has been shown to be effective in improving mitochondrial function and preventing/treating sarcopenia and NAFLD in menopausal women. **Objective:** To investigate the effects of ovariectomy and RT on mitochondrial function and the expression of the MOTS-c biomarker, involved in crosstalk between liver and skeletal muscle. **Methods:** 20 young adult Wistar rats were divided into 4 groups (INT-SED, INT-RT, OVX-SED and OVX-RT). Ovariectomy was performed after 13 weeks of age. RT was performed weekly (3x/week) for 20 weeks. The tissues were euthanized and collected 48 hours after the last RT session. The following analyses were carried out on liver and gastrocnemius muscle tissue biopsies: 1) Gene expression (RT-qPCR) of the electron transport chain (CTE: CI, CII, CIII, CIV and CV) and MOTS-c; 2) Oxygen consumption by High Resolution Respirometry; 3) Citrate synthase activity. Statistical analysis was performed by One-Way ANOVA followed by Fisher's Post-hoc test ( $p < 0.05$ ). **Results:** Body mass: the OVX-SED group ( $357.4 \pm 18.1$  g) was significantly larger than the other groups; Maximum workload: both RT groups had significantly increased CMC, INT-RT ( $771.6 \pm 3.1$  g) and OVX-RT ( $772.2 \pm 0.8$  g) at the end of the experiment; Liver respirometry: decreased oxygen consumption in the OVX-SED group in S3 (CI + CII) ( $40.5 \pm 13.3$  pmol/sec\*mg) compared to the other groups, and increased oxygen consumption in the RT groups (OVX-RT =  $75.6 \pm 23.6$ ; INT-RT =  $81.8 \pm 37.6$  pmol/sec\*mg); Respirometry of the gastrocnemius: decreased oxygen consumption in the OVX-SED group in S3 (CI + CII) ( $36.3 \pm 4.5$  pmol/sec\*mg) compared to the other groups, and increased oxygen consumption in the RT groups (OVX-RT =  $49.1 \pm 6.7$ ; INT-RT =  $50.5 \pm 7.5$  pmol/sec\*mg); RT-qPCR in the liver: reduced gene expression of CIV and ATP5 in the OVX-SED group ( $0.71 \pm 0.0$  and  $0.71 \pm 0.0$  AU) compared to INT-SED, and increased CII gene expression in both RT groups (OVX-RT =  $1.20 \pm 0.0$ ; INT-RT =  $1.30 \pm 0.3$  AU), RT increased MOTS-c gene expression in both trained groups (OVX-RT =  $2.29 \pm 0.6$ ; INT-RT =  $2.19 \pm 1.0$  AU); RT-qPCR in the gastrocnemius: reduction in CIII and CIV gene expression in the OVX-SED group ( $0.87 \pm 0.4$  and  $0.59 \pm 0.2$  UA) compared to INT-SED, and increase in CIV gene expression in both RT groups (OVX-RT =  $1.49 \pm 0.6$ ; INT-RT =  $1.62 \pm 0.5$  UA), RT increased MOTS-c gene expression in the OVX-RT group ( $1.26 \pm 0.4$  UA) compared to OVX-SED. **Conclusion:** Ovariectomy produced mitochondrial dysfunction in the liver and gastrocnemius, reducing gene expression of ETC and MOTS-c proteins. However, RT as a non-pharmacological intervention was effective in preventing this damage. The increased expression of the MOTS-c gene in the RT groups indicates the presence of mitochondrial biomarkers that confirm the crosstalk between liver and muscle tissues promoted by exercise.

**Keywords:** ovariectomy; menopause; mitochondrial dysfunction; MOTS-c; NAFLD; sarcopenia; crosstalk; resistance training; gene expression.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Comparação do sistema reprodutor de humanos e roedores.....	24
Figura 2 - Efeitos do estrogênio em seus receptores na célula.....	26
Figura 3 - Estrutura mitocondrial.....	28
Figura 4 - Ciclo do ácido cítrico (CAC).....	29
Figura 5 - Cadeia transportadora de elétrons (CTE).....	38
Figura 6 - Miocinas e hepatocinas no <i>Crosstalk</i> entre fígado e músculo esquelético.....	44
Figura 7 - Interferência da MOTS-c na DHGNA e sarcopenia.....	49
Figura 8 - Caixas e balança utilizada durante o experimento.....	52
Figura 9 - Distribuição dos grupos experimentais.....	53
Figura 10 - Itens utilizados para a realização do TR.....	55
Figura 11 - Planejamento experimental.....	56
Figura 12 - Titulação de Respirometria de Alta Resolução realizada em biópsia tecidual.....	58
Figura 13 - Eletroforese.....	61
Figura 14 - Curva de <i>melting</i> .....	62
Figura 15 - Estabilidade média de expressão dos genes de referência no fígado e músculo gastrocnêmio.....	63
Figura 16 - Sequência dos genes alvo.....	65
Figura 17 - Matriz para padronização da concentração dos primers.....	66
Figura 18 - Diluição seriada e curva padrão.....	67
Figura 19 - Sumarização da metodologia utilizada no estudo.....	68
Figura 20 - Comparação do tecido uterino entre os grupos.....	71
Figura 21 - Evolução da Carga de Carregamento (CMC, CMCR e CMCA).....	72
Figura 22 - Respiração mitocondrial acoplada em biópsia tecidual no fígado.....	74
Figura 23 - Respiração mitocondrial desacoplada em biópsia tecidual no fígado.....	75
Figura 24 - Respiração de vazamento mitocondrial em biópsia tecidual no fígado.....	76
Figura 25 - Respiração mitocondrial acoplada em biópsia tecidual no músculo gastrocnêmio.....	77
Figura 26 - Respiração mitocondrial desacoplada em biópsia tecidual no músculo gastrocnêmio.....	78
Figura 27 - Respiração de vazamento mitocondrial em biópsia tecidual no músculo gastrocnêmio.....	79
Figura 28 - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes (MOTS-c e AMPKa2) no fígado.....	80
Figura 29 - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes (LDH, Mpc1 e Esr1- $\alpha$ ) no fígado.....	81

Figura 30 - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes relacionados à CTE dos complexos I a IV no fígado.....	82
Figura 31 - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes relacionados à OXPHOS no fígado.....	84
Figura 32 - Análise por RT-qPCR da expressão gênica no fígado.....	85
Figura 33 - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes (MOTS-c e AMPKa2) no músculo gastrocnêmio.....	86
Figura 34 - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes (LDH, Mpc1 e Esr1- $\alpha$ ) no músculo gastrocnêmio.....	87
Figura 35 - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes relacionados à CTE dos complexos I a IV no músculo gastrocnêmio.....	89
Figura 36 - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes relacionados à OXPHOS no músculo gastrocnêmio.....	90
Figura 37 - Análise da expressão gênica e atividade da citrato sintase no músculo gastrocnêmio.....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição semanal do TR.....	56
Tabela 2 - Sequência dos genes de referência do fígado e músculo gastrocnêmio.....	64
Tabela 3 - Evolução da massa corporal e massa uterina em gramas (g).....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADP	Adenosina difosfato
AGL	Ácidos graxos livres
AIN	American Institute of Nutrition
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo
AKT	Proteína Serina-treonina cinase
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANT	Adenina nucleotídeo translocase
ATP	Adenosina trifosfato
BCL-2	Linfoma de células B 2
BCL-XL	Linfoma de células B-extra grande
BIOPS	Solução de relaxamento e preservação da biópsia
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>B2M</i>	beta-2 microglobulina
°C	Graus celsius
CAC	Ciclo do Ácido Cítrico
CAT	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CID-10	Classificação Internacional de Doenças
CK	Ciclo de Krebs
cLDH	Lactato desidrogenase citoplasmática
CMC	Carga Máxima de Carregamento
cm	Centímetros
cm <sup>3</sup>	Centímetros cúbicos
CMCR	Carga máxima de carregamento relativa
CMCA	Carga máxima de carregamento absoluta
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CS	Citrato sintase
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
CYP19A1	Aromatase
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
e <sup>-</sup>	Elétrons
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
ERs	Receptores de estrogênio
ER $\alpha$	Receptores de estrogênio alfa
ER $\beta$	Receptores de estrogênio beta
ERK1/2	Cinase 1 e 2 regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FADH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FCCP	Carbonil cianeto de p-trifluorometoxifenil-hidrazona
Fe-Cu	Íons ferro-cobre

Fe-S	Íons ferro-enxofre
FGF-21	Fator de crescimento de fibroblastos-21
FMN	Mononucleotídeo de flavina
FSH	Hormônio folículo-estimulante
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT4	Transportador de glicose 4
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GPER	Receptor de estrogênio acoplado à proteína G
h	Hora
H <sup>+</sup>	Prótons
H <sub>2</sub> O	Água
HRR	Respirometria de alta resolução
HtrA2	Serina protease
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1 $\beta$	Interleucina - 1 $\beta$
IL-6	Interleucina - 6
INT – SED	Intacto Sedentário
INT – TR	Intacto Treinamento Resistido
JNK	Jun N-termina quinase
kg	Quilograma
LabFisioEx	Laboratório de Fisiologia do Exercício
LDH	Lactato desidrogenase
LECT2	Quimiotaxia 2 derivada de células leucocitárias
LH	Hormônio luteinizante
m	Metro
MAO	Monoamina oxidase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDPs	Peptídeos Derivados de Mitocôndrias
mg	Miligramas
MIQE	Mínimas para Publicação de Experimentos Quantitativos de PCR em Tempo Real
MiR05	Solução respiratória mitocondrial número 5
mL	Mililitro
mLDH	Lactato desidrogenase mitocondrial
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MOTS-c	Quadro de leitura aberta mitocondrial do 12S rRNA-c
mmol	Micromolar
MPC	Transportador mitocondrial de piruvato
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA Mitocondrial
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
mV	Voltagem positiva
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-kB	Fator nuclear kappa B

nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NRFs	Fatores respiratórios nucleares
NTC	Controle negativo
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVX	Ovariectomia
OVX – SED	Ovariectomizado Sedentário
OVX – TR	Ovariectomizado Treinamento Resistido
OXPHOS	Fosforilação Oxidativa
PGC-1 $\alpha$	Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
Pi	Fosfato inorgânico
PiC	Carreador de fosfato
PI3K	Fosfoinositídeo 3-cinase
PPIA	Peptidilprolil isomerase A
QH <sub>2</sub>	Ubiquinol
QH•	Radical semiquinona
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
RNAses	Ácidos ribonucleases
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de Transcrição Reversa
R <sup>2</sup>	R ao quadrado
SHLPs	Pequenos Peptídeos Semelhantes à Humanina
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis 1c
S2	Estado 2
S3	Estado 3
S4	Estado 4
TNB	Ácido tionitrobenzóico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral - $\alpha$
TR	Treinamento resistido
TRH	Terapia de reposição hormonal
tRNA	RNA transportador
UCP	Proteína de desacoplamento mitocondrial
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
VDAC	Canais aniônicos dependentes de voltagem
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
Vmax	Estado respiratório experimentalmente não acoplado máximo
YWHAZ	Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase zeta
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
$\mu$ mol	Micromol

## SUMÁRIO

<b>1 ENUNCIADO DO PROBLEMA</b> .....	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>23</b>
2.1 MENOPAUSA.....	23
2.2 ESTUDOS TRANSLACIONAIS: MODELOS DE MENOPAUSA .....	24
2.3 ESTROGÊNIOS (RECEPTORES, FUNÇÕES E MITOCÔNDRIA) .....	26
2.4 MITOCÔNDRIAS .....	28
<b>2.4.1 Estrutura mitocondrial</b> .....	<b>28</b>
<b>2.4.2 Função mitocondrial</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4.3 Cadeia Transportadora de Elétrons - Complexos enzimáticos</b> .....	<b>31</b>
2.4.3.1 Complexo I.....	32
2.4.3.2 Complexo II .....	32
2.4.3.3 Complexo III.....	32
2.4.3.4 Complexo IV.....	33
2.4.3.5 Complexo V .....	33
<b>2.4.4 Proteínas relacionadas à OXPHOS, estresse mitocondrial e metabolismo</b> .....	<b>34</b>
2.4.4.1 Adenina nucleotídeo translocase (ANT).....	34
2.4.4.2 Proteína desacopladora (UCP) .....	34
2.4.4.3 Trocador de fosfato inorgânico (PiC) .....	35
2.4.4.4 Citrato sintase (CS) .....	35
2.4.4.5 Transportador mitocondrial de piruvato (MPC) .....	36
2.4.4.6 Lactato desidrogenase (LDH) .....	36
2.4.4.7 Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) .....	37
2.4.4.8 Quadro de leitura aberta mitocondrial do 12S rRNA-c (MOTS-c) .....	37
<b>2.4.5 Fosforilação Oxidativa (OXPHOS)</b> .....	<b>38</b>
2.5 FÍGADO, MENOPAUSA E DHGNA.....	40

2.6 MÚSCULO ESQUELÉTICO, MENOPAUSA E SARCOPENIA.....	42
2.7 <i>CROSSTALK</i> ENTRE FÍGADO E MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	44
<b>2.7.1 <i>Crosstalk</i> a partir das hepatocinas e miocinas .....</b>	<b>44</b>
<b>2.7.2 <i>Crosstalk</i> a partir da mitocôndria.....</b>	<b>46</b>
2.8 EXERCÍCIO FÍSICO: TREINAMENTO RESISTIDO COMO INTERVENÇÃO .....	48
<b>3 HIPÓTESES .....</b>	<b>51</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	51
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
5.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	52
5.2 ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....	52
5.3 INGESTÃO ALIMENTAR E MASSA CORPORAL.....	53
5.4 ATRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	53
5.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO – OVARIECTOMIA .....	54
5.6 TREINAMENTO RESISTIDO (TR).....	55
<b>5.6.1 Familiarização ao Protocolo de TR .....</b>	<b>55</b>
<b>5.6.2 Determinação da carga máxima de carregamento (CMC) .....</b>	<b>56</b>
<b>5.6.3 Protocolo de TR.....</b>	<b>56</b>
5.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	57
5.8 EUTANÁSIA, COLETA E ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS .....	58
5.9 ANÁLISE DA FUNÇÃO RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.....	58
<b>5.9.1 Retirada e preparação das amostras.....</b>	<b>58</b>
<b>5.9.2 Permeabilização mecânica e química .....</b>	<b>58</b>
<b>5.9.3 Análise da função respiratória.....</b>	<b>59</b>
5.10 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA .....	60
<b>5.10.1 Cuidados gerais .....</b>	<b>60</b>

5.10.2 Extração e purificação do RNA total .....	60
5.10.3 Quantificação do RNA total .....	61
5.10.4 Integridade do RNA total .....	61
5.10.5 Transcrição reversa – DNA Complementar (cDNA).....	62
5.10.6 Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real (qPCR) .....	63
5.10.7 Sintetização, concentração e eficiência dos <i>Primers</i> .....	64
5.11 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE (CS).....	68
5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	68
5.13 RESUMO DA METODOLOGIA.....	69
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
6.1 EVOLUÇÃO PONDERAL DA MASSA CORPORAL E MASSA UTERINA.....	69
6.2 CARGA DE CARREGAMENTO DO TR .....	72
6.3 ANÁLISES DE RESPIROMETRIA .....	74
6.3.1 Respiração mitocondrial acoplada em biópsia tecidual no fígado .....	74
6.3.2 Respiração mitocondrial desacoplada em biópsia tecidual no fígado .....	75
6.3.3 Respiração de vazamento mitocondrial em biópsia tecidual no fígado .....	76
6.3.4 Respiração mitocondrial acoplada em biópsia tecidual no músculo gastrocnêmio	77
6.3.5 Respiração mitocondrial desacoplada em biópsia tecidual no gastrocnêmio.....	78
6.3.6 Respiração de vazamento mitocondrial em biópsia tecidual no gastrocnêmio .....	79
6.4 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA (RT-qPCR) .....	80
6.4.1 Expressão dos genes ( <i>Mots-c</i> e <i>Ampka2</i> ) no fígado .....	80
6.4.2 Expressão dos genes ( <i>LDH</i> , <i>Mpc1</i> e <i>Esr1-<math>\alpha</math></i> ) no fígado.....	81
6.4.3 Expressão dos genes relacionados à CTE ( <i>CI</i> a <i>CIV</i> ) no fígado .....	82
6.4.4 Expressão dos genes da OXPHOS ( <i>Atps</i> , <i>Pic</i> , <i>Ant1</i> ) e <i>Ucp2</i> no fígado .....	84
6.4.5 Expressão gênica da citrato sintase no fígado .....	85
6.4.6 Expressão dos genes ( <i>Mots-c</i> e <i>Ampka2</i> ) no músculo gastrocnêmio .....	86
6.4.7 Expressão dos genes ( <i>Ldh</i> , <i>Mpc1</i> e <i>Esr1-<math>\alpha</math></i> ) no músculo gastrocnêmio.....	87

<b>6.4.8</b>	<b>Expressão dos genes relacionados à CTE (<i>CI</i> a <i>CIV</i>) no músculo gastrocnêmio ....</b>	<b>88</b>
<b>6.4.9</b>	<b>Expressão dos genes da OXPHOS (<i>Atps</i>, <i>Pic</i>, <i>Ant1</i>) e <i>Ucp3</i> no gastrocnêmio .....</b>	<b>89</b>
<b>6.4.10</b>	<b>Expressão gênica e atividade da citrato sintase no músculo gastrocnêmio .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>
7.1	EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL E MASSA UTERINA .....	92
7.2	CARGA DE CARREGAMENTO DO TREINAMENTO .....	93
7.3	ANÁLISES RESPIROMÉTRICAS.....	94
7.3.1	Respiração mitocondrial acoplada em biópsia (S3 CI, S3 CI + CII e RCR) .....	94
7.3.2	Respiração mitocondrial desacoplada em biópsia tecidual (Vmax e UCR) .....	97
7.3.3	Respiração de vazamento mitocondrial em biópsia tecidual (S2 e S4) .....	97
7.4	EXPRESSÃO GÊNICA RT-qPCR.....	98
7.4.1	Expressão gênica ( <i>Mots-c</i> e <i>Ampka2</i> ).....	98
7.4.2	Expressão gênica (CTE e OXPHOS).....	100
7.4.3	Expressão gênica ( <i>Ldha</i> , <i>Mpc1</i> e <i>Esr1-<math>\alpha</math></i> ) .....	103
7.4.4	Expressão gênica e atividade da CS .....	104
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>105</b>
8.1	PERSPECTIVAS FUTURA .....	105
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>107</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>129</b>

## 1 ENUNCIADO DO PROBLEMA

É evidente que a população com mais de 60 anos está aumentando de forma gradativa no cenário mundial, podendo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), chegar a 2 bilhões o número de idosos no mundo até 2050. No Brasil, o número de pessoas com 60 anos ou mais aumentou para 15,6%, evidenciando um crescimento significativo da população idosa em relação às pessoas mais jovens no cenário demográfico do país (IBGE, 2022). Esse aumento na expectativa de vida traz consigo novos desafios relacionados à saúde, bem-estar e qualidade de vida.

O envelhecimento é um processo amplo que envolve diversas mudanças nos aspectos fisiológicos, comportamentais, ambientais, sociais e psicológicos do ser humano (SBGG, 2020). Para as mulheres, o envelhecimento está relacionado à menopausa, marcada por processos de senescência reprodutiva que impacta diversos sistemas do corpo e resulta em diferentes manifestações (WOODS; MITCHELL, 2016). Atualmente no Brasil, o número total de mulheres é de 104,5 milhões, correspondendo a 51,5% da população do país. Além disso, a expectativa de vida das mulheres brasileiras tem aumentado a cada década, alcançando atualmente uma média de 79 anos. Portanto, a busca pela saúde e qualidade de vida torna-se imprescindível, considerando que as mulheres estão vivendo mais e passarão um terço de suas vidas ou mais no período pós-menopáusicas (IBGE, 2022; CHO *et al.*, 2022).

A menopausa é um acontecimento fisiológico natural na vida da mulher, que ocorre entre sua quarta e quinta década de vida. Nesse período, há o término dos ciclos menstruais, esgotamento dos folículos ovarianos e redução na produção e secreção de alguns hormônios, como o estrogênio e a progesterona, levando conseqüentemente a mulher ao fim de sua fase reprodutiva (NELSON, 2008; BRADY, 2015). Esse declínio hormonal pode predispor o organismo da mulher a disfunções sistêmicas, contribuindo para o surgimento de algumas doenças como obesidade, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, osteoporose, sarcopenia e doença hepática gordurosa não alcoólica (SUZUKI; ABDELMALEK, 2009; LOBO *et al.*, 2014).

O estrogênio representa um grupo composto por três isoformas, entre elas a Estrona (E1), o Estradiol (E2) e o Estriol (E3), sendo o E2 também conhecido como 17 $\beta$ -estradiol a isoforma mais abundante no organismo feminino em idade reprodutiva. Esse hormônio atua em processos importantes, como regulação do sistema reprodutor, características sexuais secundárias e maturação da mulher (RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014). Além disso, o estrogênio desempenha um papel importante no controle do sistema ósseo, cardiovascular, muscular, atuando também no cérebro, tecido adiposo e controle metabólico (JACKSON *et al.*, 2013).

O estrogênio desempenha um papel significativo na função hepática, atuando por meio de seus receptores específicos (ERs) presentes no fígado. Embora o fígado seja conhecido por realizar diversas funções metabólicas envolvendo diferentes substratos como carboidratos, proteínas e lipídios, é destacado seu papel essencial na regulação do metabolismo dos ácidos graxos livres (AGL) e colesterol. Portanto, uma diminuição nos níveis de estrogênio circulante como observado em períodos pós-menopáusicos, pode resultar em modificações na função hepática, desencadeando processos patológicos caracterizados pelo acúmulo excessivo de gordura no interior dos hepatócitos, conhecido como doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (DELLA TORRE *et al.*, 2016).

A redução nos níveis de estrogênio também está fortemente associada às doenças musculoesqueléticas (por exemplo a sarcopenia) em mulheres no período pós-menopáusico. Indicando uma disfunção muscular progressiva caracterizada pela redução tanto na qualidade quanto na quantidade de massa muscular (MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009; GERACI *et al.*, 2021). Além disso, essa redução pode ocasionar impactos metabólicos significativos, considerando que o músculo esquelético é constituído por células altamente ativas e dinâmicas, que demandam de muita energia. Grande parte dessa energia, é produzida pelas mitocôndrias localizadas no sarcoplasma celular. Elas desempenham um papel essencial no fornecimento de energia, enquanto também exercem funções relacionadas à saúde e controle da morte celular (HEPPLE, 2014).

Além disso, os estudos têm destacado uma comunicação metabólica e funcional entre os tecidos hepático e muscular, indicando a existência de um eixo de interação (*crosstalk*) entre fígado e músculo esquelético (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2020; SEVERINSEN; PEDERSEN, 2020). A manutenção dos níveis adequados de massa muscular é um fator determinante para a regulação do metabolismo energético, força e desempenho físico, sendo que sua redução abaixo do ideal, como observado em casos de sarcopenia, está associada ao maior risco no desenvolvimento da DHGNA (KOO *et al.*, 2017; KIM; KIM, 2020; PASCO *et al.*, 2022). Esses achados, apoiam a ideia de que o aumento da massa muscular é indispensável para manter a saúde e a qualidade de vida, principalmente nas mulheres onde há alterações hormonais decorrentes da menopausa, que levam a prejuízos como a redução da  $\beta$ -oxidação hepática, piora do controle lipídico e diminuição da massa muscular, levando a quadros de sarcopenia e DHGNA (MESSIER *et al.*, 2011).

Em relação às mitocôndrias, essas organelas são essenciais para as funções metabólicas e viabilidade celular (TAN *et al.*, 2015; MORIO *et al.*, 2021). Distúrbios na atividade mitocondrial estão relacionados à patogênese da sarcopenia e da DHGNA, envolvendo alterações na permeabilidade das membranas mitocondriais, extravasamento de proteínas para o citosol, comprometimento da cadeia transportadora de elétrons (CTE), redução na produção de ATP,

diminuição da dinâmica, biogênese e mitofagia, aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), danos ao DNA mitocondrial (mtDNA), prejuízo da  $\beta$ -oxidação e das vias de síntese proteica (WEI *et al.*, 2008; GUSDON *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2015). Além disso, as mitocôndrias apresentam capacidade de comunicação entre si, com outras organelas, com o núcleo celular e outros tecidos, por meio de moléculas sinalizadoras. O MOTS-c, um peptídeo mitocondrial, tem papel central na sinalização intracelular e endócrina, promovendo adaptações metabólicas positiva ao estresse e melhorando a função mitocondrial e o metabolismo celular. Isso sugere que as mitocôndrias apresentam papel importante no *crossstalk* entre o fígado e o músculo esquelético (LEE *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o exercício físico tem recebido destaque na literatura por promover respostas positivas, atenuando as disfunções decorrentes da redução hormonal em mulheres na fase pós-menopáusicas. O exercício físico tem impactos na massa muscular, controle metabólico, função hepática e atividade mitocondrial, sendo recomendado como abordagem terapêutica para indivíduos diagnosticados com DHGNA e sarcopenia (BACCHI *et al.*, 2013; AASLD, 2022). Estudos anteriores, evidenciaram os impactos positivos do treinamento resistido no sistema muscular (ROSSINI, 2016), ósseo (SHIGUEMOTO *et al.*, 2012), controle lipídico (LEITE *et al.*, 2009) e endotelial (LINO *et al.*, 2018), no período pós-menopáusicas.

Embora diversos estudos tenham identificado uma relação entre a sarcopenia e a DHGNA, indicando a existência de um eixo entre o fígado e o músculo esquelético, ainda há uma carência significativa de pesquisas que investiguem essa problemática a nível biomolecular e mitocondrial (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2020). Existindo assim, a necessidade de mais trabalhos científicos que possam contribuir para elucidar os mecanismos envolvidos no *crossstalk* a partir da mitocôndria (KOO *et al.*, 2017; IWAKI *et al.*, 2023).

Diante desse cenário, este trabalho pretende aprofundar a compreensão dos mecanismos envolvidos no *crossstalk* entre fígado (DHGNA) e músculo esquelético (sarcopenia) durante o período pós-menopáusicas, a partir da bioenergética, função mitocondrial e expressão de biomarcadores mitocondriais. Pretende-se também identificar uma forma de prevenção / tratamento para essas doenças, utilizando o treinamento resistido (TR) como intervenção em um modelo experimental de menopausa.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MENOPAUSA

A menopausa marca um evento de característica fisiológica natural à medida que a mulher se aproxima da senescência reprodutiva (envelhecimento dos aspectos relacionados a fertilidade), levando a alterações fisiológicas, endócrinas e estruturais do aparelho reprodutor feminino (NAMS, 2013; DAVIS *et al.*, 2015). Geralmente a menopausa de forma natural, ou seja, sem associação a causas patológicas, ocorre entre os 45 e 55 anos, tendo seu diagnóstico clínico confirmado 12 meses após o último ciclo menstrual (SBEM, 2018). A característica principal da menopausa é marcada pelo término dos ciclos menstruais, diminuição no tamanho dos ovários, esgotamento dos folículos e redução na síntese e secreção dos hormônios ovarianos estrogênio e a progesterona, levando consequentemente ao fim da fase reprodutiva da mulher (NELSON, 2008; MONTELEONE *et al.*, 2018).

O período reprodutivo da mulher tem início logo após sua primeira menstruação, conhecida como menarca (ocorre no período da puberdade). A partir daí, os ciclos menstruais e a síntese dos hormônios ovarianos são controlados pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (SILVERTHORN, 2010). Vale ressaltar que a quantidade total de oócitos (óvulos imaturos), já é estabelecida na mulher desde o seu nascimento, com número total em torno de 2 milhões. A partir da menarca, ocorre mensalmente uma diminuição dessa reserva ovariana ao longo da vida por meio da ovulação e atresia folicular, culminando na menopausa quando o número de oócitos for completamente esgotado (TAKAHASHI; JOHNSON, 2015).

Entre a quarta e quinta década de vida, a mulher se aproxima do climatério, que corresponde ao período transitório entre as fases reprodutiva e não reprodutiva com início por volta dos 40 anos, podendo se estender até os 65 anos. A menopausa ocorre em algum momento durante o climatério (FEBRASGO, 2010). No climatério ocorrem alterações biológicas, incluindo a irregularidade dos ciclos menstruais e a diminuição do número de folículos ovarianos. Essa diminuição folicular está associada com a redução de hormônios como estrogênio, progesterona, inibina B e o hormônio anti-mülleriano (produzido pelas células da granulosa, atua no desenvolvimento e crescimento folicular). Durante esse período, também há um aumento plasmático do hormônio folículo-estimulante (FSH), devido a alterações no mecanismo de *feedback* negativo, causadas pela diminuição da inibina B (produzida nos folículos, age inibindo a liberação de FSH na hipófise anterior). A redução da inibina

B e aumento do FSH, resulta em um maior recrutamento dos folículos, acelerando ainda mais o processo de perda folicular (NAMS, 2020; SANTORO *et al.*, 2021).

Além das alterações biológicas, no climatério podem ocorrer algumas manifestações clínicas, tais como sintomas vasomotores, caracterizado por ondas de calor conhecidas como “fogachos”, sudorese noturna, síndrome geniturinária (atrofia e ressecamento vulvovaginal) e sintomas do trato urinário. Também, podem manifestar sintomas psicocognitivos, como perda de memória, dificuldade de concentração, distúrbios do sono, alterações de humor, ansiedade e quadros de depressão (NELSON, 2008; TAKAHASHI; JOHNSON, 2015).

No período pós-menopausa, tanto os níveis de FSH quanto os hormônios ovarianos se encontram em níveis baixos e estáveis no sangue devido à perda da função folicular, indicando o fim da fase reprodutiva. Além disso, alguns dos sintomas clínicos já mencionados podem estar mais prevalentes nessa fase (HARLOW *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que o climatério e a menopausa não são processos patológicos, mas sim um período natural em consequência do envelhecimento, o qual é acompanhado por mudanças estruturais, hormonais, metabólicas, psicológicas e sociais que ocorrem na vida da mulher. No entanto, essas mudanças estão associadas a maiores riscos para a saúde, devido às alterações hormonais e aos processos que acompanham o envelhecimento (NIEVAS *et al.*, 2006; CARDOSO; CAMARGO, 2017).

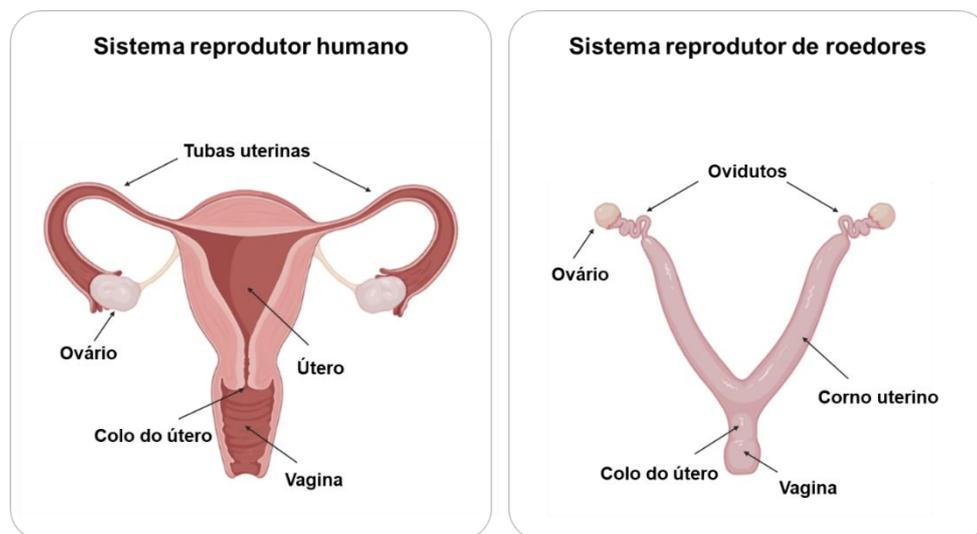
## 2.2 ESTUDOS TRANSLACIONAIS: MODELOS DE MENOPAUSA

O modelo animal é muito utilizado na pesquisa científica e possibilita uma investigação mais detalhada dos aspectos relacionados à saúde humana, sendo esses estudos caracterizados como translacionais. Os estudos com modelos animais permitem a compreensão de eventos sistêmicos, celulares e moleculares que não são identificados facilmente em pesquisas com seres humanos (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016). No âmbito dos laboratórios de pesquisa, o modelo experimental com roedores tem sido destacado para estudos sobre menopausa, hipoestrogenismo e processos relacionados a senescência reprodutiva feminina, por possuir uma população mais homogênea e apresentar semelhanças em algumas características da mulher, como alterações endócrinas, atresia folicular, ciclagem irregular e flutuações hormonais (BRINTON, 2012).

Porém, apesar dos roedores serem um modelo apropriado para a pesquisa da menopausa e envelhecimento, algumas diferenças entre a idade reprodutiva humana e animal devem ser destacadas. Ao contrário das mulheres, os roedores possuem um ciclo estral com duração média de 4

a 5 dias, composto por 4 fases: proestro, estro, metaestro e diestro. Também, o revestimento uterino dos roedores não é eliminado para o meio externo, como ocorre na menstruação, ao invés disso, ele é reabsorvido pelo próprio organismo. Além disso, o útero dos roedores apresenta-se em formato bifurcado diferentemente do útero humano, para acomodar grandes ninhadas (Figura 1). Em roedores idosos também é observada a presença de folículos ovarianos potencialmente maduros, sendo essa uma das principais diferenças quando comparado com a menopausa humana que apresenta depleção folicular completa (JOHNSON *et al.*, 2004; KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016).

**Figura 1** - Comparação do sistema reprodutor de humanos e roedores.



Fonte: Adaptado de Koebele e Bimonte-Nelson (2016). Criado com BioRender.com.

Embora as variações hormonais sejam semelhantes entre humanos e roedores, o pesquisador deve considerar as diferenças anatômicas, fisiológicas e biológicas na escolha do modelo animal, bem como o tipo de intervenção a ser realizada (ANDREOLLO *et al.*, 2012). Uma estratégia muito utilizada para reduzir os níveis dos hormônios ovarianos é por meio da ovariectomia (SENGUPTA, 2013). Esse procedimento cirúrgico é considerado “padrão-ouro” em estudos que avaliam os impactos da deficiência dos hormônios ovarianos em modelos animais. Representada pela sigla (OVX), a ovariectomia consiste na remoção bilateral dos ovários, possibilitando o declínio dos hormônios sexuais femininos, assim mimetizando um modelo de menopausa humana (JEE; YAO, 2001; BRINTON, 2012; LEMINI *et al.*, 2015).

O modelo cirúrgico de menopausa é realizado em animais saudáveis em idade reprodutiva (adultos jovens), e é amplamente utilizado na pesquisa científica para entender os aspectos relacionados ao processo de reprodução e envelhecimento no organismo feminino (SENGUPTA, 2013; KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016; YOO; LIU; KIM, 2016).

### 2.3 ESTROGÊNIO (RECEPTORES, FUNÇÕES E MITOCÔNDRIA)

O estrogênio, também chamado de estrógeno, corresponde a um grupo de hormônios esteroides derivados do colesterol com múltiplas funções no organismo, e apesar de estar relacionado principalmente com as características sexuais femininas, também está presente nos homens, porém em menores concentrações. Nas mulheres, além do estrogênio atuar em processos importantes como, regulação do sistema reprodutor e desenvolvimento das características sexuais secundárias (crescimento das mamas, maturação da genitália e pelos pubianos), ele também exerce funções no sistema ósseo, cardiovascular, muscular e imunológico, bem como no cérebro, tecido adiposo, pele e metabolismo (JACKSON *et al.*, 2013).

Há três isoformas distintas do estrogênio, sendo elas: Estrona (E1); Estradiol (E2) e Estriol (E3). Dentre essas, o E2 conhecido como  $17\beta$ -estradiol se destaca por ser o principal hormônio esteroide circulante, e com maior ação no organismo da mulher saudável em idade reprodutiva. As três isoformas são produzidas principalmente nos ovários e glândulas adrenais a partir do colesterol, mas também podem ser sintetizadas em outros locais como na placenta durante o período gestacional, fígado, encéfalo e tecido adiposo por meio da enzima conversora CYP19A1 conhecida popularmente como aromatase (BRINTON, 2008; RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014).

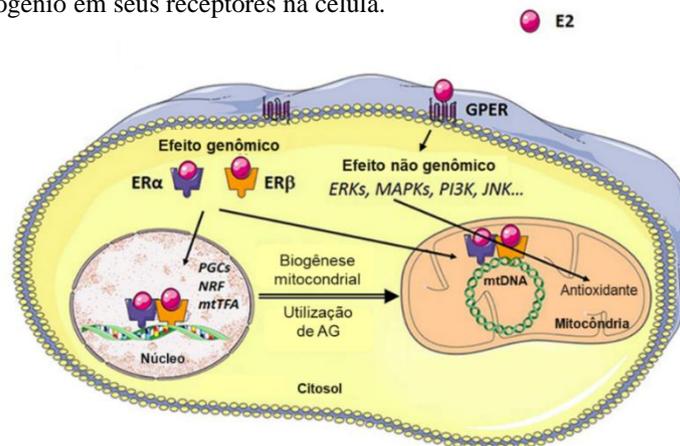
A secreção de estrogênio e progesterona, é regulada a partir do mecanismo de *feedback* positivo e negativo entre o sistema nervoso central (hipotálamo e hipófise) e as glândulas periféricas (ovários), denominado de eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Neurônios especializados localizados no hipotálamo, sintetizam e secretam de maneira pulsátil o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Em seguida, esse hormônio é transportado pelo sistema porta hipotalâmico-hipofisário até a hipófise anterior. Nesta glândula, o GnRH atua estimulando a secreção de FSH e hormônio luteinizante (LH), o qual serão direcionados até os ovários pela corrente sanguínea (HERBISON, 2016). A síntese e secreção dos hormônios GnRH, FSH e LH são reguladas pela concentração plasmática dos hormônios ovarianos: estrogênio, progesterona e inibina. Quando as concentrações plasmáticas desses hormônios estão baixas, ocorre um mecanismo de *feedback* positivo, que estimula a secreção e liberação dos hormônios pela hipófise anterior. Em contrapartida, quando as concentrações plasmáticas desses hormônios estão elevadas, um mecanismo de *feedback* negativo é ativado, inibindo a secreção e liberação hormonal pela hipófise anterior (RICHARDS, 2018; LIMONTA *et al.*, 2018).

Nos ovários, o FSH possui a função de regular o crescimento e o desenvolvimento dos folículos primordiais, estimular a síntese de estrogênio e induzir o aumento do número de células da

granulosa. O LH por sua vez, é responsável por estimular a síntese de androgênios (androstenediona e testosterona) e progesterona pelas células da teca, atuando também como ponto-chave na ovulação e formação do corpo lúteo. Ambos os hormônios, FSH e LH desempenham papéis fundamentais na regulação do ciclo menstrual, ovulação e síntese dos hormônios gonadais (ROBKER; HENNEBOLD; RUSSELL, 2018).

A atividade estrogênica nas células é mediada pela interação entre o hormônio e seus receptores específicos (ERs). São descritos dois tipos de receptores clássicos de estrogênios: receptor de estrogênio alfa ( $ER\alpha$ ), distribuído principalmente nas mamas, ovários e endométrio; e receptor de estrogênio beta ( $ER\beta$ ), distribuído de forma mais ampla principalmente no cérebro, ossos, endotélio, rins, pulmões, ovários, cólon, próstata, testículos, entre outros (HSU; CHU; KAO, 2017). Além dos receptores  $\alpha$  e  $\beta$  outro tipo de receptor foi descrito, conhecido como receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER), reconhecido como receptor não genômico de rápida sinalização presente na membrana celular e ativado por estradiol (PROSSNITZ; ARTERBURN, 2015; SILVA; PINEDA; SUÁREZ, 2020).

**Figura 2** – Efeitos do estrogênio em seus receptores na célula.



Descrição - Exemplo da interação do estrogênio em diversos receptores em uma célula muscular. O estradiol (E2) se liga em seus receptores citosólicos, receptor de estrogênio  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) e  $\beta$  ( $ER\beta$ ), promovendo a translocação do complexo E2/ER para o núcleo. Esse complexo interage com o DNA nuclear, desencadeando a transcrição de genes que incluem o coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma ( $Pgc-1\alpha$ ), os fatores respiratórios nucleares (NRFs) e outros genes envolvidos na biogênese mitocondrial e na utilização de ácidos graxos livres (AGL). O E2 também interage com os receptores de estrogênio ligados ao DNA mitocondrial (mtDNA), facilitando a transcrição e a replicação do mtDNA. Outra forma de ligação é por meio dos receptores de estrogênio acoplados à proteína G (GPER) na membrana plasmática, ativando diversas vias de sinalização intracelular, como cinase 1 e 2 regulada por sinal extracelular (ERK1/2), cinases de proteína ativadas por mitógeno p38 (MAPKs), fosfoinosítideo 3-cinase (PI3K), cinase de proteína c-Jun-NH2-terminal (JNK) entre outras, resultando na transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes. Fonte: Adaptado de Ventura-Clapier *et al.* (2019).

Embora o estrogênio esteja associado às características sexuais secundárias femininas, é observado que sua redução ou ausência está associada a diversas disfunções no organismo, como

sarcopenia e dinapenia (ROSSINI, 2016), redução do tecido ósseo (SHIGUEMOTO *et al.*, 2012), disfunção endotelial (LINO *et al.*, 2018), aumento da composição corporal e perfil lipídico (LEITE *et al.*, 2009), doenças cardiovasculares (NEWSON, 2018), aumento do estresse oxidativo (SUMIEN *et al.*, 2021; TSIALTAS *et al.*, 2021) e resistência à insulina (CHO *et al.*, 2022). O estrogênio também atua na função hepática auxiliando na regulação do metabolismo lipídico, sendo o fígado um dos principais alvos desse hormônio (DELLA TORRE *et al.*, 2016).

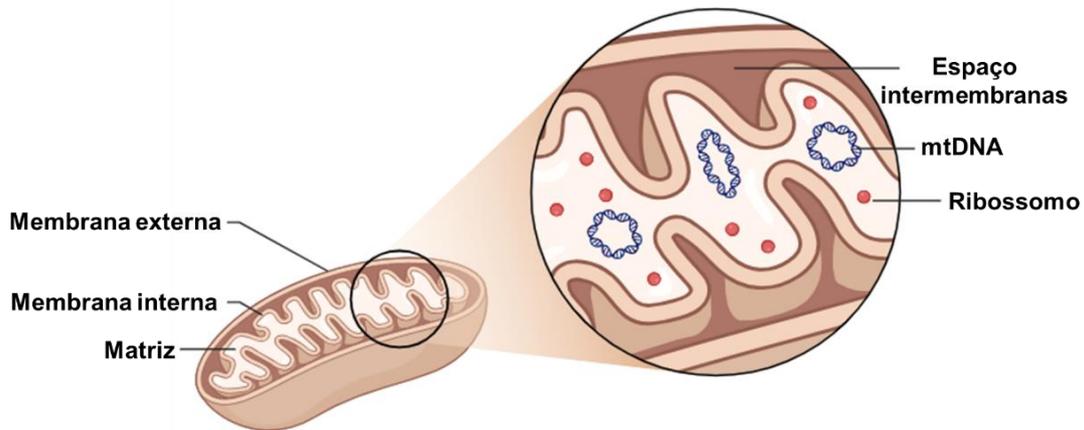
Como descrito anteriormente, o estrogênio desempenha um papel crucial no organismo devido a sua capacidade de interagir e ativar diversas vias de sinalização e influenciar diferentes respostas celulares e metabólicas, em tecidos e órgãos reprodutivos e não reprodutivos (KIYAMA; KIYAMA, 2015). Nas mitocôndrias, há evidências de que o estrogênio exerce influência por meio de receptores presentes na organela sobre a função, dinâmica e biogênese mitocondrial, regulando as vias de expressão das proteínas relacionadas à bioenergética (Figura 2), além de atuar na inibição da apoptose principalmente no tecido cardíaco e muscular esquelético (VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2019; YOH *et al.*, 2023).

## 2.4 MITOCÔNDRIAS

### 2.4.1 Estrutura mitocondrial

As mitocôndrias são organelas com formato esférico ou alongado presentes no citoplasma das células eucarióticas, e são essenciais para o metabolismo aeróbio. Conhecidas como “usinas de força” da célula, as mitocôndrias fornecem muita energia por meio da síntese de ATP durante o processo chamado respiração celular, e sem elas as células seriam incapazes de produzir a energia necessária para os processos metabólicos. No organismo humano, a quantidade, o tamanho e o formato das mitocôndrias podem variar conforme as necessidades energéticas do tecido em que se encontram (RODWELL *et al.*, 2018). Sua estrutura básica é composta por uma matriz, uma membrana interna (MMI), uma membrana externa (MME) e o espaço intermembranas (NELSON; COX, 2018).

**Figura 3** - Estrutura mitocondrial.

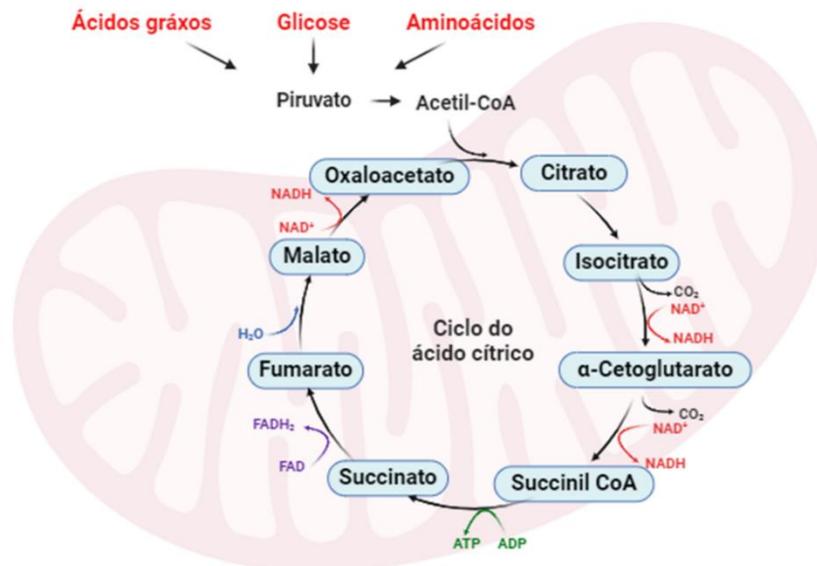


Descrição - O tamanho, o formato e a localização das mitocôndrias variam conforme o tipo de célula e sua necessidade energética. Sua estrutura básica consiste em uma matriz contendo o mtDNA (DNA mitocondrial) e os ribossomos, uma membrana interna, uma membrana externa e o espaço intermembranas. Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2018). Criado com BioRender.com.

Na matriz mitocondrial, encontram-se enzimas que participam do metabolismo oxidativo do piruvato (complexo piruvato desidrogenase), da  $\beta$ -oxidação de lipídeos, enzimas envolvidas na oxidação dos aminoácidos e os ribossomos. O Ciclo do Ácido Cítrico (CAC), também conhecido como Ciclo do Ácido Tricarboxílico (CAT) ou Ciclo de Krebs (CK) (Figura 4), também é um dos constituintes da matriz mitocondrial, sendo esse o grande responsável pela produção de elétrons ( $e^-$ ) de alta energia que são transportados pelos carreadores nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) para a CTE, contribuindo assim para o processo de produção de ATP pela fosforilação oxidativa (do inglês, OXPHOS) (NELSON; COX, 2018).

As mitocôndrias também possuem genoma próprio (mtDNA), localizado na matriz em formato circular. O mtDNA em humanos é constituído por uma fita dupla contendo 16.569 pares de bases que abrigam 37 genes codificadores de 13 RNAs mensageiros (mRNAs), 2 RNAs ribossomais (rRNAs) (12S e 16S rRNA) e 22 RNAs transportadores (tRNAs), sendo traduzidas 13 proteínas a partir do mtDNA. Entretanto, a maior parte da codificação das proteínas mitocondriais é realizada pelo DNA nuclear, assim o trabalho em sincronia dos genomas mitocondrial e nuclear é fundamental para processos como, transcrição e tradução das proteínas mitocôndrias e vias de replicação da organela. Essa colaboração entre os genomas é essencial para o bom funcionamento mitocondrial (ANNESLEY; FISHER, 2019).

**Figura 4** - Ciclo do Ácido Cítrico (CAC).



Descrição - Reações do CAC na matriz mitocondrial a partir dos substratos: ácidos graxos, glicose e aminoácidos para formação de acetil-CoA. Durante as reações são gerados os equivalentes redutores NADH e FADH<sub>2</sub>. A enzima succinato desidrogenase participa tanto do CAC quanto da cadeia transportadora de elétrons. Fonte: Adaptado de Martínez-Reyes e Chandel (2020). Criado com BioRender.com.

A MMI apresenta em seu formato uma série de dobras ou invaginações sobre a matriz mitocondrial na qual recebem o nome de cristas mitocondriais. Essas invaginações ampliam a área de contato entre a membrana e a matriz, e fazem com que mais proteínas possam estar contidas e organizadas estrategicamente na membrana (AZZU; BRAND, 2010). Essa membrana é constituída por uma dupla camada fosfolipídica contendo cardiolipina, um difosfatidil-glicerol formado por 4 cadeias de ácidos graxos de 18 carbonos, que reduz a permeabilidade da membrana e impede a livre passagem de íons, prótons (H<sup>+</sup>) e pequenas moléculas carregadas. Para atravessar a membrana, essas moléculas necessitam de proteínas transportadoras específicas (ALBERTS *et al.*, 2017). Também estão localizados na MMI, os complexos enzimáticos que constituem a CTE e outras proteínas integrais de membrana, associadas ao transporte de moléculas, OXPHOS e síntese de ATP, como a adenina nucleotídeo translocase (ANT), o transportador de glutamato, o carreador de fosfato (PiC), canais de cálcio e potássio, entre outros transportadores (BRAND *et al.*, 2005).

A MME, por sua vez, apresenta uma aparência lisa formada por uma bicamada lipídica e proteínas integrais denominadas canais aniônicos dependentes de voltagem (VDAC) também conhecidas como porinas. Esses canais formam passagens transmembrana, fazendo com que essa membrana apresente maior permeabilidade a íons e moléculas pequenas, advindas do citosol ou espaço intermembranas. Entretanto, por mais que as moléculas consigam atravessar a MME com

facilidade através dos canais, elas não podem passar pela MMI (LIMA; DUARTE; SÁ, 2011). Além das porinas, na MME podem ser encontradas enzimas como a glicerofosfato aciltransferase, a acilCoA graxo sintase, a monoamina oxidase (MAO), a fosfolipase A2, e proteínas envolvidas na morte celular programada (apoptose) como a BCL-2 e BCL-XL (NELSON; COX, 2018).

O espaço intermembranas compreende a região aquosa localizada entre a MMI e a MME. Nesse espaço, são encontradas algumas proteínas como as caspases (2, 3, 8 e 9), a HtrA2/Omi e a Endonuclease G envolvidas na apoptose celular, a Smac/DIABLO responsável por promover a ativação das caspases 9, o citocromo c que embora tenha papel principal no transporte de  $e^-$  na CTE, quando liberado no citosol está relacionado com processos de apoptose. Além disso, no espaço intermembranas encontram-se a adenilato cinase e a creatina-cinase, ambas envolvidas no metabolismo energético (SOUZA, 2005; RODWELL *et al.*, 2018).

#### **2.4.2 Função mitocondrial**

A principal função das mitocôndrias, é a produção de moléculas de ATP pela OXPHOS a partir de diferentes substratos. Além de grandes produtoras de energia, as mitocôndrias possuem outras funções essenciais, visando manter a homeostase e viabilidade celular. Estas funções incluem a produção de calor conhecida como termogênese, capacidade de sinalização para o citosol e núcleo, controle dos níveis de cálcio intracelular por processo de sequestro e liberação (GIORGI; MARCHI; PINTON, 2018), ciclo da ureia, modulação do estado redox, síntese de hormônios esteroides e sinalização do sistema imunológico. Além disso, as mitocôndrias estão envolvidas em processos como proliferação, diferenciação e apoptose celular por meio da liberação do citocromo c (KAMER; MOOTHA, 2015; MARTÍNEZ-REYES; CHANDEL, 2020).

#### **2.4.3 Cadeia Transportadora de Elétrons - complexos enzimáticos**

A CTE é constituída por cinco complexos enzimáticos formados a partir de subunidades proteicas codificadas pelos DNAs nuclear e mitocondrial. Separados fisicamente e localizados na MMI, esses complexos (I, II, III, IV e V ou ATP-sintase) participam de forma ativa no transporte dos  $e^-$  pela cadeia respiratória. Também fazem parte da CTE, a coenzima-Q também conhecida como ubiquinona e o citocromo c, o qual transportam os  $e^-$  entre os complexos. Esse transporte tem início a partir da oxidação dos equivalentes redutores NAD e FAD, provenientes do CAC, da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e da glicerol-3-fosfato-desidrogenase presente na MMI (NELSON; COX, 2018).

#### 2.4.3.1 Complexo I

O complexo I, também conhecido por NADH-desidrogenase ou NADH: ubiquinona-oxirredutase, é uma grande enzima em formato de L com uma parte inserida na MMI e outra na matriz mitocondrial composta por 45 cadeias polipeptídicas (7 do genoma nuclear e 38 mitocondrial), incluindo um mononucleotídeo de flavina (FMN) contendo flavoproteína e centros ferro-enxofre fazendo desse o maior entre os complexos da CTE (FIEDORCZUK *et al.*, 2016). Esse complexo é responsável pela transferência dos  $e^-$  advindos do NADH para a coenzima-Q (ubiquinona). Ele catalisa dois processos simultâneos: (1) a transferência exergônica (libera energia) de um íon hidreto do NADH e um  $H^+$  da matriz para a ubiquinona; (2) a transferência endergônica (consome energia) de quatro  $H^+$  da matriz para o espaço intermembranas. Os  $H^+$  são direcionados contra um gradiente de concentração, portanto o complexo I é considerado uma bomba de  $H^+$  acionada pela energia dos  $e^-$  (NELSON; COX, 2018; RODWELL *et al.*, 2018).

#### 2.4.3.2 Complexo II

O complexo II, também conhecido por succinato desidrogenase é composto por 5 grupos prostéticos de dois tipos e 4 subunidades proteicas codificadas pelo genoma nuclear, sendo a única enzima do CAC ligada a MMI, é formada por FAD, centro ferro-enxofre (Fe-S) e heme b (RASHEED; TARJAN, 2018). É responsável pela transferência dos  $e^-$  a partir do  $FADH_2$  advindo da succinato desidrogenase e da  $\beta$ -oxidação da acil-CoA dos ácidos graxos para a ubiquinona, reduzindo essa a ubiquinol ( $QH_2$ ). A transferência de  $e^-$  no complexo II não é acompanhada do bombeamento de  $H^+$  da matriz para o espaço intermembranas através da MMI, logo a produção de energia por meio desse complexo é inferior à do complexo I (NELSON; COX, 2018; RODWELL *et al.*, 2018).

#### 2.4.3.3 Complexo III

Os  $e^-$  presentes no  $QH_2$  são transferidos para o citocromo c a partir do complexo III, também chamado de ubiquinona: citocromo c oxidorreductase ou citocromo  $bc_1$ , sendo esse formado por 11 subunidades proteicas (10 do genoma nuclear e 1 mitocondrial) contendo citocromo b, citocromo  $c_1$  e uma proteína ferro-enxofre de Rieske (XIA *et al.*, 2013). Nesse complexo ocorre um modelo proposto por Mitchell chamado “Ciclo Q”, onde duas moléculas de  $QH_2$  são oxidadas para Q liberando dois  $H^+$  por molécula (totalizando quatro  $H^+$ ) no espaço intermembranas e dois  $e^-$  para o

citocromo c. Ao mesmo tempo, uma molécula Q é reduzida para o radical semiquinona (QH•), em seguida dois H<sup>+</sup> são captados da matriz mitocondrial e QH• é reduzida a QH<sub>2</sub>. Neste sentido, os complexos I e III funcionam como bombas de H<sup>+</sup> acionadas pela energia advinda dos e<sup>-</sup>. O QH<sub>2</sub> doa dois e<sup>-</sup>, porém um elétron é direcionado ao centro Fe-S para o reduzir Q e o outro é direcionado para o citocromo c. O citocromo c é uma proteína solúvel de pequena massa molecular presente no espaço intermembranas, e atua comoceptor, transportador e doador de e<sup>-</sup> para o complexo IV. (NELSON; COX, 2018; RODWELL *et al.*, 2018).

#### 2.4.3.4 Complexo IV

O complexo IV, também chamado de citocromo c oxidase é uma enzima composta por 13 subunidades proteicas (10 do genoma nuclear e 3 mitocondrial) contendo grupos heme e um centro com íons ferro-cobre (YOSHIKAWA; SHIMADA, 2015). A transferência dos e<sup>-</sup> para o oxigênio (O<sub>2</sub>) por meio desse complexo ocorre da seguinte maneira: o citocromo c doa seus e<sup>-</sup> para o centro Cu<sub>A</sub>, que prossegue para o heme a, em seguida para o centro heme a<sub>3</sub>-CuB Fe-Cu e por fim os e<sup>-</sup> se unem a uma molécula de O<sub>2</sub> e duas moléculas de H<sup>+</sup> formando H<sub>2</sub>O. Essa energia redox formada pela reação, faz com que o complexo IV bombeie dois H<sup>+</sup> da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas (NELSON; COX, 2018; RODWELL *et al.*, 2018).

#### 2.4.3.5 Complexo V

Mais conhecido como ATP-sintase ou FoF<sub>1</sub> ATPase, o complexo V é uma grande enzima composta por 28 subunidades proteicas (26 do genoma nuclear e 2 mitocondrial) que formam dois componentes ligados entre si (Fo e F<sub>1</sub>). O domínio Fo possui relação com a oligomicina e está inserido na MMI formando um canal de H<sup>+</sup>. O domínio F<sub>1</sub> se projeta para fora da membrana em direção a matriz e é composto por três subunidades α e três subunidades β que formam a cabeça catalítica responsável pela fosforilação do ADP. A ATP-sintase catalisa de forma rotacional a formação de ATP a partir da adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi), impulsionada pelo fluxo de H<sup>+</sup> do espaço intermembranas em direção a matriz que foram anteriormente bombeados pelos complexos I, III e IV (MITCHELL, 1961). Os H<sup>+</sup> presentes no espaço intermembranas se ligam a subunidade Fo da ATP-sintase, fazendo com que ocorra uma mudança na conformação da subunidade F<sub>1</sub> da enzima, favorecendo a síntese de ATP em sua superfície. O ATP recém-sintetizado

somente é liberado da enzima sob impulsão gerada pelo gradiente de  $H^+$  no espaço intermembranas (NELSON; COX, 2018; RODWELL *et al.*, 2018).

## 2.4.4 Proteínas relacionadas à OXPHOS, estresse mitocondrial e metabolismo energético

### 2.4.4.1 Adenina nucleotídeo translocase (ANT)

A adenina nucleotídeo translocase (ANT), também conhecida como transportador de ADP/ATP, é uma proteína codificada pelo genoma nuclear e encontrada na MMI tendo um papel muito importante na OXPHOS. A ANT é responsável pela troca de ATP/ADP entre a matriz mitocondrial e o citoplasma simultaneamente, sendo assim chamada de antiportador. A ANT liga-se ao  $ADP^{3-}$  presente no espaço intermembranas e o transporta para a matriz enquanto faz o transporte inverso de uma molécula de  $ATP^{4-}$ . O movimento de quatro cargas negativas para fora, em comparação com as três direcionadas para dentro, é favorecido pelo gradiente eletroquímico transmembrana que confere à matriz uma carga mais negativa. Além disso, uma força próton-motriz facilita a troca entre ATP e ADP (NELSON; COX, 2018). Nos humanos existem quatro isoformas, sendo elas: ANT1 expressa predominantemente no coração e músculos; ANT2 e ANT3 expressas de forma sistêmica; ANT4 específica dos testículos (DUPONT *et al.*, 2012; FLIERL *et al.*, 2022).

### 2.4.4.2 Proteína desacopladora (UCP)

A proteína desacopladora (do inglês, UCP), pertence à família de carreadores de ânions mitocondriais. As UCPs estão localizadas na MMI e desempenham a função fisiológica de transferir os  $H^+$  e elétrons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, resultando na dissipação do gradiente de  $H^+$  através da membrana interna (RICQUIER; CASTEILLA; BOUILLAUD, 1991). Ao retornarem para a matriz mitocondrial, os  $H^+$  participam de uma reação acoplada no qual a ATP-sintase utiliza essa energia para sintetizar o ATP. De maneira semelhante, a UCP atua como um canal alternativo permitindo o retorno dos  $H^+$  à matriz, porém em reação desacoplada gerando apenas calor e diminuindo conseqüentemente a produção de ATP (AZZU; BRAND, 2010).

Em mamíferos a família das UCPs é composta por cinco isoformas (UCPs de 1 a 5) que apresentam similaridade estrutural, porém com expressões teciduais diferentes (BRONDANI *et al.*, 2012). A UCP1 é expressa exclusivamente no tecido adiposo marrom (TAM) e está mais envolvida com a termogênese. A UCP2 é amplamente presente em diversos tecidos, incluindo tecido adiposo branco, coração, rins e fígado tendo maior atuação no controle do estresse oxidativo. A UCP3 é

expressa especificamente no músculo esquelético, cardíaco e TAM com maior atuação no metabolismo dos ácidos graxos e controle do estresse oxidativo (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000; SREEDHAR; ZHAO, 2017). E a UCP4 e a UCP5, são expressas exclusivamente no tecido neuronal (RAMSDEN *et al.*, 2012).

#### 2.4.4.3 Trocador de fosfato inorgânico (PiC)

O carreador de fosfato mitocondrial (do inglês, PiC) é uma proteína simporte, ou seja, transporta duas moléculas simultaneamente na mesma direção. Localizado na MMI, o PiC é responsável por transportar uma molécula de fosfato inorgânico e um  $H^+$  do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. Esse transporte é favorecido pelo gradiente de  $H^+$ , onde a concentração de  $H^+$  é relativamente baixa na matriz, assim facilitando sua entrada (NELSON; COX, 2018). A junção das proteínas transportadoras ligadas a MMI (ATP-sintase, ANT e PiC), formam um único complexo chamado ATP sintassomo, sendo esse crucial para a OXPHOS e conseqüentemente para a síntese de ATP.

Além de possuir papel central no transporte do fosfato (substrato importante para a produção energética), o PiC tem relação com o cálcio mitocondrial e no mecanismo de sobrevivência celular, por interação direta com a ciclofilina D e o inibidor viral da apoptose localizado na mitocôndria (SEIFERT *et al.*, 2015).

#### 2.4.4.4 Citrato sintase (CS)

A citrato sintase (CS) é uma enzima mitocondrial responsável pela formação do citrato a partir do oxaloacetato e da acetilCoA, sendo essa a primeira etapa do CAC. Embora essa enzima esteja localizada na matriz mitocondrial, sua síntese ocorre por meio da codificação no DNA nuclear. A CS desempenha um papel crucial no CAC, auxiliando na produção de energia por meio da interconversão de metabólitos (CHHIMPA *et al.*, 2023). A atividade dessa enzima é inibida por concentrações elevadas de ATP, acetilCoA e NADH em situações de alta disponibilidade energética. Essa regulação garante que o CAC não promova uma oxidação excessiva de acetilCoA (LIU *et al.*, 2018).

A atividade da CS também é considerada um indicador quantitativo da integridade e conteúdo mitocondrial (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; GILLEN *et al.*, 2016; MARIN *et al.*, 2023). Isso se deve ao papel dessa enzima na manutenção do CAC, no fluxo de energia através da CTE e na preservação da saúde mitocondrial (YUBERO *et al.*, 2016).

#### 2.4.4.5 Transportador mitocondrial de piruvato (MPC)

O transportador mitocondrial de piruvato (do inglês, MPC), é um complexo heterodímero formado por duas unidades proteicas (MPC1 e MPC2). Localizado na MMI, tem como principal função o transporte do piruvato citosólico para a matriz mitocondrial (TAVOULARI *et al.*, 2019). Cada isoforma é codificada por um genes distinto, porém a união dessas proteínas é necessária para a existência e funcionalidade do complexo MPC na membrana (BRICKER *et al.*, 2012).

A MMI apresenta alta seletividade, fazendo com que a passagem de algumas moléculas importantes para o metabolismo energético como o piruvato, só ocorra através de transportadores especializados (ALBERTS *et al.*, 2017). Por ser considerado uma molécula chave no metabolismo energético, qualquer prejuízo no transporte do piruvato para a matriz mitocondrial pode resultar em problemas bioenergéticos (JIANG *et al.*, 2022). Portanto, o MPC possui intersecção metabólica central ligando a glicólise (citósol) com a OXPHOS (mitocôndria) (YIEM; FINCK, 2022). Além disso, na maioria das células o MPC é vital, e sua ausência pode comprometer a saúde celular (YIEM; FINCK, 2022).

#### 2.4.4.6 Lactato desidrogenase (LDH)

A lactato desidrogenase (LDH) é um enzima tetramérica composta de duas subunidades proteicas, pertencente à classe das oxidorreduções. Crucial para o metabolismo energético celular, a LDH está presente tanto no citoplasma (cLDH) quanto nas mitocôndrias (mLDH) e sua principal função é catalisar a conversão reversível de lactato em piruvato e  $\text{NAD}^+$ , sendo esse um processo fundamental na via metabólica da glicose (KHAN *et al.*, 2020). A LDH apresenta cinco isoformas diferentes, formadas a partir das combinações das subunidades M e H, sendo cada uma predominante em tecidos específicos de acordo com suas necessidades metabólicas: a LDH-1 é mais presente no coração; a LDH-2 nos leucócitos e rins; a LDH-3 nos pulmões; a LDH-4 nos rins, placenta e pâncreas; e a LDH-5 nos músculos esqueléticos e fígado (HALL, 2000).

Acreditava-se que em condições aeróbias (na presença de  $\text{O}_2$ ) o produto final da glicólise era o piruvato e em condições anaeróbias (na deficiência de  $\text{O}_2$ ) o lactato. No entanto, evidências tem mostrado que a produção de lactato ocorre mesmo em condições aeróbias, sendo o lactato o produto final do metabolismo glicolítico capaz de ligar a glicólise à OXPHOS (ROGATZKI *et al.*, 2015). A reação da LDH é sempre próxima do equilíbrio, porém, a atividade dessa enzima é fortemente a favor do lactato, sendo assim, o lactato é sempre o resultado final da glicólise (LAMBETH;

KUSHMERICK, 2002). Além disso, está bem estabelecido na literatura que o lactato é uma molécula importante para o metabolismo energético de vários tecidos, incluindo músculo esquelético, coração, fígado e cérebro, e não apenas um resíduo metabólico da glicólise (KANE, 2014).

#### 2.4.4.7 Proteína quinase ativada por AMP (AMPK)

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK), é um complexo heterotrimérico formado por uma subunidade catalítica  $\alpha$  e duas subunidades reguladoras  $\beta$  e  $\gamma$ . Em humanos, há duas subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ ), duas subunidades  $\beta$  ( $\beta 1$  e  $\beta 2$ ), e três subunidades  $\gamma$  ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  e  $\gamma 3$ ) formando 12 isoformas diferentes quando combinadas. Dentre elas, a isoforma AMPK $\alpha 2$ , é mais expressa no fígado, músculo esquelético e cardíaco (SHARMA *et al.*, 2023). A AMPK, é uma enzima central no metabolismo celular, atuando como um sensor regulador do equilíbrio energético das células (ROSS; MACKINTOSH; HARDIE, 2016). A AMPK é ativada em condições de estresse energético, o qual aumenta a razão citosólica de AMP:ATP ou ADP:ATP como em casos de hipóxia, deficiência nutricional, exercício físico entre outros. Após ativada, ela atua fosforilando enzimas-chave, que favorecem a síntese de ATP e regulam a homeostase energética. De forma geral, a AMPK atua de duas maneiras: inibindo processos anabólicos, para reduzir o consumo de ATP, e estimulando processos catabólicos, para aumentar a geração de ATP (HERZIG; SHAW, 2018).

A AMPK exerce seu efeito em diferentes vias incluindo, acetil-CoA carboxilases (ACC1 e ACC2), glicogênio sintases (GYS1 e GYS2) e complexo mTOR 1 (mTORC1), assim inibindo processos de síntese de lipídios, proteínas e glicogênio. Dessa forma, a AMPK contribui para o aumento da captação de glicose e oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias (SHARMA *et al.*, 2023). A AMPK também regula positivamente diversos aspectos relacionados à saúde e viabilidade mitocondrial, como aumento da biogênese, mitofagia dinâmica e controle do estado redox, sendo essa enzima considerada uma “guardiã” da organela sob o ponto de vista energético (HERZIG; SHAW, 2018). Além disso, a AMPK também está diretamente envolvida na translocação nuclear e na mediação da ação dos peptídeos mitocondriais (WAN *et al.*, 2023).

#### 2.4.4.8 Quadro de leitura aberta mitocondrial do 12S rRNA-c (MOTS-c)

O quadro de leitura aberta mitocondrial do 12S rRNA-c (MOTS-c), é um peptídeo com 16 aminoácidos codificado pelo genoma mitocondrial a partir do gene MT-RNR1. O MOTS-c desempenha um papel na regulação da captação de glicose, no metabolismo lipídico e muscular.

Também está envolvido em diversas alterações fisiológicas e patológicas associadas ao processo de envelhecimento (LEE *et al.*, 2015). Além disso, nos últimos anos, ficou evidente que o MOTS-c exerce influência significativa na obesidade, inflamação, neuroproteção e hipocinesia associada ao envelhecimento (YIN *et al.*, 2020; KANG *et al.*, 2021).

A expressão do MOTS-c é significativamente aumentada em resposta ao estresse ou exercício físico. Em repouso, o RNA mensageiro (mRNA) é distribuído principalmente na matriz mitocondrial. Em situação de estresse o mRNA é liberado da mitocôndria e traduzido no citoplasma, sendo posteriormente translocado para o núcleo da célula pela via AMPK/PGC-1 $\alpha$ . No núcleo, o MOTS-c interage com diversos fatores de transcrição, com o intuito de regular a expressão gênica e desencadear uma resposta metabólica ao estresse (LEE *et al.*, 2015). O MOTS-c exerce suas principais funções inibindo a via Folato-Purina-AMPK, ao aumentar os níveis de 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR) e ativar a AMPK, o MOTS-c também aumenta a expressão do PGC-1 $\alpha$  colaborando para a biogênese mitocondrial, assim existindo uma comunicação mútua entre genes mitocondriais e nucleares (LEE, 2019).

A AMPK pode promover a translocação nuclear de MOTS-c mediando seus efeitos fisiológicos, e desencadeando um ciclo de *feedback* positivo (WAN *et al.*, 2023). O MOTS-c é encontrado no plasma e principalmente em tecidos como músculo esquelético, fígado, coração, tecido adiposo e cérebro (TURKEL *et al.*, 2022). Sendo o músculo esquelético o principal alvo desse peptídeo (FUKU *et al.*, 2015).

#### 2.4.5 Fosforilação Oxidativa (OXPHOS)

A OXPHOS é o processo metabólico final da respiração celular em organismos aeróbios para obtenção de energia. Todos os processos oxidativos envolvidos na degradação de carboidratos, gorduras e aminoácidos convergem para a fosforilação do ADP e a utilização do O<sub>2</sub> como acceptor final dos e<sup>-</sup> advindos da CTE. O mecanismo da OXPHOS pode ser dividido em três componentes distintos, porém acoplados:

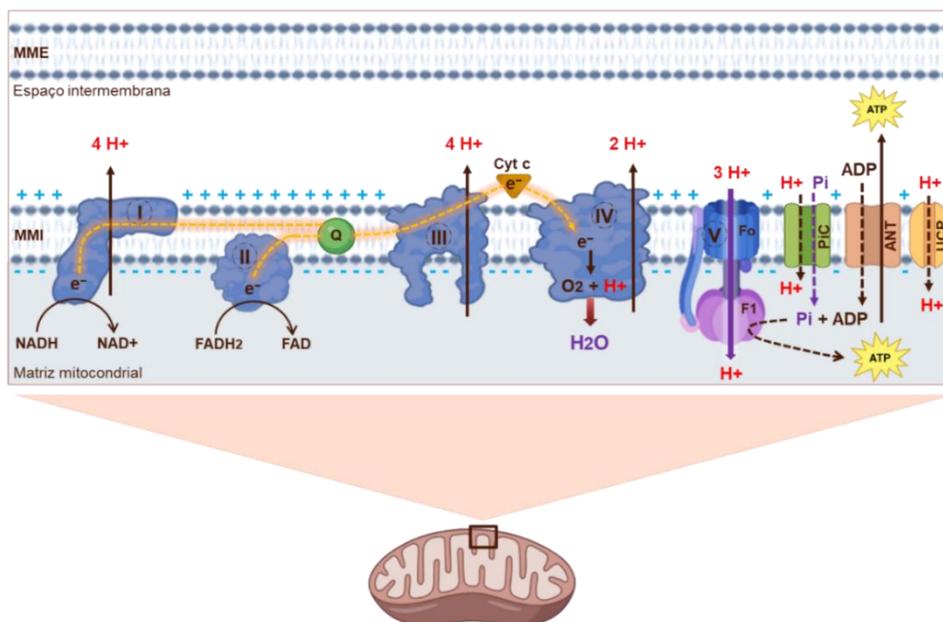
- 1- Os e<sup>-</sup> doados pelos carreadores NAD e FAD são conduzidos pela CTE por meio de reações redox (reações na qual ocorre a doação e aceção de e<sup>-</sup> entre diferentes moléculas), ou seja, a transferência de e<sup>-</sup> de um complexo para outro até seu acceptor final que é o O<sub>2</sub> no complexo IV.
- 2- A energia dos e<sup>-</sup> ocasiona o bombeamento dos H<sup>+</sup> através dos complexos proteicos (4 H<sup>+</sup> pelo complexo I, 4 H<sup>+</sup> pelo complexo III e 2 H<sup>+</sup> pelo complexo IV) da matriz mitocondrial em direção ao espaço intermembranas, assim gerando um gradiente de pH e uma diferença de voltagem

positiva (mV), conservando a energia na forma de um potencial eletroquímico pelo acúmulo de  $H^+$  em relação à matriz.

3- O fluxo de retorno dos  $H^+$  para a matriz mitocondrial, a favor de seu gradiente de concentração, consegue estimular a atividade da ATP-sintase e como consequência a síntese de ATP a partir do ADP e Pi (RODWELL *et al.*, 2018).

Um gradiente de concentração de  $H^+$  no espaço intermembranas é imprescindível para que a OXPHOS aconteça. O bombeamento de  $H^+$  através dos complexos da CTE, produz um gradiente eletroquímico conhecido como potencial quimiosmótico ou força próton-motriz, sendo esse um modelo proposto pelo químico britânico Peter Dennis Mitchell em 1961 (MITCHELL, 2011). Esta força tem duas associações, sendo uma química em razão do acúmulo de  $H^+$  possuir uma energia associada para igualar as concentrações entre os dois lados da MMI, e uma elétrica em razão da matriz estar eletronegativa e o espaço intermembranas eletropositivo, fazendo assim com que ocorra uma atração dos  $H^+$  pela carga negativa em direção a matriz. Esse modelo de potencial quimiosmótico permitiu a compreensão de como acontece a formação do ATP por meio da CTE e OXPHOS (MITCHELL, 2011).

**Figura 5** - Cadeia transportadora de elétrons (CTE).



Descrição - Em mamíferos a CTE é formada por cinco complexos enzimáticos (I, II, III, IV e V) e dois substratos intermediários: a coenzima Q (Q) e citocromo C (cyt c). Os equivalentes reduzidos NADH e FADH<sub>2</sub> transferem seus e- para os complexos I e II respectivamente, ocorrendo o bombeamento de H<sup>+</sup> da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Os H<sup>+</sup> bombeados retornam para a matriz através do complexo V (ATP-sintase), sintetizando ATP a partir do ADP + Pi. Os ADP/ATP atravessam a membrana interna (MMI) através do canal ANT. Os H<sup>+</sup> podem atravessar a MMI pelo carreador de fosfato (PiC), ou UCPS. Fonte: Adaptado de Bellance, Lestienne e Rossigno (2009). Criado com BioRender.com.

## 2.5 FÍGADO, MENOPAUSA E DHGNA

O fígado é considerado o segundo maior órgão do corpo humano, sendo responsável por diversas funções metabólicas essenciais para o funcionamento do organismo. Dentre suas principais funções, destacam-se a detoxificação sanguínea, excreção da bile, armazenamento de glicose na forma de glicogênio, síntese de triglicerídeos e colesterol. Além disso, o fígado apresenta alta capacidade mitótica, responsável pela regeneração do órgão em caso de lesão com perda tecidual, permitindo sua rápida recuperação de massa e volume. Aproximadamente 80% do tecido hepático é composto pelos hepatócitos (principais células hepática), enquanto o restante é constituído por outros tipos, como as células de *Kupffer* (um tipo de macrófago) e células estreladas capazes de armazenar lipídeos e vitamina A (FLEISHER, 2012).

Em condições normais, o fígado desempenha um papel fundamental no metabolismo dos carboidratos (armazena muito glicogênio e sintetiza glicose a partir de outros substratos), no metabolismo proteico (desaminação de aminoácidos, remoção da amônia e síntese das proteínas plasmáticas) e no metabolismo lipídico (síntese de colesterol, fosfolipídios, proteínas de transporte e lipogênese de novo) (NELSON; COX, 2018). Os AGL também são captados pelo fígado e transformados em triglicerídeos pelo processo de esterificação, podendo ser exportados para a corrente sanguínea por meio da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), oxidados nas mitocôndrias por  $\beta$ -oxidação ou armazenados no próprio fígado na forma de gotículas lipídicas (< 5% do órgão) (GUYTON; HALL, 2016).

No fígado, a regulação do metabolismo lipídico é resultado da interação entre diversos fatores, que atuam para manter e controlar a homeostase lipídica hepática (BECHMANN *et al.*, 2012). Portanto, um desequilíbrio nesse metabolismo resulta no acúmulo excessivo de triglicerídeos no interior das células hepáticas, sendo essa a característica central da DHGNA. Esse acúmulo excessivo de lipídios intracelular, ocasiona uma série de eventos prejudiciais ao fígado, incluindo alterações na estrutura celular (deslocamento do núcleo para a periferia) e redução da capacidade oxidativa e funcional das mitocôndrias, das quais podem resultar em danos irreversíveis ao órgão e levar ao desenvolvimento da DHGNA (BRUNT *et al.*, 2015; IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). Essa doença abrange uma ampla gama de alterações hepáticas, desde seu estágio inicial conhecido como esteatose hepática, até estágios mais avançados, como a esteato-hepatite não alcoólica, cirrose e em alguns casos carcinoma hepatocelular (BRASIL, 2016; MUNDI *et al.*, 2020).

Em mulheres na menopausa, foi evidenciado que a redução dos níveis de estrogênio favorece o acúmulo de gordura no fígado (PAQUETTE *et al.*, 2007). Além disso, evidências sugerem que a

prevalência da DHGNA é mais elevada no período pós-menopáusico em comparação com o pré-menopáusico, indicando um possível efeito protetor desse hormônio contra o desenvolvimento da doença (DISTEFANO, 2020). Apoiando a afirmação anterior, o estudo conduzido por Hamaguchi *et al.* (2012), investigou a relação entre idade, menopausa e DHGNA em mulheres. Os resultados revelaram uma maior prevalência da doença em mulheres pós-menopáusicas, independentemente do aumento da massa corporal ou presença da síndrome metabólica, quando comparadas com mulheres na pré-menopausa.

Observa-se também, que mulheres em idade reprodutiva apresentam taxas mais baixas de DHGNA em comparação com os homens da mesma faixa etária, no entanto, após a menopausa com a redução estrogênica, foi observado que a prevalência de DHGNA se tornou semelhante ou superior à dos homens (YANG *et al.*, 2014; BALLESTRI *et al.*, 2017). Estudos com animais também identificaram uma relação entre a deficiência de estrogênio com o aumento da gordura hepática intracelular, corroborando com a ideia de proteção advinda do hormônio contra o desenvolvimento da DHGNA (ROGERS *et al.*, 2009; KAMADA *et al.*, 2011; CÔTÉ *et al.*, 2012). Essa proteção está relacionada à capacidade do estrogênio em limitar o acúmulo de gordura hepática (ZHU *et al.*, 2013).

No fígado, diferentes vias estão envolvidas na metabolização dos lipídios. Entre elas, a oxidação dos AGL por meio da  $\beta$ -oxidação, que resulta na formação de moléculas de acetil-CoA, é uma das principais. Esse processo ocorre na matriz mitocondrial dos hepatócitos e desempenha um papel essencial na produção de energia (VAN DER WINDT *et al.*, 2018). Os hepatócitos na zona periportal (zona I) são abundantes em número de mitocôndrias, com cerca de 800 organelas em cada célula (PESSAYRE; MANSOURI; FROMENTY, 2002). Essas mitocôndrias atuam como sensores, monitorando e mantendo o equilíbrio intracelular, para evitar processos que podem contribuir para o surgimento ou piora no quadro de doenças metabólicas hepáticas como a DHGNA (MORIO *et al.*, 2021).

No caso de sobrecarga lipídica, às mitocôndrias hepáticas aumentam sua atividade oxidativa como resposta adaptativa gerando maior estresse. Além disso, é observado um aumento da biogênese mitocondrial em pacientes com DHGNA em estágio inicial (MANSOURI; GATTOLIAT; ASSELAH, 2018). Entretanto, essa flexibilidade mitocondrial é posteriormente perdida ao longo do desenvolvimento da doença e sua atividade é reduzida (KOLIAK *et al.*, 2015). O estresse imposto à organela ocasiona maior produção de EROs, danos ao mtDNA e às estruturas mitocondriais, comprometimento da  $\beta$ -oxidação, aumento da permeabilidade das membranas com extravasamento de proteínas, redução na atividade da CTE, diminuição da produção de ATP e mitofagia, gerando danos hepatocelulares, resistência à insulina e inflamação, assim, estabelecendo um círculo vicioso

entre o acúmulo de AGL e triglicerídeos no hepatócito, maior atividade oxidativa da mitocôndria e aumento da disfunção mitocondrial (WEI *et al.*, 2008; GUSDON *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2015; NASSIR, 2022). Portanto, a disfunção mitocondrial emerge como um fator central para o desenvolvimento e progressão de doenças hepáticas como a DHGNA (RAMANATHAN; ALI; IBDAH, 2022).

## 2.6 MÚSCULO ESQUELÉTICO, MENOPAUSA E SARCOPENIA

Em indivíduos saudáveis, aproximadamente 40% da massa corporal é composta por músculos esqueléticos, responsáveis por gerar força, produzir movimentos, auxiliar na estabilidade das articulações e manutenção da postura corporal (HONG *et al.*, 2014). O músculo é constituído por populações de células denominadas miócitos, que se diferenciam entre si e formam longos feixes musculares com características metabólicas e funcionais distintas (ZUMBAUGH *et al.*, 2022). Os músculos esqueléticos também apresentam grande capacidade adaptativa, que possibilita sua remodelação estrutural por meio de diferentes estímulos, sendo essa capacidade conhecida como plasticidade muscular (GONZALEZ *et al.*, 2016).

Alguns fatores, como lesão, inflamação, inatividade física e doenças, podem gerar um desequilíbrio na composição e função muscular, resultando no desenvolvimento de doenças musculoesqueléticas como a sarcopenia (CRUZ-JENTOFT; SAYER, 2019; MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020). Em 1989, Irwin Rosemberg foi o pioneiro ao sugerir e descrever o termo “sarcopenia” (do grego “*sarx*”, carne e “*penia*”, perda). A sarcopenia é caracterizada como um distúrbio muscular esquelético que envolve a perda da massa muscular de forma generalizada e progressiva, associada à diminuição da força e desempenho funcional (CRUZ-JENTOFT *et al.*, 2019). Além disso, a perda da massa muscular associada à sarcopenia está correlacionada a problemas como quedas, fraturas, declínio funcional, fragilidade, impactos na qualidade de vida e mortalidade (CRUZ-JENTOFT; SAYER, 2019). Em 2016, a *Aging in Motion Coalition* reconheceu a sarcopenia como doença, com atribuição de seu próprio código internacional CID-10 M62.84 (ANKER; MORLEY; HAEHLING, 2016).

Embora esteja ligada ao envelhecimento, a sarcopenia resulta de um desequilíbrio entre processos celulares complexos que envolvem as vias anabólicas (síntese) e catabólicas (degradação). Esse desequilíbrio pode ser desencadeado por mecanismos multifatoriais, incluindo deficiência nutricional, sedentarismo, alterações hormonais, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, aumento nos níveis de marcadores inflamatórios, entre outros (BEAUDART *et al.*, 2017). As alterações

celulares presentes no tecido muscular sarcopênico incluem a diminuição do tamanho e número de miofibrilas, redução da proliferação das células satélites e deposição excessiva de gordura intramuscular (obesidade sarcopênica ou mioesteatose), que contribuem para alterações na composição do músculo esquelético, que resultam na diminuição de sua capacidade funcional e metabólica (ZAMBONI; RUBELE; ROSSI, 2019).

O declínio na força e massa muscular é observado precocemente em mulheres quando comparadas aos homens da mesma idade. Isso se deve, por apresentarem uma redução importante nos níveis de estrogênios durante e após a menopausa, resultando na substituição de grande parte do tecido muscular contrátil por tecido gorduroso intramuscular. Dessa forma, existe uma relação entre a diminuição dos níveis de estrogênios e a perda acentuada da massa muscular (BROWN, 2008; KANG *et al.*, 2017). No estudo de Li *et al.* (2023), foi constatado uma diminuição significativa da massa muscular em mulheres com insuficiência ovariana em comparação com aquelas que apresentavam função ovariana normal, sugerindo um papel crucial do estrogênio na manutenção da massa muscular.

A deficiência estrogênica após a menopausa pode ocasionar um declínio da massa muscular após a quinta década de vida (MESSIER *et al.*, 2011). Isso ocorre, devido à propriedade anabólica do hormônio  $17\beta$ -estradiol, o qual promove sinalizações positivas na célula do tecido muscular esquelético, estimulando a síntese proteica e a proliferação das células satélites, favorecendo a reparação e manutenção do tecido (GERACI *et al.*, 2021).

Além da redução na força e massa muscular, a sarcopenia pode acarretar impactos metabólicos significativos, considerando que o músculo esquelético é constituído por células altamente ativas e dinâmicas das quais demandam muita energia advinda do metabolismo fosfogênico, glicolítico e oxidativo para suas atividades (BASKIN; WINDERS; OLSON, 2015). Grande parte da energia utilizada pelos miócitos, é produzida pelas mitocôndrias por meio da OXPHOS (HEPPLE, 2014).

No músculo esquelético existem dois tipos de subpopulações mitocondriais, as quais estão estrategicamente localizadas e se diferenciam em especificidade e função conforme as exigências metabólicas de cada região celular. Cerca de 80% do volume mitocondrial no músculo esquelético, é composto por mitocôndrias intermiofibrilares (localizadas entre os sarcômeros), estas apresentam uma forma mais alongada e estão bem próximas do retículo sarcoplasmático e túbulos transversos. As mitocôndrias intermiofibrilares são as principais fornecedoras de energia para a contração muscular. A outra parte é constituída por mitocôndrias subsarcolemas (localizadas próximo ao sarcolema), responsáveis pelo fornecimento energético para o transporte transmembranar de íons e substratos (HOOD, 2001; MARZETTI *et al.*, 2013; CARTER, CHEN, HOOD, 2015).

As mitocôndrias possuem papel central relacionado a viabilidade e saúde das células musculares, portanto um distúrbio na atividade mitocondrial está fortemente relacionado a patogênese da sarcopenia, principalmente por menor produção de ATP, dinâmica, biogênese e mitofagia reduzidas, maior produção de EROs, danos no mtDNA, comprometimento da cadeia respiratória e aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial com sinalização pró-apoptótica. Além disso, o estresse oxidativo advindo da disfunção mitocondrial é capaz de inibir a via AKT/mTOR bem como todos os processos envolvidos nessa via, inibindo a síntese proteica e promovendo a atrofia muscular (HEPPLE, 2014; TAN *et al.*, 2015).

No estudo conduzido por Wang *et al.* (2013), os autores observaram que a disfunção mitocondrial resultante dos danos ao mtDNA, teve relação com uma diminuição do *pool* de células satélites, e redução da massa muscular em camundongos. Além disso, a redução do volume, densidade e capacidade oxidativa das mitocôndrias musculares pode resultar em distúrbios metabólicos, incluindo a redução na taxa metabólica basal. Esses efeitos podem contribuir ainda mais para o quadro de sarcopenia (RYGIEL; PICARD; TURNBULL, 2016).

## 2.7 CROSSTALK ENTRE FÍGADO E MÚSCULO ESQUELÉTICO

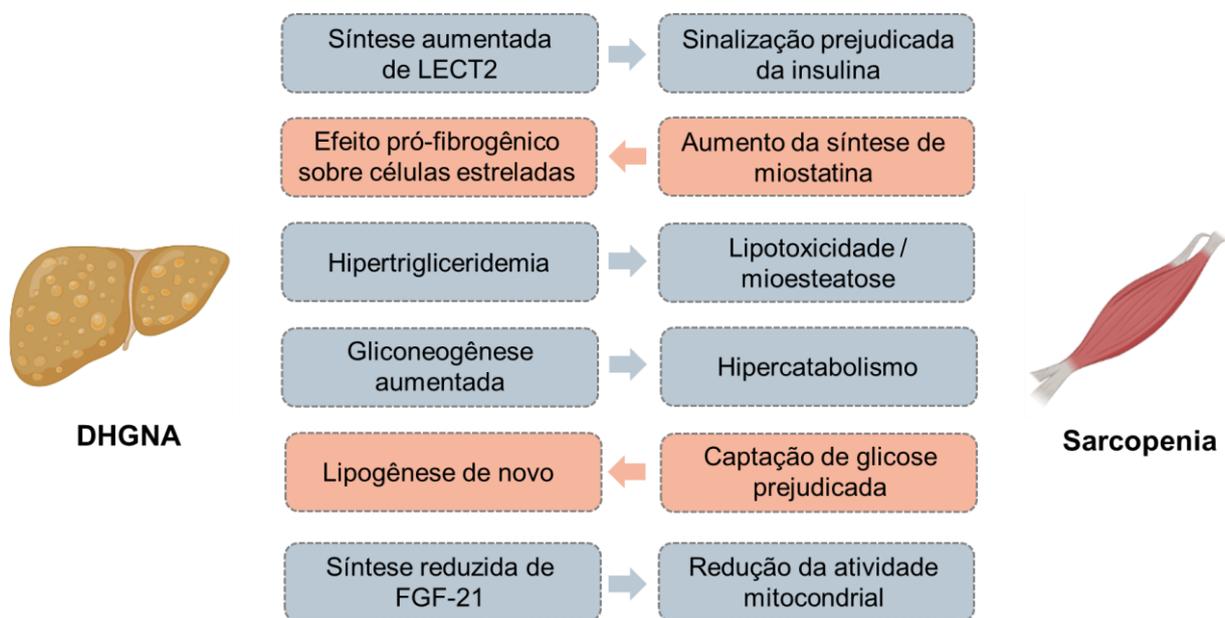
### 2.7.1 Crosstalk a partir das hepatocinas e miocinas

A massa muscular esquelética em níveis adequados e o funcionamento saudável do tecido hepático são determinantes para a regulação do metabolismo energético do organismo. Evidências indicam que baixos níveis de massa muscular, como os observados na sarcopenia, estão relacionados ao desenvolvimento e progressão de DHGNA, incluindo esteatose, esteato-hepatite não alcoólica e fibrose, independente de outros fatores (KOO *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2018). Assim, é possível que possa existir uma comunicação (*crosstalk*) entre a atividade muscular e a patogênese da DHGNA, ou vice-versa (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2020).

No estudo conduzido por Hong *et al.* (2014), os pesquisadores observaram que os indivíduos com menores índices de massa muscular esquelética apresentavam risco aumentado para DHGNA, estabelecendo assim uma relação entre a condição muscular e a saúde hepática. Corroborando aos achados, Lee *et al.* (2015), identificaram que indivíduos sarcopênicos tinham aproximadamente duas vezes mais risco para o desenvolvimento de DHGNA, independentemente da presença de obesidade ou síndrome metabólica, em comparação com indivíduos com a massa muscular preservada.

O *crossstalk* metabólico e funcional entre fígado e músculo esquelético é influenciado por diversos fatores (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2020). Sinais bioquímicos bidirecionais por meio da secreção desregulada de citocinas do músculo (miocinas) e do fígado (hepatocinas), exercem influência nos mecanismos relacionados a deficiência de vitamina D, estresse oxidativo, ambiente pró-inflamatório, resistência à insulina e resistência anabólica (SEVERINSEN; PEDERSEN, 2020; IWAKI *et al.*, 2023).

**Figura 6** – Miocinas e hepatocinas no *crossstalk* entre fígado e músculo esquelético.



Descrição - FGF-21: fator de crescimento de fibroblastos-21; LECT2: quimiotaquia 2 derivada de células de leucócitos; DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica. Fonte: Adaptado de Armandi *et al.* (2021).

A perda da massa muscular, estimula a gliconeogênese, aumenta a regulação positiva da proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis 1c (SREBP-1c), inibe a  $\beta$ -oxidação e modifica o transporte de triglicérides, levando ao acúmulo de lipídios no músculo esquelético e fígado (KALYANI; CORRIERE; FERRUCCI, 2014). Além disso, o músculo esquelético, fornece aminoácidos como substrato para a síntese de glicose, agravando ainda mais o quadro de sarcopenia (ARMANDI *et al.*, 2021). Isto é acompanhado por um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que no fígado estimula o acúmulo de lipídios por meio da lipogênese *de novo*. O TNF- $\alpha$  também tem efeitos na ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), um importante fator de transcrição que promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para o aumento do catabolismo muscular e o desenvolvimento de DHGNA (KIM; KIM, 2020).

Na DHGNA, a inflamação de maneira crônica gerada nos hepatócitos pelo excesso de triglicerídeos, advém da infiltração de células inflamatórias como os macrófagos M1 que liberam citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- $\alpha$  e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). A presença dessas citocinas em excesso no sangue pode impactar negativamente o músculo esquelético ao estimular a degradação das proteínas filamentosas, reduzir a miogênese e inibir a atividade do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (AL-SHANTI; STEWART, 2012; CASTOLDI *et al.*, 2016; GEHRKE; SCHATTENBERG, 2020). Além disso, citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo fígado conhecidas como hepatocinas, também podem impactar diretamente no tecido muscular. A quimiocina 2 derivada de células leucocitárias (LECT2), está associada positivamente com a resistência à insulina, levando à fosforilação da Jun N-terminal quinase (JNK) nas células musculares e prejudicando sua capacidade de resposta à insulina (YOO *et al.*, 2017). Outras hepatocinas envolvidas na DHGNA como a fetuína A e a selenoproteína P, também estão relacionadas na diminuição da sensibilidade à insulina e desordem metabólica (CAVIGLIA *et al.*, 2020).

### **2.7.2 Crosstalk a partir da mitocôndria**

Em relação às mitocôndrias, estas organelas além de desempenharem papel-chave no metabolismo de produção energética, também apresentam capacidade de comunicação intra e extracelular. Quando submetidas a estímulos estressantes, as mitocôndria se comunicam com o núcleo celular (comunicação mitonuclear) por meio de sinais anterógrados e retrógrados que permitem a regulação da expressão gênica a partir do núcleo como resposta adaptativa ao estresse (KIM; LEE, 2024).

A comunicação mitocondrial ocorre a partir de moléculas sinalizadoras, entre as quais se destacam os Peptídeos Derivados de Mitocôndrias (do inglês, MDPs) (NASHINE; KENNEY, 2020). Codificados a partir do genoma mitocondrial, os MDPs desempenham várias funções no organismo, incluindo citoproteção, regulação do metabolismo energético, produção de EROs, função e biogênese mitocondrial. Atualmente foram encontrados oito MDPs: Humanina e Pequenos Peptídeos Semelhantes à Humanina 1 a 6 (do inglês, SHLPs 1-6), codificados no gene do RNA ribossômico 16S; e MOTs-c codificados no gene do RNA ribossômico 12S (MERRY *et al.*, 2020).

O MOTs-c é o polipeptídeo mitocondrial mais recente descoberto em 2015, e apresenta um aumento de sua expressão de forma significativa em resposta a perturbação metabólica e estresse oxidativo. Esse peptídeo atua como um importante citoprotetor, auxiliando na função mitocondrial e regulando a captação de glicose, metabolismo lipídico, resistência à insulina, inflamação e

neuroproteção em situações estressantes. Além disso, o MOTS-c tem capacidade de interagir com diferentes órgãos por meio da corrente sanguínea em humanos e roedores (KIM *et al.*, 2019; WAN *et al.*, 2023).

Em mulheres pós-menopáusicas, o MOTS-c contribui para o controle do peso corporal e prevenção da resistência à insulina, ambos associados com a redução hormonal. De acordo com o estudo realizado por Lu *et al.* (2019), o tratamento com MOTS-c em ratas ovariectomizadas reduziu a massa gorda, os níveis de lipídios no sangue e triglicerídeos hepático, assim prevenindo os efeitos metabólicos negativos relacionados à redução hormonal na menopausa, como a obesidade e a resistência à insulina. Além disso, foi demonstrado que o peptídeo MOTS-c promove efeito anti-inflamatório ao reduzir os níveis de marcadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no tecido adiposo (ZHAI *et al.*, 2017).

No fígado, o MOTS-c apresenta grande repercussão, principalmente em condições de estresse como na DHGNA. É observado que os níveis plasmáticos de MOTS-c estão elevados na fase inicial da doença em resposta ao estresse hepático, sendo esses níveis posteriormente reduzidos em estágios mais avançados da doença, sugerindo a sobrecarga mitocondrial nessas fases (KIRIK *et al.*, 2023). Essa resposta inicial visa restaurar o distúrbio metabólico do fígado, indicando que os peptídeos mitocondriais são responsivos ao estresse hepático e se correlacionam positivamente com o conteúdo de gordura no órgão, tanto em humanos quanto em modelos murinos (SEQUEIRA *et al.*, 2021). Em camundongos, o MOTS-c melhorou a massa corporal e a massa relativa do fígado, além de reduzir o acúmulo de gordura e reverter o balonamento dos hepatócitos, assim protegendo contra o desenvolvimento de doenças metabólicas hepáticas. O MOTS-c também foi capaz de melhorar a função mitocondrial, especialmente no CAC e no transporte de acilcarnitina. Portanto, o MOTS-c é um importante biomarcador mitocondrial envolvido na prevenção da DHGNA e na redução da progressão em todo o espectro da doença (LU *et al.*, 2024).

O tecido muscular esquelético expressa de forma abundante o MOTS-c, sendo este órgão um dos principais alvos do peptídeo, o qual atua no aumento da sensibilidade à insulina, melhora a utilização de glicose, promove a expressão do transportador de glicose 4 (GLUT4) e aumenta a produção de calor (LEE *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado que o MOTS-c pode inibir a expressão da miostatina, um regulador negativo do crescimento e desenvolvimento muscular, sendo sugerido como possível terapia para atrofia do músculo esquelético, como em quadros de sarcopenia. Níveis plasmáticos de MOTS-c apresentaram correlação inversa com os níveis plasmáticos de miostatina (KUMAGAI *et al.*, 2021). De acordo com García-Benlloch *et al.* (2022), o MOTS-c exerce um efeito miogênico no crescimento e regeneração do tecido muscular esquelético, aumentando a

formação de miotubos e inibindo a via atrófica IL-6/JAK/STAT3 impulsionada por citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, o MOTS-c pode atuar contra a perda de massa muscular em doenças musculoesqueléticas.

As mitocôndrias são organelas multifuncionais que estão ganhando reconhecimento como importantes reguladoras da célula. Isso se deve à sua capacidade de comunicação direta com o núcleo e com outras organelas, desempenhando um papel crucial na sinalização intracelular e endócrina (KIM *et al.*, 2019). Além disso, sua capacidade de se comunicar sistemicamente com outros tecidos por meio dos MDPs, posiciona essa organela como um elemento central na saúde e na doença (LEE; KIM; COHEN, 2016). Em particular, o MOTS-c vem sendo amplamente estudado por seu papel na adaptação metabólica e celular em resposta a estímulos estressantes, como o exercício físico, a menopausa, a DHGNA e a sarcopenia (LU *et al.*, 2019; SEQUEIRA *et al.*, 2021; KUMAGAI *et al.*, 2021). Assim, é possível que as mitocôndrias tenham papel importante no *crosstalk* entre o fígado e o músculo esquelético.

## 2.8 EXERCÍCIO FÍSICO: TREINAMENTO RESISTIDO COMO INTERVENÇÃO

Diferentes abordagens são utilizadas para tratar ou aliviar os sintomas associados à redução estrogênica na menopausa, incluindo medicamentos não hormonais como antidepressivos, terapias comportamentais, fitoterápicos, homeopatia, acupuntura, terapia de reposição hormonal (TRH) e o exercício físico. Entretanto, as duas últimas abordagens, são as mais discutidas no meio científico e clínico, como forma de intervenção tanto para amenizar os sintomas quanto para prevenir / tratar as possíveis disfunções pós-menopáusicas ocasionadas pela redução hormonal (DAVIS; BABER, 2022).

Embora a TRH seja comumente utilizada por meio da reposição sintética do estrogênio e progesterona, a literatura ainda é inconsistente quanto a sua eficácia e segurança, associando esse tratamento ao risco aumentado para câncer endometrial e de mama, além de doença tromboembólica (CHLEBOWSKI *et al.*, 2020). Por outro lado, o exercício físico tem ganhado destaque por ser considerado uma intervenção eficiente, segura e não farmacológica, capaz de contribuir na prevenção e tratamento clínico de diversas doenças, incluindo as disfunções pós-menopáusicas (PEDERSEN; SALTIN, 2016; WARBURTON; BREDIN, 2017; ACSM, 2018). Respostas positivas são observadas em mulheres nessa fase, indicando que a prática de exercício físico exerce influência no controle metabólico, melhora da massa muscular, perfil lipídico, capacidade cardiorrespiratória, função hepática e mitocondrial (LEITE *et al.*, 2010; AASLD, 2022).

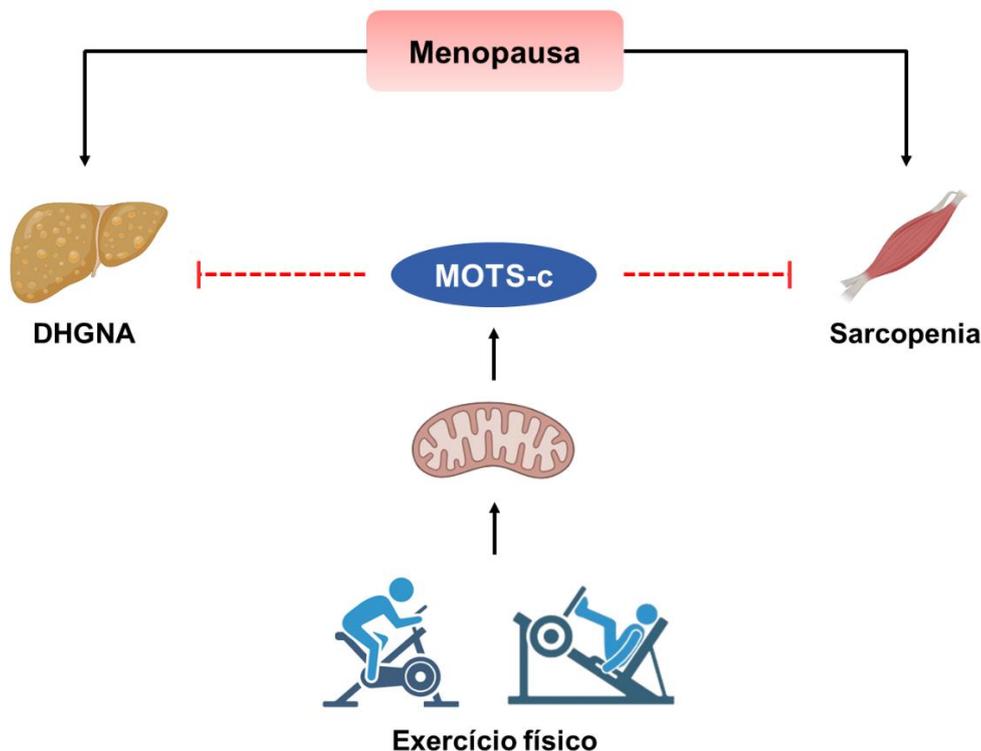
Dentre as modalidades de exercício físico, o treinamento aeróbio (TA) e o treinamento resistido (TR) ou de força, são amplamente conhecidos e utilizados pela população em geral, comunidade científica e clínica. Ambos são capazes de provocar adaptações fisiológicas, que resultam no aumento do consumo de oxigênio, melhora do metabolismo oxidativo e respostas mitocondriais significativas (BARBIERI *et al.*, 2013; NIELSEN *et al.*, 2017). O TR envolve o uso de uma determinada resistência, podendo ser pela massa corporal ou uma carga externa (pesos, elásticos, etc.) com o propósito de gerar contração muscular e aumento na capacidade de produção de força (ECKSTROM, *et al.*, 2020). Diversos estudos evidenciaram respostas positivas do TR no sistema muscular, ósseo, hemodinâmico, tecido endotelial e perfil lipídico, no período pós-menopáusico (LEITE *et al.*, 2009; SHIGUEMOTO *et al.*, 2012; ROSSINI, 2016; LINO *et al.*, 2018).

O TR é indicado para atenuar os problemas relacionados a esteatose hepática e alterações na composição corporal decorrentes da redução hormonal na menopausa. Corroborando à assertiva, Corriveau *et al.* (2008) observaram que o TR foi capaz de reduzir a deposição de lipídeos no fígado e na região abdominal, diminuindo a expressão de genes relacionados com a lipogênese em ratas ovariectomizadas. No fígado, o TR contribui para melhorar a DHGNA ao aumentar a oxidação dos AGL e prevenir danos mitocondriais causados por agentes estressantes, como a ROS (VAN DER WINDT *et al.*, 2018). Também é relatado que o TR melhora a DHGNA diminuindo os níveis de lipídeos intra-hepático mesmo sem alterações significativas na massa corporal (HASHIDA *et al.*, 2017). No estudo de Takahashi *et al.* (2015), em 12 semanas de TR os autores observaram a redução da massa livre de gordura e do grau de esteatose hepática, além de melhorar os níveis circulantes de insulina e reduzir o índice de resistência à insulina, identificando que o TR ajuda a melhorar as características da síndrome metabólica em pessoas com DHGNA.

Em relação a massa muscular de mulheres pós-menopáusicas, é observada uma diminuição em aproximadamente 0,6% ao ano, ocasionada pela redução nos níveis de estrogênio circulante, contribuindo dessa forma para a patogênese da sarcopenia (KHADILKAR, 2019). No entanto, o TR é recomendado como uma intervenção não farmacológica eficiente para a recuperação da estrutura muscular esquelética e a melhora da composição corporal. Dessa forma, o TR é a modalidade mais indicada para manter a força e a massa muscular, evitando quadros de sarcopenia no período pós-menopáusico (FJELDSTAD *et al.*, 2009; CHO *et al.*, 2022; RODRIGUES *et al.*, 2022). Existem fortes evidências que apoiam os benefícios do TR em promover aumento da massa muscular e força, melhora da mobilidade e adaptações hormonais positivas, assim combatendo diversas doenças incluindo as musculoesqueléticas como a sarcopenia (FRAGALA *et al.*, 2019).

Na função mitocondrial, é evidenciado que a prática de exercício físico é capaz de aprimorar a qualidade e eficiência das mitocôndrias (BOUZID *et al.*, 2015), como o aumento da biogênese, melhora da dinâmica (fusão e fissão), remodelamento das cristas mitocondriais e mitofagia, favorecendo o aumento do consumo de oxigênio e oxidação dos ácidos graxos (YOON *et al.*, 2022). Pesquisas indicam que o TR, pode contribuir para restaurar a função e a biogênese mitocondrial, tendo efeitos positivos nos complexos mitocondriais I, III e IV, assim resultando em melhor capacidade de OXPHOS, além de aumentar a força e a massa muscular (GROENNEBAEK; VISSING, 2017; FIUZA-LUCES *et al.*, 2019; MEMME; HOOD, 2021). Além disso, foi observado que o exercício físico promove o aumento nos níveis de MOTS-c no músculo esquelético e no plasma durante e imediatamente após (esses níveis são reduzidos progressivamente no período de descanso), o qual melhora a atividade metabólica, sensibilidade à insulina e o desempenho físico (YANG *et al.*, 2021), sugerindo uma resposta metabólica adaptativa ao exercício induzida por esse peptídeo mitocondrial (REYNOLDS *et al.*, 2021).

**Figura 7** – Interferência da MOTS-c na DHGNA e sarcopenia.



Descrição - DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica. MOTS-c: quadro de leitura aberta mitocondrial do 12S rRNA-c. A menopausa representa uma forma de estresse crônico que contribui negativamente para a patogênese da sarcopenia e DHGNA. Por outro lado, o exercício físico representa um estresse positivo e controlado que possibilita maior liberação do peptídeo MOTS-c pela mitocôndria, o qual atua em adaptações celulares que previnem e/ou impedem o desenvolvimento dessas doenças (representado pela seta vermelha tracejada). Fonte: Elaborado pelo autor (2024). Criado com BioRender.com.

### 3 HIPÓTESES

Diante do que foi abordado e das lacunas científicas a serem exploradas em relação à temática, formulamos as seguintes hipóteses:

- a) A ovariectomia leva a disfunção mitocondrial no fígado e músculo gastrocnêmio, induzindo ao desenvolvimento da DHGNA e sarcopenia.
- b) A ovariectomia reduz a expressão dos genes relacionados com a CTE, OXPHOS e MOTS-c no fígado e músculo gastrocnêmio.
- c) O TR como tratamento não-farmacológico, pode interferir positivamente na função mitocondrial e na expressão dos genes relacionados com a CTE e OXPHOS no fígado e músculo gastrocnêmio.
- d) O TR pode aumentar a expressão do gene *Mots-c* indicando a presença de biomarcadores mitocondriais que confirmam o *crossstalk* entre o fígado e músculo esquelético.

Essas hipóteses visam esclarecer os mecanismos biológicos envolvidos na interação entre menopausa, DHGNA e sarcopenia, além de explorar o TR como potencial intervenção preventiva para essas condições.

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo investigar os efeitos da ovariectomia e do TR sobre a função mitocondrial e a expressão do biomarcador MOTS-c, envolvido no *crossstalk* entre fígado e músculo esquelético.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar os efeitos da ovariectomia sobre a função (respirometria) mitocondrial no fígado e músculo gastrocnêmio.
- b) Analisar os efeitos da ovariectomia na expressão dos genes envolvidos na CTE, OXPHOS e no biomarcador MOTS-c, no fígado e músculo gastrocnêmio.
- c) Analisar os efeitos do TR sobre a função (respirometria) mitocondrial no fígado e músculo gastrocnêmio.

- d) Analisar os efeitos do TR na expressão dos genes envolvidos na CTE, OXPPOS e no biomarcador MOTS-c no fígado e músculo gastrocnêmio.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A realização dos procedimentos experimentais foi iniciada somente após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar) sob protocolo número 4381011222 em 14/dez/2022, seguindo todos os regulamentos necessários conforme o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011) e a Resolução Normativa CONCEA no. 55 (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica, DBCA CONCEA, 2023). Para a manipulação correta e adequada dos animais, foi realizado pelo pesquisador e demais envolvidos o curso de Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório, sob número de certificado RQCN-SBTD-4N47-NYTP.

### 5.2 ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

A amostra foi composta por 20 ratas da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), adultas jovens, advindas do Biotério Central da UFSCar após a aprovação da CEUA/UFSCar. Durante o período experimental, os animais foram alojados em caixas de polipropileno com dimensões (41 cm x 34 cm x 17,5 cm) sob leito de maravalha (raspas de madeira), em quantidades máximas de 5 ratas por caixa. Os animais ficaram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício (LabFisioEx) localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) – UFSCar em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade e iluminação com ciclo invertido de 12h (6-18h escuro e 18-6h claro), com oferta de água filtrada e dieta *ad libitum*. A rotina de higienização das caixas foi estabelecida três vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira) às 7h, com verificação das condições atuais da instalação e dos animais aos fins de semana e feriados.

Os animais chegaram no biotério do laboratório com três semanas de vida, onde foram separados em quatro grupos diferentes e permaneceram para aclimatação em ambiente de acesso restrito, controlado, isolado de outros animais ou pessoas e silencioso em ciclo invertido por três semanas, priorizando a segurança e o bem-estar dos animais.

**Figura 8** – Caixas e balança utilizada durante o experimento.



Descrição - A: caixa de polipropileno (41 cm x 34 cm x 17,5 cm) com grade e suporte de água. B: balança eletrônica para pesagem dos animais (em gramas). Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 5.3 INGESTÃO ALIMENTAR E MASSA CORPORAL

O monitoramento da ingestão alimentar foi realizado diariamente às 7h, sendo ofertado ração do tipo peletizada (SOCIL/ADM), conforme as recomendações do American Institute of Nutrition para animais adultos AIN-93M (COSTA *et al.*, 2014). A ração foi igualmente distribuída em todos os grupos durante todo o período experimental.

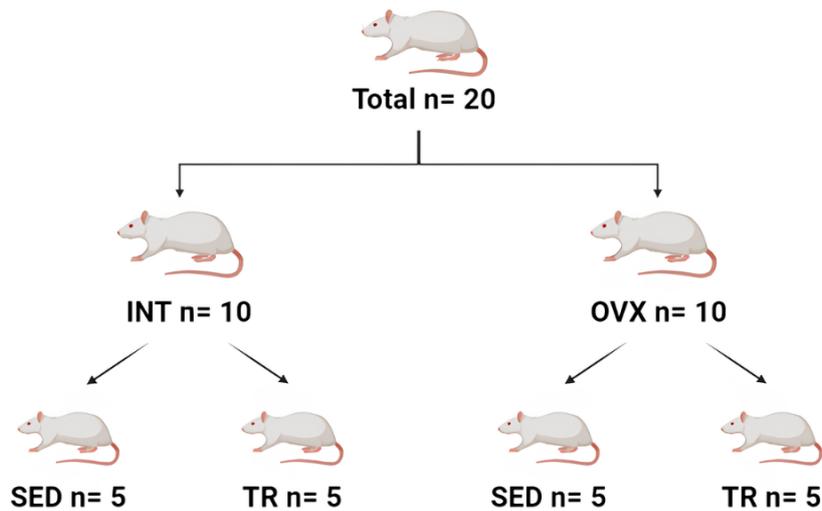
A massa corporal de cada animal foi verificada semanalmente, todas as sextas-feiras às 8h, utilizando uma balança eletrônica com precisão de 0,5 g (BEL Engineering®), após o período de aclimatação.

### 5.4 ATRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos de maneira randomizada em quatro grupos diferentes (n = 5 ratas por grupo). Em seguida foi realizado um sorteio utilizando o programa Excel (*Microsoft Corporation*) a partir da fórmula: =ALEATÓRIO (), para atribuição de cada grupo experimental.

- 1) Intacto Sedentário (INT - SED);
- 2) Intacto Treinamento Resistido (INT - TR);
- 3) Ovariectomizado Sedentário (OVX - SED);
- 4) Ovariectomizado Treinamento Resistido (OVX - TR).

**Figura 9** - Distribuição dos grupos experimentais.



Descrição - n: número de ratas; INT: intacto; OVX: ovariectomizado; SED: sedentário; TR: treinamento resistido. Fonte: Elaborado pelo autor (2024). Criado com BioRender.com.

## 5.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO – OVARIECTOMIA

Os animais do grupo OVX foram submetidos ao procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral com 13 semanas de vida (KALU, 1991), apresentando massa corporal média de  $281,9 \pm 13,6$  g. A anestesia foi realizada com associação de xilazina (10 mg/kg) e ketamina base (5 mg/kg), administrada por via intraperitoneal. Após a anestesia, as ratas foram colocadas na mesa cirúrgica em posição de decúbito lateral. Foi realizada uma pequena incisão (1,0 - 1,5 cm) através da pele e camada muscular, aproximadamente 1 cm abaixo da última costela, perpendicular ao corpo do animal, com o auxílio de tesoura e pinça cirúrgica. Após a incisão, a cavidade peritoneal foi aberta, os ovários foram localizados e expostos, e realizada uma ligadura com fio de poliéster (*Coats*) embebido em iodo logo abaixo da fimbria. Após a ligadura, os ovários foram removidos e as incisões na musculatura e pele foram suturadas com fio de seda estéril 4-0 (*Shalon Medical*). O procedimento cirúrgico foi realizado em ambos os lados da mesma forma. Ao final da cirurgia, foi administrado Pentabiótico® (0,1 mL/kg) por via intramuscular.

As ratas ficaram em observação pós-cirúrgica em gaiolas isoladas, para a recuperação da anestesia geral. Os animais dos grupos INT-SED e INT-TR, não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. O TR iniciou 1 semana após a cirurgia, o que segundo Brinton (2012) entre 1 a 2 semanas é o tempo adequado para o estrogênio atingir de níveis baixos a quase não detectáveis no plasma sanguíneo.

## 5.6 TREINAMENTO RESISTIDO (TR)

### 5.6.1 Familiarização ao Protocolo de TR

Foi proporcionado aos animais dos grupos treinados, sessões de familiarização ao protocolo de TR. A familiarização foi realizada durante três dias consecutivos, nos quais os animais deveriam escalar uma escada vertical com medida (1,1 m x 0,18 m), espaço entre degraus de (2 cm) e inclinação de (80°). Inicialmente, foram realizadas três escaladas: na primeira escalada, a rata era colocada próximo ao final da escada (1/3 superior); na segunda escalada, a rata era colocada a partir da metade da escada; e na terceira escalada, a rata era colocada no início da escada (1/3 inferior). Após as três escaladas iniciais, as ratas subiram mais três vezes, percorrendo toda a escada (total de 57 degraus) até o topo.

No primeiro dia de adaptação, as ratas realizaram todas as escaladas sem fita adesiva presa na cauda e sem o aparato de carga. No segundo dia de adaptação, as escaladas foram realizadas somente com a fita adesiva presa na cauda. No terceiro dia de adaptação, as escaladas foram realizadas com o aparato de carga vazio preso na cauda.

Os aparatos de carga foram desenvolvidos pelos pesquisadores do laboratório a partir de tubos de polipropileno do tipo *falcon* de 50 mL. As cargas utilizadas nos aparatos, foram constituídas de chumbos para pesca de diferentes tamanhos e massas (Figura 10). O aparato de carga era preso à porção proximal da cauda dos animais com o auxílio de fita adesiva (3M Brasil). Quando necessário, o pesquisador poderia aplicar um estímulo na ponta da cauda dos animais, utilizando os dedos polegar e indicador (formato de pinça) para que os mesmos iniciassem o movimento de escalada.

O tamanho total da escada permite que os animais realizem entre 8 a 12 movimentos em cada escalada. No topo da escada, há uma câmara de alojamento em formato de casa no tamanho (20 cm<sup>3</sup>), onde os animais após escalarem todos os degraus descansavam por 120 segundos.

**Figura 10** –Itens utilizados para a realização do TR.



Descrição - A: escada de treinamento; B: aparato de carga (tubos de polipropileno) unidos por barbante e uma haste de metal; C: pesos de diferentes massas. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 5.6.2 Determinação da carga máxima de carregamento (CMC)

Após a familiarização, foi determinada a carga máxima de carregamento (CMC) da seguinte forma: a primeira escalada foi determinada em 80% da massa corporal do animal; após 120 segundos de recuperação, a segunda escalada foi realizada com um acréscimo de peso em 30 g. Este padrão no acréscimo da carga (30 g) a cada escalada, foi repetido até atingir uma carga na qual a rata não conseguisse percorrer toda a escada. A maior carga carregada por todo o percurso da escada, foi considerada a CMC da rata.

A determinação da CMC foi realizada sempre na primeira sessão semanal (segunda-feira), iniciando com 80% da CMC e incluindo acréscimos de 30 g a cada escalada. Esta padronização para a determinação da CMC, foi realizada semanalmente durante todo o experimento.

### 5.6.3 Protocolo de TR

O protocolo de TR, foi desenvolvido a partir do modelo proposto por Hornberger e Farrar (2004) e adaptado por Queiroz (2017). As sessões de TR consistiam em 5 escaladas com cargas progressivas de 65%, 70%, 75%, 80% e 85% da CMC de cada animal, duas vezes na semana (quarta

e sexta-feira) às 13h, com intervalo de 48h entre as sessões (Tabela 1). Todas as sessões de treinamento foram realizadas na sala para procedimentos situada no LabFisioEx, com duração máxima de aproximadamente 2h, em ambiente escuro sob luz vermelha de 150W para melhor visualização dos pesquisadores. As sessões de treinamento foram realizadas sistematicamente durante 20 semanas, somando um total de 59 sessões de TR ao final do experimento. Na semana 20, foram realizadas a CMC e apenas uma sessão de TR (quarta-feira).

**Tabela 1** - Distribuição semanal do TR.

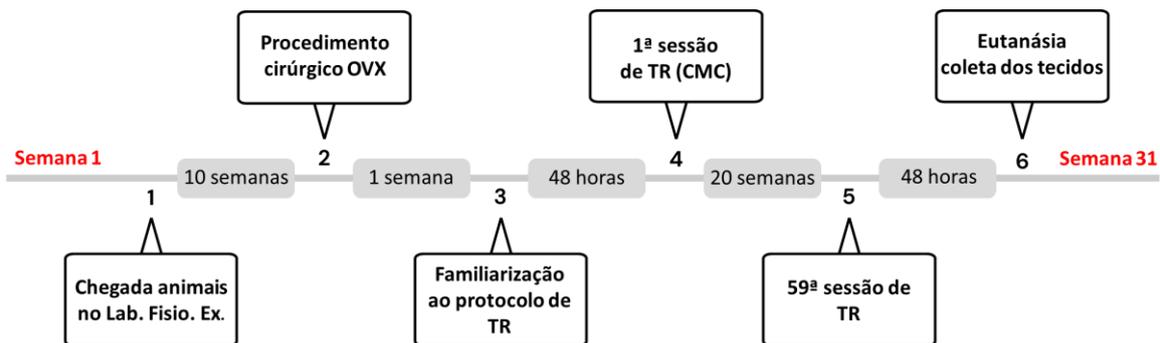
Grupos	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta
INT-TR	CMC	Descanso	Treino	Descanso	Treino
OVX-TR	CMC	Descanso	Treino	Descanso	Treino

Descrição - INT-TR: intacto treinamento resistido; OVX-TR: ovariectomizado treinamento resistido; CMC: carga máxima de carregamento. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

## 5.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A Figura 11 apresenta uma visão geral do planejamento experimental, detalhando todas as etapas desde a chegada dos animais ao biotério do LabFisioEx, até o momento da eutanásia e a coleta dos tecidos de interesse.

**Figura 11** - Planejamento experimental.



Descrição - *Timeline* dos procedimentos realizados a partir da chegada dos animais no biotério do LabFisioEx (semana 1), até a eutanásia e coleta dos tecidos (semana 31). OVX: ovariectomia; TR: treinamento resistido; CMC: carga máxima de carregamento. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

## 5.8 EUTANÁSIA, COLETA E ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS

Ao final do experimento, todos os animais foram eutanasiados de forma humanitária (ética e adequada) por método de decapitação, sob efeito sedativo inalatório com isoflurano (1 mL/100 g), com o objetivo de minimizar o sofrimento dos animais conforme as recomendações da Resolução Normativa CONCEA nº. 55 (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica, DBCA CONCEA, 2023). Os grupos treinados foram eutanasiados 48h após a última sessão de TR.

Os tecidos foram coletados imediatamente após a eutanásia, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados adequadamente em *freezer* (-80°C) para análises de expressão gênica. Os tecidos destinados à respirometria, foram encaminhados imediatamente em recipiente com reagente no gelo para a análise conforme protocolo estabelecido. Os tecidos escolhidos para as análises deste estudo foram o fígado e o músculo gastrocnêmio em sua porção vermelha (fibras do tipo I), devido à alta abundância de mitocôndrias e à intensa solicitação desse músculo no protocolo de treinamento estabelecido. O útero foi dissecado para comparação de massa e tamanho entre os grupos INT e OVX.

## 5.9 ANÁLISE DA FUNÇÃO RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

### 5.9.1 Retirada e preparação das amostras

Os tecidos (fígado e músculo gastrocnêmio porção vermelha) foram colocados imediatamente em solução de relaxamento e preservação da biópsia BIOPS: (tampão Ca-EGTA 10 mM, cálcio livre 0,1 µM, imidazol 20 mM, taurina 20 mM, K-MES 50 mM, DTT 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 6,56 mM, ATP 5,77 mM, fosfocreatina 15 mM, pH 7,1) por 5 minutos no gelo (LETELLIER *et al.*, 1992). Em seguida, os tecidos foram dissecados para proporcionar a retirada de duas amostras de cada tecido com massa úmida pesando em torno de 4 - 6 mg.

### 5.9.2 Permeabilização mecânica e química

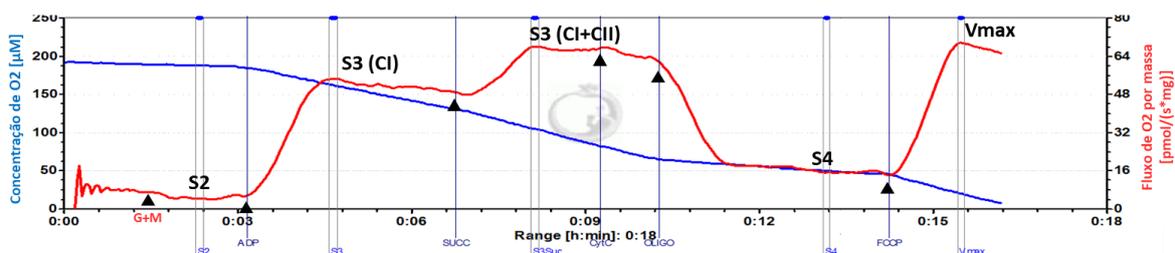
As amostras de cada tecido foram submetidas a um processo de permeabilização mecânica com o auxílio de uma pinça histológica e uma agulha de procedimento em uma placa de Petri no gelo. Em seguida, as amostras foram submetidas a um processo de permeabilização química durante 10 minutos em solução gelada de BIOPS, contendo saponina 5 mg/mL, sendo gentilmente agitadas em

câmara fria (no gelo). Na sequência, ainda em leve agitação os tecidos foram transferidos para uma solução respiratória mitocondrial número 5 (MiR05) 1 mL por 15 minutos (GNAIGER, 2012).

### 5.9.3 Análise da função respiratória

O consumo de oxigênio dos tecidos permeabilizados foi medido por meio da técnica de Respirometria de Alta Resolução (HRR) no oxígrafo OROBOROS® (Innsbruck, Áustria). As amostras foram colocadas em cubas separadas do equipamento (cubas A e B) em meio de análise respiratória mitocondrial MiR05 2 mL (EGTA 0,5 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 3 mmol/L, ácido lactobiônico 60 mmol/L, taurina 20 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/L, HEPES 20 mmol/L, sacarose 110 mmol/L, BSA 1 g/L, pH = 7,0). As titulações realizadas para a análise da respiração mitocondrial foram adaptadas do protocolo proposto por Kuznetsov *et al.* (2008), com as seguintes adições: 1- glutamato (G) 10 mmol/mL e malato (M) 5 mmol/mL em ambas as cubas para estimular a respiração de repouso (respiração de fuga ou Estado 2 [S2]); 2- adição de ADP 1 mmol/mL, para estimular o consumo de oxigênio pelos substratos do complexo I da cadeia respiratória (respiração acoplada ou Estado 3 CI [S3/CI]); 3- adição de succinato (Suc) 10 mmol/mL, para estimular o consumo de oxigênio pelos substratos dos complexos I e II da cadeia respiratória (Estado 3 CI + CII [S3/CI+CII]); 4- adição de citocromo c (c) 10 μmol/mL, para teste de integridade da membrana externa mitocondrial (TEPP *et al.*, 2011); 5- após o alcance do limiar máximo de estímulo e estabilização, adição de oligomicina (Omy) 1 μmol/mL, para inibir o complexo V da cadeia respiratória (respiração com vazamento experimental ou Estado 4 [S4]); 6- para finalizar a análise, foi adicionado carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenil hidrazona (FCCP) 2 μmol/mL, com o intuito de obter um estado respiratório experimentalmente não acoplado máximo (Vmax) para avaliação da capacidade respiratória através do sistema de transferência de e- (CHANCE; WILLIAMS, 1955; GNAIGER, 2012).

**Figura 12** - Titulação de Respirometria de Alta Resolução realizada em biópsia tecidual.



Descrição - Linha Azul: concentração de oxigênio da cuba; Linha Vermelha: velocidade de consumo de oxigênio pelo tecido (fluxo de O<sub>2</sub>/massa); G+M: glutamato + malato; ADP: adenosina difosfato; Succ: succinato; CytC: citocromo c; Oligo: oligomicina; FCCP: carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenil hidrazona; S2: estado 2; S3 (CI): estado 3; S3 (CI + CII): estado 3 com succinato; S4: estado 4; Vmax: estado respiratório não acoplado máximo. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

## 5.10 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

A análise de expressão gênica foi realizada por meio da quantificação do mRNA utilizando o procedimento de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de Transcrição Reversa (do inglês, RT-qPCR), realizada no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada e Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos presentes no campus da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

O experimento foi realizado seguindo as diretrizes de Informações Mínimas para Publicação de Experimentos Quantitativos de PCR em Tempo Real (MIQE), visando a confiabilidade, integridade e consistência dos resultados obtidos, assim aumentando a transparência experimental (BUSTIN *et al.*, 2009).

### 5.10.1 Cuidados gerais

Para evitar a presença de ácidos ribonucleases (RNAses) e outras possíveis contaminações dos tecidos analisados, cuidados foram adotados durante todo o experimento incluindo a esterilização por autoclavagem de microtubos, ponteiras, materiais cirúrgicos e vidrarias; limpeza constante de todas as superfícies incluindo bancada, equipamentos e pipetas com a utilização de etanol 70%, água destilada e agente de descontaminação de superfícies (*RNaseZap - Invitrogen™*); manipulação de todos os procedimentos sob a utilização de luvas descartáveis e máscara; e todos os experimentos foram realizados em capela de exaustão em ambiente controlado.

### 5.10.2 Extração e purificação do RNA total

A extração e purificação do RNA total, foi realizada conforme o TRI Reagent Protocol: 50 mg de tecido (fígado e gastrocnêmio porção vermelha) foram colocados em microtubo 2 mL com tampa de rosca (*FastPrep*) contendo 3 *beads* de aço inox 3 mm (*Lysing Matrix S, Bulk, MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA*) em 1 mL de TRI Reagent® (Sigma, USA). As amostras foram homogeneizadas na *FastPrep®- 24 Classic Instrument (MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA)* em rotação de 30 segundos, com intervalos de 1 minuto com os microtubos imersos no gelo. Este procedimento foi repetido 3 vezes, totalizado 3 rotações de 30 segundos com 2 intervalos de 1 minuto no gelo. Após a homogeneização completa, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi adicionado clorofórmio 200 µL, seguido de agitação por 15 segundos no Vórtex (K45-2810, KASVI, BR) e incubação de 3 minutos em temperatura ambiente. Após isso,

as amostras foram centrifugadas (Sigma 1-14k, *Sigma Laborzentrifugen, Alemnha*) a 12.000 x g por 15 minutos a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante (fase aquosa superior contendo RNA) foi retirado cuidadosamente com pipeta e transferido para um microtubo 1,5 mL tipo *ependorf* vazio sendo adicionado isopropanol 500 µL. As amostras foram agitadas manualmente e permaneceram encubadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos a uma temperatura de 4 °C para a precipitação do RNA e formação do *pellet* no fundo do tubo. O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente de forma manual em recipiente de descarte apropriado, sendo acrescentado etanol 75% 1000 µL em cada amostra para lavagem do *pellet*. Novamente o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o microtubo colocado para secagem entre 5 e 10 minutos em ar ambiente, tomando os devidos cuidados para o *pellet* secar adequadamente sem contaminação. Após secagem completa, foi adicionado água tratada com DEPC (*Invitrogen*) 20 µL, as amostras foram quantificadas e posteriormente armazenadas adequadamente em *freezer* a -80 °C.

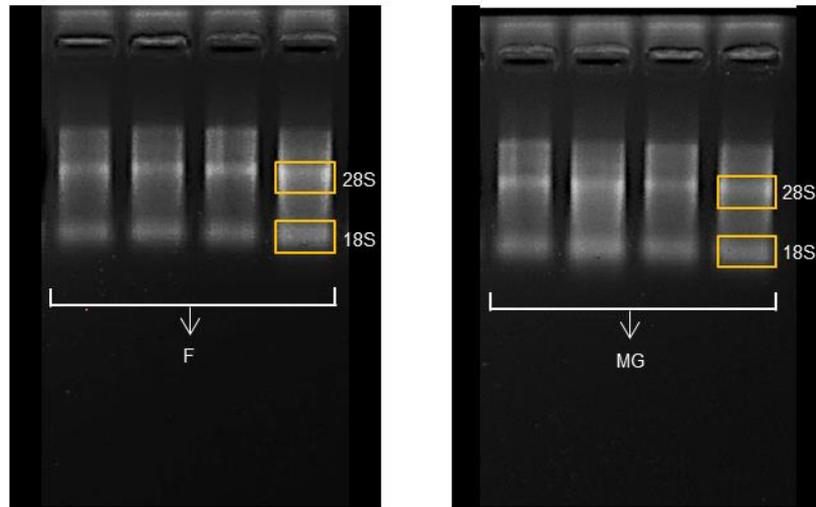
### 5.10.3 Quantificação do RNA total

A análise quantitativa do RNA presente nas amostras, foi realizada por meio do método de espectrofotometria utilizando o NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*™) para determinar a absorvância nos comprimentos de onda a 260 nm e 280 nm. O grau de pureza das amostras em relação à contaminação por proteínas foi determinado pela razão  $A_{260/280}$ , considerando adequados os valores entre 1,9 a 2,1. Em relação a outros agentes contaminantes, o grau de pureza foi determinado pela razão  $A_{260/230}$ , considerando adequados os valores entre 1,5 a 1,8.

### 5.10.4 Integridade do RNA total

A integridade do RNA total foi confirmada por meio da técnica de eletroforese, visualizando as bandas ribossomais 28S e 18S sob luz ultravioleta em gel de agarose desnaturante 1,2%. As amostras foram coradas utilizando brometo de etídio (Figura 13).

**Figura 13** – Eletroforese.



Descrição - Exemplo de eletroforese em gel de agarose (1,2%) indicando a integridade do RNA total. F: fígado; MG: músculo gastrocnêmio porção vermelha; 28S e 18S: bandas ribossomais. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 5.10.5 Transcrição reversa – DNA Complementar (cDNA)

Para eliminar possíveis moléculas de DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I, Amplification Grade (*Invitrogen Corporation*) seguindo as especificações do fabricante.

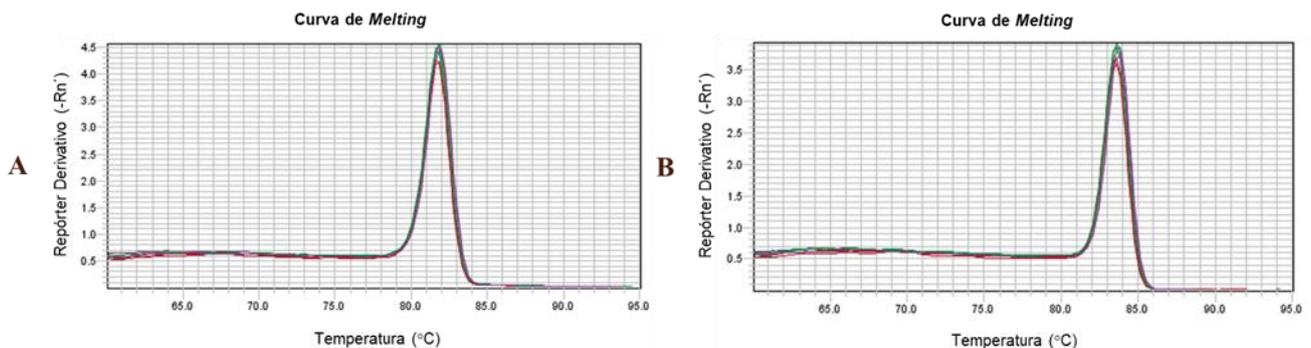
Em um microtubo de 0,2 mL foram adicionados: RNA (a quantidade foi obtida a partir do cálculo: 2000/quantidade de RNA na amostra); Buffer com  $MgCl_2$  10X 1  $\mu$ L; DNase I 1  $\mu$ L; água tratada com DEPC (a quantidade de água foi de acordo com cada amostra) completando no total 10  $\mu$ L no microtubo. Em seguida, as amostras ficaram encubadas em temperatura ambiente (25 °C) por 15 minutos. Logo após, foi adicionado EDTA 1  $\mu$ L e as amostras foram levadas ao Termociclador C1000™ Thermal Cycler (*Bio-Rad*) por 10 minutos a 65 °C. Foram adicionadas: água tratada com DEPC 4,2  $\mu$ L; e Primer Oligo dT (*Exxtend*) 1  $\mu$ L. Novamente as amostras foram levadas ao Termociclador por 5 minutos a 65 °C. A seguir foram adicionados: 10X RT Random Primers 1  $\mu$ L; 10X RT Buffer 2  $\mu$ L; 25X dNTP mix 0,8  $\mu$ L; e Transcriptase Reversa (*Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific*) 1  $\mu$ L. A síntese de cDNA foi feita a 25 °C por 10 minutos, depois a 37 °C por tempo total de 120 minutos. A reação foi paralisada por meio de incubação a 85 °C por 5 minutos.

### 5.10.6 Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real (qPCR)

Para as reações de qPCR foram utilizadas microplacas de 0,1 mL *MicroAmp<sup>®</sup> Fast 96-well* (*Applied Biosystems<sup>®</sup>*) contendo 96 poços livre de RNase com tampa plástica adesiva que permite a passagem de luz. Em cada poço foram colocados os seguintes reagentes: mix *Primer (Forward / Reverse)* 3 µL com sua concentração eficiente previamente ajustados; cDNA 3 µL; *GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix* (Promega) 6 µL.

As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 2 minutos a uma temperatura de 25 °C e logo em seguida processadas no sistema de detecção por PCR em tempo real *QuantStudio<sup>™</sup> 6 Flex* (*Applied Biosystems*). O programa de ciclagem térmica foi determinado em 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A curva de *melting* foi determinada por meio da variação da temperatura em 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos. Após a corrida, a temperatura de *melting* foi analisada para verificar uma possível formação de dímeros ou amplificações inespecíficas, representadas pelo aparecimento de mais de um pico (Figura 14). As amostras foram amplificadas em duplicatas e em todas as análises foram feitos controles negativos (NTC), com água estéril substituindo a amostra.

**Figura 14** - Curva de *melting*.



Descrição - Exemplo de uma curva de *melting* utilizada para determinar a especificidade do produto amplificado. A: fígado; B: músculo gastrocnêmio porção vermelha. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

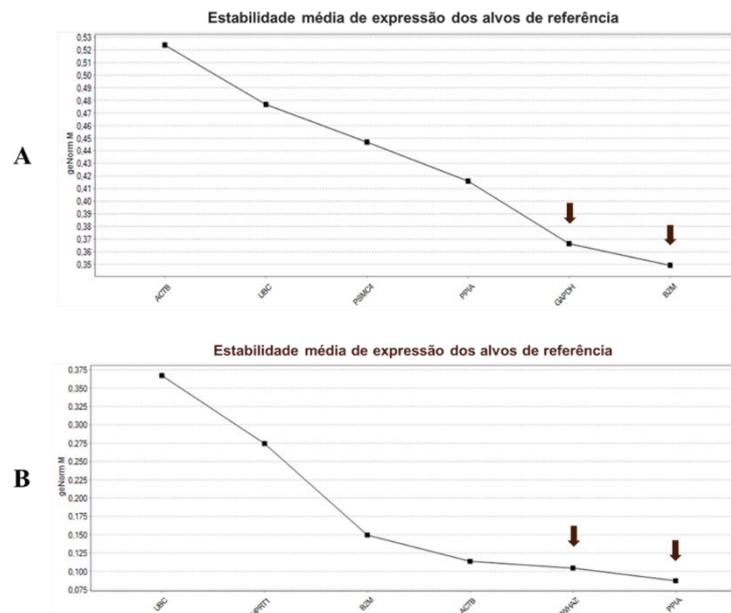
A análise comparativa dos resultados foi baseada na derivação da fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os dados de  $C_q$  foram exportados e analisados em planilha do programa Excel (*Microsoft Corporation*). O  $\Delta C_q$  foi calculado a partir da fórmula ( $C_q$  do gene alvo -  $C_q$  dos genes de referência). O  $\Delta\Delta C_q$  foi calculado utilizando a subtração de  $\Delta C_q$  pela média de  $\Delta C_q$  do grupo controle (INT-SED). O negativo deste resultado ( $-\Delta\Delta C_q$ ) é então elevado à potência de 2 ( $2^{-\Delta\Delta C_q}$ ).

### 5.10.7 Sintetização, concentração e eficiência dos *Primers*

Todos os genes analisados, foram obtidos por meio de pesquisa utilizando o site *National Center for Biotechnology Information* – NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Posteriormente, foi utilizado o site *Integrated DNA Technologies* - IDT ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)) para sintetizar os *primers*, sendo realizado um ensaio com cada gene para verificar e confirmar sua especificidade, comparando as sequências sintetizadas com um banco de dados, utilizando o algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Os *primers* foram sintetizados levando em consideração alguns parâmetros essenciais como quantidade de nucleotídeos, bases nitrogenadas de guanina e citosina (G/C) e temperatura de *melting*. Todos os *primers* foram adquiridos da empresa *Exxtend* (Paulínia/SP) e suas sequências são apresentadas na Tabela 2 e Figura 3.

Os genes de referência para controle endógeno foram selecionados a partir do cálculo geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Nesse processo, foi conduzida uma análise utilizando seis candidatos a gene de referência específicos para cada tecido. Depois, os dados gerados foram submetidos no programa qbase+, que emprega o algoritmo geNorm para identificar os melhores genes de referência entre os seis candidatos previamente selecionados. A Figura 15, representam as análises realizadas no qbase+ e os genes de referência endógenos selecionados para cada tecido.

**Figura 15** – Estabilidade média de expressão dos genes de referência no fígado e músculo gastrocnêmio.



Descrição - Análise de estabilidade dos candidatos a gene de referência por meio do algoritmo geNorm. A: músculo gastrocnêmio (*B2m*: Beta-2 microglobulina e *Gapdh*: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase); B: fígado (*Ppia*: Peptidilprolil isomerase A e *Ywhaz*: Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, zeta). As setas pretas representam os dois genes com maior estabilidade que foram recomendados pelo algoritmo de acordo com cada tecido analisado. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Tabela 2** - Sequência dos genes de referência do fígado e músculo gastrocnêmio.

Tecido	Gene	RefSeq	Primer F/R	C (nM)	E (%)
Gastro	<i>Gapdh</i>	NM_017008.4	F: TCCAGTATGACTCTACCCACG	100	96,06
			R: CACGACATACTCAGCACCAG	100	
Gastro	<i>B2m</i>	NM_012512.2	F: CGAGACCGATGTATATGCTTGC	100	102,99
			R: CCGGATCTGGAGTTAAACTGG	100	
Fígado	<i>Ppia</i>	NM_017101.1	F: GAAGATCACCATCTCCGACTG	150	105,20
			R: GTGAGAGCAGAGATTACAGGG	150	
Fígado	<i>Ywhaz</i>	NM_013011.4	F: AGAGTCGTACAAAGACAGCAC	150	95,98
			R: GAATGAGGCAGACAAAGGTTG	150	

Descrição - Genes de referência do músculo gastrocnêmio: *Gapdh*: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; *B2m*: Beta-2 microglobulina. Genes de referência do fígado: *Ppia*: Peptidilprolil isomerase A; *Ywhaz*: Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, zeta. RefSeq: sequências de referência. F: *forward*. R: *reverse*. C: concentração. nM: nanomolar. E: eficiência. Fonte: Elaborado pelo grupo de pesquisadores LabFioEx, (2023).

Os genes alvo utilizados nas análises de RT-qPCR, foram selecionados com base nos objetivos do nosso estudo. Para analisar a expressão gênica da CTE, escolhemos os genes *CI*, *CII*, *CIII* e *CIV*. Também escolhemos os genes da *Atps*, *Pic*, *Ant1* e *Ucps 2* e *3*, que em conjunto com os complexos da CTE, representam as principais proteínas envolvidas no processo de OXPHOS. Para entender o comportamento do metabolismo glicolítico, escolhemos os genes da *Mpc1* e *Ldha*. Para analisar o *crossstalk* entre o fígado e músculo esquelético em nível mitocondrial, escolhemos analisar a expressão do gene *Mots-c* e *Ampka2*, que desempenha um papel central nessa comunicação. A expressão do gene *Cs* foi analisada com o propósito de contribuir em conjunto com a avaliação de sua atividade, fornecendo dados relevantes sobre o conteúdo mitocondrial e a normalização dos dados da respirometria. Além disso, com o objetivo de analisar a interferência da redução do estrogênio na expressão de seu próprio receptor, escolhemos analisar a expressão gênica do *Esr1- $\alpha$*  por ser a principal isoforma envolvida na regulação do equilíbrio energético (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013).

Todos os genes alvo analisados juntamente com suas respectivas sequências, concentrações e eficiências, estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Sequência dos genes alvo.

Gene	RefSeq	Primer F/R	C (nM)	E (%)
<i>CI</i>	NM_001005550.1	F: CGGCTTAAACGGGAGTATCTG	150	100,83
		R: AAAGTGAGTTCCTGGGAGTGG	150	
<i>CII</i>	NM_001005534.1	F: TGTAAGAACATCAGAGCTGCG	150	96,18
		R: CCCCTGTCAAACGTCTTCAG	150	
<i>CIII</i>	NM_001008888.1	F: CCTTCAACATCTCCTACTCTGAG	150	99,70
		R: TTTTGCCCCGAGTCACC	150	
<i>CIV</i>	NM_017202.1	F: TTCGCTGAGATGAACAAGGG	150	94,40
		R: GATCAAAGGTATGAGGGATGGG	150	
<i>Atps</i>	NM_023093.1	F: ATGTGGGCTTGCTGTGTC	150	98,07
		R: AGCATCCAGATCAGAACCAAAC	150	
<i>Pic</i>	NM_139100.2	F: TCTACTTCAGGCTCCCTCG	150	103,73
		R: TTCCTTTGCACTTTCAACTG	150	
<i>Ant1</i>	NM_053515.2	F: TTTCAGTGCTCTGTGCAGG	150	104,27
		R: GTCACACTCTGGCAATCAT	150	
<i>Ucp2</i>	NM_019354.3	F: GCCCCGAACCTTCTACAAG	300	96,48
		R: ATTCATAGGCAGCCATCAGG	300	
<i>Ucp3</i>	NM_013167.2	F: CCCCACAGCCTTCTACAAAG	150	98,40
		R: TGCTTGCCITGTTCAAAATGG	150	
<i>Cs</i>	XM_039078325.1	F: AAGGAAAGGCTAAGAACCCC	150	95,37
		R: ATTCATCTCCGTCATGCCATAG	300	
<i>Esr1-a</i>	NM_012689.1	F: GTGTAACGACTATGCCTCTGG	150	96,90
		R: CTCCGTTCTTATCGATGGTG	150	
<i>Mpc1</i>	NM_133561.2	F: CTTCTGTTGCGTGCCATG	150	96,19
		R: ACTGTCCCTTTCAAGAGCTG	150	
<i>Mots-c</i>	Não tem	F: ATGAAGCGGAAAGAAATGGG	150	95,27
		R: TCGTAATGTICTCTGGGAAA	150	
<i>Ldha</i>	NM_017025.2	F: TCTCCCTGAAGTCTCTGAACC	150	95,23
		R: GGATGTGTAACCTTTCAGCTTG	150	
<i>Ampka2</i>	NM_023991.2	F: CCAGAGCAAACCATACGACA	150	96,00
		R: TCACGTAATTGCCAGTCACTG	150	

Descrição - *CI*: NADH-desidrogenase; *CII*: Succinato desidrogenase; *CIII*: Ubiquinona: citocromo c oxidoreductase; *CIV*: Citocromo c oxidase; *Atps*: ATP-sintase; *Pic*: Carreador de fosfato; *Ant1*: Adenina nucleotídeo translocase 1; *Ucp2*: Proteína de desacoplamento 2; *Ucp3*: Proteína de desacoplamento 3; *Cs*: Citrato sintase; *Esr1-a*: Receptor de estrogênio 1; *Mpc1*: Transportador de piruvato mitocondrial 1; *Mots-c*: Quadro de leitura aberta mitocondrial do 12S rRNA-c; *Ldha*: Lactato desidrogenase A; *Ampka2*: Proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica alfa 2. RefSeq: sequências de referência. F: *forward*. R: *reverse*. C: concentração. nM: nanomolar. E: eficiência. Fonte: Elaborado pelo grupo de pesquisadores LabFioEx (2023).

A concentração de cada *primer* utilizado na análise, foi testada a partir de uma matriz pré-estabelecida (Figura 17). Foi padronizada uma primeira concentração (150/150 nM) para realizar o teste de eficiência. Caso a reação não obtivesse sucesso, um novo teste a partir de outras concentrações era realizado.

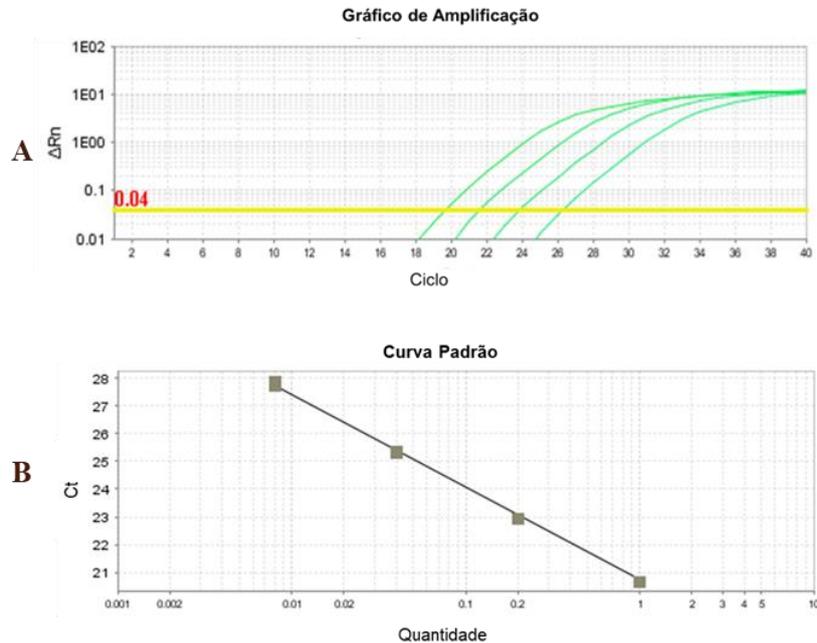
**Figura 17** - Matriz para padronização da concentração dos *primers*.

		<i>Primer Reverse</i> (nM)		
		100	150	300
<i>Primer Forward</i> (nM)	100	100/100	100/150	100/300
	150	150/100	150/150	150/300
	300	300/100	300/150	300/300

Descrição - Exemplo da matriz utilizada para padronização da concentração dos *primers forward* e *reverse* em nanomolar (nM). Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Para avaliar a eficiência das reações, foram realizadas diluições seriadas de amostras do grupo controle INT-SED (Figura 18 A), sendo indicada pela inclinação (*slope*) da curva padrão. Uma reação com 100% de eficiência resulta em uma curva padrão com *slope* de -3,32. A eficiência de amplificação é dada pela fórmula  $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ . Outros parâmetros como  $R^2$  e Y- intercept (ponto em que a curva corta o eixo Y) também são obtidos neste experimento e foram cuidadosamente avaliados (Figura 18 B). Para ser considerado “eficiente”, um *primer* deve apresentar valores entre 90-110% (KAVANAGH; JONES; NAYAB, 2011). Porém, em nossas análises buscamos manter valores de eficiência entre 95-105% garantindo uma eficiência adequada.

**Figura 18** - Diluição seriada e curva padrão.



Descrição - A: diluições seriadas (1/5); B: curva padrão utilizada para determinação da eficiência dos *primers*. O valor de eficiência deve estar entre 90 e 110%. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 5.11 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE (CS)

A atividade da enzima citrato sintase, foi avaliada por método colorimétrico baseado na medição da absorbância em 412 nm devido à presença do ácido tionitrobenzóico (TNB), produto formado pela reação entre 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e CoA-SH (SHEPHERD; GARLAND, 1969). Cerca de 20 mg de tecido, foi homogeneizado em 20  $\mu$ L/mg de um tampão composto por Tris-HCl (pH = 7,4) 10 mM, EDTA 1 mM, Triton X -1000 1% (v/v). Logo após, o homogeneizado foi centrifugado a 2000 g por 3 minutos, 5  $\mu$ L do sobrenadante foi separado e adicionado em 195  $\mu$ L de uma solução composta por Tris-HCl (pH = 8,0) 10 mM, acetil-CoA 50  $\mu$ M, ácido oxaloacético 250  $\mu$ M e DTNB 100  $\mu$ M. As reações em triplicata foram incubadas a 37 °C por 20 minutos, com absorbância a 412 nm sendo registrada a cada 40 segundos em um leitor de microplacas (*Power Wave XS-2, Biotek Instruments, Winooski, EUA*).

### 5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

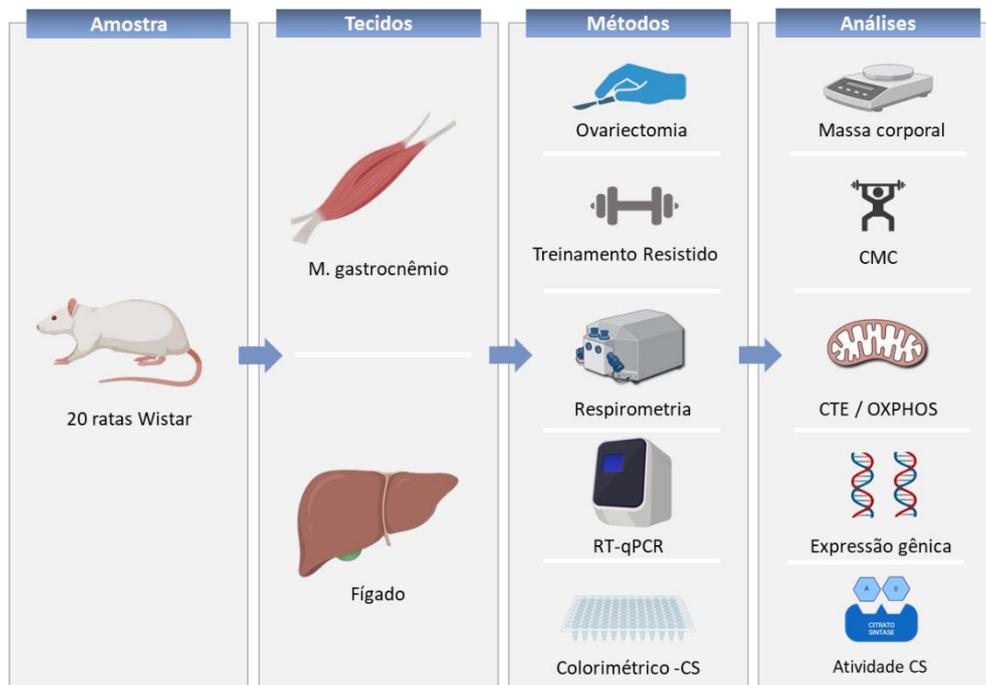
Os dados coletados foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Posteriormente foi realizada a análise de variância ANOVA *One-Way*, seguida do teste *Post-hoc* de *Fisher* para comparações múltiplas com o nível de significância estatística ( $p < 0,05$ ). Para

comparação da CMC e massa corporal dos animais, também foi utilizado o teste *t de Student*, considerando o nível de significância estatística ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram apresentados por média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Para as análises estatística e plotagem dos gráficos foram utilizados os *softwares*: STATISTICA 7 e GraphPad Prism 8 para *Windows*.

### 5.13 RESUMO DA METODOLOGIA

A Figura 19, ilustra de maneira geral a sumarização da metodologia utilizada no presente estudo.

**Figura 19** – Sumarização da metodologia utilizada no estudo.



Descrição - RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real; CS: citrato sintase; CTE: cadeia transportadora de elétrons; OXPHOS: fosforilação oxidativa. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 EVOLUÇÃO PONDERAL DA MASSA CORPORAL E MASSA UTERINA

Conforme apresentado na Tabela 3, a massa corporal dos animais foi verificada semanalmente com o objetivo de comparar os efeitos das intervenções entre os grupos, sendo observado um aumento progressivo da massa até a semana final. Na comparação intragrupos, o grupo INT-SED apresentou

diferença significativa na semana final quando comparado com a semana pré-operatória e a semana 5 ( $p = 0,0078$  e  $p = 0,0121$ , respectivamente). Ambos os grupos ovariectomizados, apresentaram diferença significativa na semana final em relação à semana pré-operatória, semana 5 e semana 10 (OVX-SED,  $p = 0,0353$ ,  $p = 0,0001$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente) e (OVX-TR,  $p = 0,0165$ ,  $p = 0,0411$  e  $p = 0,0180$ , respectivamente).

Na comparação entre grupos (Tabela 3), a partir da semana 5 foi observada diferença significativa entre os grupos intactos e ovariectomizados, indicando um aumento progressivo da massa corporal dos animais a partir da cirurgia. Na semana final, o grupo INT-SED foi significativamente menor em comparação com os grupos (OVX-SED,  $p = 0,0157$ ) e (OVX-TR,  $p = 0,0287$ ). O mesmo foi observado no grupo INT-TR em comparação com os grupos (OVX-SED,  $p = 0,0246$ ) e (OVX-TR,  $p = 0,0442$ ).

O Delta ( $\Delta$ ) foi utilizado para correção da massa corporal dos animais (Tabela 3), sendo obtido por meio do cálculo:  $\Delta = MCF - MCI$ , onde MCF é a massa corporal final e MCI é a massa corporal inicial. Foi observada diferença significativa entre o grupo INT-SED e os grupos (OVX-SED,  $p = 0,0001$  e OVX-TR,  $p = 0,0045$ ) e INT-TR e os grupos (OVX-SED,  $p = 0,0001$  e OVX-TR,  $p = 0,0001$ ). Também foi observada diferença estatística entre os grupos OVX-SED e OVX-TR com  $p = 0,0102$ . O grupo OVX-SED apresentou o maior valor da massa corporal ( $\Delta = 72,0 \pm 10,7$ ), enquanto o grupo INT-TR obteve o menor valor ( $\Delta = 12,8 \pm 3,3$ ). Isso indica que a ovariectomia promoveu um aumento significativo da massa corporal, e que o treinamento físico foi uma intervenção eficaz no controle desse aumento.

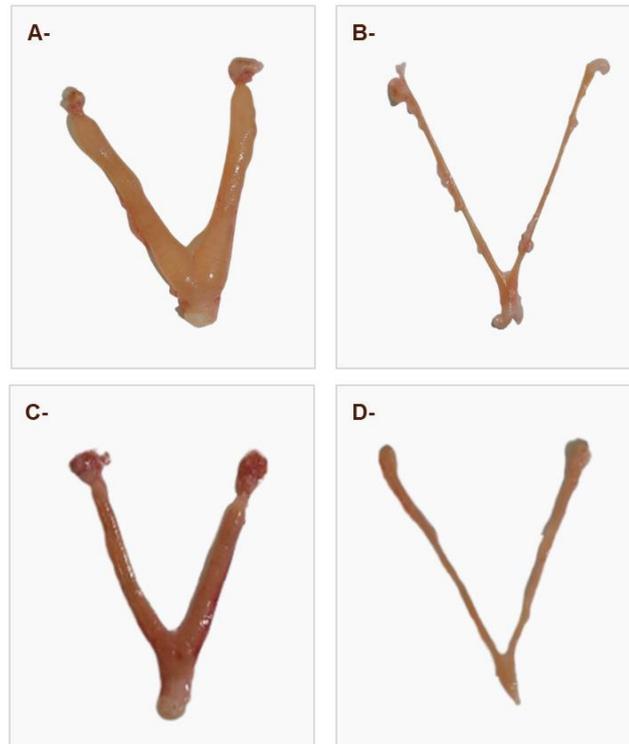
**Tabela 3** - Evolução ponderal da massa corporal e massa uterina em gramas (g).

Grupos	Massa corporal (g)						Massa útero final (g)
	Pré-operatória	Semana 5	Semana 10	Semana final	$\Delta$ (MCF - MCI)	Aumento (%)	
INT-SED	261,0 $\pm$ 11,9 <sup>a</sup>	265,8 $\pm$ 9,3 <sup>a,c</sup>	272,6 $\pm$ 13,1 <sup>a,c</sup>	285,6 $\pm$ 10,0 <sup>*,#,a,c</sup>	24,6 $\pm$ 13,0 <sup>a,c</sup>	20,7%	0,88 $\pm$ 0,08 <sup>&amp;,+</sup>
INT-TR	276,8 $\pm$ 19,5	279,0 $\pm$ 21,8 <sup>a,c</sup>	284,4 $\pm$ 18,9 <sup>a,c</sup>	289,6 $\pm$ 20,4 <sup>a,c</sup>	12,8 $\pm$ 3,3 <sup>a,c</sup>	12,9%	0,86 $\pm$ 0,06 <sup>&amp;,+</sup>
OVX-SED	285,4 $\pm$ 11,5	333,4 $\pm$ 15,0 <sup>*</sup>	354,8 $\pm$ 16,2 <sup>*,c</sup>	357,4 $\pm$ 18,1 <sup>*</sup>	72,0 $\pm$ 10,7	36,2%	0,17 $\pm$ 0,04
OVX-TR	280,6 $\pm$ 16,6	313,4 $\pm$ 25,1 <sup>*</sup>	324,4 $\pm$ 28,5 <sup>*</sup>	330,4 $\pm$ 31,3 <sup>*</sup>	49,8 $\pm$ 16,8 <sup>a</sup>	27,9%	0,22 $\pm$ 0,03

Descrição - Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomizado sedentário; OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos representam a diferença estatística entre as semanas por *test t* de *student* com ( $p < 0,05$ ), (\*) diferença significativa para a semana pré-operatória; (#) diferença significativa para a semana 5; (\$) diferença significativa para a semana 10. As letras representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ), (a) diferença significativa para o grupo (OVX-SED); (b) diferença significativa para o grupo (INT-TR) e (c) diferença significativa para o grupo (OVX-TR). O  $\Delta$  foi realizado a partir da subtração da MCF (massa corporal final) pela MCI (massa corporal inicial). A diferença estatística da massa uterina, é representada pelos símbolos: (&) diferença estatística para o grupo (OVX-SED) e (+) diferença estatística para o grupo (OVX-TR). Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A massa uterina permite analisar indiretamente a eficácia da ovariectomia e o impacto da redução estrogênica nos animais. Conforme esperado, os grupos ovariectomizados apresentaram redução significativa na massa uterina quando comparados com o grupos intactos (Tabela 3). A massa uterina do grupo OVX-SED foi significativamente menor quando comparada aos grupos (INT-SED,  $p = 0,0001$  e INT-TR,  $p = 0,0001$ ). O mesmo ocorreu para o grupo OVX-TR em relação aos grupos (INT-SED,  $p = 0,0001$  e INT-TR,  $p = 0,0001$ ). Além da redução na massa uterina em gramas, também foi observada atrofia tecidual nos animais ovariectomizados conforme apresentado na Figura 20.

**Figura 20** – Comparação do tecido uterino entre os grupos.



Descrição - A: grupo intacto sedentário; B: grupo ovariectomizado sedentário; C: grupo intacto treinado; D: grupo ovariectomizado treinado. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

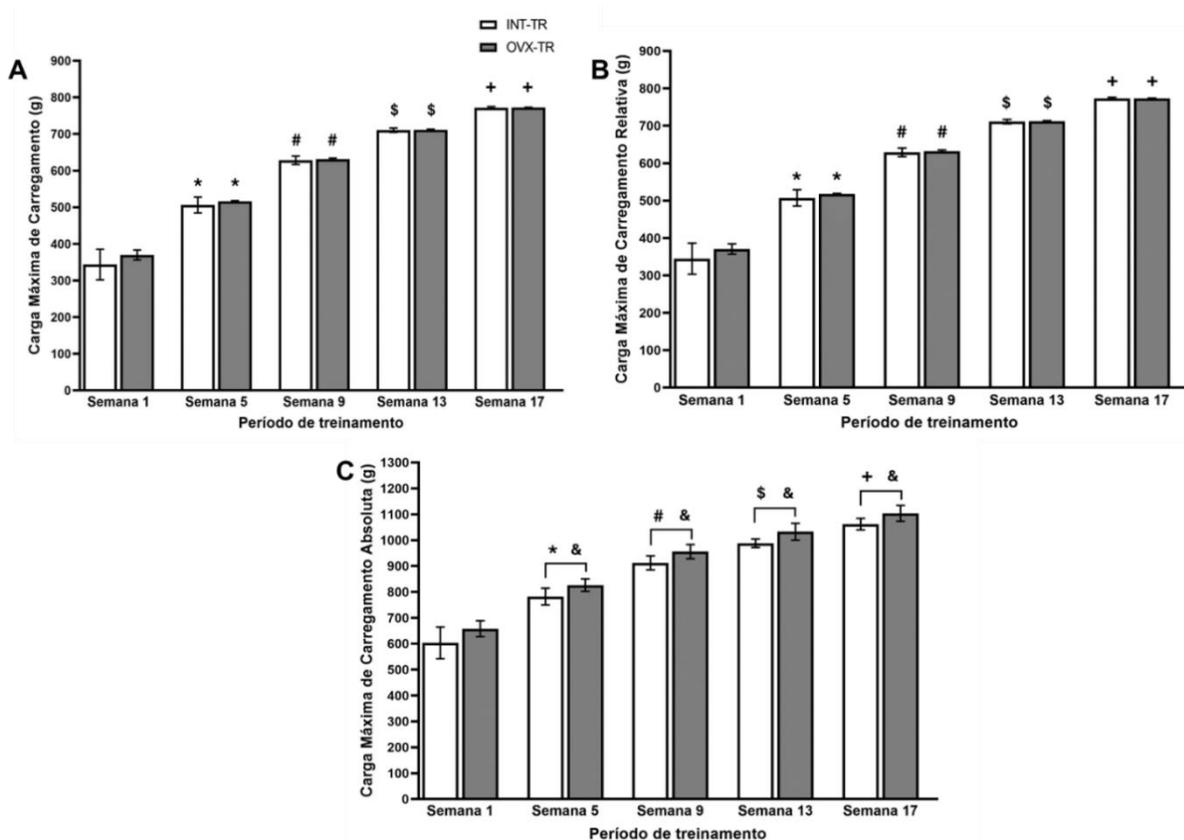
## 6.2 CARGA DE CARREGAMENTO DO TR

Na Figura 21A, é apresentado a evolução da carga máxima de carregamento (CMC) em gramas, da semana 1 até a semana 17. Não foi observada diferença estatística na CMC entre os grupos treinados (INT-TR e OVX-TR). No entanto, ambos os grupos apresentaram evolução progressiva na CMC entre a semana 1 (356,6 g) e semana 5 (511,3 g) com  $p = 0,0001$ ; semana 5 (511,3 g) e semana 9 (629,8 g) com  $p = 0,0001$ ; semana 9 (629,8 g) e semana 13 (710,8 g) com  $p = 0,0001$ ; semana 13 (710,8 g) e semana 17 (771,9 g) com  $p = 0,0001$ .

Na Figura 21B, é apresentado a evolução da carga máxima de carregamento relativa (CMCR) em gramas. A CMCR, foi obtida por meio do cálculo:  $CMCR = \frac{CMC + MC}{MC}$ , onde MC é a massa corporal. Não foi observada diferença estatística entre os grupos treinados (INT-TR e OVX-TR). Entretanto, foi observada diferença estatística em ambos os grupos na evolução da CMCR entre a semana 1 (357,6 g) e semana 5 (512,3 g) com  $p = 0,0001$ ; semana 5 (512,3 g) e semana 9 (630,8 g) com  $p = 0,0001$ ; semana 9 (630,8 g) e semana 13 (711,8 g) com  $p = 0,0001$ ; semana 13 (711,8 g) e semana 17 (772,9 g) com  $p = 0,0001$ .

Na Figura 21C, é apresentado a evolução da carga máxima de carregamento absoluta (CMCA) em gramas. A CMCA, foi obtida por meio do cálculo:  $CMCA = CMC + MC$ . Foi observada diferença estatística entre os grupos treinados (INT-TR e OVX-TR) na semana 5 ( $p = 0,0394$ ), semana 9 ( $p = 0,0357$ ), semana 13 ( $p = 0,0266$ ) e semana 17 ( $p = 0,0384$ ). Também foi observada diferença estatística em ambos os grupos na evolução da CMCA entre a semana 1 (630,6 g) e semana 5 (804,1 g) com  $p = 0,0001$ ; semana 5 (804,1 g) e semana 9 (934,2 g) com  $p = 0,0001$ , semana 9 (934,2 g) e semana 13 (1010,3 g) com  $p = 0,0001$ ; semana 13 (1010,3 g) e semana 17 (1082,7 g) com  $p = 0,0001$ .

**Figura 21** – Evolução da carga de carregamento (CMC, CMCR e CMCA).



Descrição - INT-TR: intacto treinamento resistido; OVX-TR: ovariectomizado treinamento resistido. A: Carga Máxima de Carregamento (gramas). B: Carga Máxima de Carregamento Relativa (gramas). C: Carga Máxima de Carregamento Absoluta (gramas). Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística por *test t* de *student* entre os grupos treinados e as semanas 1,5,9,13 e 17 com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para a semana 1; (#) diferença significativa para a semana 5; (\$) diferença significativa para a semana 9; (+) diferença significativa para a semana 13; (&) diferença significativa entre os grupos INT-TR e OVX-TR. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

## 6.3 ANÁLISES DE RESPIROMETRIA

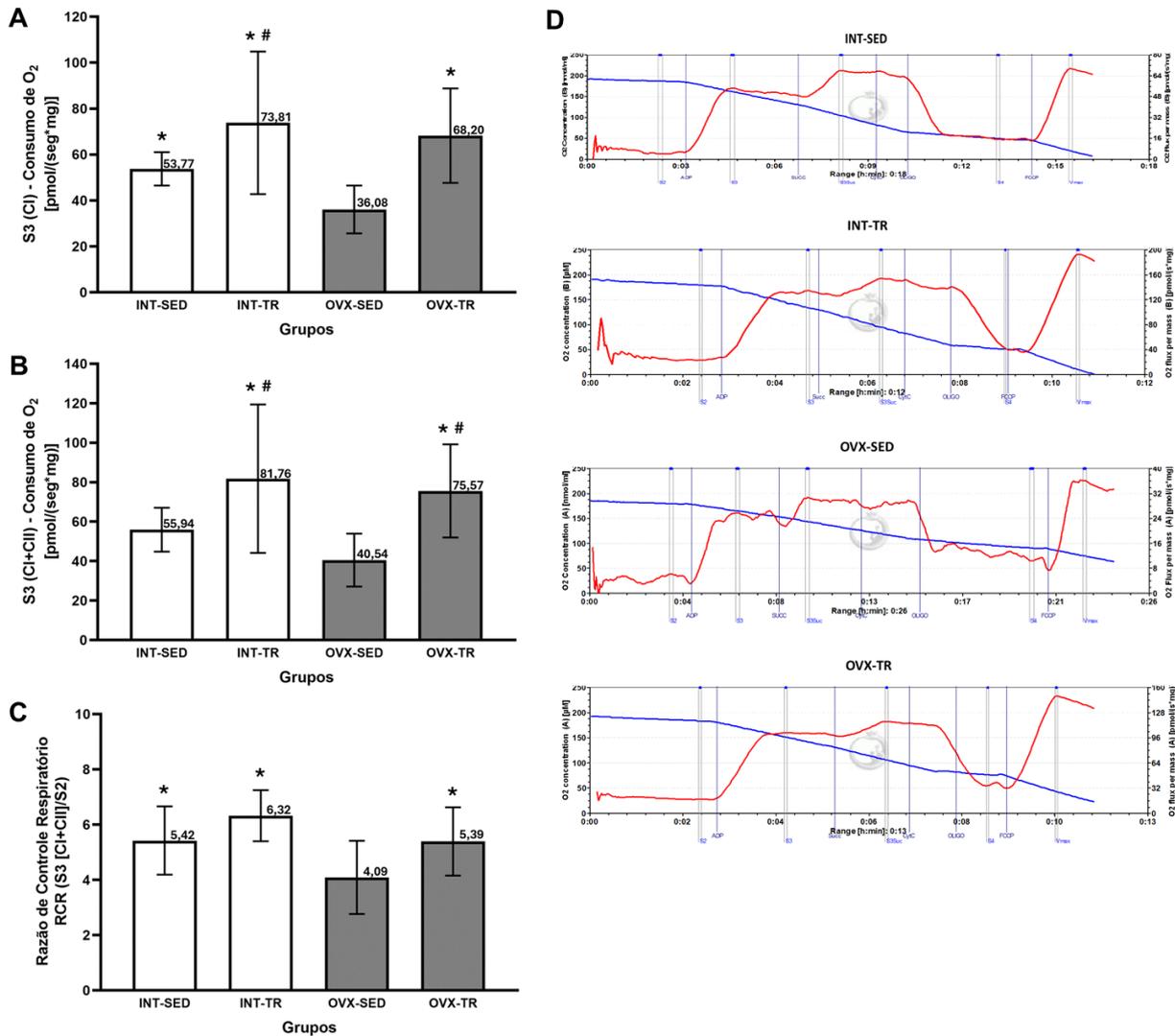
### 6.3.1 Respiração mitocondrial acoplada em biópsia tecidual no fígado

Na Figura 22, é apresentado o consumo de oxigênio mitocondrial acoplado, ou Estado Respiratório 3 (S3) em [pmol/(s\*mg)] no fígado. Na Figura 22A, o consumo de oxigênio pelos substratos do complexo I da cadeia respiratória (M + G), foi significativamente menor no grupo OVX-SED em relação ao (INT-SED,  $p = 0,0001$ ). No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram um consumo maior comparados ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0026$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente). Observa-se também que o grupo INT-TR teve consumo maior em relação ao seu respectivo grupo controle (INT-SED,  $p = 0,0296$ ).

Na Figura 22B, consumo de oxigênio no S3 determinado pelos substratos dos complexos I (M + G) e II (Suc) da cadeia respiratória, não apresentou diferença significativa entre os grupos OVX-SED e INT-SED. No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram um consumo maior comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0063$  e  $p = 0,0016$ , respectivamente) e ao grupo INT-SED ( $p = 0,0244$  e  $p = 0,0215$ , respectivamente).

Na Figura 22C, a razão de controle respiratório (RCR) foi determinada pelo cálculo:  $S3 (CI + CII) / S2$ . O grupo OVX-SED apresentou valores menores em relação aos grupos (INT-SED,  $p = 0,0263$ ), (INT-TR,  $p = 0,0001$ ) e (OVX-TR,  $p = 0,0367$ ).

**Figura 22** – Respiração mitocondrial acoplada em biópsia tecidual no fígado.



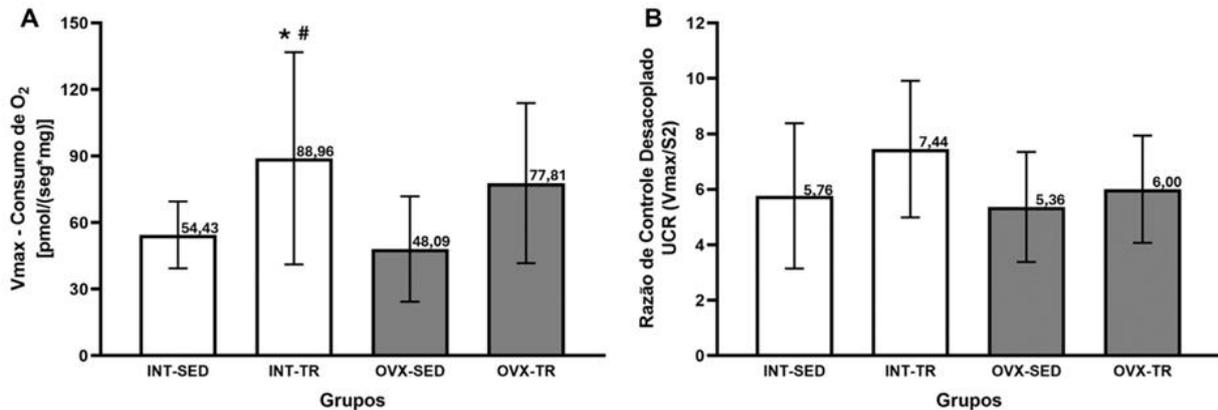
Descrição - A: S3/CI: consumo de oxigênio determinado substratos do complexo I (respiração acoplada ou Estado 3 CI); B: S3/CI+CII: consumo de oxigênio determinado pelos substratos dos complexos I e II (Estado 3 CI + CII); C: RCR: razão de controle respiratório; D: representação das corridas e titulações de todos os grupos. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 6.3.2 Respiração mitocondrial desacoplada em biópsia tecidual no fígado

Na Figura 23, é apresentado o consumo de oxigênio mitocondrial desacoplado em [pmol/(s\*mg)]. Na Figura 23A, o estado respiratório experimentalmente não acoplado máximo estimulado pelo FCCP ( $V_{max}$ ), não apresentou diferença significativa entre os grupos OVX-SED e INT-SED. No entanto, o grupo INT-TR obteve um consumo maior comparado aos grupos (OVX-SED,  $p = 0,0188$ ) e (INT-SED,  $p = 0,0254$ ).

Na Figura 23B, a razão de controle desacoplado (UCR) foi determinada pelo cálculo:  $V_{\max} / S_2$ . Observamos que os grupos treinados apresentaram valores mais elevados na UCR, embora sem significância estatística.

**Figura 23** – Respiração mitocondrial desacoplada em biópsia tecidual no fígado.

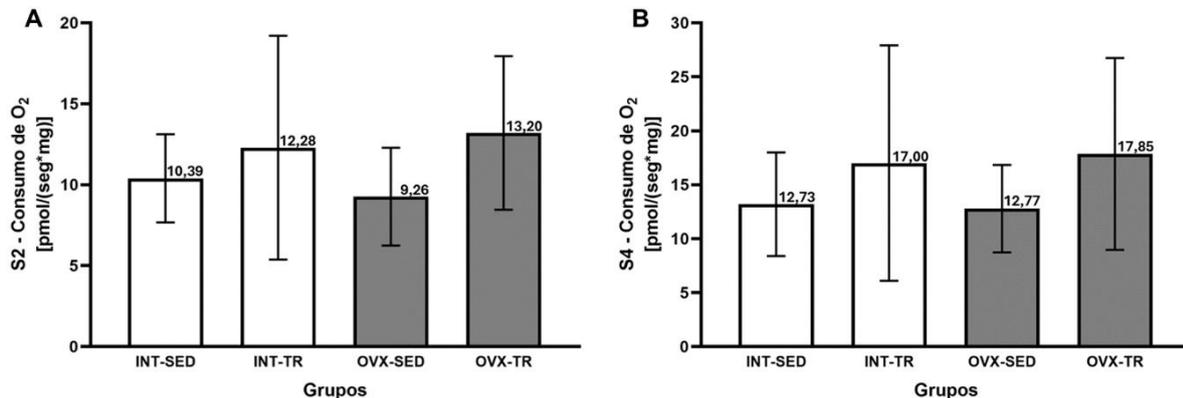


Descrição - A: V<sub>max</sub>: estado respiratório experimentalmente não acoplado máximo; B: UCR: razão de controle desacoplado determinada pelo  $V_{\max}/S_2$ . Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 6.3.3 Respiração de vazamento mitocondrial em biópsia tecidual no fígado

Na Figura 24, é apresentado a respiração de vazamento mitocondrial em [pmol/(s\*mg)]. Tanto na respiração de repouso ou fuga (S<sub>2</sub>) (Figura 24A), quanto na respiração com vazamento experimental (S<sub>4</sub>) (Figura 24B), não foram observadas diferença significativa no consumo de oxigênio entre os grupos analisados.

**Figura 24** – Respiração de vazamento mitocondrial em biópsia tecidual no fígado.



Descrição - A: S2: respiração de repouso (respiração de fuga ou Estado 2); B: S4: respiração com vazamento experimental (Estado 4). Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Análise estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

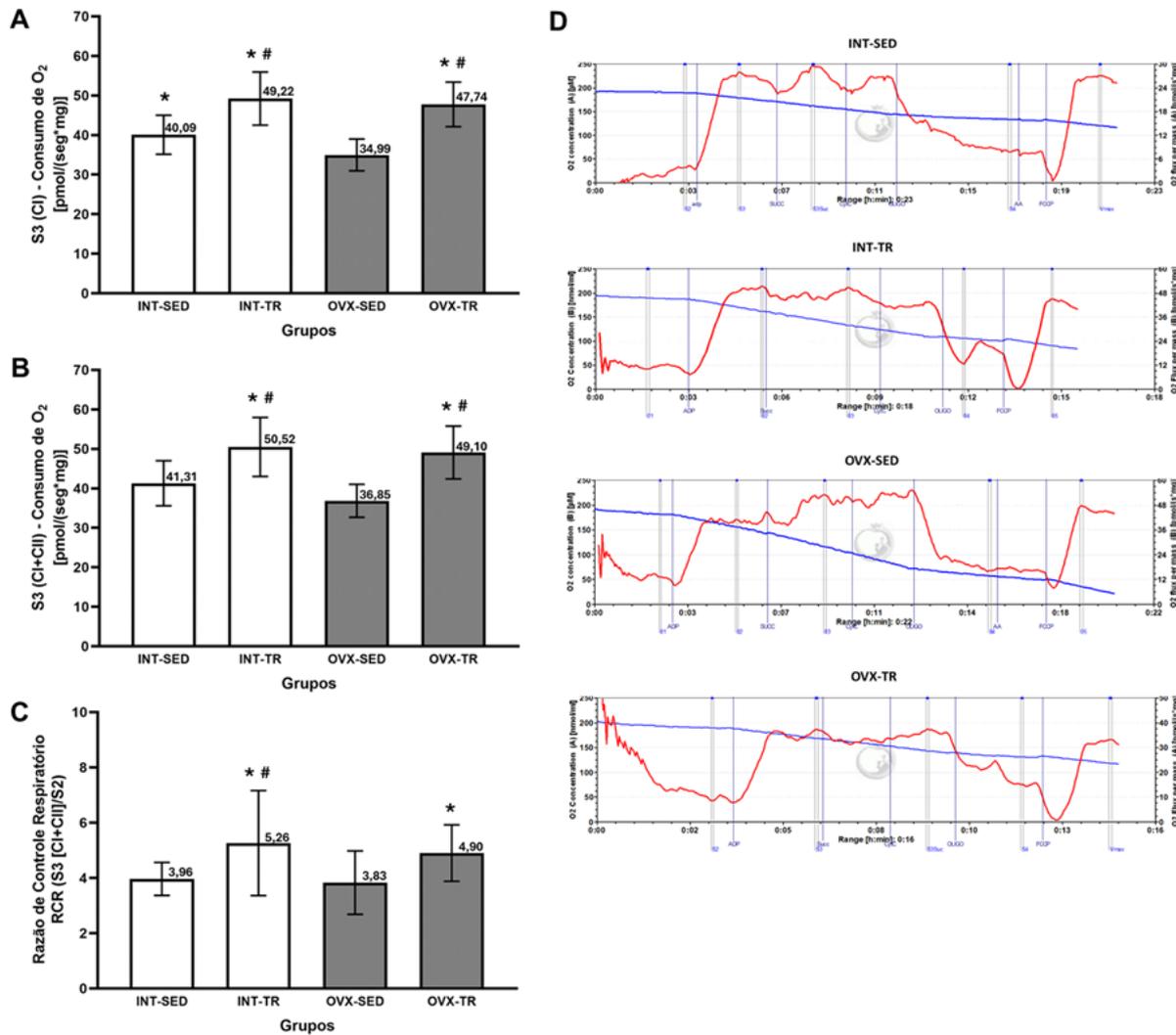
### 6.3.4 Respiração mitocondrial acoplada em biópsia tecidual no músculo gastrocnêmio

Na Figura 25, é apresentado o consumo de oxigênio mitocondrial acoplado, ou Estado Respiratório 3 (S3), em [pmol/(s\*mg)] no músculo gastrocnêmio em sua porção vermelha. Na Figura 25A, o consumo de oxigênio pelos substratos do complexo I da cadeia respiratória (M + G), foi significativamente menor no grupo OVX-SED em relação ao (INT-SED,  $p = 0,0420$ ). No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram um consumo maior comparados ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente) e ao grupo INT-SED ( $p = 0,0031$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente).

Na Figura 25B, consumo de oxigênio pelos substratos dos complexos I (M + G) e II (Suc) da cadeia respiratória, não apresentou diferença significativa entre os grupos OVX-SED e INT-SED. No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram um consumo maior comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente) e ao grupo INT-SED ( $p = 0,0074$  e  $p = 0,0018$ , respectivamente).

Na Figura 25C, a razão de controle respiratório (RCR) foi determinada pelo cálculo:  $S3 (CI + CII) / S2$ . O grupo OVX-SED não apresentou diferença significativa em relação ao grupo INT-SED. Entretanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR), tiveram valores maiores comparados ao OVX-SED ( $p = 0,0410$  e  $p = 0,0155$ , respectivamente). Observa-se também que o grupo INT-TR teve consumo maior em relação ao seu respectivo grupo controle (INT-SED,  $p = 0,0269$ ).

**Figura 25** – Respiração mitocondrial acoplada em biópsia tecidual no músculo gastrocnêmio.



Descrição - A: S3/CI: consumo de oxigênio pelos substratos do complexo I (respiração acoplada ou Estado 3 CI); B: S3/CI+CII: consumo de oxigênio determinado pelos substratos dos complexos I e II (Estado 3 CI + CII); C: RCR: razão de controle respiratório; D: representação das corridas e titulações de todos os grupos. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

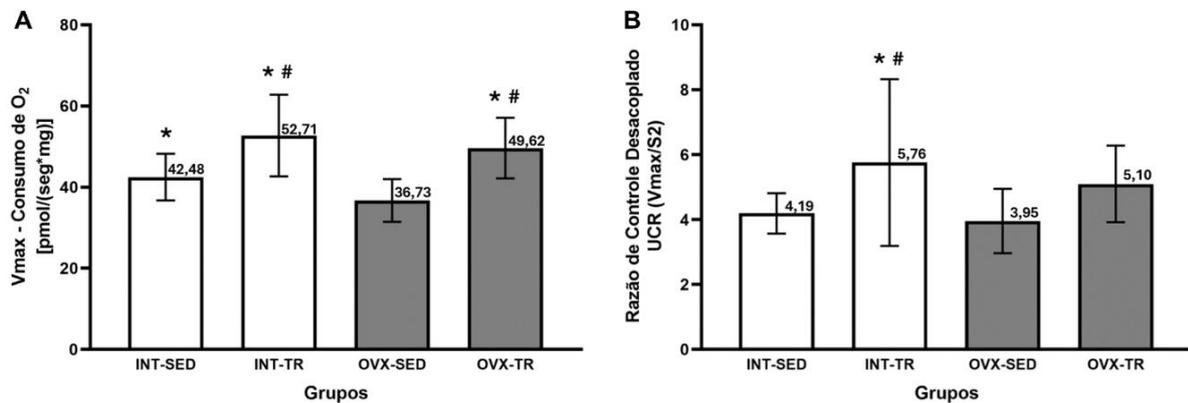
### 6.3.5 Respiração mitocondrial desacoplada em biópsia tecidual no músculo gastrocnêmio

Na Figura 26, é apresentado o consumo de oxigênio mitocondrial desacoplado em [pmol/(s\*mg)]. Na Figura 26A, o estado respiratório experimentalmente não acoplado máximo estimulado pelo FCCP ( $V_{max}$ ), apresentou redução significativa entre os grupos OVX-SED e INT-SED ( $p = 0,0317$ ). No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram um consumo

maior comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente) e ao grupo INT-SED ( $p = 0,0370$  e  $p = 0,0037$ , respectivamente).

Na Figura 26B, a razão de controle desacoplado (UCR) foi determinada pelo cálculo:  $V_{max}/S_2$ . Não foi observada diferença significativa entre os grupos sedentários (OVX-SED e INT-SED). No entanto, o grupo INT-TR obteve um consumo maior comparado aos grupos (OVX-SED,  $p = 0,0122$ ) e (INT-SED,  $p = 0,0278$ ).

**Figura 26** – Respiração mitocondrial desacoplada em biópsia tecidual no músculo gastrocnêmio.

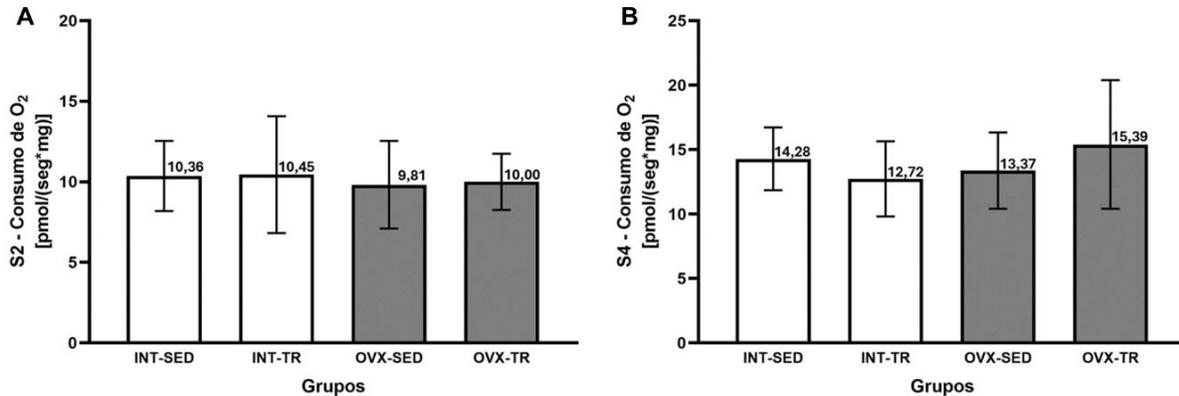


Descrição - A: V<sub>max</sub>: estado respiratório experimentalmente não acoplado máximo; B: UCR: razão de controle desacoplado determinada pelo  $V_{max}/S_2$ . Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 6.3.6 Respiração de vazamento mitocondrial em biópsia tecidual no músculo gastrocnêmio

Na Figura 27, é apresentado a respiração de vazamento mitocondrial em [pmol/(s\*mg)]. Tanto na respiração de repouso ou fuga (S<sub>2</sub>) (Figura 27A), quanto na respiração com vazamento experimental (S<sub>4</sub>) (Figura 27B), não foram observadas diferença significativa no consumo de oxigênio entre os grupos analisados.

**Figura 27** – Respiração de vazamento mitocondrial em biópsia tecidual no músculo gastrocnêmio.



Descrição - A: S2: respiração de repouso (respiração de fuga ou Estado 2); B: S4: respiração com vazamento experimental (Estado 4). Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Análise estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

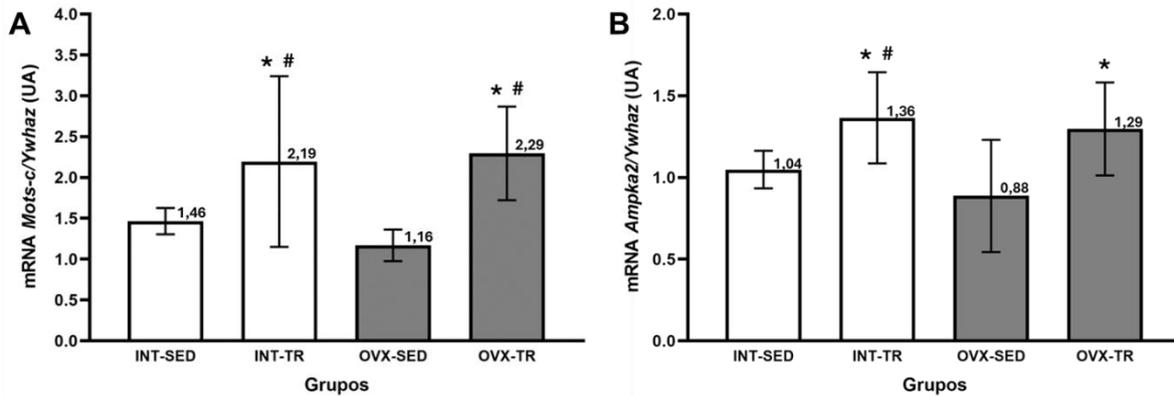
## 6.4 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA (RT-qPCR)

### 6.4.1 Expressão dos genes (*Mots-c* e *Ampka2*) no fígado

O quadro de leitura aberta mitocondrial do 12S rRNA-c (MOTS-c) está envolvido na captação de glicose, metabolismo lipídico e resistência à insulina. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED (Figura 28A). No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0023$  e  $p = 0,0077$ , respectivamente) e ao grupo INT-SED ( $p = 0,0188$  e  $p = 0,0488$ , respectivamente).

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é uma enzima central no metabolismo energético celular. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED (Figura 28B). No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0158$  e  $p = 0,0060$ , respectivamente). Observa-se também, que o grupo INT-TR apresentou maior expressão comparado ao grupo (INT-SED,  $p = 0,0278$ ).

**Figura 28** - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes (*Mots-c* e *Ampka2*) no fígado.



Descrição – *Ywhaz*, Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, zeta, gene de referência endógeno. A: *Mots-c*, Quadro de leitura aberta mitocondrial do 12S rRNA-c; B: *Ampka2*, Proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica alfa 2. UA: unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

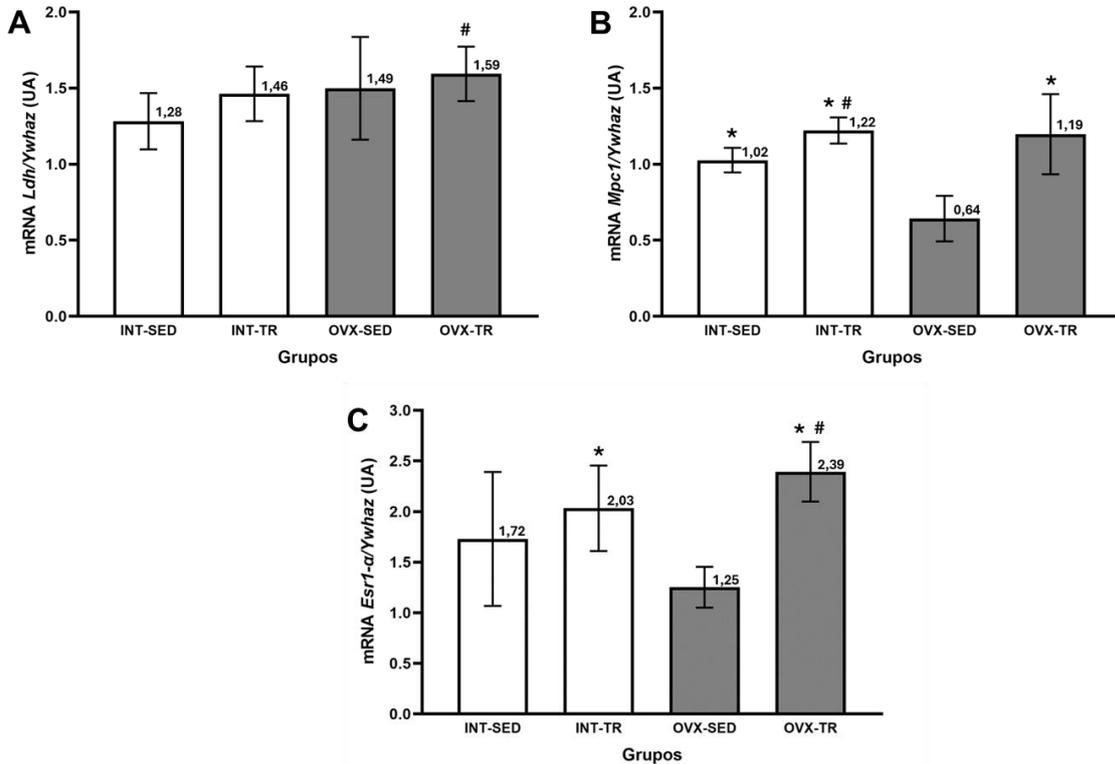
#### 6.4.2 Expressão dos genes (LDH, *Mpc1* e *Esr1- $\alpha$* ) no fígado

A lactato desidrogenase (LDH) catalisa a conversão de piruvato em lactato e vice-versa, um passo importante na via glicolítica. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED (Figura 29A). No entanto, o grupo OVX-TR teve expressão significativamente maior comparado ao grupo (INT-SED,  $p = 0,0183$ ).

O transportador mitocondrial de piruvato 1 (MPC1) é responsável pelo transporte do piruvato citosólico para a matriz mitocondrial. O grupo OVX-SED apresentou diminuição nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo (INT-SED,  $p = 0,0001$ ) (Figura 29B). No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente). Observa-se também, que o grupo INT-TR teve expressão significativamente maior comparado ao grupo (INT-SED,  $p = 0,0479$ ).

O gene receptor de estrogênio 1 alfa (*Esr1- $\alpha$* ) desempenha papel crucial na mediação dos efeitos estrogênicos nas células. Os níveis de expressão do grupo OVX-SED não apresentaram diferença estatística em comparação com o grupo INT-SED (Figura 29C). Entretanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,0052$ , respectivamente). Também foi observado, que o grupo OVX-TR apresentou maior expressão quando comparado ao grupo (INT-SED,  $p = 0,0148$ ).

**Figura 29** - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes (*Ldh*, *Mpc1* e *Esr1- $\alpha$* ) no fígado.



Descrição – *Ywhaz*, Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, zeta, gene de referência endógeno. A: *Ldh*, lactato desidrogenase; B: *Mpc1*, Transportador mitocondrial de piruvato 1; C: *Esr1- $\alpha$* , Receptor de estrogênio 1. UA, unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 6.4.3 Expressão dos genes relacionados à CTE (*CI* a *CIV*) no fígado

O NADH-desidrogenase (CI) é responsável pela transferência de  $e^-$  para a ubiquinona e o bombeamento de  $4 H^+$  para o espaço intermembranas. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED (Figura 30A). No entanto, o grupo treinado INT-TR teve expressão significativamente maior para este complexo comparado ao grupo (OVX-SED,  $p = 0,0235$ ).

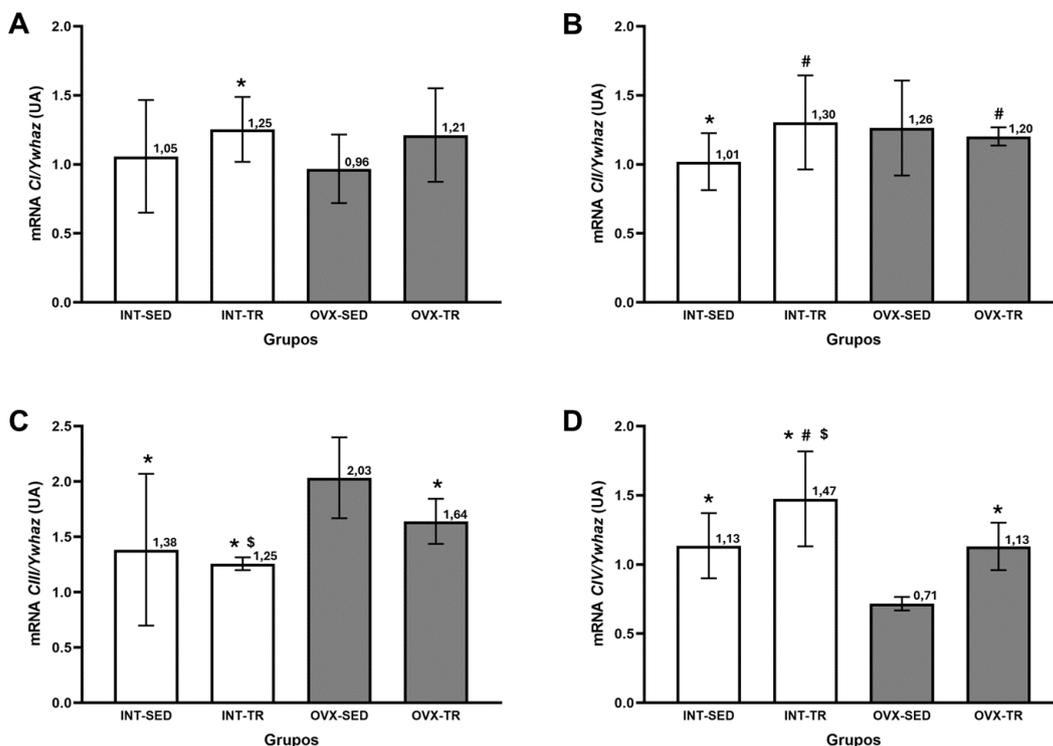
O succinato desidrogenase (CII) é responsável pela transferência de  $e^-$  para a ubiquinona e faz parte do CAC. O grupo OVX-SED apresentou maiores níveis de expressão gênica em comparação com o grupo (INT-SED,  $p = 0,0396$ ) (Figura 30B). Também foi observado, que ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) apresentaram expressão significativamente maior para este complexo comparado ao grupo INT-SED ( $p = 0,0078$  e  $p = 0,0116$ , respectivamente).

A expressão gênica da ubiquinona citocromo c oxidorreductase (CIII), responsável pela transferência de  $e^-$  para a ubiquinona e o bombeamento de  $4 H^+$  para o espaço intermembranas, foi

significativamente maior no grupo OVX-SED em comparação ao (INT-SED,  $p = 0,0084$ ) (Figura 30C). Além disso, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente menor para este complexo comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0243$  e  $p = 0,0022$ , respectivamente). Observou-se também, que o grupo INT-TR apresentou menor expressão para este complexo comparado ao grupo (OVX-TR,  $p = 0,0001$ ).

O citocromo c oxidase (CIV) é responsável por aceitar os  $e^-$  formando  $H_2O$  e bombear 2  $H^+$  para o espaço intermembranas. Os níveis de expressão do grupo OVX-SED foram significativamente menores quando comparado ao grupo (INT-SED,  $p = 0,0043$ ) (Figura 30D). Entretanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior para este complexo comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0047$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente). Observa-se também, que o grupo INT-TR apresentou maior expressão quando comparado com os grupos (OVX-TR,  $p = 0,0160$  e INT-SED,  $p = 0,0173$ ).

**Figura 30** - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes relacionados à CTE dos complexos I a IV no fígado.



Descrição – *Ywhaz*, Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, zeta, gene de referência endógeno. A: *CI*, NADH-desidrogenase; B: *CII*, Succinato desidrogenase; C: *CIII*, Ubiquinona: citocromo c oxidorreductase; e D: *CIV*, citocromo c oxidase. UA, unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED; (\$) diferença significativa para o grupo OVX-TR. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

#### 6.4.4 Expressão dos genes relacionados à OXPHOS (*Atps*, *Pic*, *Ant1*) e *Ucp2* no fígado

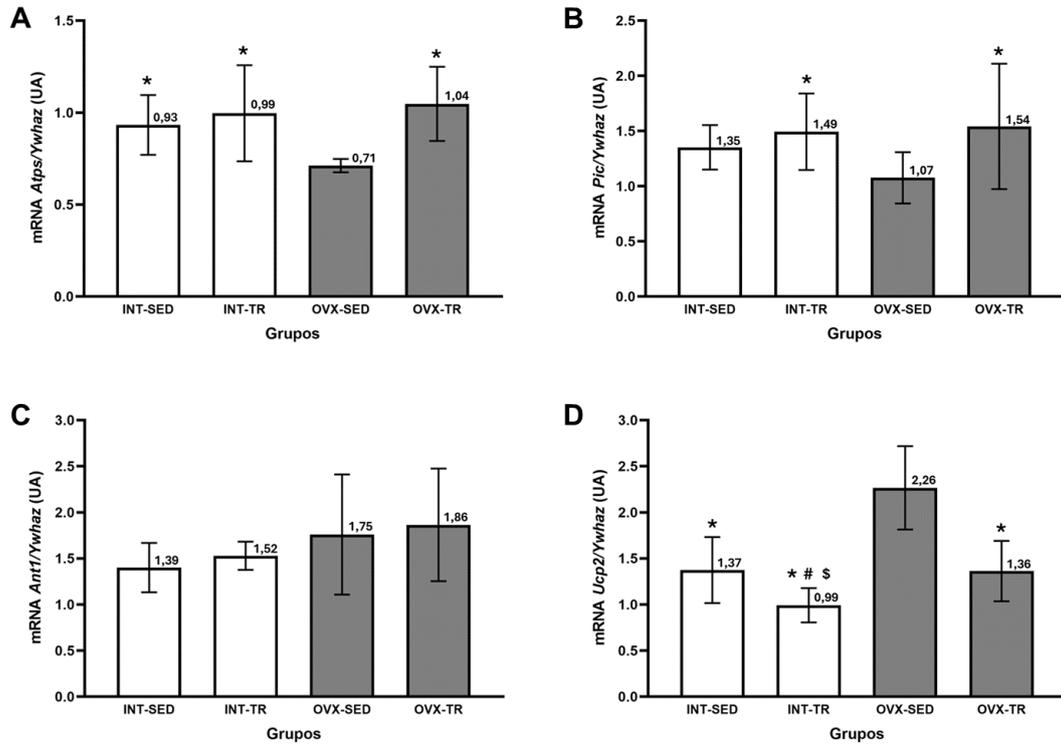
A ATP-sintase (ATPS) é responsável pela fosforilação do ADP em ATP. O grupo OVX-SED apresentou menores níveis de expressão gênica em comparação com o grupo (INT-SED,  $p = 0,0086$ ) (Figura 31A). Também foi observado que ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior para este complexo comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0050$  e  $p = 0,0148$ , respectivamente).

O carreador de fosfato (PiC) é responsável por transportar uma molécula de fosfato inorgânico e um  $H^+$  do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica comparado ao grupo INT-SED (Figura 31B). No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior para este complexo comparados ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0395$  e  $p = 0,0344$ , respectivamente).

A expressão do gene relacionado a adenina nucleotídeo translocase-1 (ANT1), responsável pela troca de ATP/ADP entre a matriz mitocondrial e o citoplasma, foi similar em todos os grupos, não existindo diferença significativa entre eles (Figura 31C).

A proteína de desacoplamento 2 (UCP2) é responsável pelo vazamento de  $H^+$  do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. O grupo OVX-SED apresentou maiores níveis de expressão gênica em comparação com o grupo (INT-SED,  $p = 0,0001$ ) (Figura 31D). Além disso, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente menor para este complexo comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente). Observa-se também, que o grupo INT-TR apresentou menor expressão quando comparado com os outros grupos (OVX-TR,  $p = 0,0001$  e INT-SED,  $p = 0,0430$ ).

**Figura 31** - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes relacionados à OXPHOS no fígado.

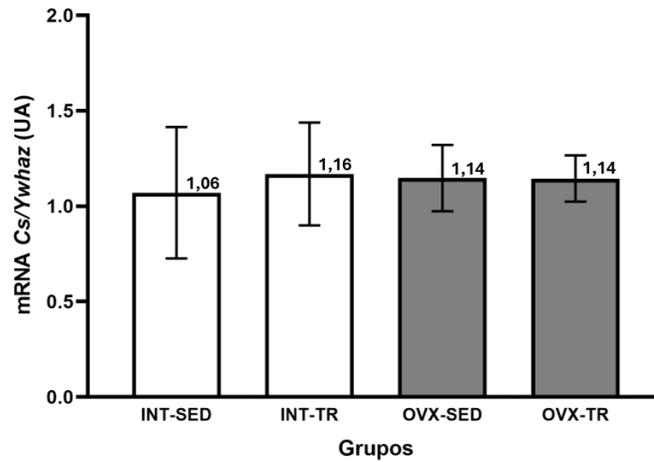


Descrição – *Ywhaz*, Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, zeta, gene de referência endógeno. A: *Atps*, ATP-sintase; B: *Pic*, Carreador de fosfato; C: *Ant1*, Adenina nucleotídeo translocase 1; e D: *Ucp2*, Proteína de desacoplamento 2. UA, unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED; (\$) diferença significativa para o grupo OVX-TR. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

#### 6.4.5 Expressão gênica da citrato sintase no fígado

A citrato sintase (CS) desempenha papel crucial no Ciclo do Ácido Cítrico (CAC), auxiliando na produção de energia, além disso, tem sido empregada como um indicador indireto da massa mitocondrial. Observa-se, que não houve diferença significativa nos níveis de expressão gênica desta enzima entre os grupos analisados (Figura 32).

**Figura 32** - Análise por RT-qPCR da expressão gênica da citrato sintase no fígado.



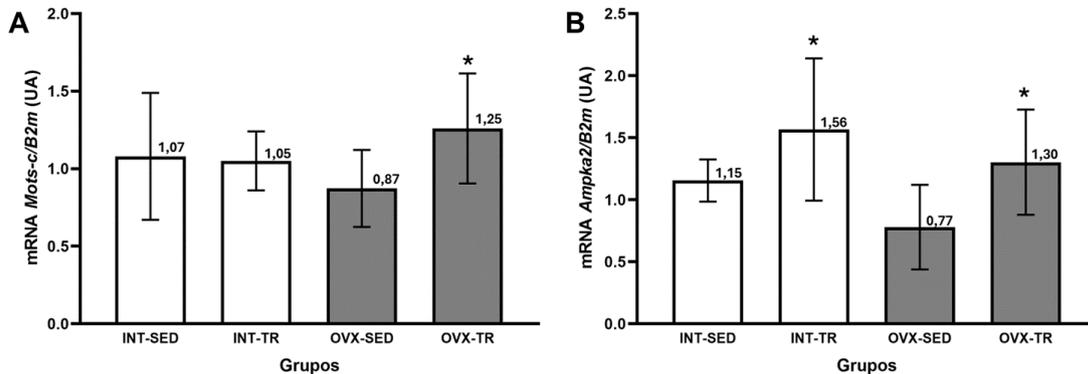
Descrição – *Ywhaz*, Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, zeta, gene de referência endógeno. *Cs*, Citrato sintase. UA, unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Teste estatístico ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

#### 6.4.6 Expressão dos genes (*Mots-c* e *Ampka2*) no músculo gastrocnêmio

O quadro de leitura aberta mitocondrial do 12S rRNA-c (MOTS-c) está envolvido na captação de glicose, metabolismo lipídico e resistência à insulina. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED (Figura 33A). No entanto, o grupo OVX-TR teve expressão significativamente maior comparado ao grupo (OVX-SED,  $p = 0,0375$ ).

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é uma enzima central no metabolismo energético celular. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED (Figura 33B). No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0365$  e  $p = 0,0030$ , respectivamente).

**Figura 33** - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes (*Mots-c* e *Ampka2*) no músculo gastrocnêmio.



Descrição - *B2m*, Beta-2 microglobulina, gene de referência endógeno. A: *Mots-c*, Quadro de leitura aberta mitocondrial do 12S rRNA-c; B: *Ampka2*, Proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica alfa 2. UA, unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED; (\$) diferença significativa para o grupo OVX-TR. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

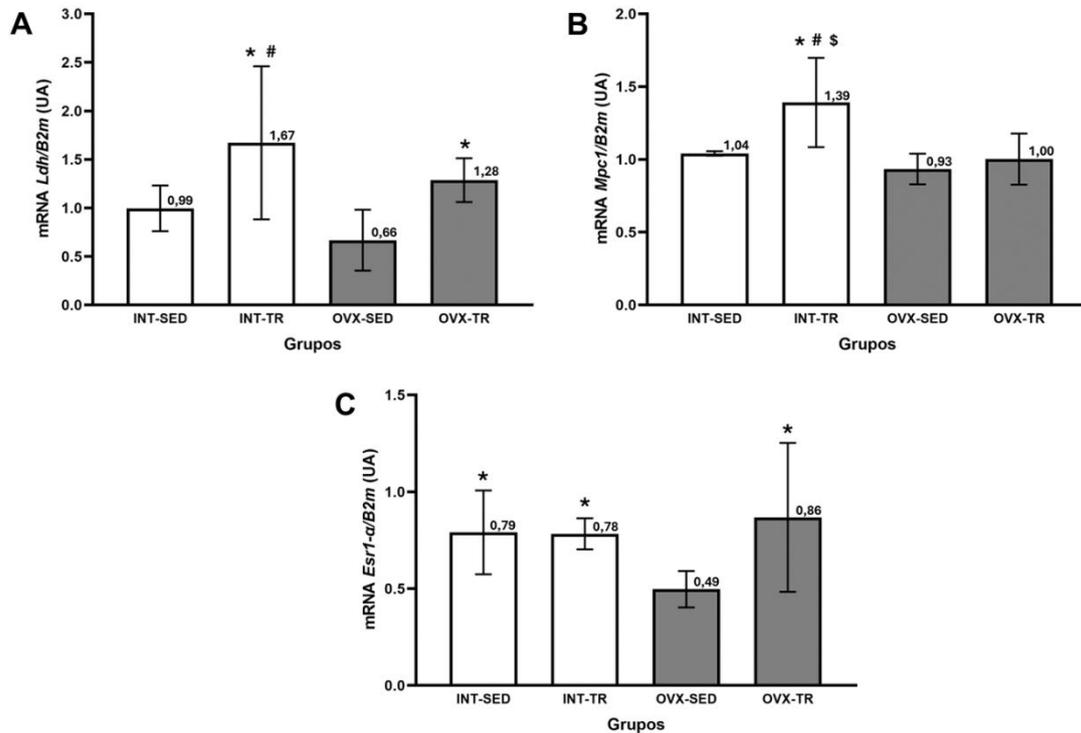
#### 6.4.7 Expressão dos genes (*Ldh*, *Mpc1* e *Esr1- $\alpha$* ) no músculo gastrocnêmio

A lactato desidrogenase (LDH) catalisa a conversão de piruvato em lactato e vice-versa, um passo importante na via glicolítica. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED (Figura 34A). Entretanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0170$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente). Observa-se também, que o grupo INT-TR apresentou maior expressão quando comparado ao grupo (INT-SED,  $p = 0,0150$ ).

O transportador mitocondrial de piruvato 1 (MPC1) é responsável pelo transporte do piruvato citosólico para a matriz mitocondrial. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED (Figura 34B). No entanto, o grupo INT-TR teve expressão significativamente maior comparado aos grupos (OVX-SED,  $p = 0,0001$ ), (INT-SED,  $p = 0,0036$ ) e (OVX-TR,  $p = 0,0016$ ).

O receptor de estrogênio 1 alfa (*Esr1- $\alpha$* ) desempenha papel crucial na mediação dos efeitos estrogênicos nas células. Os níveis de expressão gênica do grupo OVX-SED foram significativamente menores em relação aos grupos (INT-SED,  $p = 0,0260$ ), (INT-TR,  $p = 0,0405$ ) e (OVX-TR,  $p = 0,0099$ ) (Figura 34C).

**Figura 34** - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes (*Ldh*, *Mpc1* e *Esr1- $\alpha$* ) no músculo gastrocnêmio.



Descrição - *B2m*, Beta-2 microglobulina, gene de referência endógeno. A: *Ldh*, Lactato desidrogenase; B: *Mpc1*, Transportador mitocondrial de piruvato 1; C: *Esr1- $\alpha$* , Receptor de estrogênio. UA, unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED; (\$) diferença significativa para o grupo OVX-TR. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

#### 6.4.8 Expressão dos genes relacionados à CTE (*CI* a *CIV*) no músculo gastrocnêmio

O NADH-desidrogenase (CI) é responsável pela transferência de  $e^-$  para a ubiquinona e o bombeamento de 4  $H^+$  para o espaço intermembranas (Figura 35A). O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED. No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior para este complexo comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0161$  e  $p = 0,0066$ , respectivamente). Observa-se também que o grupo INT-TR apresentou maior expressão quando comparado com o seu respectivo grupo sedentário (INT-SED,  $p = 0,0314$ ).

O succinato desidrogenase (CII) é responsável pela transferência de  $e^-$  para a ubiquinona e faz parte do CAC. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED. No entanto, ambos os grupos sedentários (OVX-SED e INT-SED) tiveram expressão significativamente menor para este complexo comparado ao grupo OVX-

TR ( $p = 0,0407$  e  $p = 0,0135$ , respectivamente) (Figura 35B). Observou-se também que o grupo INT-TR apresentou maior expressão quando comparado com o seu respectivo grupo sedentário (INT-SED,  $p = 0,0218$ ).

A expressão gênica da ubiquinona: citocromo c oxidorreductase (CIII), responsável pela transferência de  $e^-$  para a ubiquinona e o bombeamento de  $4 H^+$  para o espaço intermembranas, foi significativamente menor no grupo OVX-SED em comparação ao (INT-SED,  $p = 0,0344$ ) (Figura 35C). Entretanto, o grupo INT-TR teve maior expressão quando comparado com os outros grupos (OVX-SED,  $p = 0,0001$ ; OVX-TR,  $p = 0,0069$  e INT-SED,  $p = 0,0267$ ).

O citocromo c oxidase (CIV), é responsável por aceitar os  $e^-$  formando  $H_2O$  e bombear  $2 H^+$  para o espaço intermembranas. Os níveis de expressão do grupo OVX-SED foram significativamente menores quando comparado ao grupo (INT-SED,  $p = 0,0052$ ) (Figura 35D). Observou-se também que os grupos sedentários (OVX-SED e INT-SED) apresentaram níveis de expressão significativamente menores para este complexo comparado ao grupo OVX-TR ( $p = 0,0010$  e  $p = 0,0425$ , respectivamente). O mesmo ocorre para os grupos sedentários quando comparados com o grupo INT-TR ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,0205$ , respectivamente).

#### **6.4.9 Expressão dos genes relacionados à OXPHOS (*Atps*, *Pic*, *Ant1*) e *Ucp3* no músculo gastrocnêmio**

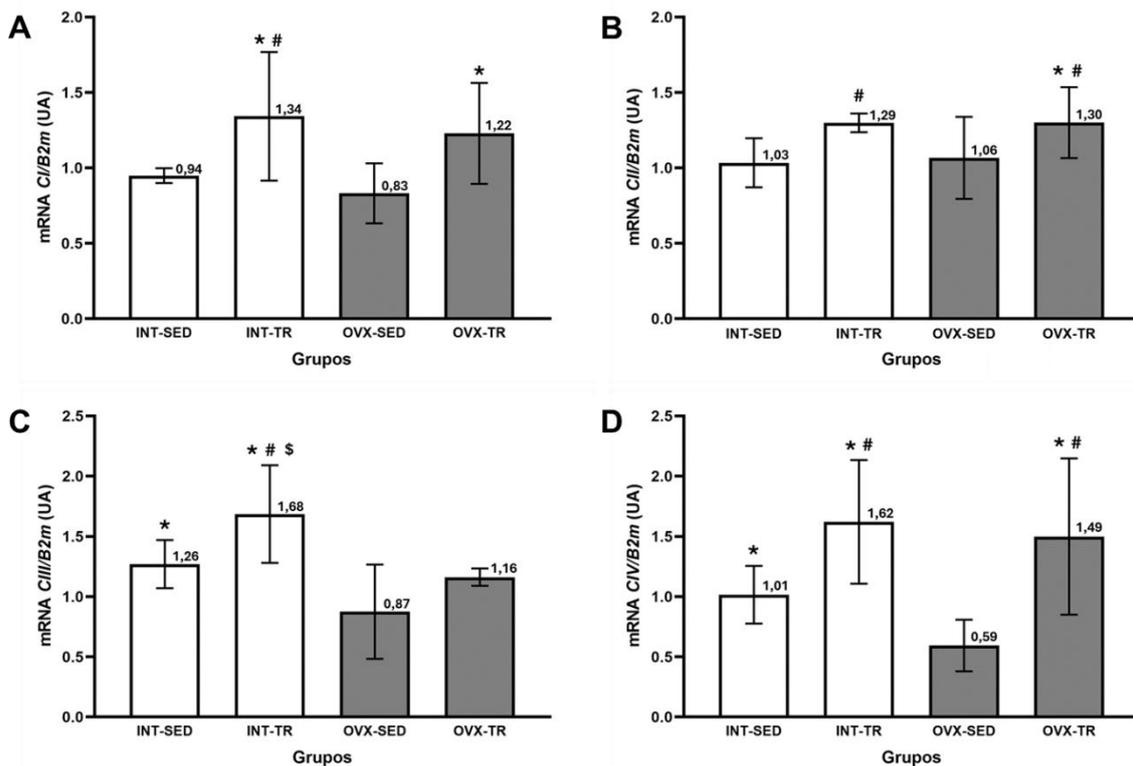
A ATP-sintase (ATPS) é responsável pela fosforilação do ADP em ATP. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED (Figura 36A). No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior para este complexo comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0334$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente). Observa-se também que o grupo INT-TR apresentou maior expressão quando comparado com os grupos (INT-SED,  $p = 0,0046$  e OVX-TR,  $p = 0,0111$ ).

O carreador de fosfato (PiC) é responsável por transportar uma molécula de fosfato inorgânico e um  $H^+$  do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED (Figura 36B). No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior para este complexo comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0372$  e  $p = 0,0020$ , respectivamente). Observa-se também que o grupo INT-TR apresentou maior expressão quando comparado com o seu respectivo grupo sedentário (INT-SED,  $p = 0,0068$ ).

A expressão do gene relacionado a adenina nucleotídeo translocase-1 (ANT1), responsável pela troca de ATP/ADP entre a matriz mitocondrial e o citoplasma, foi similar em todos os grupos, não existindo diferença significativa entre eles (Figura 36C).

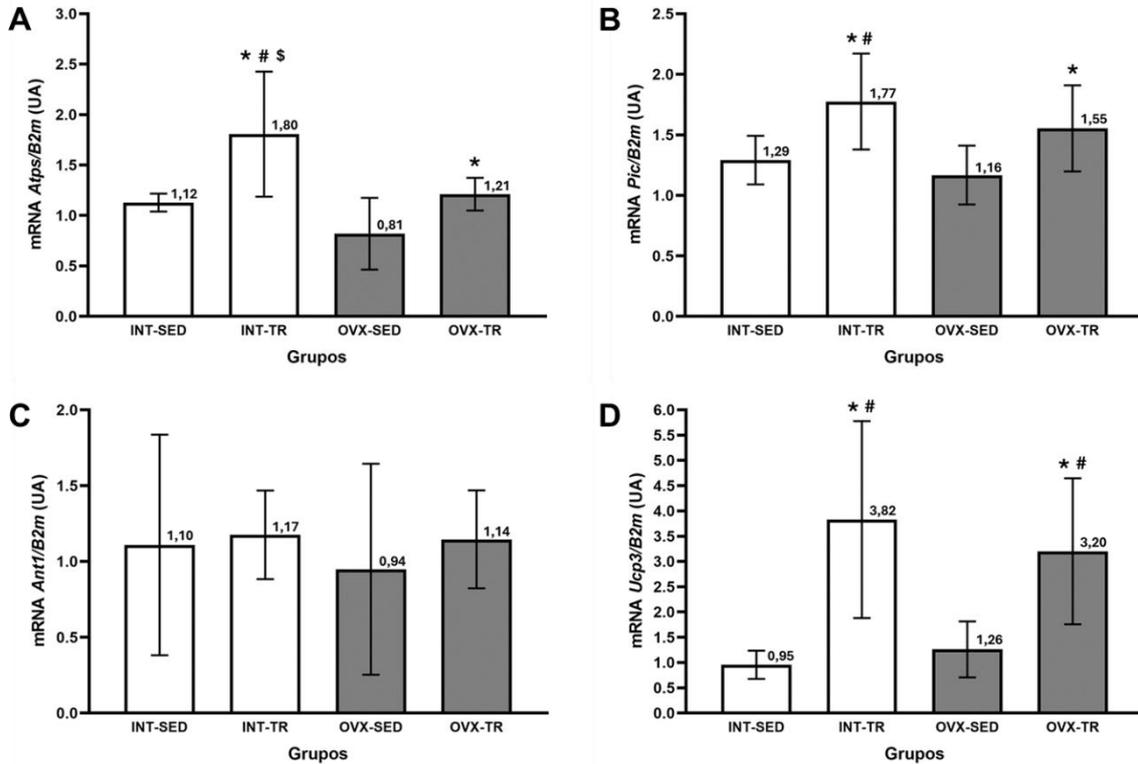
A proteína de desacoplamento 3 (UCP3) é responsável pelo vazamento de H<sup>+</sup> do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. O grupo OVX-SED não apresentou diferença estatística nos níveis de expressão gênica em comparação com o grupo INT-SED (Figura 36D). No entanto, ambos os grupos treinados (OVX-TR e INT-TR) tiveram expressão significativamente maior para este complexo comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0097$  e  $p = 0,0020$ , respectivamente). O mesmo ocorre para o grupo INT-SED ( $p = 0,0034$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente).

**Figura 35** - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes relacionados à CTE dos complexos I a IV no músculo gastrocnêmio.



Descrição - B2M, Beta-2 microglobulina, gene de referência endógeno. A: C I, NADH-desidrogenase; B: C II, Succinato desidrogenase; C: C III, Ubiquinona: citocromo c oxidorreductase; e D: C IV, Citocromo c oxidase. UA, unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média ± Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED; (\$) diferença significativa para o grupo OVX-TR. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 36** - Análise por RT-qPCR da expressão dos genes relacionados à OXPHOS no músculo gastrocnêmio.

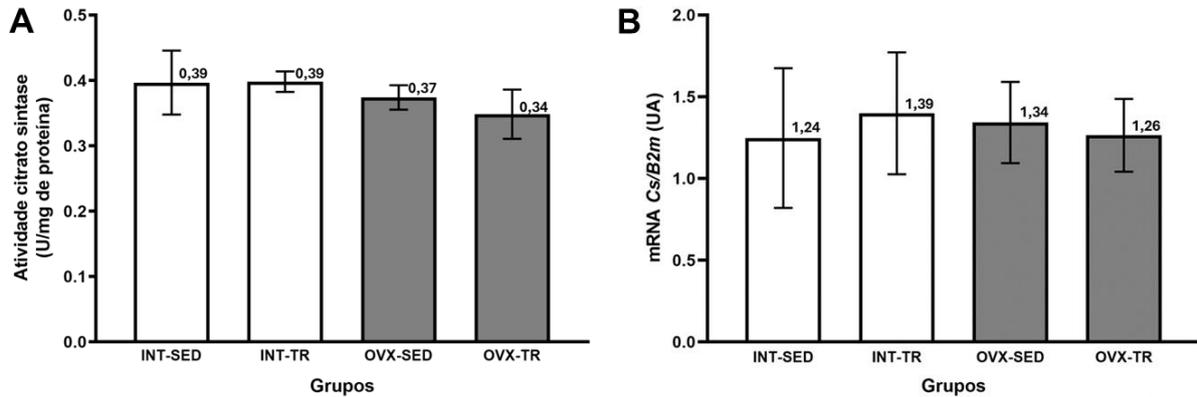


Descrição - *B2M*, Beta-2 microglobulina, gene de referência endógeno. A: *Atps*, ATP-sintase; B: *Pic*, Carreador de fosfato; C: *Ant1*, Adenina nucleotídeo translocase; e D: *Ucp3*, Proteína de desacoplamento 3. UA, unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED; (#) diferença significativa para o grupo INT-SED; (\$) diferença significativa para o grupo OVX-TR. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

#### 6.4.10 Expressão gênica e atividade da citrato sintase no músculo gastrocnêmio

A citrato sintase (CS), desempenha um papel crucial no CAC, auxiliando na produção de energia, além disso, tem sido empregada como um indicador da massa mitocondrial. Tanto na atividade da CS (Figura 37A) quanto na expressão gênica dessa enzima (Figura 37B), observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

**Figura 37** - Análise da expressão gênica e atividade da citrato sintase no músculo gastrocnêmio.



Descrição - A: atividade da citrato sintase em biópsia do músculo gastrocnêmio porção vermelha; B: análise de expressão gênica da citrato sintase. U/mg: unidades por miligrama. *B2m*, Beta-2 microglobulina, gene de referência endógeno. UA, unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-TR, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-TR, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). Teste estatístico ANOVA one-way seguida por teste *post hoc* de Fisher com ( $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL E MASSA UTERINA

O período total de pesagem dos animais foi de 28 semanas, e para analisar a evolução da massa corporal selecionamos quatro semanas específicas a partir da semana pré-operatória, com o intuito de acompanhar os efeitos da ovariectomia nos animais. Os quatro momentos escolhidos foram: pré-operatório, semanas 5, 10 e final.

Observou-se um aumento gradual da massa corporal em todos os animais ao longo do período experimental. Entretanto, nosso estudo revelou que as ratas ovariectomizadas (OVX-SED e OVX-TR) apresentaram um aumento significativo da massa em comparação com os demais grupos. Os maiores valores foram identificados no grupo OVX-SED ( $357,4 \pm 18,1$  g), indicando um aumento de 15,7% na massa corporal em relação ao grupo INT-SED. Esses achados corroboram com a literatura, relacionando a deficiência estrogênica com o aumento da massa corporal e diminuição da  $\beta$ -oxidação no período pós-menopáusico (LEITE *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2012; SHIGUEMOTO *et al.*, 2012). A redução do estrogênio observada na menopausa, pode afetar negativamente o metabolismo lipídico, o consumo energético e a composição corporal, aumentando o acúmulo de gordura abdominal e promovendo adiposidade visceral (OPOKU; ABUSHAMA; KONJE, 2023).

Por outro lado, observamos que o grupo OVX-TR apresentou redução de 8,2% na massa corporal em comparação com o grupo OVX-SED, indicando o TR como estratégia não farmacológica

eficiente na prevenção do aumento de peso e mudanças na composição corporal observadas durante e após a menopausa (LEITE *et al.*, 2009; ROSSINI, 2016). Em consonância, no estudo de Corriveau *et al.* (2008), o protocolo de TR realizado 5x/semana com 75% da massa corporal por 8 semanas, foi eficaz em reduzir a deposição de lipídeos no fígado e na região abdominal em ratas ovariectomizadas. Em contrapartida, nos estudos de Gomes-Gatto *et al.* (2016) e Queiroz (2017), os pesquisadores observaram que o TR 3x/semana por 13 semanas não foi efetivo em reduzir a massa corporal induzida pela ovariectomia nos animais. Entretanto, estudos mais recentes demonstram que o TR é capaz de melhorar os efeitos negativos da ovariectomia na adiposidade, colesterol total, triglicérides, densidade óssea e massa muscular (GOMES *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2024). Embora ainda não haja um consenso na literatura sobre os efeitos do TR na redução da massa corporal, a grande parte dos estudos, incluindo os resultados do nosso grupo de pesquisa, apontam para essa modalidade de treinamento como uma intervenção eficaz no controle da massa corporal no período pós-menopausa.

A massa uterina permite analisar indiretamente o impacto da hipostrogenia e a eficácia da cirurgia nos animais (KIM *et al.*, 2012). Em nosso trabalho, observamos uma redução significativa da massa uterina em aproximadamente 77,01%, acompanhada por atrofia tecidual nos grupos ovariectomizados em comparação com o grupos intactos. Corroborando aos nossos achados, Magosso (2015) e Scarlato (2020) encontraram resultados semelhantes, identificando redução significativa tanto na massa quanto no tamanho do útero de ratas ovariectomizadas.

## 7.2 CARGA DE CARREGAMENTO DO TREINAMENTO

O treinamento de resistência em escada já está bem estabelecido e é amplamente utilizado em estudos com animais. O protocolo de TR utilizado no presente estudo, foi desenvolvido a partir do modelo proposto por Hornberger e Farrar (2004) e adaptado por Queiroz (2017). As intensidades progressivas utilizadas nas sessões (65%, 70%, 75%, 80% e 85%) da CMC, permitem trabalhar com cargas de intensidade moderada a vigorosa, proporcionando adaptações metabólicas e musculares positivas com o risco de lesões musculotendinosas reduzido (ACSM, 2018). Estudos anteriores conduzidos por nosso grupo de pesquisa, indicam que essa modalidade de treinamento é capaz de proporcionar inúmeros benefícios no sistema muscular, ósseo, hemodinâmico, tecido endotelial, perfil lipídico e reduzir a massa corporal (LEITE *et al.*, 2009; SHIGUEMOTO *et al.*, 2012; ROSSINI, 2016; LINO *et al.*, 2018). O período total de TR em nosso trabalho foi de 20 semanas, porém para as análises da carga de carregamento, selecionamos cinco semanas ao longo do treinamento sendo elas: semanas 1, 5, 9, 13 e 17.

Na CMC, observamos um aumento progressivo em ambos os grupos treinados. O grupo INT-TR apresentou um aumento de aproximadamente 124,55% na semana 17 em comparação com a semana 1, já o grupo OVX-TR apresentou um aumento de aproximadamente 108,93%, considerando o mesmo período. Além disso, não houve diferença estatística na evolução da carga entre esses grupos.

Quando relativizamos a CMC pela massa corporal (CMCR), encontramos um aumento progressivo da carga ao longo das semanas sem diferença significativa entre os grupos, demonstrando que a ovariectomia não foi capaz de gerar impactos negativos na força muscular dos animais treinados. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados no trabalho de Queiroz (2017) e Marin *et al.* (2023), onde a carga de carregamento obteve um aumento gradativo e similar entre os grupos ovariectomizados e intactos durante 13 semanas de TR.

Quando somamos a CMC com a massa corporal (CMCA), foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos treinados. Essa diferença pode ser atribuída às variações na massa corporal entre os dois grupos, uma vez que o grupo OVX-TR exibiu valores significativamente maiores em relação ao grupo INT-TR.

### 7.3 ANÁLISES RESPIROMÉTRICAS

Está bem estabelecido que a mitocôndria é fundamental para a homeostase e viabilidade celular, sendo a principal responsável pela produção de ATP por meio da OXPHOS (GIORGI; MARCHI; PINTON, 2018). Mitocôndrias disfuncionais resultam em uma diminuição da produção de energia, aumento do estresse oxidativo, falhas nos processos de sinalização e apoptose. Além disso, a disfunção mitocondrial está associada a diversas doenças incluindo, doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos, DHGNA, sarcopenia, câncer e envelhecimento (TAN *et al.*, 2015; PROTASONI; ZEVIANI, 2021; RAMANATHAN; ALI; IBDAH, 2022).

Para analisar a função mitocondrial, utilizamos a técnica de Respirimetria de Alta Resolução (do inglês, HRR), a qual permite avaliar em tempo real o consumo de O<sub>2</sub> pelas mitocôndrias em amostras de biópsia tecidual ou células isoladas, analisando o acoplamento e o desacoplamento entre a CTE e a OXPHOS (PESTA; GNAIGER, 2012).

#### 7.3.1 Respiração mitocondrial acoplada em biópsia tecidual (S3 CI, S3 CI + CII e RCR)

O estado respiratório 3 (S3) refere-se à respiração mitocondrial em que o consumo de oxigênio é elevado devido a disponibilidade de substratos do complexo I (G + M, S3 / CI), do complexo I e II

(G + M + Suc, S3 / CI + CII) e ADP. Nesta fase é possível analisar a eficiência máxima da OXPHOS de maneira acoplada, ou seja, os H<sup>+</sup> retornam para a matriz mitocondrial através da ATP sintase gerando uma queda do gradiente eletroquímico da MMI e a síntese de ATP.

Em nosso estudo, observamos que o S3 (CI) no fígado foi significativamente reduzido no grupo OVX-SED em comparação com o grupo INT-SED, comportamento semelhante ao observado no músculo gastrocnêmio. Quando olhamos para o S3 (CI + CII), no fígado o consumo de O<sub>2</sub> no grupo OVX-SED foi menor em relação ao INT-SED, porém sem diferença estatística, sendo o mesmo resultado encontrado no músculo gastrocnêmio. Esses achados sugerem que a ovariectomia impacta negativamente a OXPHOS, reduzindo o consumo de oxigênio e consequentemente a síntese de ATP, contribuindo para a disfunção mitocondrial.

Nossos resultados estão alinhados com o estudo de Hu *et al.* (2024), que demonstraram uma redução significativa na taxa de respiração mitocondrial no estado 3 dependente de substratos do complexo I após a ovariectomia em camundongos. De forma semelhante, Lee *et al.* (2021) relataram uma diminuição significativa da capacidade respiratória mitocondrial no músculo quadríceps de camundongos OVX. No estudo de Jacobs *et al.* (2013), os autores observaram uma diminuição no consumo de O<sub>2</sub> nos músculos sóleo e gastrocnêmio com uma tendência de piora no quadríceps em camundongos idosos. Esses achados reforçam a ideia de que a capacidade respiratória mitocondrial diminui com o avanço da idade, especialmente no período pós-menopausa, o qual está fortemente associado ao processo de envelhecimento acompanhado de deficiência hormonal (VAJAPEY *et al.*, 2014). Por outro lado, Hoene *et al.* (2021) observaram um aumento da capacidade respiratória máxima no fígado de camundongos submetidos a dieta esteatogênica por seis semanas, reforçando a ideia de adaptação mitocondrial sobre estresse lipídico na fase inicial da DHGNA. Entretanto, essa flexibilidade mitocondrial é posteriormente perdida e sua função é reduzida com a progressão da doença (KOLIAK *et al.*, 2015)

Por outro lado, o S3 (CI) no fígado foi significativamente maior em ambos os grupos treinados quando comparados com seus respectivos grupos controles. O mesmo resultado foi observado nos grupos treinados no músculo gastrocnêmio. Quando olhamos para o S3 (CI + CII) nos grupos treinados, observamos um aumento significativo no consumo de O<sub>2</sub> em comparação com os grupos sedentários no fígado e músculo gastrocnêmio. Salvadego *et al.* (2013) mediram a função oxidativa em biópsia muscular do vasto lateral em homens submetidos ao treinamento de resistência agudo em bicicleta estacionária. Neste estudo os autores observaram que a respiração acoplada e a razão de controle respiratório foram mais elevados no grupo treinado melhorando assim a eficiência mitocondrial em comparação com indivíduos não treinados. Mendham *et al.* (2021) observaram que

12 semanas de treinamento aeróbio e TR 4x/semana em intensidade moderada a vigorosa resultou no aumento no conteúdo mitocondrial e capacidade de OXPHOS no músculo esquelético de mulheres obesas. Hoffmann *et al.* (2020) identificaram aumento na respiração acoplada máxima (S3 / CI + CII) em biópsia do músculo vasto lateral, após 8 semanas de treinamento de resistência aeróbia. Porter *et al.* (2015) concluíram que 12 semanas de TR em homens jovens saudáveis resultaram em mudanças positivas na OXPHOS, ao melhorar a capacidade respiratória acoplada.

A Razão de Controle Respiratório (RCR), é uma importante medida utilizada para avaliar a eficiência da OXPHOS mitocondrial de maneira acoplada. A RCR é obtida a partir da divisão do S3 (CI + CII) pelo S2. Um valor alto de RCR indica que a mitocôndria está funcionando de forma eficiente. Por outro lado, um valor baixo pode sugerir desacoplamento mitocondrial e prejuízos na capacidade respiratória (GNAIGER, 2012).

Nossos resultados demonstram que a ovariectomia reduziu os valores da RCR em ambos os tecidos analisados. A RCR no fígado apresentou valores significativamente menores no grupo OVX-SED quando comparado com o grupo INT-SED. Quando olhamos para o músculo gastrocnêmio, também encontramos uma redução no grupo OVX em relação ao INT-SED, porém, sem significância estatística. Gouspillou *et al.*, (2014) encontraram uma redução significativa da RCR no músculo vasto lateral de homens idosos. No estudo de Koliaki *et al.* (2015), os autores encontraram uma diminuição da RCR de forma gradual de acordo com o avanço nos estágios da DHGNA em biópsia hepática de pacientes obesos. Por outro lado, nossos resultados indicam que o TR foi capaz de reverter positivamente a diminuição da RCR nas ratas OVX. Tanto no fígado quanto no músculo gastrocnêmio, o grupo OVX-TR apresentou valores significativamente maiores quando comparado com o grupo OVX-SED. Corroborando aos nossos achados, Marin *et al.* (2023) observaram aumento da RCR após 13 semanas de TR no músculo vasto lateral de ratas OVX. Salvadego *et al.* (2013) observaram um aumento da respiração acoplada e da RCR em biópsia muscular de homens submetidos ao treinamento de resistência aeróbia.

Uma das hipóteses iniciais do nosso estudo era que a ovariectomia seria capaz de promover a disfunção mitocondrial no fígado e músculo gastrocnêmio, e que o TR poderia interferir positivamente melhorando a função mitocondrial nessas condições. Com base nos resultados obtidos, observamos que essas hipóteses também foram confirmadas, uma vez que encontramos uma diminuição significativa do S3 (CI), S3 (CI + CII) e RCR nos grupos ovariectomizados sedentários e o protocolo de TR foi eficiente em aumentar a respiração mitocondrial em ambos os tecidos analisados revertendo a disfunção mitocondrial pós-menopáusia.

### 7.3.2 Respiração mitocondrial desacoplada em biópsia tecidual ( $V_{max}$ e UCR)

Na velocidade máxima de consumo ( $V_{max}$ ), alcança-se o estado respiratório máximo experimentalmente não acoplado, obtido pela adição do ionóforo FCCP. Esse composto dissipa o potencial da MMI, resultando em um aumento da taxa de respiração para além da capacidade da respiração acoplada máxima (GNAIGER, 2012).

Tanto no fígado quanto no músculo gastrocnêmio, observamos uma redução nos valores da  $V_{max}$  no grupo OVX-SED em comparação com o grupo INT-SED. No fígado, essa redução não foi significativa, no entanto, no músculo gastrocnêmio observamos que sim. Entretanto, o TR foi capaz de reverter esses resultados aumentando a  $V_{max}$  nos tecidos analisados, embora com algumas diferenças específicas entre eles. No fígado, ambos os grupos TR apresentaram valores maiores, porém, apenas o INT-TR teve diferença estatística quando comparado com seu respectivo grupo controle. No músculo gastrocnêmio, ambos os grupos TR apresentaram valores significativamente maiores em relação aos seus respectivos grupos controle. No estudo de Porter *et al.* (2015), 12 semanas de TR em homens jovens saudáveis resultaram no aumento significativo da  $V_{max}$  em biópsia muscular.

Para avaliar a eficiência do desacoplamento mitocondrial, utilizamos a razão de controle desacoplado (UCR), obtida a partir da divisão da  $V_{max}$  pelo S2. Em nossos resultados, observamos uma redução nos valores da UCR tanto no fígado quanto no músculo gastrocnêmio no grupo OVX-SED em comparação com o INT-SED. No entanto, essa redução não foi estatisticamente significativa em ambos os tecidos. Em contrapartida o protocolo de TR utilizado em nosso estudo, melhorou os valores de UCR revertendo a diminuição ocasionada pela ovariectomia. No fígado, ambos os grupos TR apresentaram valores maiores, porém, sem diferença estatística quando comparados com seus respectivos grupos controle. No músculo gastrocnêmio, ambos os grupos TR apresentaram valores maiores, porém, apenas o INT-TR teve diferença estatística quando comparado com seu respectivo grupo controle.

### 7.3.3 Respiração de vazamento mitocondrial em biópsia tecidual (S2 e S4)

A respiração de repouso ou fuga (S2) permite avaliar a respiração de vazamento fisiológico. Nesse estado, a quantidade de ADP é escassa fazendo com que a ATP sintase não tenha substrato para sintetizar ATP de forma eficiente. Mesmo nesse estado, o consumo de  $O_2$  reflete o vazamento

de  $H^+$ , que retornam à matriz mitocondrial através de canais, permitindo que o fluxo de  $e^-$  e o consumo de  $O_2$  continuem ocorrendo, embora de forma reduzida (GNAIGER, 2012).

Em nosso estudo, não foram observadas diferenças significativas nos valores de S2 entre os grupos analisados, tanto no fígado quanto no músculo gastrocnêmio. Entretanto no fígado, os valores de S2 nos grupos treinados foram superiores em relação aos sedentários, embora sem significância estatística. Nossos achados indicam que tanto a ovariectomia quanto o TR não foram capazes de provocar alterações no S2 no fígado e músculo gastrocnêmio de ratas OVX. Esses resultados estão de acordo com os obtidos previamente por nosso grupo de pesquisa. Rossini (2016) e Monteiro (2019) também não observaram diferenças significativas nos valores de S2 entre os grupos sedentários e treinados em 22 semanas de TR no córtex pré-frontal, músculo sóleo e gastrocnêmio em ratas OVX.

A respiração com vazamento experimental (S4) permite avaliar a respiração de vazamento a partir da adição da Oligomicina com inibição da ATP sintase. O consumo de  $O_2$  é mantido pelo retorno de  $H^+$  para a matriz mitocondrial de forma desacoplada (GNAIGER, 2012).

Assim como observado no S2, também não encontramos diferenças significativas nos valores de S4 entre os grupos analisados, tanto no fígado quanto no músculo gastrocnêmio. Entretanto no fígado, os valores de S4 nos grupos treinados foram superiores em relação aos sedentários embora sem significância estatística. No músculo gastrocnêmio, os valores de S4 foram ligeiramente superiores no grupo OVX-TR em relação ao seu respectivo grupo controle, porém sem significância estatística. Nossos achados indicam que a ovariectomia e o TR também não foram capazes de provocar alterações no S4 no fígado e músculo gastrocnêmio de ratas OVX.

## 7.4 EXPRESSÃO GÊNICA RT-qPCR

### 7.4.1 Expressão gênica (*Mots-c* e *Ampka2*)

As mitocôndrias são organelas multifuncionais que estão ganhando reconhecimento como importantes sinalizadoras (KIM *et al.*, 2019). Uma das moléculas derivadas dessa organela é o MOTS-c, que desempenha um papel crucial na comunicação intracelular e endócrina, interagindo com organelas, núcleo e diferentes tecidos por meio da corrente sanguínea (WAN *et al.*, 2023). Esse peptídeo está envolvido na regulação da captação de glicose, metabolismo lipídico, resistência à insulina, inflamação e neuroproteção. Portanto, o MOTS-c é considerado um importante biomarcador mitocondrial envolvido na prevenção e controle da DHGNA (LU *et al.*, 2024).

A expressão do *Mots-c* é aumentada em resposta ao estresse ou exercício físico (LEE *et al.*, 2015). Em nosso estudo, encontramos um aumento significativo da expressão gênica de *Mots-c* em

ambos os grupos treinados, em comparação com seus respectivos grupos controle no fígado. Quando olhamos para o músculo, também encontramos um aumento no grupo OVX-TR em relação ao OVX-SED. Esses resultados confirmam uma de nossas hipóteses iniciais de que o TR é capaz de aumentar a expressão desse biomarcador mitocondrial no fígado e músculo gastrocnêmio como resposta adaptativa ao exercício, principalmente em ratas ovariectomizadas. Ao pesquisar na literatura, encontramos apenas um trabalho que investigou os efeitos do MOTS-c no metabolismo em ratas ovariectomizadas. Lu *et al.* (2019), administraram doses do peptídeo em camundongos fêmeas OVX por 12 semanas. Ao final, os autores concluíram que o MOTS-c foi capaz de regular o metabolismo lipídico, inibir o acúmulo de gordura e reduzir a resposta inflamatória ocasionadas pela redução hormonal pós-menopáusia. Entretanto, não encontramos trabalhos que explorem diretamente a expressão do gene *Mots-c* no fígado no contexto da menopausa ou treinamento. Sendo assim, nosso estudo se destaca por investigar essa interação, oferecendo novas contribuições e sugerindo a necessidade de mais pesquisas para compreender os mecanismos pré e pós-transcricionais e suas implicações na DHGNA.

Por outro lado, o aumento dos níveis de *Mots-c* no músculo esquelético e no plasma já está bem estabelecido na literatura. Um estudo recente demonstrou que o exercício aeróbico agudo de alta intensidade em bicicleta ergométrica aumentou a expressão de *Mots-c* no músculo esquelético e plasma (REYNOLDS *et al.*, 2021). Corroborando aos achados anteriores, Yang *et al.* (2021), observaram em camundongo submetidos ao treinamento de corrida em esteira com inclinação 5 dias/semana por 8 semanas, um aumento nos níveis de MOTS-c no músculo esquelético e no plasma durante e imediatamente após o exercício. Curiosamente no estudo de Walden *et al.* (2021), os autores não encontraram aumento dos níveis de MOTS-c no músculo esquelético e plasma após uma única sessão de TR em indivíduos ativos. Em nossos resultados, também observamos diminuição na expressão gênica de *Mots-c* nos dois tecidos analisados do grupo OVX-SED, porém sem significância estatística, concordando com a diminuição dos níveis desse peptídeo sobre estresse metabólico prolongado (KIRIK *et al.*, 2023).

A AMPK, é uma enzima central no metabolismo celular, atuando como um sensor regulador do equilíbrio energético das células, além de estar diretamente envolvida na translocação nuclear e na mediação da ação do MOTS-c (WAN *et al.*, 2023). Nosso resultados evidenciam um aumento significativo na expressão da *Ampka2* em ambos os grupos treinados, quando comparados com seus respectivos grupos controle no fígado, e um aumento nos grupos treinados em relação ao OVX-SED no músculo gastrocnêmio, indicando maior necessidade dessa enzima em situações de estresse metabólico energético como ocorre durante o exercício físico. Além disso, o aumento observado tanto

na expressão da *Mots-c* quanto na *Ampka2*, reforça a interação entre as duas proteínas para a adaptação celular sob estresse metabólico (YANG *et al.*, 2021).

Durante o exercício físico, a demanda energética muscular aumenta consideravelmente, exigindo maior síntese de ATP e conseqüentemente maior atividade da AMPK. Estudo de Fentz *et al.* (2015) realizado com camundongos knockout para AMPK no músculo esquelético revelou a importância fundamental dessa enzima na adaptação metabólica muscular durante o exercício aeróbio em esteira. Hamada, Arias e Cartee (2006), relataram aumento da fosforilação da enzima AMPK no músculo esquelético de camundongos após uma única sessão de corrida em esteira. Os estudos utilizando o TR como intervenção embora limitados na literatura, também observaram alterações na AMPK. Nesse contexto, Zuo *et al.* (2023) encontraram um aumento significativo nos níveis séricos dessa proteína em homens jovens tanto após uma sessão aguda, quanto após um período crônico de 6 semanas de TR. Dreyer *et al.* (2006) relataram um aumento da atividade da AMPK logo após a execução de uma única sessão de exercícios resistidos em homens e mulheres jovens sedentários, enquanto Ahtiainen *et al.* (2015), encontraram a fosforilação aumentada dessa enzima após uma única sessão de TR em membros inferiores de homens. Isso sugere que o TR é uma modalidade capaz de gerar impactos metabólicos positivos aumentando a ativação, os níveis séricos e a expressão gênica da AMPK. Além disso, como a atividade da AMPK é suprimida pela inflamação, obesidade e diabetes, o aumento de sua atividade tem sido considerado uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da DHGNA (SMITH *et al.*, 2016).

#### 7.4.2 Expressão gênica (CTE e OXPHOS)

A principal função das mitocôndrias, é a produção de energia por meio da CTE e OXPHOS (POPOV, 2020). A disfunção mitocondrial ocasiona diversos prejuízos na organela que levam a diminuição na síntese de ATP, gerando impactos negativos na célula (SORRENTINO; MENZIES; AUWERX, 2018). Uma de nossas hipóteses iniciais foi que a ovariectomia seria capaz de reduzir a expressão dos genes relacionados com a CTE e OXPHOS no fígado e músculo gastrocnêmio. Essa hipótese também foi confirmada, pois foi observada uma redução significativa na expressão dos genes dos complexos (*CIV* e *Atps*) no fígado e (*CIII* e *CIV*) no músculo gastrocnêmio, nos grupos OVX-SED em relação ao INT-SED. Hu *et al.* (2024) encontraram uma redução da expressão proteica dos complexos mitocondriais I, IV e V em camundongos OVX em comparação ao grupo Sham. Já no estudo de Cioffi *et al.* (2022), os autores observaram reduções significativas da expressão gênica dos

complexos CII, CIII e CV no fígado de ratos obesos sedentários, além disso também houve redução da expressão proteica dos mesmos complexos.

Por outro lado, em ambos os grupos treinados do nosso estudo foi observado um aumento significativo na expressão de alguns genes da CTE e OXPHOS, em comparação com seus respectivos grupos controle, no fígado e músculo gastrocnêmio. No fígado, encontramos aumento dos genes (*CII* e *CIV*) no grupo INT-TR e (*CIV*, *Atps* e *Pic*) no grupo OVX-TR. No músculo, encontramos aumento dos genes (*CI*, *CII*, *CIII*, *CIV*, *Atps* e *Pic*) no grupo INT-TR e (*CI*, *CII*, *CIV*, *Atps* e *Pic*) no grupo OVX-TR. Esses resultados indicam que o TR foi capaz de aumentar a expressão dos genes da CTE, contribuindo na qualidade e função mitocondrial. Embora a maioria dos estudos apresentem um aumento na biogênese mitocondrial, capacidade oxidativa e melhora dos complexos da cadeia respiratória promovidos por meio de exercícios aeróbios (JEPPESEN *et al.*, 2006; ZOLADZ *et al.*, 2016), alguns autores também relataram esses benefícios provenientes do TR (GROENNEBAEK; VISSING, 2017; FIUZA-LUCES *et al.*, 2019). Donges *et al.* (2012) encontraram um aumento nas taxas de mRNA e síntese proteica miofibrilar e mitocondrial de forma equivalente em sessões agudas de exercício aeróbio em bicicleta ergométrica e de TR em homens sedentários 1x/semana por 3 semanas. Corroborando aos achados, Porter *et al.* (2015) concluíram que 12 semanas de TR em homens jovens saudáveis resultaram em mudanças positivas na OXPHOS, ao melhorar a capacidade respiratória juntamente com maior expressão gênica da *Cox4il* (*CIV*). Mendham *et al.* (2021) encontram um aumento do conteúdo proteico em todos os complexos da CTE em mulheres submetidas a 12 semanas de treinamento aeróbio e TR 4x/semana em intensidade moderada a vigorosa. Sendo assim, é possível inferir que o TR foi capaz de influenciar positivamente a expressão de alguns genes da CTE e OXPHOS revertendo os prejuízos induzidos pela OVX conforme observado em nossos resultados.

Em relação as UCPs, estas desempenham um papel crítico na fosforilação oxidativa, permitindo um controle flexível do metabolismo energético e influenciando processos como termogênese e defesa contra o estresse oxidativo (DEMINE; RENARD; ARNOULD, 2019). Além disso, a disfunção dessas proteínas vem sendo alvo de estudo em diversas doenças (ECHTAY *et al.*, 2018). Em nosso estudo, analisamos a expressão gênica da *Ucp2* presente no fígado, e *Ucp3* presente no músculo esquelético (SREEDHAR; ZHAO, 2017). No fígado, os níveis de expressão da *Ucp2* foram significativamente maiores nos grupos intactos (INT-SED e OVX-SED) quando comparados com seus respectivos grupos treinados. Alguns estudos mostraram uma correlação positiva entre a *Ucp2* e o desenvolvimento da obesidade (JIN *et al.*, 2013). Como a DHGNA está associada ao excesso de gordura e obesidade, é plausível que a UCP2 desempenhe algum papel na doença

(ESTERBAUER *et al.*, 2001), em concordância com nosso estudo que apesar de não analisarmos a DHGNA de forma direta, identificamos que o grupo OVX-SED (que apresentou maior massa corporal), apresentou níveis de expressão da *Ucp2* significativamente maiores quando comparado com os outros grupos. Também corroborando aos nossos achados, Serviddio *et al.* (2008), encontraram maior expressão gênica da *Ucp2* em hepatócitos de humanos e murinos ao longo do desenvolvimento da DHGNA. Staňková *et al.* (2020) encontraram um aumento significativo da expressão gênica da *Ucp2* em camundongos com DHGNA. Inicialmente, esse aumento atua como um mecanismo de proteção contra o excesso de AGL na mitocôndria, entretanto esse mecanismo expõe o fígado a reduções crônicas de ATP devido ao maior desacoplamento ocasionado pela UCP, prejudicando a capacidade do fígado de responder adequadamente as demandas energéticas. Em contrapartida o TR reduziu significativamente os níveis de expressão da *Ucp2* no fígado como forma de prevenção (INT-TR) ou tratamento (OVX-TR), porém mais estudos são necessários para entender melhor os mecanismos envolvidos entre a UCP2 e a DHGNA no contexto da menopausa.

Por outro lado, quando direcionamos o olhar para o músculo gastrocnêmio, os resultados encontrados da *Ucp3* foram inversos aos encontrados no fígado, ou seja, os níveis de expressão da *Ucp3* encontrados foram significativamente mais altos nos grupos treinados (INT-TR e OVX-TR). Concordando com nossos resultados, Jeong e Yoon (2012) observaram um aumento no mRNA do *Ppara* e *Ucp3*, no músculo gastrocnêmio de camundongos OVX submetidos a um protocolo de 6 semanas de natação. Além de contribuir para o controle do estresse oxidativo sem induzir o desacoplamento mitocondrial, a regulação positiva da UCP3 também está associada a maior mobilização e oxidação dos AGL quando esses estão em excesso (BEZAIRE *et al.*, 2005; GUARDIA; LUZI; CODELLA, 2024). Por outro lado, sua redução está vinculada ao desenvolvimento de lipotoxicidade e à resistência à insulina no músculo esquelético (MACLALLAN *et al.*, 2005). No estudo recente de Codella *et al.* (2023), os animais com expressão aumentada da UCP3 apresentaram menor gordura corporal acompanhada de maior massa magra em comparação com um grupo controle. Por atuarem contra o estresse oxidativo no músculo esquelético (AGUER *et al.*, 2013), é notável que sua expressão seria maior em indivíduos treinados, concordando com nossos resultados, uma vez que o exercício físico provoca adaptações positivas nos mecanismos antioxidantes. Apesar disso, os estudos de Monteiro (2019) e Nagai *et al.* (2016), observaram uma regulação positiva da expressão do mRNA da *Ucp3* no músculo esquelético de ratas OVX, em comparação com os grupos treinados em esteira e TR 3x/semana por 22 semanas. Sendo assim, mais estudos são necessários para identificar o comportamento da expressão gênica e proteica da UCP3 utilizando o TR como intervenção.

### 7.4.3 Expressão gênica (*Ldha*, *Mpc1* e *Esr1-α*)

A LDH é responsável por catalisar a conversão reversível de piruvato em lactato, sendo essa uma molécula importante para o metabolismo energético de vários tecidos (KHAN *et al.*, 2020). Além disso, o lactato desempenha um papel positivo no processo de adaptação ao treinamento físico, contribuindo tanto para a produção de energia quanto para as adaptações fisiológicas que melhoram o desempenho e a recuperação muscular, fazendo com que a LDH seja a enzima chave nesse processo (LEE *et al.*, 2023). No fígado, observamos aumento na expressão do gene *Ldha* nos grupos treinados em relação aos seus respectivos grupos controles, porém sem significância estatística. Já no músculo gastrocnêmio o aumento na expressão desse gene nos grupos treinados foi significativamente maior em relação aos grupos controles. Costa *et al.* (2009) evidenciaram maior atividade das enzimas CK e LDH no músculo vasto lateral de homens não treinados submetidos a 6 dias de TR consecutivos. No estudo de Váczi *et al.* (2011) a atividade da LDH aumentou significativamente após 3 sessões consecutivas de TR para membros inferiores de alta intensidade em homens treinados. A partir dos nossos resultados e os trabalhos encontrados na literatura, podemos inferir que o exercício físico promove respostas adaptativas enzimáticas e metabólicas com o intuito de otimizar o fornecimento e a utilização de energia pelas células. Uma das adaptações benéficas do treinamento é a maior eficiência na produção e utilização do lactato, mediada pela atividade da enzima LDH. Contribuindo com a assertiva, em nosso estudo observamos que a expressão gênica dessa enzima foi significativamente maior nos grupos treinados, especialmente no músculo gastrocnêmio, reforçando as adaptações metabólicas positivas em decorrência do treinamento.

O transportador mitocondrial de piruvato (do inglês, MPC), tem como principal função transportar o piruvato para a matriz mitocondrial. Portanto, o MPC possui intersecção metabólica central ligando a glicólise (citosol) com a OXPHOS (mitocôndria) (TAVOULARI *et al.*, 2019; YIEM; FINCK, 2022). Mutações no MPC 1 e 2 identificadas em humanos, resultaram em atraso no crescimento e manifestações clínicas como hipotonia, encefalopatia e morte precoce (JIANG *et al.*, 2022). No fígado, observamos que a ovariectomia reduziu significativamente a expressão do gene *Mpc1* em comparação com os grupos intactos. Entretanto, no músculo gastrocnêmio essa redução foi observada, mas sem significância estatística. MCCOMMIS *et al.* (2020) relataram que a expressão gênica e proteica do MPC foi reduzida no coração com insuficiência cardíaca em humanos e camundongos.

Em relação ao TR, observamos que essa intervenção foi capaz de aumentar a expressão gênica do *Mpc1* de forma significativa em relação aos grupos intactos no fígado e músculo gastrocnêmio.

No entanto, o aumento no grupo OVX-TR não foi significativo quando comparado com o grupo OVX-SED no tecido muscular. Contudo, ao revisar a literatura, não encontramos estudos que investigaram a expressão do mRNA *Mpc1* em modelos humanos ou murinos sob condições pós-menopáusicas e exercício físico.

O estrogênio está envolvido em processos importantes no organismo da mulher atuando no sistema ósseo, cardiovascular, muscular, cérebro, tecido adiposo, controle metabólico e mitocondrial (JACKSON *et al.*, 2013). No entanto, as funções desse hormônio são mediadas por seus receptores (ERs) presentes na membrana, citoplasma e mitocôndrias de algumas células (YOH *et al.*, 2023). Uma diminuição desses receptores é observada na menopausa, uma vez que os níveis circulantes de estrogênio regulam sua expressão (BALTGALVIS *et al.*, 2010). A redução dos receptores, particularmente do ER $\alpha$ , tem sido relacionada ao aumento dos fatores da síndrome metabólica, como obesidade e resistência à insulina, em mulheres de meia-idade e animais (RIBAS *et al.*, 2010; HEVENER *et al.*, 2020; KO; JUNG, 2021).

Em nosso estudo, observamos que a ovariectomia reduziu os níveis de expressão do gene *Esr1- $\alpha$*  no grupo OVX-SED quando comparados aos outros grupos no fígado e músculo gastrocnêmio. Concordando com nossos achados, Young-Min *et al.* (2017) encontraram uma redução nuclear do ER $\alpha$  e ER $\beta$  no músculo esquelético de mulheres pós-menopáusicas. Por outro lado, em nosso estudo observamos que o TR foi capaz de reverter esse cenário, com níveis significativamente maiores na expressão do gene *Esr1- $\alpha$*  no grupo OVX-TR em comparação ao grupo OVX-SED, em ambos os tecidos analisados. Lemoine *et al.* (2002) observaram um aumento significativo do RE $\alpha$  no músculo gastrocnêmio de ratas submetidas ao treinamento de corrida em esteira por 7 semanas. Por outro lado, Hao *et al.* (2010) não encontraram aumento na expressão do RE $\alpha$  no fígado de ratas ovariectomizadas submetidas ao treinamento aeróbico em esteira 5x/semana por 12 semanas. No entanto, acreditamos que mais estudos são necessários utilizando o modelo de treinamento resistido como intervenção no período pós-menopausa, visando elucidar os efeitos dessa abordagem sobre a expressão gênica e proteica do RE $\alpha$  em diferentes tecidos.

#### 7.4.4 Expressão gênica e atividade da CS

A CS é uma enzima mitocondrial que catalisa a formação de citrato a partir de oxaloacetato e acetilCoA, representando a primeira etapa do CAC (CHHIMPA *et al.*, 2023). Além disso, sua atividade é amplamente utilizada como um indicador quantitativo da integridade e conteúdo mitocondrial (GILLEN *et al.*, 2016). No presente estudo, não encontramos diferenças significativas

na expressão gênica da *Cs* entre os grupos analisados, tanto no fígado quanto no músculo gastrocnêmio. Esses resultados sugerem que as intervenções realizadas (OVX e TR) não foram capazes de modificar os níveis de expressão dessa enzima nos tecidos avaliados. A atividade da CS no músculo gastrocnêmio foi similar em todos os grupos, indicando que essas mesmas intervenções não alteraram o conteúdo mitocondrial no tecido. Nossos resultados então de acordo com estudos anteriores que investigaram os efeitos do TR sobre a atividade da citrato sintase, devido sua grande associação com a densidade e volume mitocondrial. Estes estudos também não encontraram diferenças significativas entre os grupos analisados (LARSEN *et al.*, 2012; PARISE; BROSE; TARNOPOLSKY, 2015; FLACK *et al.*, 2016; MARIN *et al.*, 2023). No fígado, Liu, Kao e Wu (2019) não encontraram diferença na atividade da CS em camundongos submetidos a 8 semanas de treinamento moderado. Lund *et al.* (2016) observaram que a atividade da CS não foi diferente entre indivíduos obesos e controles em biópsia de fígado. Hoene *et al.* (2021) não encontraram diferença na atividade da CS no tecido hepático de camundongos treinados em esteira por seis semanas.

## 8 CONCLUSÃO

O presente estudo investigou os efeitos da ovariectomia e do TR sobre a expressão gênica dos complexos da CTE, OXPHOS e do peptídeo MOTS-c, além da capacidade respiratória mitocondrial em um modelo de menopausa. A partir dos resultados encontrados, podemos concluir que a ovariectomia promoveu disfunção mitocondrial no fígado e músculo gastrocnêmio, reduzindo a capacidade respiratória mitocondrial e a expressão gênica da CTE e OXPHOS em ambos os tecidos. Esses prejuízos podem contribuir para o desenvolvimento da DHGNA e a sarcopenia, uma vez que a disfunção mitocondrial está diretamente relacionada com essas doenças. No entanto, 20 semanas de TR, foi eficaz em prevenir esses danos, minimizando os efeitos deletérios associados a redução do estrogênio após a menopausa.

Além disso, o aumento significativo na expressão do gene *Mots-c* nos grupos treinados (INT-TR e OVX-TR) em ambos os tecidos analisados, destaca a presença de um biomarcador mitocondrial que confirma o *crossstalk* entre fígado e músculo esquelético promovido pelo exercício físico.

### 8.1 PERSPECTIVAS FUTURA

As descobertas deste estudo contribuem para melhor compreensão dos efeitos da menopausa induzida pela ovariectomia sobre a função mitocondrial no fígado e músculo esquelético, enfatizando o TR como uma estratégia promissora na saúde mitocondrial em estados de deficiência hormonal.

Além disso, a comunicação mitocondrial entre os tecidos por meio do peptídeo mitocondrial MOTS-c, fornece novos insights a respeito do *crosstalk* entre fígado e músculo esquelético modulado pelas adaptações positivas do exercício físico.

Além disso, acreditamos que a caracterização detalhada do *crosstalk* mitocondrial entre fígado e músculo esquelético, mediado pelo peptídeo MOTS-c, pode fornecer novas direções para a comunidade científica. Para isso, são necessários novos estudos que explorem com maior profundidade os mecanismos envolvidos nesse *crosstalk*, analisando as principais vias moleculares relacionando função mitocondrial, DHGNA e sarcopenia bem como o potencial clínico do TR como intervenção.

Por fim, sugerimos pesquisas futuras que envolvam modelos translacionais e humanos, que poderão ampliar a aplicabilidade dos nossos achados, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias promovendo a saúde em mulheres pós-menopáusicas.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- AL-SHANTI, N.; STEWART, C. E. Inhibitory effects of IL-6 on IGF-1 activity in skeletal myoblasts could be mediated by the activation of SOCS-3. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 3, p. 923-933, mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.23420>.
- AASLD - AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES. **Clinical Practice Guidelines**, v. 28, n. 5, mai. 2022, p. 528-562.
- ACSM - AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. **Guidelines for Exercise Testing and Prescription**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
- AGUER, C. *et al.* Muscle uncoupling protein 3 overexpression mimics endurance training and reduces circulating biomarkers of incomplete  $\beta$ -oxidation. **FASEB J**, v. 27, n. 10, p. 4213-4225, oct. 2013. DOI: 10.1096/fj.13-234302.
- AHTIAINEN, J. P. *et al.* Exercise type and volume alter signaling pathways regulating skeletal muscle glucose uptake and protein synthesis. **European Journal of Applied Physiology**, v. 115, p. 1835-1845, apr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00421-015-3155-3>.
- ANDREOLLO, N. A. *et al.* Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 25, n. 1, p. 49-51, mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-67202012000100011>.
- ANNESLEY, S. J.; FISHER, P. R. Mitochondria in Health and Disease. **Cells**, v. 8, n. 7, jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fcells8070680>.
- ANKER, S. D.; MORLEY, J. E.; HAEHLING, S. V. Welcome to the ICD-10 code for sarcopenia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 7, n. 5, p. 512-514, dec. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002%2Fjcsm.12147>.
- ARMANDI, A. *et al.* The Impact of Dysmetabolic Sarcopenia Among Insulin Sensitive Tissues: A Narrative Review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, nov. 2021. DOI: 10.3389/fendo.2021.716533.
- AZZU, V.; BRAND, M. D. The on/off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 5, p. 298-307, may. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.11.001>.
- BACCHI, E. *et al.* Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 Randomized Trial). **Hepatology**, v. 58, n. 4, p. 1287-1295, oct. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.26393>.
- BALLESTRI, S. *et al.* NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. **Adv Ther**, v. 34, n. 6, p. 1291-1326, may. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007%2Fs12325-017-0556-1>.

- BALTGALVIS, K. A. *et al.* Estrogen Regulates Estrogen Receptors and Antioxidant Gene Expression in Mouse Skeletal Muscle. **PLOS ONE**, apr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010164>.
- BARBIERI, E. *et al.* Mitohormesis in muscle cells: a morphological, molecular, and proteomic approach. **Muscle, Ligaments and Tendons Journal**, v. 3, n. 4, p. 254-266, oct. 2013.
- BASKIN, K. K.; WINDERS, B. R.; OLSON, E. N. Muscle as a "mediator" of systemic metabolism. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 2, p. 237-248, feb. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.021>.
- BEAUDART, C. *et al.* Health Outcomes of Sarcopenia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169548>.
- BECHMANN, L. P. *et al.* The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 4, p. 952-964, apr. 2012. DOI: [10.1016/j.jhep.2011.08.025](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.025).
- BELLANCE, L.; LESTIENNE, P.; ROSSIGNOL, R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, n. 11, p. 4015-4034, jan. 2009. DOI: <https://doi.org/10.2741/3509>.
- BEZAIRE, V. *et al.* Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 8, p. 977-979, jun. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.04-2765fje>.
- BOUZID, M. A. *et al.* Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update. **Sports Medicine**, v. 45, n. 9, p. 1245-1261, sep. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0348-1>.
- BRADY, C. W. Liver disease in menopause. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 25, p. 7613-7620, jul. 2015.
- BRAND, M. D. *et al.* The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. **Biochemical Journal**, v. 392, p. 353-362, dec. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj20050890>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Biblioteca Virtual em Saúde**. Esteatose hepática, 2016. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/esteatose-hepatica/> Acesso em: 13 set. 2022.
- BRICKER, D. K. *et al.* A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. **Science**, v. 337, n. 6090, p. 96-100, jul. 2012. DOI: [10.1126/science.1218099](https://doi.org/10.1126/science.1218099).
- BRINTON, R. D. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 10, p. 529-537, oct. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.07.003>.
- BRINTON, R. D. Minireview: Translational animal models of human menopause: Challenges and emerging opportunities. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3571-3578, aug. 2012. DOI: [10.1210/en.2012-1340](https://doi.org/10.1210/en.2012-1340).

BRONDANI, L. A. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 4, p. 215-225, jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302012000400001>.

BROWN, M. Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. **Advances in Physiology Education**, v. 32, n. 2, p. 120-126, jun. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1152/advan.90111.2008>.

BRUNT, E. M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 15080, dec. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2015.80>.

BUSTIN, S. A. *et al.* As Diretrizes do MIQE: Informações Mínimas para Publicação de Experimentos de PCR Quantitativos em Tempo Real. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, abr. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

CARDOSO, E. C.; CAMARGO, M. J. G. Terapia Ocupacional em Saúde da Mulher: Impacto dos sintomas do climatério na atividade profissional. **Tempus-Actas de Saúde Coletiva**, v. 11, n. 1, p. 153-167, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.18569/tempus.v11i1.2273>.

CARTER, H. N.; CHEN, C. C. W.; HOOD, D. A. Mitochondria, muscle health, and exercise with advancing age. **Physiology**, v. 30, n. 3, p. 208-223, may. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1152/physiol.00039.2014>.

CASTOLDI, A. *et al.* The Macrophage Switch in Obesity Development. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 637, p. 1-11, jan. 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00637.

CAVIGLIA, G. P. Interplay between Oxidative Stress and Metabolic Derangements in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The Role of Selenoprotein P. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21228838>.

CHAKRAVARTHY, M. V. *et al.* Harnessing Muscle–Liver Crosstalk to Treat Nonalcoholic Steatohepatitis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, dec. 2020. Doi: 10.3389/fendo.2020.592373.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: I. kinetics of oxygen utilization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 217, n. 1, p. 383-393, nov. 1955. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)57189-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)57189-7).

CHHIMPA, N. *et al.* The Novel Role of Mitochondrial Citrate Synthase and Citrate in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 94, n. 1, p. 453-472, jul. 2023. DOI: 10.3233/JAD-220514.

CHLEBOWSKI, R. T. *et al.* Association of Menopausal Hormone Therapy With Breast Cancer Incidence and Mortality During Long-term Follow-up of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. **JAMA**, v. 324, n. 4, p. 369–380, jul. 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.9482.

CHO, E. J. *et al.* Role of exercise in estrogen deficiency-induced sarcopenia. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 18, n. 1, p. 2-9, feb. 2022. DOI: <https://doi.org/10.12965%2Fjer.2244004.002>.

CODELLA, R. *et al.* Overexpression of UCP3 decreases mitochondrial efficiency in mouse skeletal muscle in vivo. **FEBS Lett**, v. 597, n. 2, p. 309-319, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14494>.

CONCEA - CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica**, Brasília/DF, 2023.

CORRIVEAU, P. *et al.* O treinamento de resistência previne o acúmulo de gordura no fígado em ratas ovariectomizadas. **Elsevier**, v. 59, n. 3, p. 259-267, mar. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2008.02.005>.

COSTA, N. M. B. **Nutrição Experimental: Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Ed. Rubio, 2014.

COSTA, A. *et al.* Impact of repeated bouts of eccentric exercise on sarcolemma disruption in human skeletal muscle. **Acta Physiol Hung**, v. 96, n. 2, p. 189-202, jun. 2009. DOI: [10.1556/APhysiol.96.2009.2.4](https://doi.org/10.1556/APhysiol.96.2009.2.4).

CÔTÉ, I. *et al.* Liver fat accumulation may be dissociated from adiposity gain in ovariectomized rats. **Climacteric**, v. 15, n. 6, p. 594-601, dec. 2012. DOI: <https://doi.org/10.3109/13697137.2011.637650>.

CRUZ-JENTOFT, A. J.; SAYER, A. A. Sarcopenia. **The Lancet**, v. 393, n. 10191, p. 2636-2646, jun. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)31138-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)31138-9).

CRUZ-JENTOFT, A. J. *et al.* Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. **Age and Ageing**, v. 48, n. 4, may. 2019. DOI: [10.1093/ageing/afz046](https://doi.org/10.1093/ageing/afz046).

DAVIS *et al.* Menopause. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 15004, apr. 2015. DOI: [10.1038/nrdp.2015.4](https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.4).

DAVIS, S. R.; BABER, R. J. Treating menopause — MHT and beyond. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 18, p. 490–502, may. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00685-4>.

DELLA TORRE, S. *et al.* An Essential Role for Liver ER $\alpha$  in Coupling Hepatic Metabolism to the Reproductive Cycle. **Cell Reports**, v. 15, n. 2, p. 360-371, apr. 2016.

DEMINE, S.; RENARD, P.; ARNOULD, T. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. **Cells**, v.8, n. 8, jul. 2019. DOI: [10.3390/cells8080795](https://doi.org/10.3390/cells8080795).

DISTEFANO, J. K. NAFLD and NASH in Postmenopausal Women: Implications for Diagnosis and Treatment. **Endocrinology**, v. 161, n. 10, oct. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1210/en-docr/bqaa134>.

DOMINGOS, M. M. *et al.* Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. **Eur J Appl Physiol.**, v. 112, n. 4, p. 1437-1444, apr. 2012. DOI: 10.1007/s00421-011-2098-6.

DONGES, C. E. *et al.* Concurrent resistance and aerobic exercise stimulates both myofibrillar and mitochondrial protein synthesis in sedentary middle-aged men. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 12, p. 1992-2001, jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1152/japphysiol.00166.2012>.

DREYER, H. C. *et al.* Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. **J Physiol.**, v. 576, n. 2, p. 613-624, oct. 2006. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.113175.

DUPONT, P. Y. *et al.* Computational identification of transcriptionally co-regulated genes, validation with the four ANT isoform genes. **BMC Genomics**, v. 13, n. 482, sep. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-482>.

ECHTAY, K. S. *et al.* Uncoupling proteins: Martin Klingenberg's contributions for 40 years. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 657, n. 1, p. 41-55, nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.09.006>.

ECKSTROM, E. *et al.* Physical Activity and Healthy Aging. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 36, n. 4, p. 671-683, aug. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cger.2020.06.009>.

ESTERBAUER, H. *et al.* A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. **Nature Genetics**, v. 28, p. 178-183, jun. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1038/88911>.

FEBRASGO - Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. **Manual de Orientação em Climatério**, 2010.

FENTZ, J. *et al.* AMPK $\alpha$  is critical for enhancing skeletal muscle fatty acid utilization during in vivo exercise in mice. **FASEB J**, v. 29, n. 5, p. 1725-1738, may. 2015. DOI: 10.1096/fj.14-266650.

FIEDORCZUK, K. *et al.* Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I. **Nature**, v. 538, p. 406-410, oct. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature19794>.

FIGUEIREDO, P. A. *et al.* Age-Induced Morphological, Biochemical, and Functional Alterations in Isolated Mitochondria From Murine Skeletal Muscle. **The Journals of Gerontology**, v. 63, n. 4, p. 350-359, apr. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1093/gerona/63.4.350>.

FIUZA-LUCES, C. *et al.* Physical Exercise and Mitochondrial Disease: Insights From a Mouse Model. **Frontiers in Neurology**, v. 10, n. 790, jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00790>.

FJELDSTAD, C. *et al.* Whole-body vibration augments resistance training effects on body composition in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 63, n. 1, p. 79-83, may. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2009.03.013>.

FLACK, K. D. *et al.* Resistance exercise training and in vitro skeletal muscle oxidative capacity in older adults. **Physiological Reports**, v. 4, n. 13, jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.14814/phy2.12849>.

FLEISHER, L. A. **Anesthesia and Uncommon Diseases**. 6 ed., Saunders, 2012.

FLIERL, A. *et al.* The mitochondrial adenine nucleotide transporters in myogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 188, p. 312-327, aug. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.05.022>.

FRAGALA, M. S. *et al.* Resistance Training for Older Adults: Position Statement From the National Strength and Conditioning Association. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 33, n. 8, p. 2019-2052, aug. 2019. DOI: 10.1519/JSC.0000000000003230.

FUKU, N. *et al.* The mitochondrial-derived peptide MOTS-c: a player in exceptional longevity? **Aging Cell**, v. 14, n. 6, p. 921-923, dec. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/accel.12389>.

FULLER, K. N. Z. *et al.* Estradiol treatment or modest exercise improves hepatic health and mitochondrial outcomes in female mice following ovariectomy. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 320, n. 6, p. 1020–1031, jun. 2021. DOI: 10.1152/ajpendo.00013.2021.

GARCIA-BENLLOCH, S. *et al.* MOTS-c promotes muscle differentiation in vitro. **Peptides**, v. 155, sep. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170840>.

GEHRKE, N.; SCHATTENBERG, J. M. Metabolic Inflammation-A Role for Hepatic Inflammatory Pathways as Drivers of Comorbidities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease? **Gastroenterology**, v. 158, n. 7, p. 1929-1947, may. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.020>.

GERACI, A. *et al.* Sarcopenia and Menopause: The Role of Estradiol. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, may 2021. DOI: 10.3389/fendo.2021.682012.

GILLEN, J. B. *et al.* Twelve Weeks of Sprint Interval Training Improves Indices of Cardiometabolic Health Similar to Traditional Endurance Training despite a Five-Fold Lower Exercise Volume and Time Commitment. **PLoS One**, v. 11, n. 4, apr. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0154075.

GIORGI, C.; MARCHI, S.; PINTON, P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 19, n. 11, p. 713-730, nov. 2018. DOI: 10.1038/s41580-018-0052-8.

GNAIGER, E. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. An Introduction to OXPHOS Analysis. **Mitochondr Physiol Network**, v.17, n.18, p.1-64, 2012.

GOMES, R. M. Strength training reverses ovariectomy-induced bone loss and improve metabolic parameters in female Wistar rats. **Life Sci**, v, 15, n. 213, p. 134-141, nov. 2018. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.10.032.

GOMES-GATTO, C. V. *et al.* Estrogen deficiency in ovariectomized rats: can resistance training re-establish angiogenesis in visceral adipose tissue? **CLINICS**, v. 71, n. 9, p. 528-536. DOI: [https://doi.org/10.6061/clinics/2016\(09\)08](https://doi.org/10.6061/clinics/2016(09)08).

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, may. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0450-4>

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, apr. 2014. DOI: 10.1096/fj.13-242750.

GUARDIA, L. D.; LUZI, L.; CODELLA, R. Muscle-UCP3 in the regulation of energy metabolism. **Mitochondrion**, v. 76, may. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2024.101872>.

GUSDON, A. M.; SONG, K. X.; QU, S. Nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis and therapeutics from a mitochondria-centric perspective. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, oct. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/637027>.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology**. 13 ed. Elsevier, 2016.

GROENNEBAEK, T.; VISSING, K. Impact of Resistance Training on Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis, Content, and Function. **Frontiers in Physiology**, v. 8, sep. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00713>.

HALL, G. V. Lactate as a fuel for mitochondrial respiration. **Acta Physiol Scand**, v. 168, n. 4, p. 643-656, apr. 2000. DOI: 10.1046/j.1365-201x.2000.00716.x.

HAMADA, T.; ARIAS, E. B.; CARTEE, G. D. Increased submaximal insulin-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle after treadmill exercise. **J Appl Physiol**, v. 101, n. 5, p. 1368-1376, nov. 2006. DOI: 10.1152/jappphysiol.00416.2006.

HAMAGUCHI, M. *et al.* Aging is a risk factor of nonalcoholic fatty liver disease in premenopausal women. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 3, p. 237-243, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.3748%2Fwjg.v18.i3.237>.

HAO, L. *et al.* Effects of treadmill exercise training on liver fat accumulation and estrogen receptor alpha expression in intact and ovariectomized rats with or without estrogen replacement treatment. **European Journal of Applied Physiology**, v. 109, p. 879–886, mar. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1426-6>.

HARLOW, S. D. *et al.* Executive Summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: Addressing the Unfinished Agenda of Staging Reproductive Aging. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 4, p. 1159-1168, apr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3362>.

HASHIDA, R. *et al.* Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 142-152, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.023>.

HEPPLE, R. T. Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, sep. 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00211>.

HERBISON, A. E. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, p. 452-466, may. 2016. DOI: [10.1038/nrendo.2016.70](https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.70).

HERZIG, S.; SHAW, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 19, n. 2, p. 121–135, feb. 2018. DOI: [10.1038/nrm.2017.95](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95).

HEVENER, A. L. *et al.* The Impact of Skeletal Muscle ER $\alpha$  on Mitochondrial Function and Metabolic Health. **Endocrinology**, v. 161, n. 2, feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1210/endo-cr/bqz017>.

HOENE, M. *et al.* Exercise prevents fatty liver by modifying the compensatory response of mitochondrial metabolism to excess substrate availability. **Mol Metab.**, v. 54, oct. 2021. DOI: [10.1016/j.molmet.2021.101359](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101359).

HOFFMANN, C. *et al.* Response of Mitochondrial Respiration in Adipose Tissue and Muscle to 8 Weeks of Endurance Exercise in Obese Subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 105, n. 11, nov. 2020. DOI: [10.1210/clinem/dgaa571](https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa571).

HONG, H. C. *et al.* Relationship between sarcopenia and nonalcoholic fatty liver disease: The Korean Sarcopenic Obesity Study. **Hepatology**, v. 59, n. 5, p. 1772-1778, may. 2014. DOI: [10.1002/hep.26716](https://doi.org/10.1002/hep.26716).

HOOD, D. A. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, n. 3, p. 1137-1157, mar. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.3.1137>.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 29, n.1, p. 16-31, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1139/h04-002>.

HSU, L. H.; CHU, N. M.; KAO, S. H. Estrogen, Estrogen Receptor and Lung Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, aug. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18081713>.

HU, Y. *et al.* Passive exercise is an effective alternative to HRT for restoring OVX induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. **Front. Endocrinol**, v. 15, jan. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1356312>.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatísticas Sociais**. População cresce, mas número de pessoas com menos de 30 anos cai 5,4% de 2012 a 2021, 2022.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE Educa**. Homens e mulheres, 2022.

IPSEN, D. H.; LYKKESFELDT, J.; TVEDEN-NYBORG, P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Cellular and Molecular Life and Sciences**, v. 75, n. 18, p. 3313-3327, jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007%2Fs00018-018-2860-6>.

IWAKI, M. *et al.* Impact of Sarcopenia on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients**, v. 15, n. 4, feb. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fnu15040891>.

JACKSON, K. C. *et al.* Ectopic lipid deposition and the metabolic profile of skeletal muscle in ovariectomized mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 304, p. 206-217, feb. 2013. doi:10.1152/ajpregu.00428.2012.

JACOBS, R. A. *et al.* Fast-twitch glycolytic skeletal muscle is predisposed to age-induced impairments in mitochondrial function. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 68, n. 9, p. 1010-1022, sep. 2013. DOI: 10.1093/gerona/gls335.

JEE, W. S.; YAO W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 1, n. 3, p. 193-207, mar. 2001.

JEONG, S.; YOON, M. Swimming's prevention of ovariectomy-induced obesity through activation of skeletal-muscle PPAR $\alpha$ . **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 22, n. 1, p. 1-10, feb. 2012. DOI: 10.1123/ijsnem.22.1.1.

JEPPESEN, T. D. *et al.* Aerobic training is safe and improves exercise capacity in patients with mitochondrial myopathy. **Brain**, v. 129, n. 12, p. 3402-3412, dec. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/awl149>.

JIANG, H. *et al.* Identification and characterization of novel MPC1 gene variants causing mitochondrial pyruvate carrier deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 45, n. 2, p. 264-277, mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/jimd.12462>.

JIN, X. *et al.* Uncoupling protein and nonalcoholic fatty liver disease. **Chin Med J**, v. 126, n. 16, aug. 2013. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20130940.

JOHNSON, J. *et al.* Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v. 428, p. 145-150, mar. 2004.

KALYANI, R. R.; CORRIERE, M.; FERRUCCI, L. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 2, n. 10, p. 819-829, oct. 2014. DOI: [https://doi.org/10.1016%2FS2213-8587\(14\)70034-8](https://doi.org/10.1016%2FS2213-8587(14)70034-8).

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v. 15, n.3, p. 175-19, dec. 1991. DOI: 10.1016/0169-6009(91)90124-i.

KAMADA, Y. *et al.* Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high-fat and high-cholesterol diet. **American Journal of Physiology**, v. 301, n. 6, p. 945-1098, dec. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00211.2011>.

KAMER, K. J.; MOOTHA, V. K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, p. 545-553, aug. 2015. DOI: 10.1038/nrm4039.

KANE, D. A. Lactate oxidation at the mitochondria: a lactate-malate-aspartate shuttle at work. **Front Neurosci**, v. 8, n. 366, nov. 2014. DOI: 10.3389/fnins.2014.00366.

KANG, G. M. *et al.* Mitohormesis in Hypothalamic POMC Neurons Mediates Regular Exercise-Induced High-Turnover Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 2, p. 334-349, feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.01.003>.

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, feb. 2017. DOI: <https://doi.org/10.11005%2Fjbm.2017.24.1.9>.

KAVANAGH, I.; JONES, G.; NAYAB, S. N. **PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide**. Caister Academic Press, 2011. p.77.

KHADILKAR, S. S. Musculoskeletal Disorders and Menopause. **J Obstet Gynaecol India**, v. 69, n. 2, p. 99-103, mar. 2019. DOI: 10.1007/s13224-019-01213-7.

KHAN, A. A. The Biochemical and Clinical Perspectives of Lactate Dehydrogenase: An Enzyme of Active Metabolism. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 20, n. 6, p. 855-868, 2020. DOI: 10.2174/1871530320666191230141110.

KIM, S. J. *et al.* MOTS-c: an equal opportunity insulin sensitizer. **Journal of Molecular Medicine**, v. 97, p. 487-490, feb. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01758-0>.

KIM, S. J. *et al.* The mitochondrial-derived peptide MOTS-c is a regulator of plasma metabolites and enhances insulin sensitivity. **Physiol Rep**, v. 7, n. 13, jul. 2019. DOI: 10.14814/phy2.14171.

KIM, D. *et al.* The effects of Sutaehwan-Gami on menopausal symptoms induced by ovariectomy in rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, n. 227, nov. 2012. DOI: 10.1186/1472-6882-12-227.

KIM, G.; KIM, J. H. Impact of skeletal muscle mass on metabolic health. **Endocrinology and Metabolism**, v. 35, n. 1, p. 1-6, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3803/EnM.2020.35.1.1>.

KIM, K. H.; LEE, C. B. Socialized mitochondria: mitonuclear crosstalk in stress. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 56, p. 1033-1042, may. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01211-4>.

KIRIK, A. *et al.* The relationship of circulating MOTS-c level with liver fibrosis and metabolic components in patients with metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 27, n. 17, p. 8074-8080, sep. 2023. DOI: 10.26355/eurrev\_202309\_33567.

KIYAMA, R.; KIYAMA, Y. W. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. **Environment International**, v. 83, p. 11-40, oct. 2015. DOI: 10.1016/j.envint.2015.05.012.

KO, S.; JUNG, Y. J. Energy Metabolism Changes and Dysregulated Lipid Metabolism in Postmenopausal Women. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 45-56, dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13124556>.

KOEBELE, S. V.; BIMONTE-NELSON, H. A. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. **Maturitas**, v. 87, p. 5-17, may. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016%2Fj.maturitas.2016.01.015>.

KOLIAKI, C. *et al.* Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 5, p. 739-746, may 2015.

KOO, B. K. *et al.* Sarcopenia is an independent risk factor for non-alcoholic steatohepatitis and significant fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 123-131, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.019>.

KUMAGAI, H. *et al.* MOTS-c reduces myostatin and muscle atrophy signaling. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 320, n. 4, p. 680–690, apr. 2021. DOI: 10.1152/ajpendo.00275.2020.

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, may 2008.

LAMBETH, M. J.; KUSHMERICK, M. J. A computational model for glycogenolysis in skeletal muscle. **Ann Biomed Eng**, v. 30, n. 6, p. 808-827, jun. 2002. DOI: 10.1114/1.1492813.

LARSEN, S. *et al.* Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 14, p. 3349-3360, jul. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230185>.

LEE, C. Nuclear transcriptional regulation by mitochondrial-encoded MOTS-c. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 6, n. 2, feb. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/23723556.2018.1549464>.

LEE, C.; KIM, K. H.; COHEN, P. MOTS-c: A novel mitochondrial-derived peptide regulating muscle and fat metabolism. **Free Radic Biol Med.**, v. 100, p. 182-187, nov. 2016. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.015.

LEE, Y. *et al.* Sarcopenia is associated with NAFLD independently of obesity and insulin resistance: Nationwide surveys (KNHANES 2008–2011). **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 2, p. 486-493, aug. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.051>.

LEE, C. *et al.* The Mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. **Cell Metabolism**, v.21, n. 3, p. 443–454, mar. 2015. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.02.009.

LEE, H. *et al.* MiR-141-3p promotes mitochondrial dysfunction in ovariectomy-induced sarcopenia via targeting Fkbp5 and Fibin. **Ageing**, v. 13, n. 4, p. 4881–4894, feb. 2021. DOI: 10.18632/ageing.202617.

LEITE, R. D. *et al.* Efeitos da ovariectomia e treinamento de resistência no conteúdo lipídico no músculo esquelético, fígado e coração; depósitos de gordura; e perfil lipídico. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 34, n. 3, p. 1079-1086, dez. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1139/H09-116>.

LEITE, R. D. *et al.* Menopause: Highlighting the Effects of Resistance Training. **International Journal of Sports Medicine**, v.31, p.761-767, jul. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1263117>.

LEMINI, C. *et al.* Ovariectomy differential influence on some hemostatic markers of mice and rats. **Experimental Animals**, v. 64, n. 1, p. 81-89, oct. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1538%2Fexpanim.14-0052>.

LEMOINE, S. *et al.* Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha expression in different rat skeletal muscle type. **Acta Physiologica**, v. 175, n. 3, p. 211-217, jul. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2002.00992.x>.

LETELLIER, T. *et al.* Mitochondrial Myopathy Studies on Permeabilized Muscle Fibers1. **Pediatric Research**, v. 32, n. 1, p. 17-22, jan. 1992.

LI, S. *et al.* Loss of muscle mass in women with premature ovarian insufficiency as compared with healthy controls. **Menopause**, v. 1, n. 2, p. 122-127, feb. 2023. DOI: [10.1097/GME.0000000000002120](https://doi.org/10.1097/GME.0000000000002120).

LIMA, T. F. O.; DUARTE, D. A.; SÁ, A. L. B. Mitochondria Revised. **Electronic Journal Collection Health**, v. 2, p. 94-107, 2011.

LIMONTA, P. *et al.* GnRH in the Human Female Reproductive Axis. **Vitamins and Hormones**, v. 107 p. 27-66, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.003>.

LINO, A. D. S. *et al.* O treinamento resistido e a restrição calórica previnem o aumento da pressão arterial sistólica melhorando o efeito do óxido nítrico no músculo liso e as alterações morfológicas na aorta de ratas ovariectomizadas. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, ago. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201843>.

LIU, H. W.; KAO, H. H.; WU, C. H. Exercise training upregulates SIRT1 to attenuate inflammation and metabolic dysfunction in kidney and liver of diabetic db/db mice. **Nutrition & Metabolism**, v. 16, n. 22, apr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0349-4>.

LIU, X. *et al.* Acetate production from glucose and coupling to mitochondrial metabolism in mammals. **Cell**, v. 175, n. 2, p. 502-513, oct. 2018. DOI: [10.1016/j.cell.2018.08.040](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.040).

LIVAK, N. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dec. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LOBO, R. A. *et al.* Prevention of diseases after menopause. **Climacteric**, v. 17, n. 5, p. 540-556, oct. 2014.

- LU, H. *et al.* The mitochondrial genome-encoded peptide MOTS-c interacts with Bcl-2 to alleviate nonalcoholic steatohepatitis progression. **Cell Reports**, v. 43, n. 1, p. 113-587, jan. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113587>.
- LU, H. *et al.* MOTS-c peptide regulates adipose homeostasis to prevent ovariectomy-induced metabolic dysfunction. **Journal of Molecular Medicine**, v. 97, p. 473-485, feb. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00109-018-01738-w>.
- LUND, M. T. *et al.* Hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation is normal in obese patients with and without type 2 diabetes. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 15, p. 4351-4358, aug. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1113/JP272105>.
- MACLALLAN, J. D. *et al.* Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2343-2350, aug. 2005. DOI: [10.2337/diabetes.54.8.2343](https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2343).
- MAGOSSO, N. S. S. **Efeitos do treinamento de força a da reposição hormonal no mecanismo de ação de irisina de ratas ovariectomizadas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- MALTAIS, M. L.; DESROCHES, J.; DIONNE, I. J. Changes in muscle mass and strength after menopause. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v.9, n.4, p.186-197, oct. 2009.
- MANSOURI, A; GATTOLLIAT, C. H.; ASSELAH, T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. **Gastroenterology**, v. 155, n. 3, p. 629-647, sep. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.06.083>.
- MARIN *et al.*, Resistance training prevents dynamics and mitochondrial respiratory dysfunction in vastus lateralis muscle of ovariectomized rats. **Experimental Gerontology**, v. 173, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2023.112081>.
- MARTÍNEZ-REYES, I.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. **Nature Communications**, v. 3, n. 11, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>.
- MARZETTI, E. *et al.* Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2288-2301, oct. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016%2Fj.biocel.2013.06.024>.
- MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 3, p. 309-338, jun. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1210/er.2012-1055>.
- MCCOMMIS, K. S. *et al.* Nutritional modulation of heart failure in mitochondrial pyruvate carrier-deficient mice. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 11, p. 1232-1247, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00296-1>.

MENDHAM, A. E. *et al.* Exercise training improves mitochondrial respiration and is associated with an altered intramuscular phospholipid signature in women with obesity. **Diabetologia**, v. 64, n. 7, p. 1642–1659, mar. 2021. DOI: 10.1007/s00125-021-05430-6.

MEMME, J. M.; HOOD, D. A. Molecular Basis for the Therapeutic Effects of Exercise on Mitochondrial Defects. **Frontiers in Physiology**, v. 11, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.615038>.

MERRY, T. L. *et al.* Mitochondrial-derived peptides in energy metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 319, n. 4, p. 659-666, oct. 2020. DOI: 10.1152/ajpendo.00249.2020.

MESSIER, V. Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones. **Maturitas**, v. 68, n. 4, p. 331-336, feb. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.01.014>.

MILLER, B. *et al.* Mitochondrial DNA variation in Alzheimer's disease reveals a unique micro-protein called SHMOOSE. **Mol Psychiatry**, v. 28, n. 4, p. 1813–1826 apr. 2023. DOI: 10.1038/s41380-022-01769-3.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144–148, jul. 1961. DOI: <https://doi.org/10.1038/191144a0>.

MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. **Bioenergetics**, v. 1807, n. 12, p. 1507-1538, dec. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2011.09.018>.

MONTEIRO, A. R. B. **Efeito do treinamento resistido na função mitocondrial e na expressão gênica da ucp-3 no músculo de ratas ovariectomizadas**. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

MONTELEONE, P. *et al.* Symptoms of menopause — global prevalence, physiology and implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 4, p. 199-215, feb. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.180>.

MORIO, B. *et al.* Role of mitochondria in liver metabolic health and diseases. **Cell Calcium**, v. 94, mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102336>.

MUKUND, K.; SUBRAMANIAM, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 12, n. 1, p. 14-62, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>.

MUNDI, M. S. *et al.* Evolution of NAFLD and Its Management. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 35, n. 1, p. 72-84, feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ncp.10449>.

NAMS - NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY. Menopause Guide, 2013.

NAMS - NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY. Promoting women's health at mid-life and beyond, 2020.

NAGAI, S. *et al.* Estrogen modulates exercise endurance along with mitochondrial uncoupling protein 3 downregulation in skeletal muscle of female mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 480, n. 4, p. 758-764, nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.129>.

NASHINE, S.; KENNEY, M. C. Effects of Mitochondrial-Derived Peptides (MDPs) on Mitochondrial and Cellular Health in AMD. **Cells**, v. 9, n. 5, apr. 2020. DOI: 10.3390/cells9051102.

NASSIR, F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. **Biomolecules**, v. 12, n. 6, jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom12060824>.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals**, Washington, D. C.; National Academy Press, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

NELSON, H. D. Menopause. **The Lancet**, v. 371, n. 9614, p. 760-770, mar. 2008. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60346-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60346-3).

NEWSON, L. Menopause and cardiovascular disease. **SAGE Journals**, v. 24, n. 1, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/2053369117749675>.

NIELSEN, J. *et al.* Plasticity in mitochondrial cristae density allows metabolic capacity modulation in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 595, n. 9, p. 2839-2847, may. 2017. DOI: 10.1113/JP273040.

NIEVAS, A. F. *et al.* Depressão no climatério: indicadores biopsicossociais. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 55, n. 4, p. 274-279, dez. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0047-20852006000400003>.

OPOKU, A. A.; ABUSHAMA, M.; KONJE, J. C. Obesity and menopause. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 88, p. 1023-1048, jun. 2023. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2023.102348.

PAQUETTE, A. *et al.* Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: Impact of a high-fat diet. **Maturitas**, v. 58, n. 2, p. 182-190, 20 oct. 2007.

PARISE, G.; BROSE, A. N.; TARNOPOLSKY, M. A. Resistance exercise training decreases oxidative damage to DNA and increases cytochrome oxidase activity in older adults. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 3, p. 173-180, mar. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.09.002>.

PASCO, J. A. *et al.* Fatty Liver Index and Skeletal Muscle Density. **Calcified Tissue International**, v. 110, n. 6, p. 649-657, jun. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00223-021-00939-9>.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as medicine - Evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 25, p. 1-72, nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/sms.12581>.

PESSAYRE, D.; MANSOURI, A.; FROMENTY, B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. **American Journal of Physiology**, v. 282, n. 2, p. 193-199, feb. 2002. DOI: 10.1152/ajpgi.00426.2001.

PESTA, D.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. **Methods Mol Biol**, v 810, p. 25–58, 2012. DOI: 10.1007/978-1-61779-382-0\_3.

POPOV, L. D. Mitochondrial biogenesis: An update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 9, p. 4892–4899, may. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111%2Fjcmm.15194>.

PORTER, C. *et al.* Resistance Exercise Training Alters Mitochondrial Function in Human Skeletal Muscle. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 47, n. 9, p. 1922–1931, sep. 2015. DOI: 10.1249/MSS.0000000000000605.

PROSSNITZ, E. R.; ARTERBURN, J. B. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVII. G Protein–Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 3, p. 505-540, jul. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1124%2Fpr.114.009712>.

PROTASONI, M.; ZEVIANI, M. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n. 2, jan. 2021. DOI: 10.3390/ijms22020586.

QUEIROZ, A. L. F. DE. **Efeito da ovariectomia e do treinamento resistido nos parâmetros hemodinâmicos e na função mitocondrial do rim e do ventrículo esquerdo de ratas**. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

RAMANATHAN, R.; ALI, A. H.; IBDAH, J. A. Mitochondrial Dysfunction Plays Central Role in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23137280>.

RAMSDEN, D. B. *et al.* Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Brain and Behavior**, v. 2, n. 4, p. 468-478, jul. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/brb3.55>.

RASHEED, M. R. H. A.; TARJAN, G. Succinate Dehydrogenase Complex: An Updated Review. **Archives**, v. 142, n. 12, p. 1564–1570, dec. 2018. DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0285-RS>.

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, jan. 2014.

REYNOLDS, J. C. *et al.* MOTS-c is an exercise-induced mitochondrial-encoded regulator of age-dependent physical decline and muscle homeostasis. **Nature Communications**, v. 12, n. 470, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20790-0>.

RIBAS, V. *et al.* Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ER $\alpha$ -deficient mice. **American Journal of Physiology**, feb. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00504.2009>.

RICHARDS, J. S. Chapter One - The Ovarian Cycle. **Vitamins and Hormones**, v. 107 p. 1-25, 2018. DOI: 10.1016/bs.vh.2018.01.009.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. **The Biochemical Journal**, v. 345, n. 2, p. 161–179, jan. 2000.

RICQUIER, D.; CASTEILLA, L.; BOUILLAUD, F. Molecular studies of the uncoupling protein. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 9, p. 2237-2242, jun. 1991. DOI: 10.1096/fasebj.5.9.1860614.

ROBKER, R. L.; HENNEBOLD, J. D.; RUSSELL, D. L. Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time. **Endocrinology**, v. 159, n. 9, p. 3209-3218, sep. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1210%2Fen.2018-00485>.

RODRIGUES, F. *et al.* A Review on Aging, Sarcopenia, Falls, and Resistance Training in Community-Dwelling Older Adults. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 2, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fijerph19020874>.

RODWELL, V. W. *et al.* Harper's Illustrated Biochemistry. 31. ed. McGraw Hill, 2018.

ROGATZKI, M. J. *et al.* Lactate is always the end product of glycolysis. **Front Neurosci**, v. 9, n. 22, feb. 2015. DOI: 10.3389/fnins.2015.00022.

ROGERS, N. H. *et al.* Reduced Energy Expenditure and Increased Inflammation Are Early Events in the Development of Ovariectomy-Induced Obesity. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2161-2168, may. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1210%2Fen.2008-1405>.

ROSS, F. A.; MACKINTOSH, C.; HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. **FEBS J.**, v. 283, n. 16, p. 2987–3001, aug. 2016. DOI: 10.1111/febs.13698.

ROSSINI, J. **O Treinamento Resistido Previne a Disfunção Mitocondrial no Córtex Pré-Frontal e no Músculo Vasto Lateral de Ratas Ovariectomizadas.** Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

RYGIEL, K. A.; PICARD, M.; TURNBULL, D. M. The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 15, p. 4499-4512, aug. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1113%2FJP271212>.

SALVADEGO, D. *et al.* Skeletal muscle oxidative function in vivo and ex vivo in athletes with marked hypertrophy from resistance training. **J Appl Physiol**, v. 114, n. 11, p. 1527-1535, jun. 2023. DOI: 10.1152/jappphysiol.00883.2012.

- SANTORO, N. *et al.* The Menopause Transition: Signs, Symptoms, and Management Options. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 106, n. 1, p. 1-15, jan. 2021. DOI: 10.1210/clinem/dgaa764.
- SANTOS, J. D. M. *et al.* Strength Training Protects High-Fat-Fed Ovariectomized Mice against Insulin Resistance and Hepatic Steatosis. **Int J Mol Sci**, v. 25, n. 10, 50-66, may. 2024. DOI: 10.3390/ijms25105066.
- SATAPATI, S. *et al.* Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 4, apr. 2016. DOI: 10.1172/JCI86695.
- SBEM - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. **Menopausa**, 2018. Disponível em: <https://www.endocrino.org.br/sbem-responde-menopausa/#:~:text=%E2%80%93Em%20geral%2C%20a%20idade%20das,entre%2045%20a%2055%20anos>. Acesso em: 01 dez. 2022.
- SCARLATO, G. C. G. **Efeito do treinamento resistido sobre o coeficiente de controle de fluxo (fcc) da cadeia respiratória mitocondrial do músculo gastrocnêmio de ratas ovariectomizadas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.
- SEIFERT, E. L. *et al.* The mitochondrial phosphate carrier: Role in oxidative metabolism, calcium handling and mitochondrial Disease. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 464, n. 2, p. 369–375, aug. 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.031.
- SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 6, p. 624-630, jun. 2013.
- SEQUEIRA, I. R. *et al.* Plasma mitochondrial derived peptides MOTS-c and SHLP2 positively associate with android and liver fat in people without diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1865, n. 11, nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129991>.
- SEVERINSEN, M. C. K.; PEDERSEN, B. K. Muscle–Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. **Endocrine Reviews**, v. 41, n. 4, p. 594-609, may. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1210/ENDREV/BNAA016>.
- SHARMA, A. *et al.* AMP-activated protein kinase: An energy sensor and survival mechanism in the reinstatement of metabolic homeostasis. **Experimental Cell Research**, v. 428, n. 1, jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113614>.
- SHEPHERD, D.; GARLAND, P. B. Citrate synthase from rat liver: [EC 4.1.3.7 Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. **Methods in Enzymology**, v. 13, p. 11-16, DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(69\)13006-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(69)13006-2).
- 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, oct. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2010.01284.x>.

SILVA, C. D. H.; PINEDA, J. C. V.; SUÁREZ, A. L. P. Expression and Role of the G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPR30/GPER) in the Development and Immune Response in Female Reproductive Cancers. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, n. 544, aug. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389%2Ffendo.2020.00544>.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SMITH, B. K. *et al.* Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 331, n. 4, p. 730-740, oct. 2016. DOI: 10.1152/ajpendo.00225.2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA. **Envelhecimento e longevidade**, 2020.

SORRENTINO, V.; MENZIES, K. J.; AUWERX, J. Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 6, n.58, p. 353-389, jan. 2018. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104908.

SOUZA, C. F. M. **Um estudo clínico, bioquímico histoquímico e genético-molecular de pacientes com doenças do DNA mitocondrial**. Tese (Doutor em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SREEDHAR, A.; ZHAO, Y. Uncoupling Protein 2 and Metabolic Diseases. **Mitochondrion**, v. 34, p. 135–140, may. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016%2Fj.mito.2017.03.005>.

STANKOVÁ, Adaptation of Mitochondrial Substrate Flux in a Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 3, feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21031101>.

SUMIEN, N. *et al.* Neurodegenerative Disease: Roles for Sex, Hormones, and Oxidative Stress. **Endocrinology**, v. 162, n. 11, p. 1-14, nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab185>.

SUNNY, N. E. *et al.* Excessive Hepatic Mitochondrial TCA Cycle and Gluconeogenesis in Humans with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 804–810, dec. 2011. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.11.004.

SUNNY, N. E.; BRIL, F.; CUSI, K. Mitochondrial Adaptation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Mechanisms and Treatment Strategies. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 4, p. 250-260, apr. 2017. DOI: 10.1016/j.tem.2016.11.006.

SUZUKI, A.; ABDELMALEK, M. F. Nonalcoholic fatty liver disease in women. **Women's Health**, v. 5, n. 2, p. 191-203, mar. 2009. DOI: 10.2217/17455057.5.2.191.

TAKAHASHI, T. A.; JOHNSON, K. M. Menopause. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 3, p. 521-534, may. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.01.006>.

TAKAHASHI, A. *et al.* Simple Resistance Exercise helps Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. **Int J Sports Med**, v. 36, n. 10, p. 848-852, 2015. DOI: 10.1055/s-0035-1549853.

TAN, P. L. *et al.* Differential thiol oxidation of the signaling proteins Akt, PTEN or PP2A determines whether Akt phosphorylation is enhanced or inhibited by oxidative stress in C2C12 myotubes derived from skeletal muscle. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 62, p. 72-79, may. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.02.015>.

TAVOULARI, S. The yeast mitochondrial pyruvate carrier is a hetero-dimer in its functional state. **The EMBO Journal**, v. 38, n. 10, may. 2019. DOI: <https://doi.org/10.15252/embj.2018100785>.

TEPP, K. *et al.* High efficiency of energy flux controls within mitochondrial interactosome in cardiac intracellular energetic units. **BBA Bioenergetics**, v. 1807, n. 12, p. 1549-1561, dec. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.08.005>.

TORRES, M. J. Impact of 17 $\beta$ -estradiol on complex I kinetics and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in liver and skeletal muscle mitochondria. **J Biol Chem.**, v. 293, n. 43, p. 16889–16898, oct. 2018. DOI: [10.1074/jbc.RA118.005148](https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005148).

TSIALTAS, I. *et al.* Anti-Apoptotic and Antioxidant Activities of the Mitochondrial Estrogen Receptor Beta in N2A Neuroblastoma Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22147620>.

TURKEL, I. *et al.* Exercise and Metabolic Health: The Emerging Roles of Novel Exerkines. **Curr Protein Pept Sci**, v. 23, n. 7, p. 437-455. DOI: [10.2174/1389203723666220629163524](https://doi.org/10.2174/1389203723666220629163524).

VÁCZI, M. *et al.* Mechanical, Biochemical, and Electromyographic Responses to Short-Term Eccentric–Concentric Knee Extensor Training in Humans. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 25, n. 4, p. 922-932, apr. 2011. DOI: [10.1519/JSC.0b013e3181c1fa47](https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181c1fa47).

VAJAPEY, R. *et al.* The impact of age-related dysregulation of the angiotensin system on mitochondrial redox balance. **Front Physiol**, v. 24, n. 5, nov. 2014. DOI: [10.3389/fphys.2014.00439](https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00439).

VAN DER WINDT, D. J. *et al.* The effects of physical exercise on fatty liver disease. **Gene Expression**, v. 18, n. 2, p. 89-101, may. 2018. DOI: [10.3727/105221617X15124844266408](https://doi.org/10.3727/105221617X15124844266408).

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, jun. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.

VENTURA-CLAPIER, R. *et al.* Estrogens, Estrogen Receptors Effects on Cardiac and Skeletal Muscle Mitochondria. **Front. Endocrinol**, v. 10, aug. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00557>.

WALDEN, F. V. *et al.* Acute endurance exercise stimulates circulating levels of mitochondrial-derived peptides in humans. **J Appl Physiol**, v. 131, n. 3, p. 1035-1042, sep. 2021. DOI: [10.1152/jappphysiol.00706.2019](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00706.2019).

WAN, W. *et al.* Mitochondria-derived peptide MOTS-c: effects and mechanisms related to stress, metabolism and Aging. **Journal of Translational Medicine**, v. 21, n. 36, jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03885-2>.

WANG, X. *et al.* Transient systemic mtDNA damage leads to muscle wasting by reducing the satellite cell pool. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 19, p. 3976-3986, oct. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093%2Fhmg%2Fddt251>.

WARBURTON, D. E. R.; BREDIN, S. S. D. Health benefits of physical activity: a systematic review of current systematic reviews. **Current Opinion in Cardiology**, v. 32, n. 5, p. 541-556, sep. 2017. DOI: 10.1097/HCO.0000000000000437.

WEI, Y. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 2, p. 193-199, jan. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.14.193>.

WOODS, N. F.; MITCHELL, E. S. The Seattle Midlife Women's Health Study: a longitudinal prospective study of women during the menopausal transition and early postmenopause. **Women's Midlife Health**, v. 2, n. 6, p. 1-16, nov. 2016. DOI: 10.1186/s40695-016-0019-x.

XIA, D. *et al.* Structural Analysis of Cytochrome bc1 Complexes: Implications to the Mechanism of Function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v.1827, n. 11, p. 1278-1294, nov. 2013. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.11.008.

YANG, B. *et al.* MOTS-c interacts synergistically with exercise intervention to regulate PGC-1 $\alpha$  expression, attenuate insulin resistance and enhance glucose metabolism in mice via AMPK signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 6, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166126>.

YANG, J. D. *et al.* Gender and Menopause Impact Severity of Fibrosis Among Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. **Hepatology**, v. 59, n. 4, p. 1406-1414, apr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002%2Fhep.26761>.

YIEM, N. K. H.; FINCK, B. N. The mitochondrial pyruvate carrier at the crossroads of intermediary metabolism. **American Journal of Physiology**, v. 323, n. 1, p. 33-52, jul. 2022. DOI: 10.1152/ajpendo.00074.2022.

YIN, X. *et al.* The intraperitoneal administration of MOTS-c produces antinociceptive and anti-inflammatory effects through the activation of AMPK pathway in the mouse formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 870, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172909>.

YOH, K. *et al.* Roles of Estrogen, Estrogen Receptors, and Estrogen-Related Receptors in Skeletal Muscle: Regulation of Mitochondrial Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, fev. 2023. DOI: 10.3390/ijms24031853.

YOO, H. J. *et al.* Association of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) with NAFLD, metabolic syndrome, and atherosclerosis. **PLoS One**, v. 12, n. 4, apr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0174717>.

YOO, J. H.; LIU, Y.; KIM, H.S. Hawthorn Fruit Extract Elevates Expression of Nrf2/HO-1 and Improves Lipid Profiles in Ovariectomized Rats. **Nutrients**, v. 8, n. 5, may. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu8050283>.

YOON, T. K. *et al.* Exercise, Mitohormesis, and Mitochondrial ORF of the 12S rRNA Type-C (MOTS-c). **Diabetes Metab J.**, v. 4, n. 3, p. 402–413, may. 2022. DOI: 10.4093/dmj.2022.0092.

YOSHIKAWA, S.; SHIMADA, A. Reaction mechanism of cytochrome c oxidase. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 4, p. 1936–1989, feb. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr500266a>.

YOUNG-MIN, P. *et al.* Time since menopause and skeletal muscle estrogen receptors, PGC-1 $\alpha$ , and AMPK. **Menopause**, v. 24, n. 7, p. 815-823, jul. 2017. DOI: 10.1097/GME.0000000000000829.

YUBERO, D. *et al.* A statistical algorithm showing coenzyme Q10 and citrate synthase as biomarkers for mitochondrial respiratory chain enzyme activities. **Scientific Reports**, v. 6, n. 15, dec. 2016. DOI: 10.1038/s41598-016-0008-1.

YU, R. *et al.* Relationship of sarcopenia with steatohepatitis and advanced liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. **BMC Gastroenterology**, v. 18, n. 51, apr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12876-018-0776-0>.

ZAMBONI, M.; RUBELE, S.; ROSSI, A. P. Sarcopenia and obesity. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 22, n. 1, p. 13-19, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1097/mco.0000000000000519>.

ZHAI, D. *et al.* MOTS-c peptide increases survival and decreases bacterial load in mice infected with MRSA. **Molecular Immunology**, v. 92, p. 151-160, dec. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.10.017>.

ZHAO, Q. Y. *et al.* Assessment of mitochondrial function in metabolic dysfunction-associated fatty liver disease using obese mouse models. **Zool Res.**v. 41, n. 5, p. 539–551, sep. 2020. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2020.051.

ZHU, L. *et al.* Estrogen Treatment After Ovariectomy Protects Against Fatty Liver and May Improve Pathway-Selective Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 62, n. 2, p. 424-434, feb. 2013. DOI: <https://doi.org/10.2337/db11-1718>.

ZOLADZ, J. A. *et al.* Endurance training increases the efficiency of rat skeletal muscle mitochondria. **Pflugers Arch**, v. 468, n. 10, p. 1709–1724, aug. 2016. DOI: 10.1007/s00424-016-1867-9.

ZUMBAUGH, M. D. *et al.* Molecular and biochemical regulation of skeletal muscle metabolism. **Journal of Animal Science**, v. 100, n. 8, p. 1-18, aug. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/jas/skac035>.

## ANEXOS

## ANEXO I - Certificado CEUA

<p><b>Pró Reitoria</b>   <b>Pesquisa</b></p>	<p><b>Comissão de Ética no Uso de Animais</b>          Universidade Federal de São Carlos</p>	
<b>CERTIFICADO</b>		
<p>Certificamos que a proposta intitulada "MENOPAUSA &amp; BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL: EFEITOS DA OVARIETOMIA E DO TREINAMENTO RESISTIDO NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTADO REDOX DE RATAS JOVENS MADURAS", protocolada sob o CEUA nº 4381011222 (ID 001739), sob a responsabilidade de <b>Gilberto Eiji Shiguemoto e equipe; Iara Dinik Santos Avelar; Christopher Barsaque Garcia; Rafael Nascimento; Natália Mayumi Inada</b> - 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 <b>aprovada</b> pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 14/12/2022.</p>		
<p>We certify that the proposal "MENOPAUSE AND MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS: EFFECTS OF RESISTANCE TRAINING ON MITOCHONDRIAL FUNCTION AND REDOX STATE IN YOUNG MATURE OVARIETOMIZED RATS", utilizing 80 isogenic rats (80 females), protocol number CEUA 4381011222 (ID 001739), under the responsibility of <b>Gilberto Eiji Shiguemoto and team; Iara Dinik Santos Avelar; Christopher Barsaque Garcia; Rafael Nascimento; Natália Mayumi Inada</b> - 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 <b>approved</b> by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 12/14/2022.</p>		
<p>Finalidade da Proposta: <b>Pesquisa</b></p>		
<p>Vigência da Proposta: de <b>01/2023</b> a <b>12/2025</b>      Área: <b>Ciências Fisiológicas</b></p>		
<p>Origem: <b>Biotério Central da UFSCar</b></p>		
<p>Espécie: <b>Ratos isogênicos</b>      sexo: <b>Fêmeas</b>      idade: <b>8 a 12 semanas</b>      N: <b>80</b></p>		
<p>Linagem: <b>rattus / wistar</b>      Peso: <b>200 a 260 g</b></p>		
<p>Local do experimento: Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia do Exercício Experimental</p>		
<p>São Carlos, 04 de janeiro de 2023</p>		
 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	
<p><small>Rodovia Washington Luis, Km 235, Bairro Monjolinho - CEP 13565-905 São Carlos/SP - tel: 55 (16) 3351-8028          Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8h às 12h e das 14h às 16h : e-mail: ceua@ufscar.br          CEUA N 4381011222</small></p>		

## ANEXO II - Certificado de Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório



**República Federativa do Brasil  
Universidade de São Paulo  
Instituto de Ciências Biomédicas**

A Diretora do Instituto de Ciências Biomédicas, nos termos do artigo 74, parágrafo único, inciso 5, alínea "b", do Estatuto da Universidade de São Paulo, certifica que

**Christopher Barsaque Garcia**

de nacionalidade brasileira,  
portador da cédula de identidade RG nº 448541683 SP,  
nascido a 26 de março de 1996 e natural do Estado de São Paulo,  
concluiu o



**Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão:  
Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório**

E, para que possa gozar de todos os direitos e prerrogativas legais, outorga-lhe o presente  
Certificado.

São Paulo, 06 de outubro de 2022

**Presidente da Comissão de Cultura e  
Extensão Universitária**

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

**Diretora**

Patricia Gama

Código de controle: **RQCN-SBTD-4N47-NYTP**