



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**

**DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FISIOTERAPIA**

---



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

***JULIANA ROSSINI***

**São Carlos, 2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**

**DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FISIOTERAPIA**



---

# **O Treinamento Resistido Previne a Disfunção Mitocondrial no Córtex Pré-Frontal e no Músculo Vasto Lateral de Ratas Ovariectomizadas.**

***JULIANA ROSSINI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito para a obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

**Área de Concentração:** Processo de Avaliação E Intervenção em Fisioterapia.

***Orientador: Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto***

**São Carlos, 2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R835t            Rossini, Juliana  
                  O treinamento resistido previne a disfunção  
                  mitocondrial no córtex pré-frontal e no músculo vasto  
                  lateral de ratas ovariectomizadas / Juliana Rossini.  
                  -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
                  59 p.

                  Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
                  São Carlos, 2016.

                  1. Menopausa. 2. Ovariectomia. 3. Disfunção  
                  mitocondrial. 4. Sarcopenia. 5. Dinapenia. I. Título.



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Juliana Rossini, realizada em 29/04/2016:

---

Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto  
UFSCar

---

Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa  
UFSCar

---

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione  
USP



Dedico essa dissertação aos meus amados pais  
*Luiz Antonio Rossini e Maria Antonieta Menegasso  
Rossini*, por sempre me apoiarem e me incentivarem em  
meus sonhos, à minha família que de alguma forma  
contribuíram para que eu pudesse realizar esse trabalho.  
Em especial ao meu namorado *André Lanza*, pelo apoio  
incondicional, por estar ao meu lado no decorrer dessa  
caminhada até chegar neste importante momento da  
minha vida.  
E a todas as pessoas que compreendem a importância da  
busca e partilha do conhecimento.



## AGRADECIMENTOS

---



Em primeiro lugar a *Deus*, por ter guiado os meus passos, pois sem *Ele* nada é possível.

Ao meu orientador Prof. Dr. *Gilberto Eiji Shiguemoto*, toda a minha gratidão e admiração!

Obrigada por abrir as portas do laboratório me proporcionando um novo horizonte de conhecimentos, aprendizagens e oportunidades. Agradeço pela confiança em mim depositada!

Ao meu namorado *André Lanza*, acima de tudo amigo, companheiro, incentivador, obrigada pela presença em todos os momentos dessa minha jornada, de todo apoio e compreensão a mim dados, sem os quais eu não teria chegado até aqui. Obrigada por TUDO!

À minha família! Em especial aos meus pais pelo apoio e incentivo, não fosse por isso, tudo teria sido mais difícil. O que sou hoje devo a vocês. Minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos e cunhados,

agradeço pela compreensão da minha ausência em muitos momentos.

Aos professores do Laboratório de Fisiologia do Exercício Prof. Dr. *Vilmar Baldissera*, Prof. Dr. *Sérgio Eduardo de Andrade Perez*, por colaborarem com o espaço, equipamentos e materiais, para que os experimentos dessa pesquisa acontecessem.

Agradeço ao Prof. Dr. *Anibal Eugenio Vercesi*, por ter aberto as portas do Laboratório da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, contribuindo grandemente para a realização dessa pesquisa.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia pelos ensinamentos a mim atribuídos.

Aos colegas e companheiros de estudo, sempre com uma palavra de incentivo e ajuda.

Aos amigos pelo trabalho em equipe: **Anne Lee de Queiroz, André Lanza, Cecília Tardivo, Danilo Vinhoti, Marcelo Ribeiro, Marina Zambon, Marina Barbosa.**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudos a mim fornecida.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse sonho.



*Sonhe com o que você quiser. Vá para onde queira ir.  
Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e  
nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos.  
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para  
fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente  
para fazê-la feliz.*

*Clarice Lispector*

**Muito Obrigada a Todos!!**

## RESUMO

---

**Introdução:** A medida em que envelhecemos, o corpo humano passa por várias alterações fisiológicas importantes, especificamente em mulheres na pós-menopausa, período em que os níveis de estrogênio estão em declínio, provocando alterações na função mitocondrial tanto do músculo esquelético quanto do cérebro. A menopausa é mimetizada experimentalmente por uma técnica chamada ovariectomia, que provoca essas alterações em ratas, como a perda de massa muscular (sarcopenia), no entanto estudos têm demonstrado que essa perda de massa muscular relacionada à idade é um processo distinto da perda de força. Considerando que a perda de força muscular está dissociada dessa condição, passou a ser denominada como dinapenia. O treinamento resistido (TR) possui efeitos benéficos na pós-menopausa, porém ainda não está bem estabelecido na literatura os possíveis efeitos do TR sobre a função mitocondrial do córtex motor cerebral e músculo esquelético de ratas ovariectomizadas.

**Objetivo:** O presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre a função mitocondrial (consumo de oxigênio) em biópsia tecidual do córtex motor pré-frontal e músculo Vasto Lateral (VL) em ratas. **Materiais e Métodos:** Foram utilizadas 40 ratas Wistar adultas, distribuídas em 4 grupos experimentais (Sham-SED, Sham-TR, OVX-SED e OVX-TR). A ovariectomia foi realizada com 13 semanas. O Treinamento Resistido (TR) proposto foi o modelo de subida em escada, e realizado por 13 semanas. As massas do córtex pré-frontal, cerebelo, Vasto Lateral (VL) e Reto Femoral (RF) foram analisadas após o sacrifício, que aconteceu 48h após o último treino. O consumo de oxigênio e os parâmetros respiratórios mitocondriais foram realizados em biópsia tecidual do córtex pré-frontal e do músculo Vasto Lateral (VL) por meio da técnica de Respirimetria de Alta Resolução (Oroboros®). **Resultados:** foi encontrado diminuição da massa muscular do VL e RF, bem como do cerebelo no grupo OVX-SED comparado aos outros grupos ( $p < 0,05$ ). O TR preveniu essa perda da massa muscular e cerebelar. O consumo de oxigênio apresentou-se diminuído no grupo OVX-SED em comparação aos outros grupos experimentais ( $p < 0,05$ ), efeito novamente prevenido pelo TR. **Conclusão:** A ovariectomia produziu disfunção mitocondrial no córtex pré-frontal e no VL, efeito deletério prevenido pelo TR.

**Palavras chave:** menopausa, ovariectomia, disfunção mitocondrial, sarcopenia, dinapenia, treinamento resistido.

## ABSTRACT

---

**Introduction:** As we age, human body goes through several important physiological changes, especially in women after menopause, during which estrogen levels are declining, causing changes in mitochondrial function both in skeletal muscle and brain. Menopause is mimicked experimentally by a technique called ovariectomy, that causes some alterations in rats, such as the loss of muscle mass (sarcopenia); however studies have demonstrated that loss of age-related muscle is a different process from strength loss. Whereas the loss of muscle strength is dissociated from this condition, it was renamed as dinapenia. Resistance Training (RT) has beneficial effects on postmenopausal women, but is not well established in the literature the possible effects of RT on mitochondrial function of the cerebral motor cortex and skeletal muscle of ovariectomized rats. **Objective:** This study aimed to investigate the effects of ovariectomy and resistance training on mitochondrial function (oxygen consumption) in tissue biopsy of the prefrontal cortex and vastus lateralis muscle (VL) in rats. **Materials and Methods:** were used 40 adult female rats divided into 4 experimental groups (Sham-SED, Sham- TR, OVX-SED and OVX-TR). The ovariectomy was performed at 13 weeks. The Resistance Training (RT) proposed was the climb stairs model, and held for 13 weeks. The masses of the prefrontal cortex, cerebellum, Vastus Lateralis (VL) and Retus Femoralis (RF) were analyzed after sacrifice, which took place 48 hours after the last training session. Oxygen consumption and mitochondrial respiratory parameters were performed on tissue biopsy of the prefrontal cortex and the vastus lateralis (VL) by technique of High Resolution Respirometry (Oroboros®). **Results:** it was found decreased muscle mass (VL and RF), as well as the cerebellum in OVX-SED group compared to other groups ( $p < 0.05$ ). TR prevented the loss of muscle and cerebellar mass. Mitochondrial oxygen consumption was decreased in OVX-SED group compared to the other experimental groups ( $p < 0.05$ ), effect once again prevented by TR. **Conclusion:** ovariectomy produced mitochondrial dysfunction in the prefrontal cortex and VL, deleterious effect prevented by RT.

**Key words:** menopause, ovariectomy, mitochondrial dysfunction, sarcopenia, dinapenia, resistance training.

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Menopausa .....	3
2.2. Ovariectomia .....	4
2.3. Sarcopenia vs Dinapenia .....	6
2.3.1. Sarcopenia .....	6
2.3.2. Dinapenia .....	8
2.3.3. Sarcopenia, Dinapenia e sua Relação com as Mitocôndrias .....	10
2.4. Estrogênio e a Bioenergética do Cérebro .....	11
2.5. Estrutura e Função das Mitocôndrias .....	14
2.6. Cadeia Respiratória Mitocondrial e Fosforilação Oxidativa .....	16
2.7. As Mitocôndrias e o Estresse Oxidativo .....	17
2.8. Efeitos do Treinamento Resistido Sobre o Sistema Neuromuscular e as Adaptações Mitocondriais .....	20
<b>3. HIPÓTESES</b> .....	22
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	23
4.1. Objetivo Geral .....	23
4.2. Objetivos Específicos .....	23
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
5.1. Animais e Condições Experimentais .....	24
5.2. Grupos Experimentais .....	24
5.3. Procedimentos Cirúrgicos: Ovariectomia e Sham-OVX .....	25
5.4. Protocolo de Treinamento Resistido .....	26
5.4.1. Familiarização ao protocolo de TR .....	26
5.4.2. Determinação da Carga Máxima de Carregamento (CMC) .....	27
5.4.3. Protocolo de TR 13 Semanas .....	28
5.5. Eutanásia dos Animais e Coleta dos Tecidos .....	29
5.6. Desenho Experimental .....	29
5.7. Medidas de Parâmetros Mitocondriais .....	30
5.7.1. Preparação das Amostras .....	30
5.7.2. Avaliação de Parâmetros Respiratórios .....	31
5.7.3. Avaliação de Parâmetros Respiratórios .....	31

5.8. Forma de Análise Estatística dos Resultados .....	31
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
6.1. Análise da evolução ponderal da massa corporal e de massas teciduais de interesse do estudo das ratas do experimento .....	33
6.2. Carga Máxima de Carregamento do Treinamento Resistido .....	35
6.3. Consumo de Oxigênio do Córtex Pré-Frontal Cerebral .....	36
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
7.1. Evolução ponderal da massa corporal e massas teciduais de interesse do estudo das ratas do experimento, e carga máxima de carregamento .....	42
7.2. Análise da Função Mitocondrial por meio do Consumo de Oxigênio da Cadeia Transportadora de Elétrons do Córtex Pré-Frontal de do Músculo Vasto Lateral – Respirometria de Alta Resolução .....	44
7.2.1. Córtex Pré- Frontal .....	44
7.2.2. Músculo Vasto Lateral .....	46
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

FIGURA 1. Expectativa de vida no Brasil – 2000/2060 .....	3
FIGURA 2. Ressonância Magnética de um corte transversal de coxa .....	6
FIGURA 3. Estudo longitudinal comparando perda de força e massa muscular .....	8
FIGURA 4. Mecanismos biológicos que contribuem para a dinapenia .....	10
FIGURA 5. Biossíntese do hormônio estradiol a partir do colesterol .....	12
FIGURA 6. Estrutura da Mitocôndria .....	15
FIGURA 7. Complexos da Cadeira Respiratória .....	17
FIGURA 8. Organograma dos grupos experimentais .....	25
FIGURA 9. Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia .....	26
FIGURA 10. Equipamentos utilizados para o treinamento resistido .....	27
FIGURA 11. Apresentação esquemática das cargas de carregamento por sessão de treinamento e por sessão de CMC .....	29
FIGURA 12. Delineamento experimental .....	30
FIGURA 13. Carga Máxima de Carregamento .....	35
FIGURA 14. Respirometria de Alta Resolução .....	36
FIGURA 15. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do Córtex Pré-Frontal - Análise em Repouso (A) e inibido por Oligomicina (B) .....	38
FIGURA 16. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do Córtex Pré-Frontal estimulado por ADP (A) e Controle Respiratório Repouso (B) .....	38
FIGURA 17. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do Córtex Pré-Frontal estimulado por FCCPP (A) e Controle Respiratório FCCP/Repouso (B) .....	39
FIGURA 18. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do músculo Vasto Lateral – Análise em Repouso (A) e inibido por Oligomicina (B) .....	39
FIGURA 19. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do músculo Vasto Lateral estimulado por ADP (A) e Controle Respiratório ADP/Repouso (B) .....	40
FIGURA 20. Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do músculo Vasto Lateral estimulado por FCCPP (A) e Controle Respiratório FCCP/Repouso (B) .....	41

## TABELAS

---

TABELA 1. Cronograma do treinamento resistido .....	28
TABELA 2. Evolução Ponderal da Massa Corporal dos Grupos Experimentais .....	33
TABELA 3. Massa dos Tecidos: Córtex Pré-Frontal, Cerebelo, Vasto Lateral e Reto Femoral .....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{m}$	Micrômetro
•OH	Radical hidroxil
AEC	Acoplamento excitação-contração
ANOVA	Análise de variância simples
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina soro bovino
Ca	Cálcio
CaK <sub>2</sub> EGTA	Tampão de Cálcio/EGTA/Hidróxido de Potássio
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório
CMC	Carga Máxima de Carregamento
CRM	Cadeira Respiratória Mitocondrial
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
DHPR	Dihidropiridina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPM	Desvio Padrão da Média
E1	Estrona
E2	17 $\beta$ -estradiol
E3	Estriol
EGTA	Etileno glicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetracético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERs	Receptores de Estrogênio
ER $\alpha$	Receptor de Estrogênio alfa
ER $\beta$	Receptor de Estrogênio beta
FCCP	Carbonil cianeto de p-trifluorometoxifenil-hidrazona
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HEPES	[N-(2 hidroxietil) piperazina N'- (2 ácido etanosulfônico)]
HOH-	Íonperoxil
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-6	Interleucina 6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato Monopotássico
L	Litro
MiR05	Meio de respiração número 05
MgCl	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mmol/L	Milimol por litro
MnSOD	Enzima superóxido dismutase de manganês mitocondrial
mtDNA	DNA Mitocondrial
NO	Óxido Nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio Molar
O <sub>2</sub> -	ânion superóxido
O <sub>2</sub> •	Radical hidroxil
OSPHOS	Fosforilação Oxidativa (mitochondrial oxidative phosphorylations system)
OVX	Ovariectomia

pH	Potencial Hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
PRDX5	Enzima Peroxiredoxina 5
RyRs	Rianodina
SED	Sedentário
Sham	Animal intacto
SOBRAC	Sociedade Brasileira de Climatério
TH	Terapia de reposição hormonal
TNF- $\alpha$	Fator alfa de necrose tumoral
TR	Treinamento Resistido
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta

## 1. INTRODUÇÃO

---

As mulheres são a maioria da população brasileira, segundo o censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2010, com estimativas populacionais publicadas em 2013, as doenças relacionadas com a menopausa constituem um importante problema de saúde pública e isso tem despertado o interesse de pesquisadores em diversas áreas na busca de novos parâmetros com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios causados pela menopausa.

Menopausa é definida como a permanente interrupção da menstruação resultante da perda da atividade folicular ovariana, etapa final e natural da fase reprodutiva feminina (MESSIER *et al.*, 2011). Após a menopausa, várias doenças crônicas podem emergir, usualmente por volta da sexta década de vida, incluindo síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, osteoporose, artrite, declínio cognitivo e demência, e alguns tipos de câncer (LOBO *et al.*, 2014).

Acrescenta-se a essa assertiva, com bom suporte da literatura atual, a hipótese de que o declínio do estrogênio com a menopausa desempenha importante papel na perda da massa muscular em mulheres pós-menopáusicas (MALTAIS *et al.*, 2009). A perda natural da massa muscular relacionada ao envelhecimento é conhecida como “*sarcopenia*”, um termo utilizado mundialmente para descrever esse evento (GREENLUND & NAIR, 2003), proposto por *Irwin Rosenberg* em 1988 que incluía diminuição da massa muscular e função (ROSENBERG, 1997).

Prejuízo funcional e diminuição da mobilidade, fragilidade e incapacidade física, aumento no risco de quedas e síndrome da imobilidade são as principais consequências da sarcopenia (CRUZ-JENTOFT *et al.*, 2010) que estão diretamente associadas ao aumento dos custos na área da saúde do idoso (FRIED *et al.*, 2001).

Nestas circunstâncias, durante toda a década passada, a sarcopenia vinha sendo frequentemente definida como a perda da massa e força muscular relacionadas à idade, fato este que implicava em interligação causal entre os conceitos, e que as alterações na massa muscular provocavam alterações diretas na força (MESSIER *et al.*, 2011). Entretanto, este é um conceito que está em revisão.

Com base nisso, *Clark & Manini* (2008) explicitam que estes eventos (perda da força e da massa muscular) devem ser definidos independentemente, e propõem o termo “*dinapenia*” para descrever a perda da força muscular relacionada à idade.

O conceito de dinapenia emerge na literatura como um fator importante nos eventos relacionados à fragilidade física que envolve o sistema musculoesquelético de idosos e mulheres pós-menopáusicas, pois a diminuição da força muscular parece ser mais pronunciada e importante que a perda da massa muscular que ocorre naturalmente nesses indivíduos.

Os fatores musculares envolvidos direcionam-se principalmente para a redução da capacidade intrínseca de geração de força que ocorre no músculo envelhecido, evento que pode contribuir para o aumento da fraqueza muscular. A causa dessa redução precisa ainda de melhor compreensão, porém, alguns estudos direcionam para alterações no processo de acoplamento excitação-contração (JIMENEZ-MORENO *et al.*, 2008; DELBONO, 2000) e a associação com a infiltração de tecido adiposo inter e intra-fibras musculares (GOODPASTER *et al.*, 2001). Acoplamento excitação-contração é o processo fisiológico de conversão do sinal neural em ativação muscular (potencial de ação subsarcolemal) para gerar a contração e força muscular. Existem vários eventos-chaves envolvidos diretamente nesse processo, qualquer interrupção ou desacoplamento em algum ponto da via, pode resultar em diminuição na capacidade de geração de força, e, portanto, produzir a dinapenia (MACINTOSH *et al.*, 2006).

Alguns efeitos do exercício aeróbio sobre a função mitocondrial em regiões cerebrais específicas, como o hipotálamo, e no músculo esquelético estão bem estabelecidos, enquanto outros ainda permanecem contraditórios. Entretanto, ainda não está bem descrito na literatura os possíveis efeitos do treinamento resistido sobre a função mitocondrial do córtex motor cerebral e músculo esquelético de ratas ovariectomizadas, tendo como norte o conceito da dinapenia.

Para analisarmos os efeitos e alterações que a diminuição nos níveis de estrogênio provocam na função mitocondrial tanto do músculo esquelético quanto no cérebro, utilizamos uma técnica em animais roedores que mimetiza a menopausa humana, sendo um modelo animal experimental amplamente utilizado em pesquisas científicas, a ovariectomia (THOMPSON *et al.*, 1995).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1. Menopausa

No Brasil, a expectativa de vida da população feminina é de 78,6 anos, segundo o IBGE (2010), diante desses dados podemos dizer que as mulheres irão viver um terço ou mais de suas vidas no estado de pós-menopausa, pois a estimativa de idade para a menopausa natural é de 51 anos em média (GOLD *et al.*, 2001). E em 2030, se forem mantidas as tendências registradas nos últimos anos, as mulheres viverão em média 81,2 anos, podendo chegar a 85,3 em 2060. (IBGE, 2010; Portal Brasil, 2014).



**FIGURA 1 - Expectativa de vida no Brasil – 2000/2060.** Figura adaptada a partir de dados do IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais (2016).

A menopausa é um processo que ocorre naturalmente, relacionado com a idade, e tem como resultado a cessação permanente da secreção de hormônios esteróides ovarianos, ocasionando a interrupção na produção dos oócitos (óvulos imaturos) que circundam o aparelho folicular associada com uma variedade de alterações fisiológicas e estruturais, incluindo todos os aspectos do declínio reprodutivo (WALKER & HEMDON, 2008).

O processo que engloba a menopausa acontece em estágios, com eventos endócrinos e parâmetros variáveis, definido como climatério, que se caracteriza como a fase de transição entre o período reprodutivo e o não-reprodutivo, tendo como marco principal a menopausa que corresponde ao último ciclo menstrual da vida da mulher

(BRINTON, 2012) somente reconhecido após passados 12 meses de cessação da menstruação (HARLOW & SIGNORELLO, 2000). Esse ciclo varia muito entre as mulheres, podendo ocorrer entre os 40 e 58 anos de idade (NORTH AMERICAN MONOPAUSE SOCIETY, 2016).

Segundo a Sociedade Brasileira de Climatério - SOBRAC (2004) o climatério se divide em três fases: a fase pré-menopausal (início do declínio da função ovariana até a menopausa); a fase perimenopausal (período de 2 anos que precede e sucede a menopausa); e a fase pós-menopausal (inicia 2 anos após a menopausa e finda na senectude). Nesse período do climatério e principalmente na pós-menopausa, várias doenças crônicas podem emergir, usualmente por volta da sexta década de vida, incluindo síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, osteoporose, artrite, demência e alguns tipos de câncer (LOBO *et al.*, 2014).

Para a mulher esse período é um sinal característico do envelhecimento, mas é apenas o início de mudanças no seu sistema reprodutor. Embora a senescência reprodutiva feminina caracteriza-se pela redução de oócitos (WALKER & HEMDON, 2008), o envelhecimento resulta da interação complexa de alterações endócrinas dependentes da idade e do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal. (REGAN, 2007).

Embora se trate de um fenômeno fisiológico, a diminuição da produção dos hormônios esteróides principalmente o estrogênio, pode afetar a maioria dos sistemas e órgãos, como o cérebro e mama, sistema cardiovascular (coração e vasos), imunológico, reprodutivo (ovários e útero), bexiga, pele e ossos (RETTBERG *et al.*, 2014) causando diversas alterações que impactam negativamente na qualidade de vida das mulheres, tais como: alterações do humor, distúrbios do sono, sintomas vasomotores, ressecamento das mucosas e da pele, alterações cognitivas, diminuição da libido e mais tardiamente, alterações uroginecológicas, diminuição da densidade óssea e aumento do risco cardiovascular (SCHOENAKER *et al.*, 2014).

Com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos nas alterações fisiológicas associadas ao período da pós-menopausa, utilizaremos uma técnica chamada ovariectomia em ratas (THOMPSON *et al.*, 1995).

## **2.2. Ovariectomia**

Experimentalmente, a menopausa pode ser mimetizada por uma técnica denominada ovariectomia (OVX), que constitui na retirada bilateral dos ovários de ratas

de laboratório (THOMPSON *et al.*, 1995). Essa é uma prática já bastante estabelecida e utilizada na literatura pela comunidade científica para a obtenção de resultados sobre as influências dos hormônios ovarianos na fisiologia do ciclo reprodutivo em ratas adultas (BRINTON, 2012) e assim poder prevenir e/ou reverter essas alterações em um modelo experimental e translacional. Várias são as características e alterações endócrinas encontradas nos roedores, ratos e camundongos, que se assemelham com as alterações endócrinas no ser humano, como por exemplo, depleção dos folículos ovarianos; ciclos irregulares e flutuações dos hormônios esteróides; e fertilidade irregular em ratas. (KEMPEN *et al.*, 2012; KALU, 1991).

A utilização de ratas jovens nesses experimentos se fundamenta em estudos realizados correlacionando a idade de ratos com a dos seres humanos. Os ratos quando comparados aos seres humanos, têm uma infância breve e acelerada, desenvolvem-se rapidamente e tornam-se sexualmente maduros com cerca de seis semanas de vida, a menopausa de ratas ocorre entre os 15 e 18 meses de idade, já os seres humanos desenvolvem-se mais lentamente e atingem a puberdade a partir de 12 e 13 anos, a menopausa em mulheres ocorre aproximadamente aos 51 anos de idade. Na fase adulta, a cada mês do rato equivale à 2,5 anos dos seres humanos (ANDREOLLO *et al.*, 2012); e o tempo de vida dos ratos de laboratório é cerca de 3 anos de acordo com QUINN (2005).

Estudos realizados com o objetivo de mimetizar a menopausa em ratas, comparou um modelo de rata com perda óssea na pós-menopausa, que se assemelha muito com os mesmos aspectos encontrados na mulher na pós-menopausa, tanto a perda de massa óssea quanto a deficiência hormonal (SHIGUEMOTO *et al.*, 2007, BRINTON, 2012).

Em nosso laboratório estudos anteriores comprovaram que a ovariectomia tem sido usada em modelo animal por simular a menopausa humana, mostrando que a ovariectomia está associada ao aumento do risco de doenças coronarianas, às perdas ósseas, às alterações lipídicas e às mudanças na composição corporal, como redução da massa magra e aumento da gordura corporal (KALU, 1991; THOMPSON *et al.*, 2005; SHIGUEMOTO *et al.*, 2007).

Com a preocupação de relacionar os estudos em modelos animais e translocá-los para os seres humanos outros estudos evidenciaram que o ciclo reprodutivo de roedores de laboratório proporciona um modelo animal dos ciclos irregulares da perimenopausa bem definida e tratável, sendo uma importante ferramenta para a pesquisa em geral e

muito úteis com resultados confiáveis e aplicáveis nos seres humanos (ANDREOLLO *et al.*, 2012; BRINTON, 2012; LEITE *et al.*, 2009).

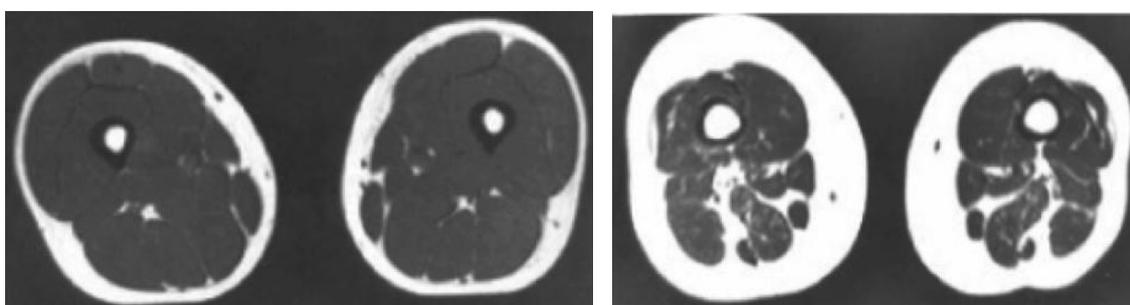
## 2.3. Sarcopenia vs Dinapenia

### 2.3.1. Sarcopenia

Sarcopenia é um termo muito utilizado para descrever a perda de massa muscular e função relacionadas à idade. De acordo com um estudo transversal na década de 1970, foi demonstrado por um médico gerontologista muito influente de nome Nathan Shock, que havia um forte declínio da massa muscular e função em pessoas no decorrer da idade, estudos esses que já tinham sido iniciados há aproximadamente 20 anos, porém não se tinha certeza ainda o que provocava isso, se seria apenas o envelhecimento natural ou algum fator relacionado ao envelhecimento ou que influenciasse o mesmo (ROSENBERG, 1997).

Foi então, que em 1988, em uma reunião no Novo México, cientistas chegaram a um consenso da importância desse evento fisiológico e/ou patológico. A palavra sarcopenia (do grego: *sarx* que significa “carne”, *penia* que significa “perda”) ficou sendo denominada como a perda da massa muscular e função, relacionadas à idade, que afeta a deambulação, mobilidade, consumo de energia, independência, consumo de nutrientes, status e função respiratória (ROSENBERG, 1997).

A figura 2 demonstra através de uma ressonância magnética as diferenças entre uma musculatura jovem e ativa em relação a uma pessoa idosa e sedentária.



Jovem 21 anos – Fisicamente Ativo

Idosa 64 anos – Sedentária

**FIGURA 2 - Ressonância magnética de um corte transversal de coxa:** a mulher idosa tem uma quantidade de massa muscular (cinza) diminuída e de gordura (branca) subcutânea e intramuscular aumentada, em relação à mulher jovem, demonstrando a sarcopenia. Figura retirada e adaptada de Rosenberg (1997).

Os mecanismos responsáveis pela sarcopenia citados na literatura são vastos, tais como: deficiências de nutrição e sedentarismo, mudanças intrínsecas bioquímicas e físicas, levando à atrofia das fibras, recrutamento ineficiente das células satélites, alteração endócrina, estresse oxidativo e redução na estimulação neuronal devido à redução do número de função dos motoneurônios alfa ( $\alpha$ ), levando a danos no DNA mitocondrial (mtDNA), e o acúmulo dessas lesões no mtDNA causaria mutações que reduziriam a produção de energia da célula afetada, resultando em uma anormalidade no sistema de transporte de elétrons que culminará na perda da fibra muscular (WANAGAT *et al.*, 2001).

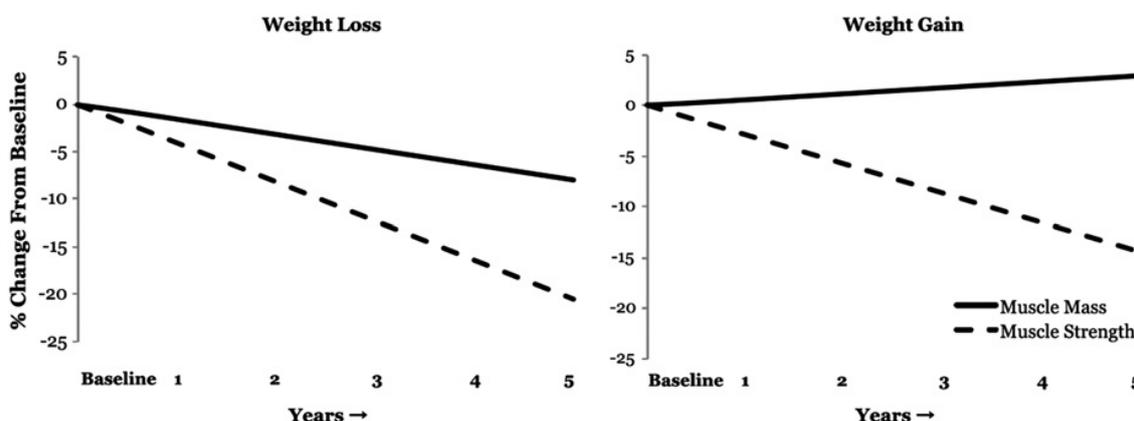
Embora muitos estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver critérios para um diagnóstico clínico que estabeleça um consenso para a definição de sarcopenia, ainda é encontrada muita resistência por parte da comunidade científica (MANINI & CLARK, 2011). Como foi demonstrado por um grupo de trabalho europeu em uma publicação de 2010 (CRUZ-JENTOFT, 2010) juntamente com uma equipe dos EUA para definirem um consenso sobre esse diagnóstico. Ambos os critérios envolvem aspectos como função física, força muscular e massa muscular (MANINI & CLARK, 2011).

A razão dessa procura em definir critérios que atinja um consenso para a definição de sarcopenia, sendo que já havia tido uma definição em 1988 por Rosenberg, como visto anteriormente, é devido à publicação de um artigo em 2008 que propõe que: a perda da força muscular relacionada à idade é apenas parcialmente explicada pela redução da massa muscular e que outros fatores fisiológicos explicariam a fraqueza muscular em adultos e idosos (CLARK & MANINI, 2008). Baseados nessa assertiva, Clark & Manini em 2008 explicitam que estes eventos (perda da força e massa muscular) devem ser definidos independentemente, e propõem o termo “*dinapenia*” (*dyna* = força; *penia* = perda) para descrever a *perda da força* muscular relacionada à idade. Essa nova terminologia vem ganhando suporte para o uso em ambientes clínicos e experimentos de pesquisa (JANSSEN, 2010; GLOVER & PHILLIPS, 2010), no entanto, apesar de sua crescente popularidade, ainda há resistência por parte da comunidade científica, principalmente em virtude da dificuldade em se encontrar um algoritmo de consenso para ambos termos: *dinapenia* e *sarcopenia* (MANINI & CLARK, 2011).

### 2.3.2. Dinapenia

O conceito de dinapenia passou a ser revisado após publicação de trabalho demonstrando que alterações na massa muscular eram menos de 5% nas variações de força muscular (TAAFE *et al.*, 2009). De fato, dados de um estudo longitudinal (*Health ABC Study*) indicaram que o declínio da força ocorre muito mais rapidamente que o declínio da massa muscular e que alterações na área de secção transversa do músculo quadríceps, era apenas de 6-8% da variabilidade inter-individual nas mudanças de força dos músculos extensores de joelho, variabilidade encontrada entre os sujeitos participantes da pesquisa (DELMONICO *et al.*, 2009).

Esses resultados são consistentes com trabalhos experimentais de força muscular, em que se observou que a perda da massa muscular associada com o desuso é inferior a 10% da perda de força muscular (CLARK *et al.*, 2006). De acordo com esses estudos constatou-se que a perda da força muscular, em adultos e idosos, é pouco relacionada com a perda de massa muscular (CLARK & TAYLOR, 2011) e que este acontecimento está relacionado com deficiência na ativação neural central (CLARK & MANINI, 2008), ou seja, não foi encontrado uma correlação entre a perda de massa muscular e consequentemente a perda de força, pois uma acontece independente da outra.

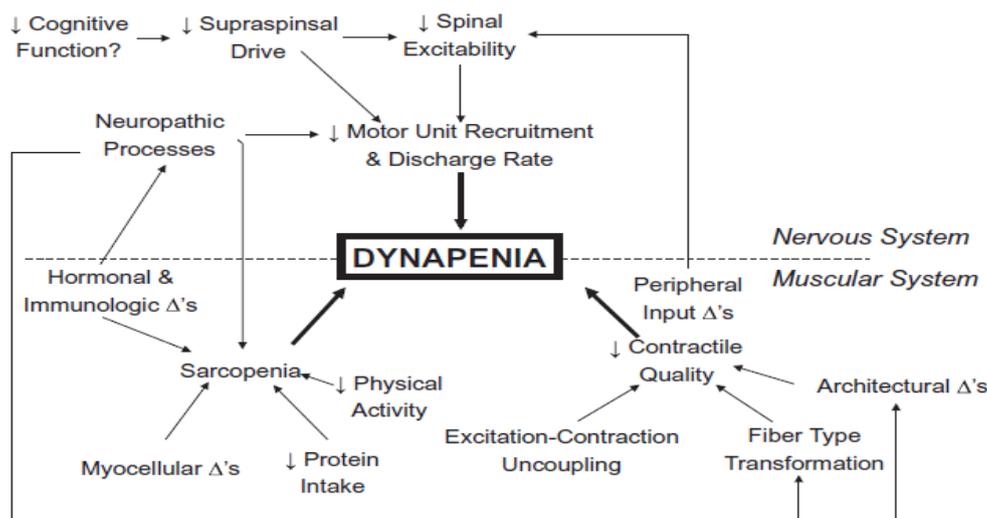


**FIGURA 3 – Estudo longitudinal comparando perda de força e massa muscular:** Esses números foram adaptados a partir de dados obtidos e publicados em um estudo longitudinal, com dados atualizados anualmente por um período de 5 anos em idosos, da *Health ABC*, para examinar a relação entre mudanças na força dos extensores de joelho e área transversal do quadríceps femoral. À esquerda: n=309 homens que perderam peso corporal; à direita: n= 143 homens que ganharam peso corporal. Gráfico à esquerda: a força muscular é perdida a uma velocidade substancialmente mais rápida do que a massa muscular. Gráfico à direita: o ganho de massa muscular não impede o envelhecimento relacionado com a perda de força muscular. Fig. adaptada a partir de dados apresentados por Delmonico *et al.* (2008).

Alterações na ativação central, como as proporcionadas pela redução no drive excitatório descendente do córtex motor, combinadas ou não com alterações periféricas (recrutamento subliminar das unidades motoras e taxa de transferência), podem provocar a dinapenia (CLARK & TAYLOR, 2011). Nesse aspecto, foi demonstrado em um trabalho a diminuição na ativação do sistema nervoso central em homens idosos comparados a sujeitos jovens quando solicitados a realizarem diferentes atividades físicas (JAKOBI & RICE, 2002)

O envelhecimento também provoca alterações deletérias nos neurônios motores da medula espinhal, alterações provocadas por exacerbação da apoptose, aumento das citocinas circulantes, principalmente o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina -6 (IL-6), bem como o aumento do estresse oxidativo mitocondrial (HVID *et al.*, 2010). Algumas fibras musculares, mas não todas, são desnervadas por esse processo, e reinervadas por meio de brotamentos colaterais dos axônios vizinhos e/ou placas motoras terminais, que resulta na formação de unidades motoras muito grandes, porém com alteração negativa na taxa de disparo, e, conseqüentemente, na estabilidade de geração de força e controle motor fino (TRACY & ENOKA, 2002).

Esse tipo de remodelamento neural periférico das unidades motoras parece atingir preferencialmente as fibras glicolíticas, ou fibras do tipo II (rápidas), que sofrem a desnervação, com conseqüente reinervação colateral proporcionada pelas fibras oxidativas ou fibras do tipo I (lentas), que ganham controle sobre as fibras desnervadas, porém, provocando alterações morfológicas e funcionais (DELBONO, 2011). Outro evento que se exacerba com o avanço da idade é a diminuição desse processo de remodelamento, que ocorre quando a desnervação ultrapassa os limites de reinervação, provocando a inutilização funcional dessas fibras musculares (KOSTEK & DELMONICO, 2011).



**FIGURA 4 - Mecanismos biológicos que contribuem para a dinapenia.** Fig. Adaptada do artigo Functional Consequences of Sarcopenia and Dynapenia in the Elderly (CLARK & MANINI, 2011).

Os mecanismos fisiológicos que ocorrem na fraqueza muscular associada ao envelhecimento são multifatoriais e envolvem déficits de ativação neural, redução da capacidade de geração de força intrínseca do músculo, bem como perda de massa muscular (MANINI & CLARK, 2011).

Em relação a sarcopenia e dinapenia, como as propriedades funcionais das mitocôndrias diferem entre as fibras de contração lenta e as fibras de contração rápida (PICARD *et al.*, 2008), em situações em que ocorre alteração no tipo de fibra, como envelhecimento e menopausa, o impacto dessas alterações nas propriedades funcionais da mitocôndria precisa ser investigado, e vice-versa.

### 2.3.3. Sarcopenia, Dinapenia e sua relação com as Mitocôndrias

As mitocôndrias geram a maior parte da energia das células, a adenosina trifosfato (ATP), pela fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias, essa energia é necessária para o transporte ativo de moléculas e íons e a síntese de biomoléculas. As mitocôndrias possuem seus próprios genomas e se replicam independentemente do genoma nuclear, porém o genoma do DNA mitocondrial (mtDNA) é um importante alvo dos danos oxidativos, causados pelas Espécies Reativas de Oxigênio, que veremos a seguir (McKENZIE *et al.*, 2002)

Embora os eventos moleculares responsáveis pela sarcopenia e dinapenia ainda não são totalmente conhecidos, como visto anteriormente, o que se encontra na literatura é que a perda da massa muscular ocorre devido a atrofia das fibras e a perda

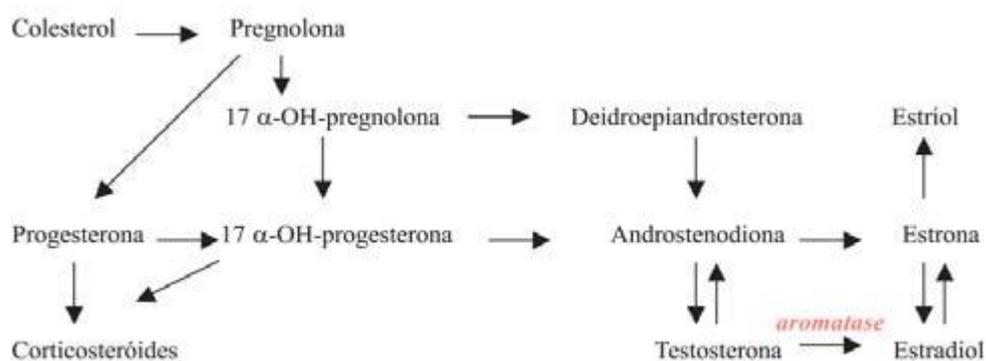
das mesmas, uma variedade de mecanismos têm sido propostos para esse acontecimento, como, por exemplo, a contração induzida pela lesão, o recrutamento de forma ineficiente das células satélites, desnervação e reinervação deficientes, alterações endócrinas, estresse oxidativo e danos no mtDNA, sendo esses dois últimos relacionados com a idade, ou seja, o envelhecimento (McKENZIE *et al.*, 2002)

Os danos oxidativos causados no mtDNA geram mutações do genoma, o que causaria uma série de complicações para o organismo, estudos demonstram que qualquer problema que comprometa a produção de ATP na mitocôndria pode prejudicar ou até mesmo levar a morte de células e assim proporcionar um mau funcionamento do organismo (WANAGAT, 2011)

Os tecidos e órgãos mais facilmente afetados pela deficiência da produção de energia celular são o sistema nervoso central, coração, sistema músculo esquelético, rins e tecidos produtores de hormonas. (WALLACE, 2010).

#### **2.4. Estrogênio e a Bioenergética do Cérebro**

Os estrogênios são hormônios esteróides responsáveis pelo fenótipo e capacidade reprodutiva feminina. Há três formas naturais de estrogênio: estrona (E1); estradiol (E2) o principal e a forma mais potente do estrogênio, conhecido também como  $17\beta$ -estradiol, é o principal estrogênio circulante durante a fase reprodutiva da mulher; e estriol (E3). (RETTBERG *et al.*, 2013). Os estrogênios são produzidos principalmente nos ovários, glândulas supra-renais e podem também ser sintetizados a partir do colesterol no encéfalo e da testosterona que é convertida em estradiol sob a ação da enzima conversora aromatase, circulando por todo o corpo, eles têm efeitos na maioria dos sistemas e órgãos, incluindo cérebro, mama, sistema cardiovascular (coração e vasos), sistema imunológico, reprodutivos (ovários e útero), bexiga, pele, e osso (KUIPER *et al.*, 1997).



**FIGURA 5 - Biossíntese do hormônio estradiol a partir do colesterol.** Em itálico, a enzima aromatase, presente em alguns tecidos não-endócrinos, como o fígado, o tecido adiposo e cérebro. Figura adaptada de Österlund & Hurd (2001).

Os hormônios esteróides mais precisamente o  $17\beta$  estradiol, podem atravessar a barreira hemato-encefálica, por possuírem características lipofílicas e com isso o cérebro produz estrogênio endogenamente a partir do colesterol, como descrito acima. Após décadas de pesquisas ficou estabelecido que o estrogênio é uma molécula sinalizadora no cérebro, juntamente com o seu papel na fisiologia feminina e reprodutiva (BRINTON, 2008).

O estrogênio é reconhecidamente uma molécula de sinalização que regula vários sistemas orgânicos coordenando múltiplas funções em órgãos, células e genes. Para isso é preciso que o estrogênio faça uma integração com os sistemas, órgãos e células, sendo necessário um repertório de receptores e vias de sinalização para ativar e regular as respostas moleculares e genômicas, altamente necessárias para a sobrevivência celular do organismo. Essa integração e coordenação do metabolismo do estrogênio, proporciona o desenvolvimento de biomarcadores periféricos que atuam como sinalizadores da bioenergética do cérebro, detectando deste modo um risco precoce de doenças neurodegenerativas associadas com disfunção metabólica, tais como a doença de Alzheimer (RETTEBERG *et al.*, 2013).

Os receptores de estrogênio (ERs) são encontrados distribuídos no cérebro intracelularmente e estão presentes nos neurônios e células da glia e expressos em ambos os sexos. São dois tipos de receptores estrogênicos descritos na literatura, receptores de estrogênio alfa ( $\alpha$ ) e receptores de estrogênio beta ( $\beta$ ) (ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ ) codificados respectivamente por genes diferentes: ESR1 e ESR2, esses dois receptores apresentam funções diferentes para as respostas biológicas e na regulação da transcrição gênica sob o comando do  $17\beta$ -estradiol. (RETTBERG *et al.*, 2013). Porém, ambos

receptores são caracterizados por sua capacidade de regular a expressão do gene, ligando-se a genes promotores de elementos de resposta aos estrogênios (BRINTON, 2009).

Os efeitos dos estrogênios são mediados por seus receptores, o mecanismo clássico de ação dos ERs envolve a interação do estrogênio com o seu receptor, formando dímeros de complexo estrogênio-receptor que são translocados para o núcleo e se ligam a elementos responsivos ao estrogênio-receptor, localizados na região promotora dos genes alvos (BORD *et al.*, 2001).

As funções cerebrais ainda são complexas e não estão totalmente entendidas, o que se tem bastante consistência na literatura é que os estrogênios atuam em várias áreas cerebrais e dependem dos receptores  $\alpha$  e  $\beta$  em importantes ações fisiológicas. O estrogênio também atua como agente neuroprotetor, essas ações neuroprotetoras exercidas pelo estrogênio previnem doenças neurodegenerativas, ações neurotróficas, aumento da plasticidade neural, atuam contra os danos causados pela proteína beta amiloide (responsável pelo desenvolvimento da doença de Alzheimer), aumentam a vitalidade mitocondrial protegendo as mitocôndrias do estresse oxidativo, aumentam a concentração e número de receptores dos neurotransmissores (serotonina, dopamina e norepinefrina), além de melhorar a perfusão cerebral (efeito vasodilatador similar ao que ocorre nas artérias coronárias) e de exercer importante ação antiinflamatória (MORRISON *et al.*, 2006).

Como visto, o estrogênio ativa as vias de sinalização em quase todos os tecidos do corpo, portanto com a menopausa estas vias seriam afetadas pela perda dos hormônios ovarianos e a menopausa está associada a um declínio significativo na produção do hormônio ovariano  $17\beta$ -estradiol o estrogênio predominante durante a fase reprodutiva feminina e da progesterona (DING *et al.*, 2013). Um número substancial das vias de sinalização reguladas pelo estrogênio converge para as mitocôndrias aumentando a expressão de várias enzimas antioxidantes diminuindo o risco de disfunção mitocondrial grave que pode levar a uma falha de energia celular e/ou apoptose (BRINTON, 2008).

De acordo com estudos o estrogênio aumenta a expressão de várias enzimas antioxidantes incluindo a peroxiredoxina 5 (PRDX5), glutarredoxina e a enzima superóxido dismutase de manganês mitocondrial (MnSOD). O estrogênio também está associado a proteção dos danos oxidativos no DNA mitocondrial (RETTBERG *et al.*, 2013).

Com o declínio significativo na produção do  $17\beta$ -estradiol pelos ovários com a menopausa, as vias de sinalização do estrogênio ficam afetadas, estudos indicam que a terapia de reposição hormonal (TH) na pós-menopausa teria efeitos benéficos se iniciada antes ou no início da menopausa, quando a saúde neurológica da mulher ainda está intacta, o que não teria o mesmo efeito em uma administração da TH mais tardiamente (REETBERG *et al.*, 2013).

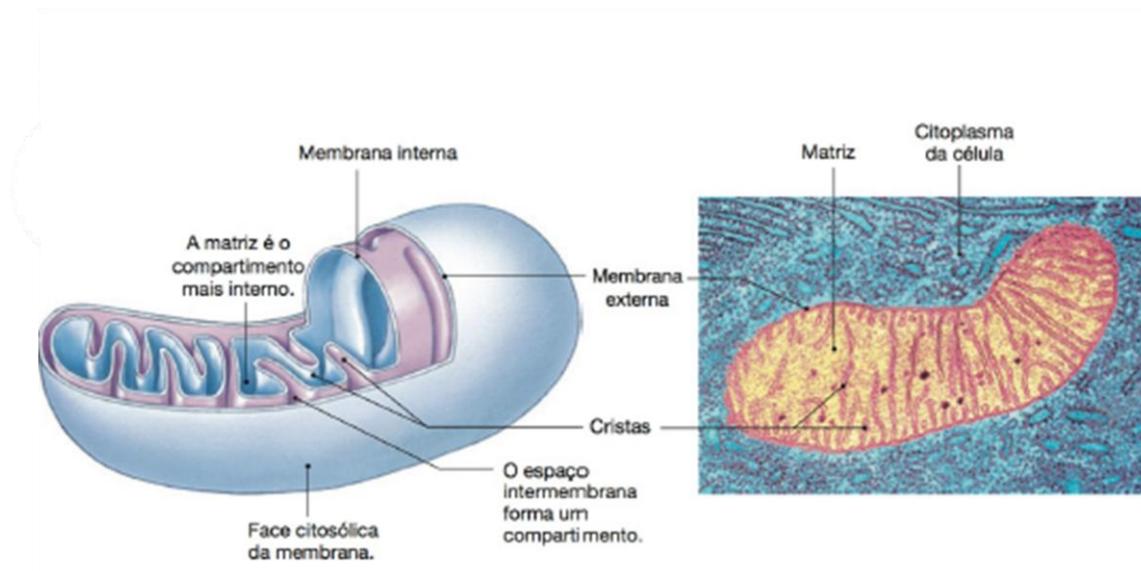
## 2.5. Estrutura e Função Mitocondrial

A mitocôndria é uma organela celular de forma arredondada ou alongada existente em praticamente todos os tipos de células eucariontes, dependentes do metabolismo aeróbio, envolta por duas membranas: a membrana externa (MEM) é lisa, esférica e permeável, às pequenas moléculas e íons, que revestem o espaço intramembranoso; e a membrana interna (MIM) possui invaginações – as cristas mitocondriais, impermeável à maior parte de moléculas pequenas e íons (NELSON & COX, 2013).

Estão intimamente ligadas à homeostase celular, tendo um papel importante na sinalização celular e apoptose, são mais de 10 a 100.000 por célula, diferentes entre si, o seu formato e quantidade variam de acordo com o tecido em que se encontram, medindo de 0,5 a 1,0 $\mu$ m de largura e até 10 $\mu$ m de comprimento, tendem a se acumular no citoplasma onde o gasto energético é mais intenso, são constituídas principalmente por proteínas e em segundo lugar por lipídios. Sua principal função é a síntese de 90% da adenosina trifosfato (ATP) celular através da fosforilação oxidativa (OXPHOS) (WALLACE, 1997).

Outras reações importantes para a célula ocorrem nas mitocôndrias como o ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), a oxidação de ácidos graxos, degradação de glicídios e lipídios, geração de radicais livres, síntese de esteróides e morte celular (LIN & BEAL, 2006). Contudo, sua principal função é no metabolismo energético, e defeitos na função mitocondrial podem ter consequências desastrosas no organismo humano (SCHAPIRA, 2006).

Na membrana interna da mitocôndria se encontram organizados grandes complexos enzimáticos com importantes funções, estruturados num sistema que se designa por Cadeia Respiratória Mitocondrial (CRM), onde ocorre o processo de fosforilação oxidativa (STOCHER & KEANEY, 2004).



**FIGURA 6 – Estrutura da Mitocôndria.** Figura retirada e adaptada de Silverthorn (2010).

A mitocôndria é responsável pela síntese de ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular, os elétrons doados por substratos oxidáveis à cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, são transferidos ao  $O_2$  reduzindo-o a  $H_2O$  (respiração mitocondrial) e a energia livre resultante é utilizada para a síntese de ATP (CARVALHO & RECCO-PIMENTEL, 2013).

Além disso, a mitocôndria contém o seu próprio DNA (mtDNA), apresentando características próprias, sua principal constituição é por proteínas e lipídios. As mutações do mtDNA podem causar falhas no processo de obtenção de energia nas células, o que caracteriza as doenças mitocondriais. Defeitos na função mitocondrial podem ter consequências desastrosas para o organismo humano. Os tecidos mais acometidos são aqueles com maior necessidade de ATP como, por exemplo, o sistema nervoso central que consome 20% da produção corpórea de ATP (SCHAPIRA, 2006; WALLACE, 1997).

## 2.6. Cadeia Respiratória Mitocondrial e Fosforilação Oxidativa

As mitocôndrias, como visto anteriormente, têm como uma de suas principais funções a síntese de ATP, (90%) do ATP celular, e isso ocorre através da fosforilação oxidativa (WALLACE, 1997). A energia utilizada para que a síntese de ATP aconteça, provém da oxidação dos carboidratos, lipídeos e aminoácidos, na forma de carreadores de elétrons (MITCHELL, 1966). Segundo Mitchell (1966) a diferença na concentração de prótons através da membrana, é a energia necessária para a formação de ATP (ou fosforilação do ADP).

A fosforilação oxidativa é o estágio final do metabolismo envolvendo a produção de energia na forma de ATP nos organismos aeróbios, reduzindo  $O_2$  molecular em água (NELSON, 2013).

Esse processo ocorre na MIM, onde se encontram complexos respiratórios enzimáticos (I, II, III, IV e V – este último também conhecido como ATP sintase, que constituem a Cadeia de Transporte de Elétrons ou Cadeia Respiratória Mitocondrial (CRM) (NELSON & COX, 2013).

A CRM é responsável pela transferência gradativa de elétrons, vindos do metabolismo intermediário para a redução do  $O_2$  e síntese de ATP, esse transporte de elétrons acontece pelos transportadores de elétrons: coenzima Q e citocromo c (NELSON & COX, 2013). Redutores de elétrons como NADH e  $FADH_2$ , provenientes do metabolismo intermediário desses complexos enzimáticos (I a IV), permite que a energia libertada por ações do complexo V ao invés de se dissipar sob a forma de calor, reduza o  $O_2$  em  $H_2O$  (WALLACE, 2010).

Na CRM, o NADH transfere seus elétrons para a coenzima Q através do complexo I; o complexo II promove a transferência de elétrons a partir do  $FADH_2$  e succinato para a coenzima Q (CoQ), o NADH e o succinato são produtos intermediários do ciclo de Krebs, e o  $FADH_2$  é proveniente da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos; da CoQ os elétrons circulam através do complexo III para o citocromo c, a coenzima Q é uma quinona altamente hidrofóbica e o citocromo c é uma proteína de baixo peso molecular, ambos movimentam-se entre os complexos carregando elétrons; e então, no complexo IV, os elétrons do citocromo c são transferidos para o oxigênio molecular, formando água ( $H_2O$ ), esse processo de transporte de elétrons é a cadeia respiratória. A energia gerada e liberada por esse processo de redução é usada para bombear prótons da matriz para o espaço intermembrana, pelos complexos I, II e IV por intermédio da MIM,

criando um gradiente eletroquímico. Este gradiente é utilizado pelo complexo V (ATP-sintase) como uma fonte de energia potencial para condensar ADP e Pi e finalmente ocorrer a síntese de ATP (WALLACE, 1997; NELSON & COX, 2013, SHAPIRA, 2000) (Figura 7).

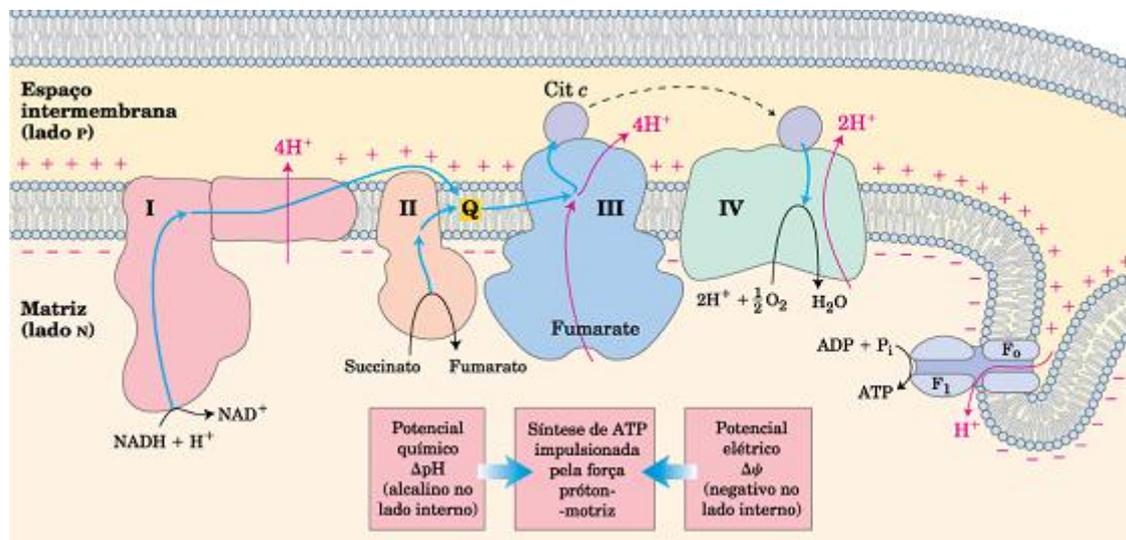


FIGURA 7 – Complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial. Figura retirada e adaptada de Nelson & Cox (2013).

## 2.7. As Mitocôndrias e o Estresse Oxidativo

Nas últimas décadas, a comunidade científica tem demonstrado um grande interesse em estudos sobre os antioxidantes, devido principalmente às descobertas dos efeitos dos radicais livres nos organismos humanos. Inúmeras são as pesquisas para melhor esclarecer o papel dos radicais livres nos processos fisiopatológicos como desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas como câncer, distúrbios auto-imunes, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, inflamação, e o envelhecimento (MIKHED *et al.*, 2015).

Uma das hipóteses mais conhecidas e aceitas para explicar o envelhecimento é a teoria dos radicais livres, proposta por *Denham Harman* em 1956, que estabelece que o envelhecimento é derivado dos efeitos deletérios nas organelas celulares, causados pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (HARMAN, 1956). Na década de 1970, essa teoria passou a considerar também a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio, como causa principal de danos celulares (BO *et al.*, 2013).

Os radicais livres são definidos como sendo um átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) sua produção tem como principal fonte o metabolismo aeróbio (ROGELL *et al.*, 2014). Alguns exemplos são o íon hidroxila (OH<sup>-</sup>), íon peróxil (HOH), ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Óxido Nítrico (NO) e Oxigênio Molecular (O<sub>2</sub>) (CAROCHO & FERREIRA, 2013). Altamente instáveis e reativos, estão sempre na tentativa de doar ou retirar um elétron de outras moléculas para se tornarem estáveis, porém quando adquirem elétrons provenientes das reações com enzimas, ácidos nucleicos e lipídeos, tornam-se instáveis e podem provocar sérios danos celulares (HALLIWELL, 2006).

Essas espécies químicas mostradas acima, que ainda não foram totalmente reduzidas, são chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas ou íons derivados do oxigênio, que em sua grande maioria possuem alta reatividade e constituem dois principais tipos de radicais livres (LU, 2010).

Uma das vias de formação das (EROs) de maior importância biológica, consiste em reduções parciais do oxigênio à água, na qual a entrada de quatro elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e do radical hidroxila (OH<sup>-</sup>), intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). No nosso organismo possuímos concentrações fisiológicas necessárias de radicais livres para o funcionamento celular normal, porém em concentrações supra fisiológicas trazem consequências celulares deletérias, causando danos oxidativos às células, por meio de modificações em proteínas, lipídios, carboidratos e mutações no mtDNA (mtDNA) e no DNA nuclear, e com isso o rompimento da homeostase celular (ROGELL *et al.*, 2014).

Por ser a maior fonte endógena de produção de radicais livres, as mitocôndrias são também as que mais sofrem oxidação no DNA e conseqüentemente a mutação do genoma. O excesso de formação de EROs causa disfunção mitocondrial, mas esse desequilíbrio não afeta apenas o mtDNA, o DNA nuclear de outras células também são prejudicados, comprometendo o bom funcionamento da célula levando-a à morte por apoptose ou necrose celular (PAYNE & CHINNERY, 2015). O efeito prejudicial do excesso de radicais livres que causam danos biológicos é denominado de estresse oxidativo, isso acontece quando há uma superprodução de EROs e uma deficiência na capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo (VALKO *et al.*, 2007).

Para evitar os danos causados pelas EROs, nosso organismo possui um eficiente sistema de mecanismo de defesa, que neutraliza as ações dos radicais livres chamados de antioxidantes. Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos (SIES, 1993).

Um exemplo de antioxidante não enzimático, e o qual daremos maior ênfase nesse trabalho, é o estrogênio, um hormônio que está associado a diversas funções fisiológicas, dentre elas atua como o principal regulador do sistema bioenergético do cérebro (BRINTON, 2008).

O cérebro, embora apresente apenas 2% da massa corpora total, uma pequena área em relação à massa corporal, consome cerca de 20% do oxigênio do total do corpo para sua respiração mitocondrial e geração de adenosina trifosfato (ATP), portanto o cérebro é um exemplo singular da importância da eficiência da função mitocondrial para a manutenção da bioenergética e viabilidade celular (MARZETTI *et al.*, 2013). Como o estrogênio é um importante regulador do sistema metabólico do cérebro, principalmente nas mulheres (BRINTON, 2008) o declínio em sua produção que ocorre com a menopausa estabelece a ligação intrínseca entre disfunção mitocondrial e desordens neurodegenerativas, como por exemplo, a Doença de Alzheimer (MOSCONI *et al.*, 2011).

Embora o foco do nosso estudo não seja as doenças degenerativas como o exemplo citado acima, as mitocôndrias apresentam papel central na integração de uma grande variedade de sinais dentro da célula, como modulação do suprimento energético, da sinalização das espécies reativas de oxigênio e das vias intrínsecas de apoptose (HEPPLE, 2014), alterações na função e dinâmica mitocondrial podem estar relacionadas a vários eventos fisiológicos celulares, contribuindo para o desenvolvimento de doenças usuais relacionadas à idade e/ou menopausa (DAI *et al.*, 2012; SEO *et al.*, 2010). Desse modo, falhas no metabolismo mitocondrial podem estar associadas à disfunção e morte celular por causas diversas (VERCESI *et al.*, 1997) e não menos importante como no desarranjo da plasticidade de células musculares levando a sarcopenia (MARZETTI *et al.*, 2013) muito comum em mulheres na pós-menopausa.

## **2.8. Efeitos do Treinamento Resistido Sobre o Sistema Neuromuscular e as Adaptações Mitocondriais.**

Está bem estabelecido na literatura que o exercício físico desempenha um importante papel na prevenção e/ou tratamento de várias desordens do organismo humano.

Reconhecidamente o exercício físico provoca adaptações fisiológicas que dependem de alguns fatores tais como: a duração do exercício, a frequência em que é realizado esse exercício e a intensidade do mesmo, que vão gerar essas adaptações resultando em um aumento do consumo de oxigênio (HALWEL, 2009). Como visto anteriormente, as mitocôndrias são o elemento mais importante no metabolismo oxidativo, portanto é certo que uma variedade de modulações fenotípicas associadas ao exercício ocorra na mitocôndria (BARBIERI *et al.*, 2013).

Aumento no conteúdo mitocondrial em resposta ao exercício foi primeiramente reportado por *Holloszy* em (1967). Desde então, o exercício físico, baseado em proposta aeróbia, tem sido utilizado como estratégia efetiva para melhorar a capacidade oxidativa mitocondrial do músculo esquelético de sujeitos jovens (SILVA *et al.*, 2009), bem como a função mitocondrial de sujeitos idosos (BROSKEY *et al.*, 2013).

Evidências científicas anteriores também reportam que o exercício melhora a saúde e função cerebral, principalmente em relação à diminuição do declínio cognitivo, tornando-se estratégia terapêutica recomendada para prevenir ou até mesmo recuperar pacientes com doenças neurodegenerativas (MATTSON, 2000). Entretanto, um recente trabalho realizado com ratas ovariectomizadas, demonstrou que o protocolo proposto de exercício aeróbio, não conseguiu reverter os efeitos negativos proporcionados pela ovariectomia na homeostase energética da região do hipocampo cerebral (BEN *et al.*, 2009).

O treinamento resistido é outra modalidade de exercício físico que tem sido muito respeitada nas últimas décadas, com vários benefícios no desempenho de atletas, benefícios relacionados a saúde de pessoas desde os adolescentes aos idosos, assim como pessoas com algum distúrbio cardiovascular e doenças neurodegenerativas, devido a melhora da potência e velocidade, o aumento da força muscular e resistência muscular localizada e hipertrofia, levando a um melhor desempenho motor, equilíbrio e coordenação (KRAEMER, 2003).

A disfunção na cadeia respiratória mitocondrial, causada por uma redução nos mecanismos antioxidantes celulares, faz com que haja um aumento na produção de EROs, acarretando em um aumento do estresse oxidativo celular no organismo, com o envelhecimento, principalmente em mulheres na pós-menopausa (TATSUTA & LANGER, 2008). Isso acarreta em danos nos componentes musculares, incluindo danos no DNA, nas miofibrilas, nas proteínas mitocondriais, na junção neuromuscular e nos elementos do retículo sarcoplasmático, responsáveis pela liberação de  $Ca^{2+}$  que inicia a contração muscular (MITCHELL *et al.*, 2012).

Está bem estabelecido na literatura, que a contração muscular produz radicais livres e que a adaptação do músculo ao exercício, tem como fonte principal, as vias de sinalização celular desencadeadas pelas espécies reativas de oxigênio. No entanto, é importante salientar que uma produção excessiva de EROs podem influenciar negativamente o desempenho do exercício, assim como prejudicar a saúde a longo prazo (SAHLIN *et al.*, 2010). Porém, a inatividade prolongada gera um aumento na produção de EROs mitocondrial (BARBIERI *et al.*, 2013), pois de acordo com o mesmo autor o local de produção de EROs no músculo pode ser diferente entre as fibras contráteis e as fibras expostas à inatividade prolongada. O exercício físico regular, portanto, é reconhecido como uma importante ferramenta na melhora da saúde como um todo (MERRY & RISTOW, 2015), melhorando o desempenho fisiológico do músculo esquelético e cardíaco, diminuindo a incidência de uma série de doenças, tais como as doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, diabetes tipo II, (RADAK *et al.*, 2005) com importantes benefícios na função cerebral, podendo agir como um fator preventivo e terapêutico em doenças como Alzheimer, Parkinson e no acidente vascular cerebral (RADAK *et al.*, 2005).

São necessárias mais investigações para compreender o real papel das mitocôndrias na produção de EROs durante a contração muscular.

### 3. HIPÓTESES

---

O conceito de sarcopenia emerge na literatura como um fator importante nos eventos relacionados à fragilidade física que envolve o sistema musculoesquelético de idosos e mulheres pós-menopáusicas.

Especificamente em relação às mulheres pós-menopáusicas, a diminuição nos níveis de estrogênio provoca alterações na função mitocondrial tanto do músculo esquelético quanto do cérebro. A disfunção mitocondrial pode constituir-se como um dos fatores intrínsecos fundamentais para compreensão e intervenção sobre os eventos celulares e biomoleculares que envolvem a sarcopenia, tanto no nível do córtex pré-frontal, como também periféricamente nos músculos esqueléticos.

Pergunta-se então:

- a) É possível haver relação entre função mitocondrial e perda de massa muscular?
- b) É possível haver uma relação da disfunção mitocondrial central (córtex motor) como conceito de sarcopenia?
- c) A ovariectomia, condição experimental em modelo animal, pode também mimetizar um modelo de sarcopenia em ratas?
- d) O treinamento resistido proposto nesse trabalho será capaz de reverter e/ou prevenir a sarcopenia, se o modelo experimental assim induzir?

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1. Objetivo Geral

O presente estudo apresentou como principal objetivo investigar os efeitos do Treinamento Resistido (TR) no córtex pré-frontal e no músculo Vasto Lateral (VL) de ratas ovariectomizadas.

### 4.2. Objetivos Específicos:

- a) analisar os efeitos de Protocolo de Treinamento Resistido sobre a função mitocondrial do córtex pré-frontal e do músculo Vasto Lateral (VL) de ratas ovariectomizadas;
- b) analisar a possível relação existente entre os conceitos de sarcopenia com a função mitocondrial de um tecido central (córtex pré-frontal) e de um tecido periférico (VL);
- c) analisar a relação entre massa teciduais específicas (córtex pré-frontal, Vasto Lateral) com os conceitos de sarcopenia.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 5.1. Animais e Condições Experimentais

Foram utilizadas 40 ratas Wistar (*Ratus Norvegicus Albinus*), adultas, obtidas do biotério CEMIB – da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Durante o período experimental, os animais ficaram mantidos em gaiolas coletivas (quatro ratas por gaiola) no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício, do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) – UFSCar, sob condições constantes de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}$  C), umidade e iluminação em ciclo invertido, 12 horas claro e 12 horas escuro (09:00-21:00h: escuro; 21:00-01:00h: claro) e com oferta de água e dieta *ad libitum*.

Os animais chegaram ao biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício - UFSCar com três semanas de vida e após a chegada permaneceram por três semanas em condição de aclimatação ao biotério e ao ciclo invertido. Após este período, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais.

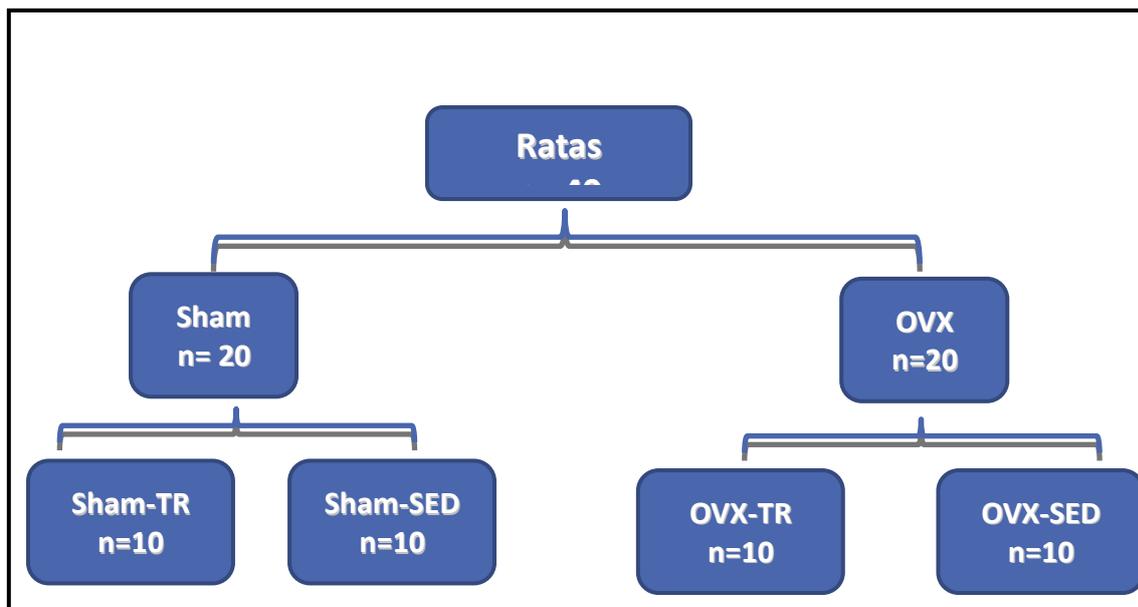
O presente estudo apresentou aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP sob protocolo CEMIB número 2534-1/2011, sendo conduzido de acordo com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América (NATIONAL RESEARCH COUNCIL'S, 1996).

### 5.2. Grupos Experimentais

Os animais foram randomicamente distribuídos em quatro grupos experimentais, a saber:

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

Os animais sedentários (Sham-SED e OVX-SED) foram mantidos em suas caixas por todo o período experimental pós-cirúrgico (13 semanas) sem nenhum tipo de atividade física, apenas o deslocamento dentro das caixas.



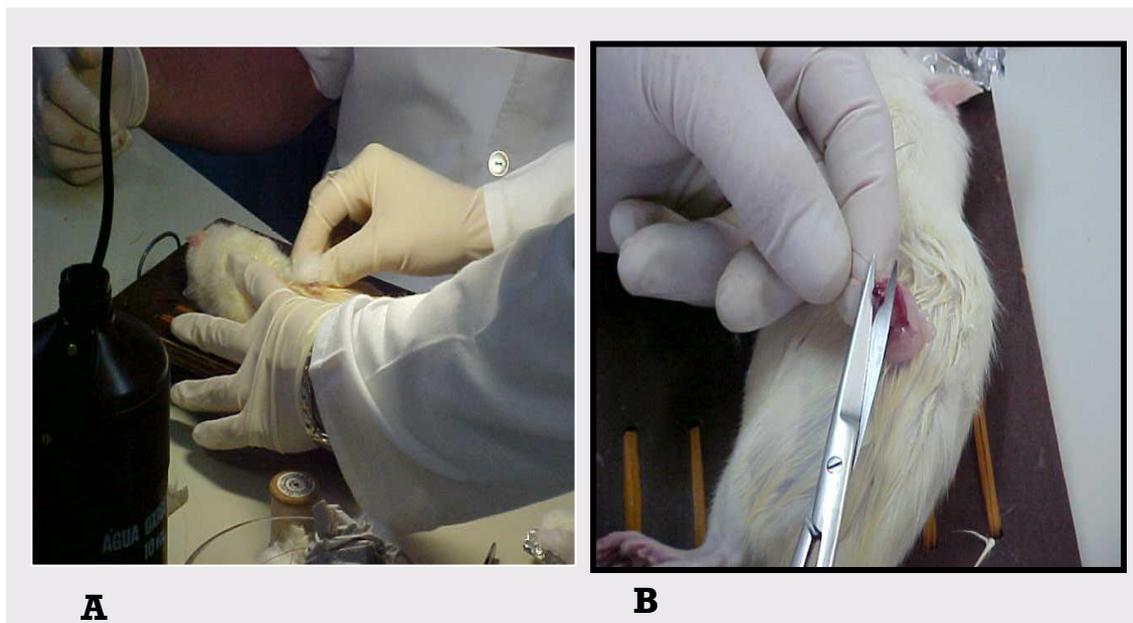
**FIGURA 8 - Organograma dos grupos experimentais:** Sham: ratas operadas intactas; OVX: ratas ovariectomizadas; SED: grupo sedentário; TR: grupo treinado

### 5.3. Procedimentos Cirúrgicos - Ovariectomia e Sham-Ovariectomia

As ratas dos grupos OVX sofreram a retirada dos ovários na 13<sup>a</sup> semana de vida segundo o modelo proposto por Kalu (1991). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados posteriormente a anestesia das ratas com uma associação de 13mg/Kg de xilazina e 33mg/Kg de ketamina base, via intraperitoneal. Primeiramente, foi realizada uma pequena incisão bilateral (1,0-1,5cm) através da pele e da camada muscular com uso de tesoura e pinça, aproximadamente 1cm abaixo da última costela, perpendicular ao corpo do animal (Figura 9A).

Para a cirurgia de ovariectomia, a cavidade peritoneal foi aberta, os ovários expostos e retirados, logo abaixo da fimbria foi realizada uma ligadura com fio de nylon. Após os ovários serem removidos, a incisão na musculatura e pele foi suturada com o fio de nylon (Figura 9B).

O treinamento resistido foi iniciado após 3-4 semanas dos procedimentos cirúrgicos, para avaliar o papel do treinamento em reverter ou diminuir os efeitos deletérios da deficiência do estrogênio (BRINTON, 2012). Os animais Sham apenas foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, com os ovários externalizados à cavidade abdominal e devolvidos, sem a retirada dos mesmos.



**FIGURA 9 - Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia.** A) Preparação para a incisão lateral, aproximadamente 1cm abaixo da última costela, perpendicular ao corpo do animal; B) Exposição do ovário e retirada do mesmo.

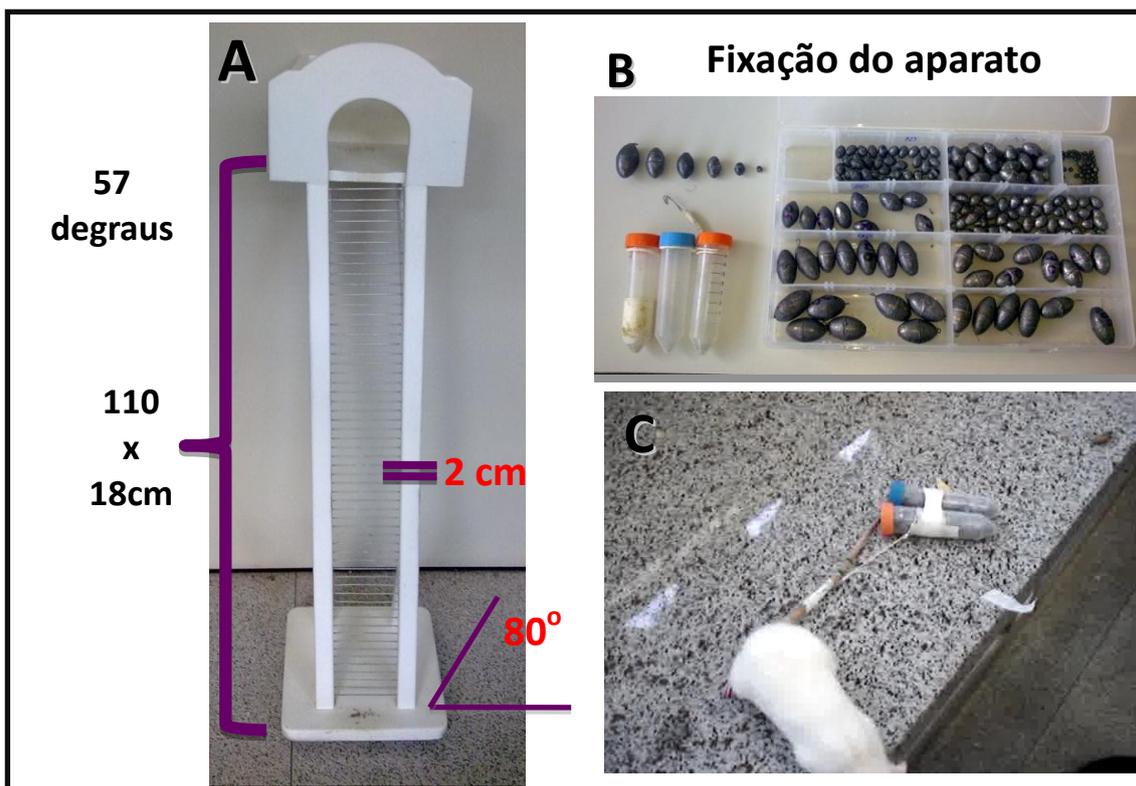
#### 5.4. Protocolo de Treinamento Resistido (TR)

O protocolo de TR é adaptado de *Hornerberg Jr & Farrar (2004)*, de acordo com as necessidades do presente estudo. Inicialmente, as ratas foram familiarizadas ao protocolo de TR conforme descrito por (*PRESTES et al., 2009*).

##### 5.4.1. Familiarização ao Protocolo de TR

A familiarização ao protocolo do TR foi realizada por meio de três sessões (adaptação), em três dias, nas quais os animais escalavam uma escada vertical (1,1x0,18m, degrau de 2cm com inclinação de 80°). Foram realizadas três subidas iniciais: 1ª do começo; 2ª da metade; 3ª do final da escada; após essas três subidas iniciais, foram realizadas mais três subidas inteiras. Na primeira sessão do primeiro dia, as ratas realizavam as subidas sem fita adesiva presa na calda e sem aparato; na segunda sessão do segundo dia, as escaladas eram realizadas apenas com fita adesiva presa na calda e na terceira sessão do terceiro dia com o aparato vazio. Tubos de polipropileno do tipo *falcon* de 50mL e chumbos para pesca de diferentes tamanhos e massas foram utilizados como aparato de carga e cargas, respectivamente (Figura 10). O aparato de carga era preso a porção proximal da cauda com uma fita auto-adesiva, com o aparato fixado a cauda, as ratas eram colocadas na parte inferior da escada e subiam a mesma.

Quando necessário, um estímulo em pinça, com os dedos, era aplicado na ponta da cauda do animal para iniciar o movimento de escalada. O tamanho da escada permite ao animal realizar de 8 a 12 movimentos por escalada. No topo da escada as ratas alcançavam uma gaiola (20 x 20 x 20cm) onde descansavam por dois minutos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem a necessidade de estímulo.



**FIGURA 10 - Equipamentos utilizados para o treinamento resistido.** A) Escada utilizada para a escalada com 57 degraus; B) Pesos utilizados com carga; C) Aparato com dois tubos *falcon* contendo a carga, atados à cauda do animal.

#### 5.4.2. Determinação da Carga Máxima de Carregamento (CMC)

A determinação da 1ª CMC foi realizada após 72h da última sessão de familiarização, definida uma vez por semana. Nessa sessão, os animais escalavam de 4-9 vezes a escada com cargas progressivamente mais pesadas, nas próximas sessões a CMC utilizada partia sempre da CMC determinada na sessão anterior. A primeira escalada consistiu em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal, após 2 minutos de recuperação a segunda escalada foi realizada com a adição de um peso de 30g. Este acréscimo de carga (+30g) foi repetido consecutivamente em cada escalada

até uma carga com a qual a rata não conseguisse escalar toda a escada. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a Carga Máxima de Carregamento CMC da rata. A determinação da CMC foi realizada uma vez por semana, sempre na primeira sessão de cada semana.

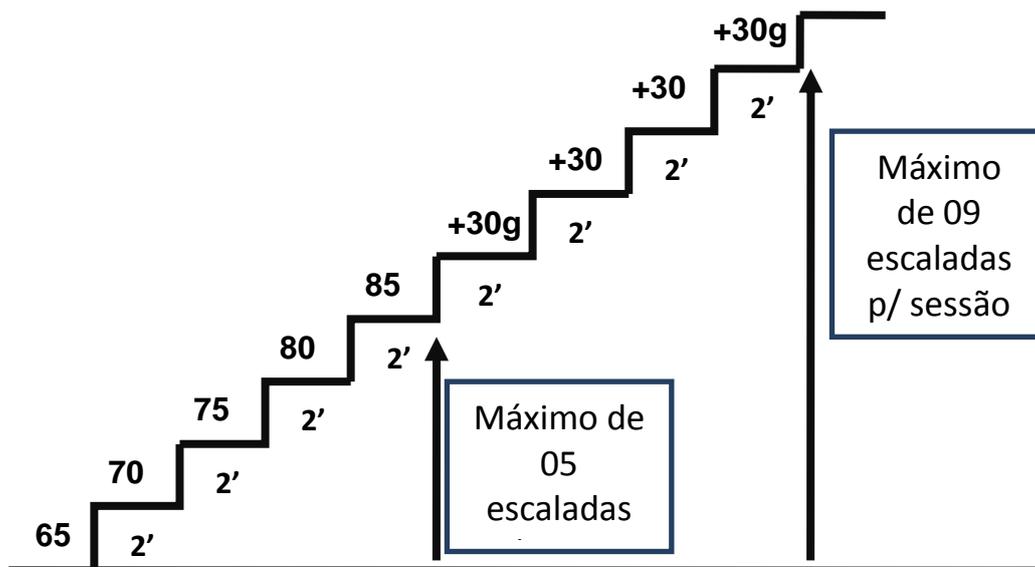
**Tabela 1. Cronograma do treinamento resistido.**

<i>GRUPOS</i>	<i>SEGUNDA</i>	<i>TERÇA</i>	<i>QUARTA</i>	<i>QUINTA</i>	<i>SEXTA</i>	<i>SÁBADO</i>
<i>OVX-TR</i>	Adaptação	X	Adaptação	X	Adaptação	X
	CMC	X	Sessão de Treino	X	Sessão de Treino	X
<i>Sham-TR</i>	X	Adaptação	X	Adaptação	X	Adaptação
		CMC	X	Sessão de Treino	X	Sessão de Treino

Adaptação: Três primeiras sessões de familiarização dos grupos Sham-TR e OVX-TR; CMC: carga máxima de carregamento, realizada na primeira sessão de treinamento de cada semana; x: período de recuperação das ratas.

#### **5.4.3. Protocolo de TR 13 Semanas**

As sessões de treinamento consistiram de 5 escaladas com cargas progressivamente mais pesadas, de 65%, 70%, 75%, 80% e 85% da CMC e ocorreram com periodicidade semanal de três vezes, com intervalo mínimo de 48 horas (terças, quintas e sábados, por exemplo). Esta padronização de sessões de treinamento foi realizada durante as 13 semanas, totalizando 36 sessões de TR.



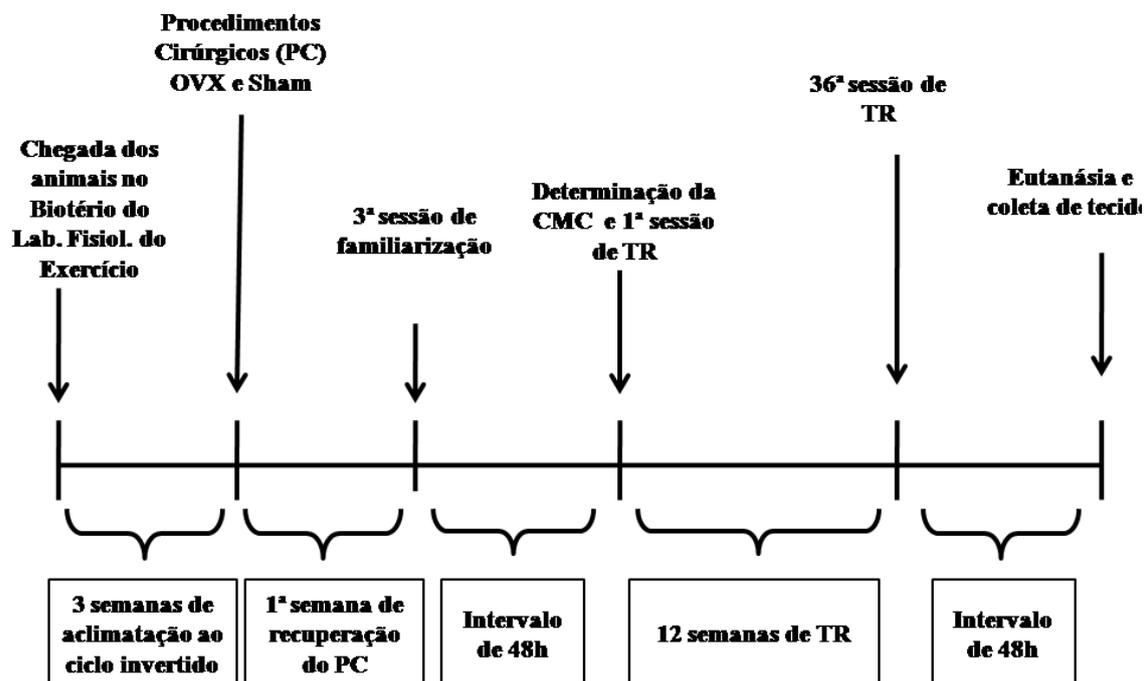
**FIGURA 11** - Apresentação esquemática das cargas de carregamento por sessão de treinamento e por sessão de CMC.

### 5.5. Eutanásia dos Animais e Coleta dos Tecidos

Os animais foram eutanasiados após 48h da última sessão de treinamento resistido. A eutanásia aconteceu por decapitação. Foi realizada a retirada dos tecidos (córtex pré-frontal, cerebelo, músculo vasto lateral e músculo reto femoral) pesados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  ou tratados conforme metodologia adequada, para posterior análise.

### 5.6. Desenho Experimental

Abaixo um resumo do desenho experimental desse estudo desde a chegada das ratas ao biotério até o momento do sacrifício, representado pela Figura 12.



**FIGUR 12 - Delineamento experimental:** linha do tempo dos procedimentos realizados. PC: Procedimentos cirúrgicos; CMC: Carga máxima de carregamento; TR: Treinamento resistido; OVX: Animal ovariectomizado; Sham: Animal controle.

### 5.7. Análise da Função Mitocondrial: Consumo de Oxigênio por meio da Técnica de Respirometria Mitocondrial em Biópsia Tecidual:

*5.7.1. Retirada e Preparação das amostras:* os tecidos (cérebro e músculo quadríceps) foram retirados imediatamente após o sacrifício do animal (biópsia); separando-se córtex e cerebelo no cérebro, e vasto lateral (VL) e reto femoral (RF) no quadríceps, todos esses tecidos foram dissecados com auxílio de lâmina de bisturi; os tecidos foram colocados em solução gelada de relaxamento e preservação da biópsia [BIOPS: (10mM Ca-EGTA - 2,77mM de CaK<sub>2</sub>EGTA + 7,23 mM K<sub>2</sub>EGTA) 20mM/L imidazol, 50mM/L K<sup>+</sup>/4-morfolinoetano ácido sulfônico, 0,5 mM/L ditiotretitol, 7mM/L MgCl<sub>2</sub>, 5mM/L ATP, 15mM/L fosfocreatina, pH=7,1]. Em seguida, os tecidos foram manuseados (dissecação apenas do tecido) para proporcionar a retirada de duas amostras de cada região com massa úmida pesando em torno de 8 a 10mg.

5.7.2. *Permeabilização Mecânica e Química*: as amostras sofreram processo de “permeabilização mecânica” com auxílio de uma pinça histológica e uma agulha de procedimento. Logo em seguida, as amostras permeabilizadas mecanicamente sofreram processo de “permeabilização química” por 30min em BIOPS contendo saponina (50 $\mu$ g/mL), gentilmente agitadas nesse período; na sequência, ainda em leve agitação, as amostras foram lavadas por 10min em “Meio de Respiração Mitocondrial” número 5 (MiR05: 60mmol/L lactobionato de potássio, 0,5mmol/L EGTA, 3mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 20mmol/L taurina, 10mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20mmol/L HEPES, 110mmol/L sacarose, 1g/L BSA, pH=7.0) (KUZNETSOV *et al.*, 2008).

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

## 5.8. Análise Estatística dos Resultados

Foi adotado um erro  $\alpha$  de 0,05, sendo o nível de significância estipulado em  $p < 0,05$  para todos os testes estatísticos realizados. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistica<sup>®</sup> versão 7.0 (*Statistica Software*<sup>®</sup>). Foram aplicados testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e de homocedacidade (Levene) para os valores das amostras de todas as variáveis dependentes. As variáveis que apresentaram distribuição normal e com homocedacidade, foram analisadas pelo teste Anova-one-

way, com aplicação do post-hoc de Tukey, quando a diferença apresentou-se de forma significativa.

## 6. RESULTADOS

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

Na **Tabela 2** são apresentados os valores da evolução ponderal da massa corporal das ratas do experimento.

**Tabela 2 – Evolução Ponderal da Massa Corporal dos Grupos Experimentais (gramas)**

Período	Grupos Experimentais			
	Grupo Intacto (Sham)		Grupo Ovariectomia (OVX)	
	Sham-SED	Sham-TR	OVX-SED	OVX-TR
<i>Inicial</i> (13 Semanas)	265,56 ± 16,39	272,56 ± 13,50	270,56 ± 15,30	273,56 ± 14,50
<i>Pós-Operatório</i> (3 Semanas)	310,52 ± 19,41	293,50 ± 14,76	330,73 ± 39,51 <sup>a</sup>	328,23 ± 25,88 <sup>a</sup>
<i>Intermediário</i> (6 semanas TR)	330,11 ± 28,07	304,24 ± 13,99 <sup>a,b,c</sup>	355,58 ± 42,50 <sup>a</sup>	339,42 ± 28,04
<i>Final</i> (13 semanas TR)	343,94 ± 28,07	316,72 ± 20,22 <sup>a,b,c</sup>	377,02 ± 46,78 <sup>a,c,d</sup>	355,28 ± 26,66 <sup>a,b,d</sup>

Valores estão expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM), n = 10 por grupo. **Grupo Ovariectomia (OVX):** Ovariectomia Sedentário (OVX-SED) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVX-TR). **Grupo Intacto (Sham):** Sham Sedentário (Sham-SED) e Sham Treinamento Resistido (Sham-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey; p<0,05 comparado aos grupos <sup>a</sup>Sham-SED, <sup>b</sup>OVX-SED, <sup>c</sup>OVX-TR, <sup>d</sup>Sham-TR.

Observou-se pelos valores da média inicial da massa corporal de todas as ratas que não houve nenhuma diferença significativa entre todos os grupos participantes do experimento, demonstrando homogeneidade da amostra inicial em relação a esse dado biométrico. Na análise intermediária (6 semanas do TR) observou-se diferença significativa do grupo Sham-TR para todos os outros grupos experimentais (p<0,05), com diminuição da massa corporal para esse grupo; essa diferença ficou ainda mais acentuada no período final do experimento (13 semanas TR). Nesse período final, o grupo OVX-SED apresentou massa corporal maior em relação a todos os outros grupos

experimentais ( $p < 0,05$ ), e o TR foi capaz de atenuar significativamente o aumento proporcionado pela ovariectomia ( $p < 0,05$ ).

Na **Tabela 3** são apresentados os valores da avaliação final da massa de alguns tecidos de análise do experimento: Córtex Pré-Frontal, Cerebelo, Vasto Lateral e Reto Femoral.

**Tabela 3 – Massa dos Tecidos: Córtex Pré-Frontal, Cerebelo, Vasto Lateral e Reto Femoral (mg).**

<i>Grupos Experimentais</i>	<i>Massa Final dos Tecidos</i>			
	<i>Córtex Pré-Frontal</i>	<i>Cerebelo</i>	<i>Vasto Lateral</i>	<i>Reto Femoral</i>
Sham-SED	77,84±2,92	330,36±3,91 <sup>a</sup>	980,86±38,83 <sup>a</sup>	475,27±22,82
Sham-TR	82,45±3,22	331,41±4,70 <sup>a</sup>	1078,73±29,28 <sup>a</sup>	619,50±74,51 <sup>a</sup>
OVX-SED	79,09±2,46	312,90±3,98	858,43±16,10	379,07±17,61
OVX-TR	79,69±4,00	331,19±2,99 <sup>a</sup>	1044,73±29,60 <sup>a</sup>	551,43±21,81 <sup>a</sup>

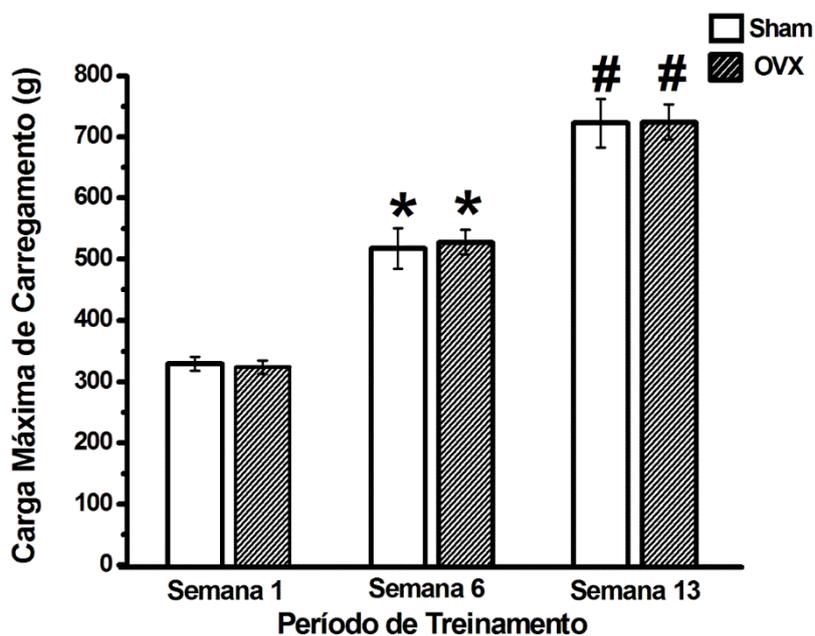
Valores estão expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM), n = 10 por grupo. **Grupo Ovariectomia (OVX):** Ovariectomia Sedentário (OVX-SED) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVX-TR). **Grupo Intacto (Sham):** Sham Sedentário (Sham-SED) e Sham Treinamento Resistido (Sham-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ; <sup>a</sup>comparado ao grupo OVX-SED.

Os resultados mais importantes a serem destacados na Tabela 3 são relativos à massa do cerebelo e do músculo Vasto Lateral (VL), que apresentaram diminuição significativa no grupo OVX-SED ( $p < 0,05$ ) em relação aos outros grupos experimentais. O Treinamento Resistido proposto foi efetivo em combater esse efeito deletério de diminuição da massa muscular proporcionado pela ovariectomia tanto para o Vasto Lateral como para o Reto Femoral ( $p < 0,05$ ), pois os valores de massa muscular do grupo OVX-TR ficaram significativamente acima dos valores do grupos OVX-SED e próximos dos valores do grupo Sham-TR. Embora a massa muscular dos grupos treinados (Sham-TR e OVX-TR) não tenha estabelecido um valor numérico significativo, os valores ficaram acima dos valores do grupo Sham-SED, demonstrando efetividade do treinamento proposto em aumentar a massa muscular. Também é

importante destacar que a massa do Córtex Pré-Frontal não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais desse estudo.

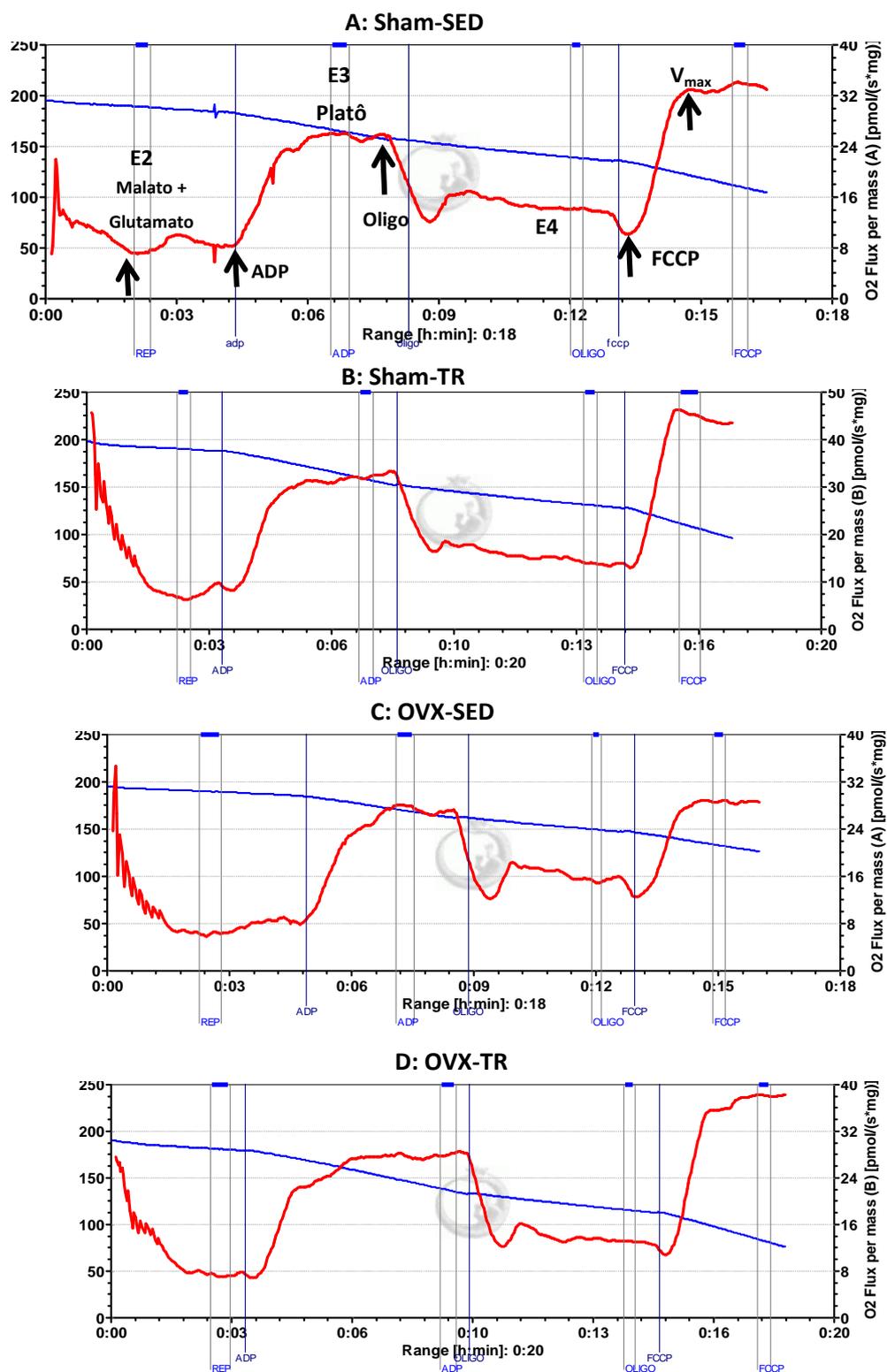
## 6.2. Carga Máxima de Carregamento do Treinamento Resistido

A carga máxima de carregamento durante as 13 semanas de treinamento resistido evoluiu de maneira similar para ambos os grupos treinados (OVX-TR e Sham-TR), não havendo nenhuma interação entre os grupos. As cargas aumentaram após a semana 6 e semana 13 quando comparadas com a semana 1, bem como a semana 13 quando comparada com a semana 6. Desta forma não houve nenhuma diferença entre os grupos (OVX-TR e Sham-TR), porém este resultado indica eficiência do treinamento resistido no decorrer das semanas (Figura 13).



**FIGURA 13 - Carga Máxima de Carregamento.** Grupos Experimentais: Sham-TR (Sham Operado Treinamento Resistido) e OVX-TR (Ovariectomizado Treinamento Resistido). Valores apresentados como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM); \*diferença significativa entre semana 6 e semana 1 ( $p < 0,05$ ); #diferença significativa entre a semana 13 e as semanas 6 e 1 ( $p < 0,05$ ).

### 6.3. Consumo de Oxigênio do Córtex Pré-Frontal Cerebral



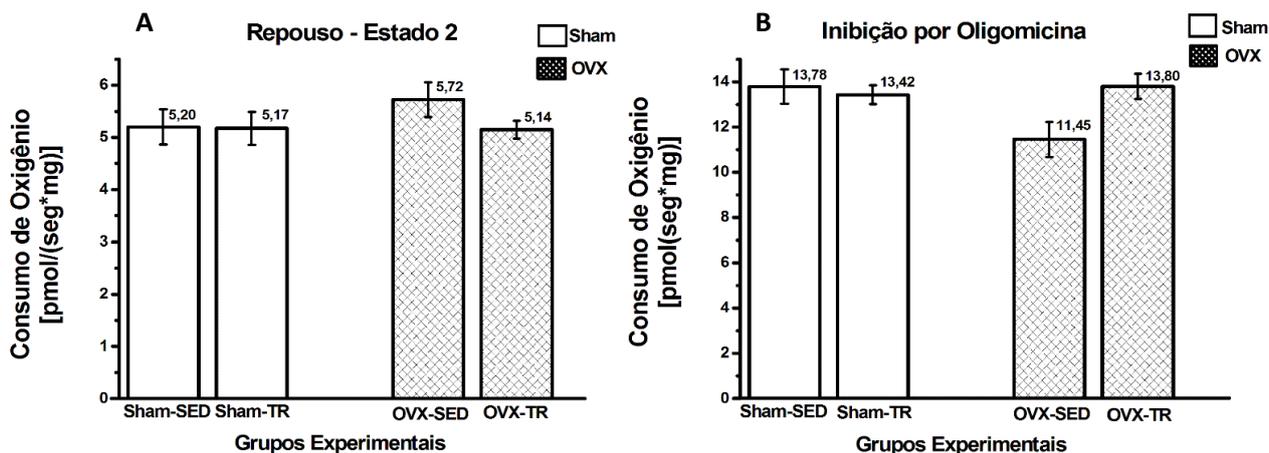
**FIGURA 14 - Respirimetria de Alta Resolução realizada em biópsia muscular do Córtex Pré-Frontal.** Linha Azul: representa o consumo de oxigênio da cuba – Linha Vermelha: representa a velocidade de consumo de oxigênio do tecido. **A:** análise gráfica de uma rata do grupo Sham-SED. **B:** análise gráfica da respiração de uma rata do grupo Sham-TR. **C:** análise gráfica de uma rata do grupo OVX-SED. **D:** análise gráfica da respiração de uma rata do grupo OVX-TR. Estados Respiratórios: E2 = repouso; E3 = estímulo respiratório por ADP; E4 = inibição respiratória por Oligomicina; V<sub>max</sub> = estímulo respiratório por FCCP.

A Figura 14 mostra a análise de respiração mitocondrial de biópsia do córtex pré-frontal uma rata Sham-SED (14A), de uma rata Sham-TR (14B), de uma rata OVX-SED (14C), e de uma rata OVX-TR (14D). A linha azul do gráfico representa o consumo de oxigênio da cuba (nM/mL), enquanto a linha vermelha representa a velocidade de consumo de oxigênio do tecido (córtex pré-frontal) corrigida por massa (pM/seg/mg). No protocolo adotado nesse projeto, utilizou-se malato (0,5mM) e glutamato (1mM) como substratos do complexo I da cadeia respiratória. O Estado 2 representa a respiração de repouso da amostra em ausência de ADP. O Estado 3, respiração ativa, é consequência do estímulo proporcionado pela adição de ADP, que pode ser inibida pela adição da Oligomicina, que leva ao Estado 4, onde novamente a mitocôndria respira em níveis de consumo de oxigênio mínimo. A capacidade máxima da cadeia respiratória ( $V_{m_{ax}}$ ) é avaliada pela adição do FCCP [carbonil cianeto-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona].

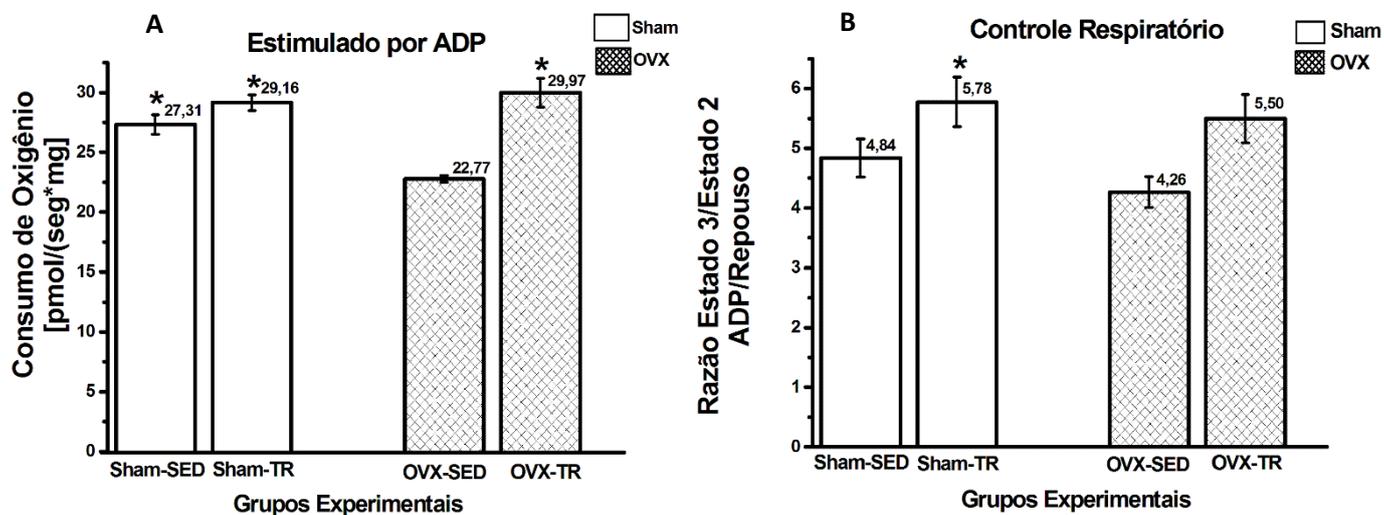
As Figuras 15, 16 e 17 apresentam os resultados do consumo de oxigênio tecidual de biópsia do córtex pré-frontal das ratas desse estudo.

O consumo de oxigênio, tanto para o estado de repouso (E2) quanto para o estado induzido pela inibição da Oligomicina (E4) (Figura 15A e B), não apresentou diferenças significativas entre todos os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ), demonstrando que não houve interferência da ovariectomia e do Treinamento Resistido aplicado nesse estudo nos estados de repouso da cadeia respiratória mitocondrial.

No consumo de oxigênio estimulado pela adição de ADP (Figura 16A), é possível observar que a ovariectomia proporcionou diminuição significativa no consumo de oxigênio do grupo OVX-SED ( $p < 0,05$ ) em relação a todos os outros grupos. Entretanto, no Controle Respiratório (Figura 16B: razão ADP/repouso), apenas o grupo Sham-TR apresentou eficiência respiratória maior em comparação ao grupo OVX-SED ( $p < 0,05$ ).

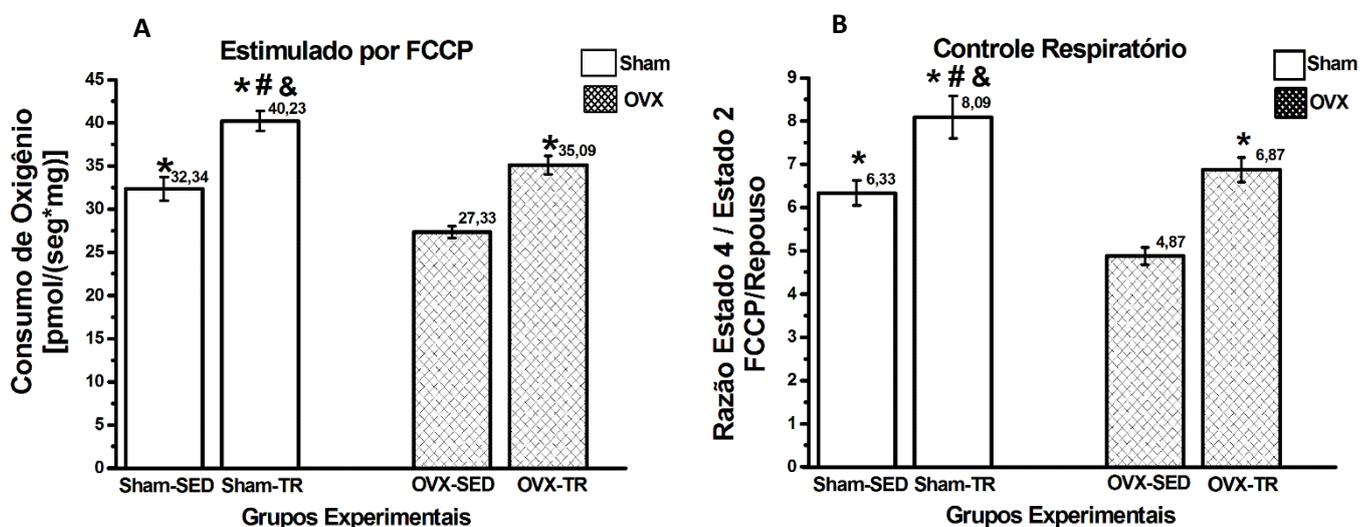


**FIGURA 15 – Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do Córtex Pré-Frontal - Análise em Repouso (A) e inibido por Oligomicina (B).** Valores estão expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), n=10 por grupo. *Grupo Ovariectomia (OVX)*:Ovariectomia Sedentário (OVX-SED) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVX-TR). *Grupo Intacto (Sham)*:Sham Sedentário (Sham-SED) e Sham Treinamento Resistido (Sham-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey,  $p < 0,05$ .



**FIGURA 16 – Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do Córtex Pré-Frontal estimulado por ADP (A) e Contole Respiratório ADP/Repouso (B).** Valores estão expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), n=10 por grupo. *Grupo Ovariectomia (OVX)*:Ovariectomia Sedentário (OVX-SED) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVX-TR). *Grupo Intacto (Sham)*:Sham Sedentário (Sham-SED) e Sham Treinamento Resistido (Sham-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey,  $P < 0,05$  - \*diferença significativa para o grupo OVX-SED.

No consumo de oxigênio estimulado pela adição de FCCP na biópsia do córtex pré-frontal ( $V_{max}$ ) (Figura 17A e B), novamente a ovariectomia produziu efeito deletério, pois o grupo OVX-SED apresentou consumo menor que todos os outros grupos, bem como controle respiratório menor ( $p < 0,05$ ). O treinamento resistido proposto foi eficiente em reverter os efeitos da ovariectomia tanto para a  $V_{max}$  como para o controle respiratório da biópsia do córtex pré-frontal. Outro aspecto importante a se ressaltar foi o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) que ocorreu no consumo de oxigênio e no controle respiratório do grupo Sham-TR, maior que todos os outros grupos experimentais.

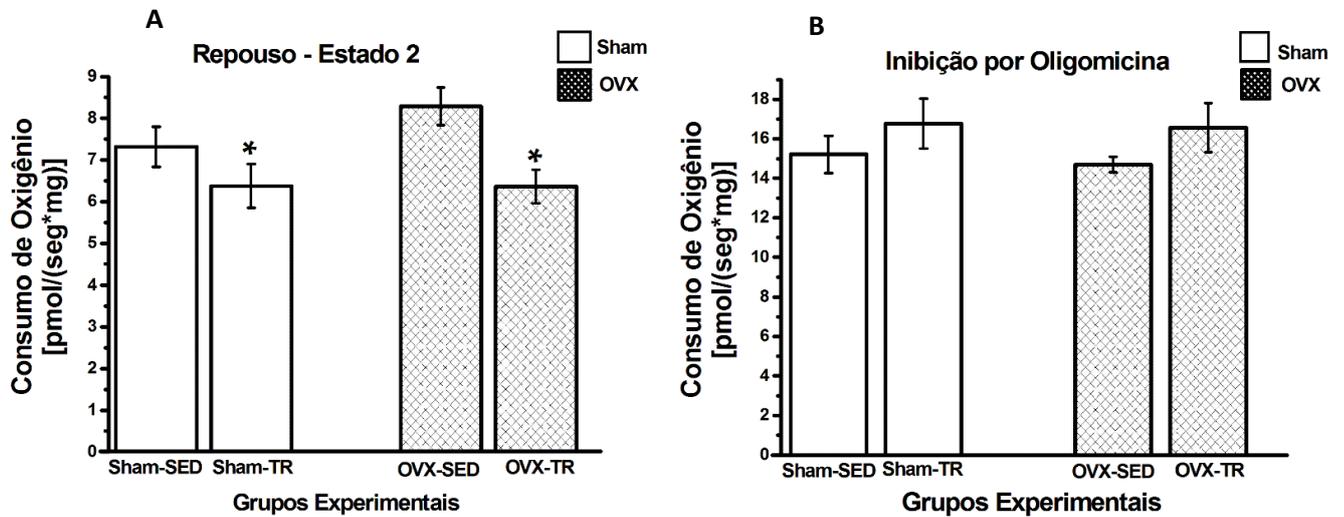


**FIGURA 17 – Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do Córtex Pré-Frontal estimulado por FCCPP (A) e Controle Respiratório FCCP/Repouso (B).** Valores estão expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM),  $n=10$  por grupo. *Grupo Ovariectomia (OVX):* Ovariectomia Sedentário (OVX-SED) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVX-TR). *Grupo Intacto (Sham):* Sham Sedentário (Sham-SED) e Sham Treinamento Resistido (Sham-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey,  $P < 0,05$  - \*diferença significativa para o grupo OVX-SED; #diferença significativa para o grupo Sham-SED; &diferença significativa para o grupo OVX-TR.

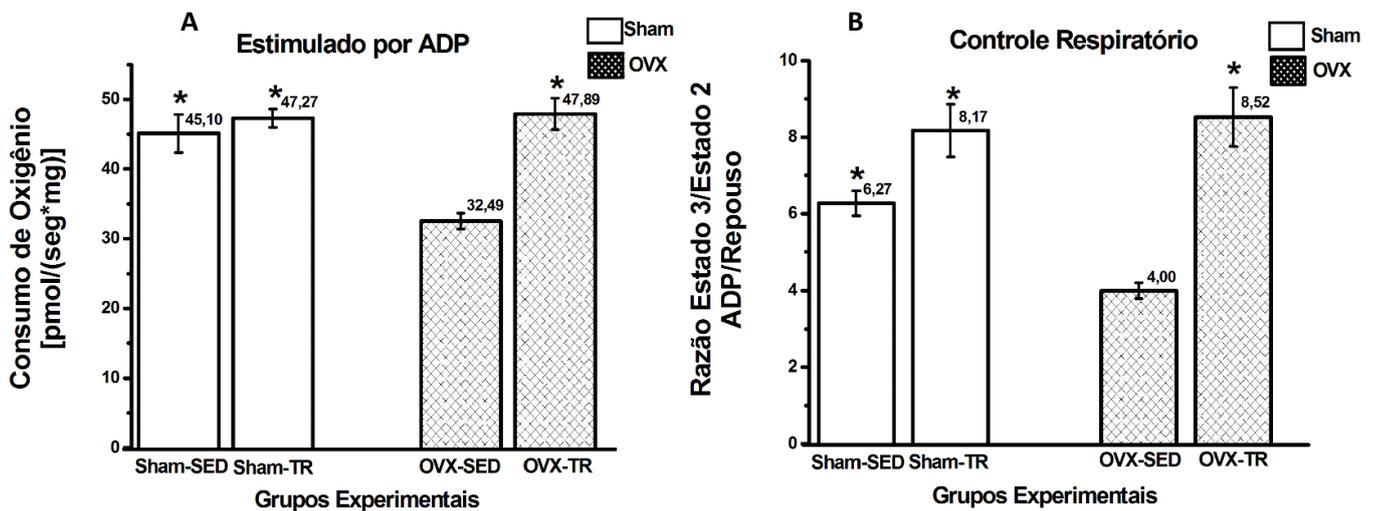
As Figuras 18, 19 e 20 apresentam os resultados do consumo de oxigênio tecidual de biópsia do músculo Vasto Lateral das ratas desse estudo.

Diferente do que ocorreu no córtex pré-frontal, o consumo de oxigênio do Vasto Lateral no estado de repouso (E2) foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) para os grupos treinados (Sham-TR e OVX-TR) comparado aos grupos sedentários (Sham-SED e OVX-SED), demonstrando que o treinamento resistido promove diminuição no consumo de oxigênio de repouso do músculo Vasto Lateral. Esse resultado não se

repete no estado de repouso provocado pela inibição da oligomicina, estado em que não houve diferença significativa entre todos os grupos (Figura 18A e B).

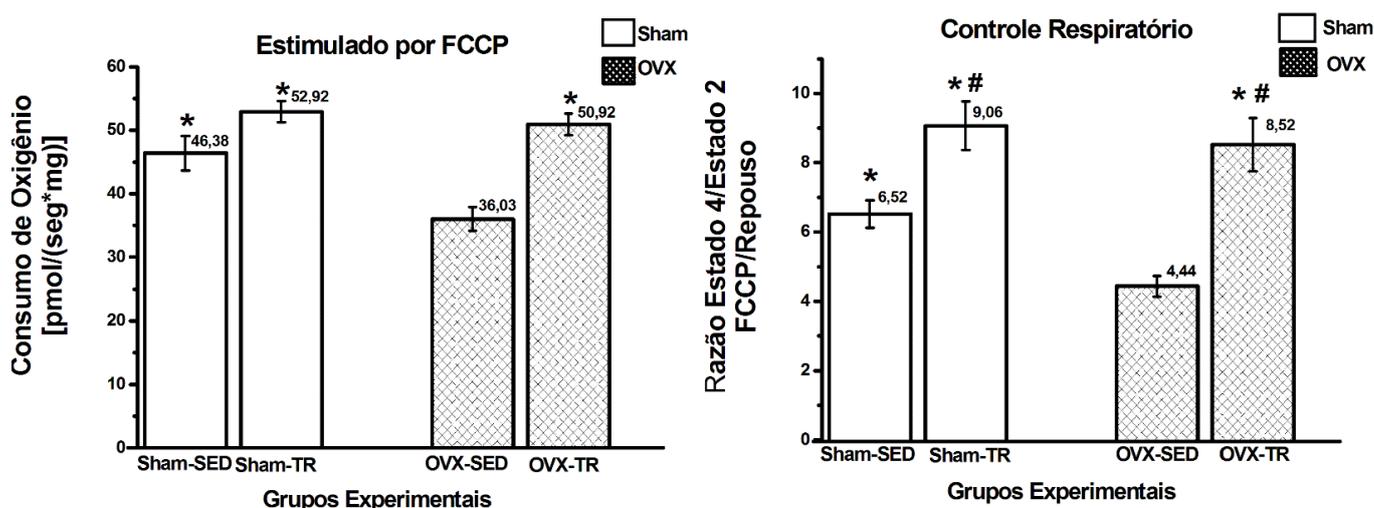


**FIGURA 18 – Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do músculo Vasto Lateral – Análise em Repouso (A) e inibido por Oligomicina (B).** Valores estão expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), n=10 por grupo. *Grupo Ovariectomia (OVX)*:Ovariectomia Sedentário (OVX-SED) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVX-TR). *Grupo Intacto (Sham)*:Sham Sedentário (Sham-SED) e Sham Treinamento Resistido (Sham-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de *Tukey*,  $p < 0,05$ .



**FIGURA 19 – Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do músculo Vasto Lateral estimulado por ADP (A) e Controle Respiratório ADP/Repouso (B).** Valores estão expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), n=10 por grupo. *Grupo Ovariectomia (OVX)*:Ovariectomia Sedentário (OVX-SED) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVX-TR). *Grupo Intacto (Sham)*:Sham Sedentário (Sham-SED) e Sham Treinamento Resistido (Sham-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de *Tukey*,  $p < 0,05$ . \*diferença significativa para o grupo OVX-SED.

Em relação ao consumo de oxigênio estimulado pela adição de ADP (Figura 19A), é possível observar que a ovariectomia também proporcionou diminuição significativa no consumo de oxigênio do músculo Vasto Lateral do grupo OVX-SED ( $p < 0,05$ ) em relação a todos os outros grupos. Esse resultado é confirmado pela diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) que ocorreu no Controle Respiratório do grupo OVX-SED em relação aos outros grupos (Figura 19B: razão ADP/repouso), demonstrando o efeito deletério da ovariectomia sobre a função mitocondrial do músculo Vasto Lateral.



**FIGURA 20 – Respirometria de Alta Resolução: Consumo de Oxigênio realizado em Biópsia do músculo Vasto Lateral estimulado por FCCPP (A) e Controle Respiratório FCCP/Repouso (B).** Valores estão expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM),  $n=10$  por grupo. **Grupo Ovariectomia (OVX):** Ovariectomia Sedentário (OVX-SED) e Ovariectomia Treinamento Resistido (OVX-TR). **Grupo Intacto (Sham):** Sham Sedentário (Sham-SED) e Sham Treinamento Resistido (Sham-TR). ANOVA One-Way e post-hoc Teste de Tukey,  $p < 0,05$ . \*diferença significativa para o grupo OVX-SED; #diferença significativa para o grupo Sham-SED.

No consumo de oxigênio estimulado pela adição de FCCP na biópsia do músculo Vasto Lateral ( $V_{max}$ ) (Figura 20A e B), novamente a ovariectomia produziu efeito deletério, pois o grupo OVX-SED apresentou consumo menor que todos os outros grupos, bem como controle respiratório menor ( $p < 0,05$ ). Também para o músculo Vasto Lateral, o treinamento resistido proposto foi eficiente em reverter os efeitos da ovariectomia tanto para a  $V_{max}$  como para o controle respiratório.

## 7. DISCUSSÃO

---

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

É bem documentado na literatura que a diminuição na produção dos hormônios ovarianos está diretamente relacionada ao aumento da massa corporal (ORSATTI *et al.*, 2010) e à desregulação da temperatura corporal em mulheres menopáusicas (DEECHER & DORRIES, 2007). O aumento na massa corporal também é encontrado em trabalhos translacionais que mimetizam experimentalmente a depleção dos hormônios ovarianos (ovariectomia), tanto em ratos (SHIGUEMOTO *et al.*, 2012; BEN *et al.*, 2009) como em camundongos (DING *et al.*, 2013). Convém ressaltar que a ovariectomia é o modelo translacional de depleção dos hormônios ovarianos cirurgicamente induzido mais aceito e utilizado para mimetizar as alterações que ocorrem no período pós-menopáusicas (BRINTON, 2012; SAVONENKO & MARKOWSKA, 2003).

O aumento da massa corporal encontrado nesse trabalho nas ratas ovariectomizadas foi reportado anteriormente como mecanismo protetor para prevenir a osteopenia promovida pela ovariectomia, estando relacionado com a sobrecarga mecânica imposta pela massa corporal (ZHAO *et al.*, 2008). Porém, trabalhos de nosso grupo de pesquisa demonstram que o aumento da massa corporal está diretamente relacionado à hiperfagia e ao consequente acúmulo de gordura provocada pela ovariectomia, e não apresentam o efeito protetor sobre a perda da massa óssea (SHIGUEMOTO *et al.*, 2012).

No grupo OVX, o TR foi efetivo em reduzir o aumento da massa corporal proporcionado pela ovariectomia. Não existe consenso na literatura sobre o efeito do TR e/ou exercício físico em promover a redução da massa corporal de ratas ovariectomizadas, pois trabalho realizado com o mesmo protocolo de treinamento em ratas OVX, demonstrou que esse tipo de treinamento foi capaz de reduzir parcialmente a gordura hepática, os depósitos de gordura (mesentérica e retroperitoneal), e a gordura dos músculos sóleo e tibial anterior (LEITE *et al.*, 2009). Em estudos anteriores realizados em ratas OVX com treinamento de saltos em tubos de água e saltos com estímulo elétrico, o aumento da massa corporal não foi evitado pelo treinamento (SHIGUEMOTO *et al.*, 2007; NOTOMI *et al.*, 2003). Estudo de Ben *et al.* (2009)

submeteu as ratas ovariectomizadas à protocolo de treinamento aeróbio moderado em esteira (60%  $VO_{2max}$ ) de duração de 4 semanas, encontrando redução significativa da massa corporal em relação ao seu grupo controle sedentário e massa próxima ao grupo Sham sedentário. Essa diminuição na massa corporal das ratas OVX proporcionada pelo treinamento aeróbio moderado, também encontrada em estudo de Saengsirisuwan *et al.*, (2009), parece estar relacionada com o aumento no gasto energético proporcionado pelo exercício, o qual pode prevenir o acúmulo de gordura corporal e/ou aumentar a mobilização de gordura como substrato energético.

O termo sarcopenia refere-se à perda da massa muscular associada ao envelhecimento normal e à menopausa em mulheres (MESSIER *et al.*, 2011). A hipótese mais plausível levantada pela literatura relaciona a diminuição dos níveis de estrogênio que ocorre no período de transição da menopausa como principal causa da diminuição da massa muscular (THOMAS, 2007). A diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da massa muscular do Vasto Lateral (VL) e do Reto Femoral (RF) encontrada em nosso estudo nas ratas ovariectomizadas sedentárias também pode ser um indicativo de que essa perda da massa muscular ocorre em modelos animais (translacionais), embora não se encontre ainda na literatura estudos que avaliaram esses músculos. Contrastando com nossos resultados, trabalhos que avaliaram a massa do músculo *soleus* encontraram manutenção da massa muscular no grupo ovariectomizado sedentário, tanto em ratos (MCCORMICK *et al.*, 2004) como em camundongos (MORAN *et al.*, 2007).

Outro dado importante nesse aspecto da massa muscular do VL e RF está relacionado ao aumento proporcionado pelo Treinamento Resistido proposto em nosso estudo nos grupos treinados (Sham-TR e OVX-TR), mas destaca-se o aumento proporcionado no grupo OVX-TR, fato que demonstra a eficiência do protocolo proposto em reverter o quadro de uma possível sarcopenia relacionada à ovariectomia. Cabe salientar que a evolução da carga máxima de carregamento foi equivalente em ambos grupos treinados (OVX e Sham).

A massa do córtex pré-frontal cerebral apresentou-se de forma equivalente em todos os grupos experimentais desse estudo, dado que demonstra que a ovariectomia não afetou a estrutura macroscópica dessa região cerebral. Mas, o resultado da análise da massa cerebelar demonstrou diminuição significativa no grupo OVX-SED, indicando interferência negativa nessa estrutura cerebral proporcionada pela ovariectomia. Cabe ressaltar que o grupo OVX-TR apresentou massa cerebelar significativamente maior que o grupo OVX-SED e semelhante aos grupos Sham (SED e TR), demonstrando

eficiência do TR proposto em manter a estrutura macroscópica em condições morfológicas grosseiras idênticas aos grupos Sham.

Como preâmbulo desse tópico da discussão, convém ressaltar que esse é o primeiro estudo que realizou a análise da função mitocondrial por meio da análise do consumo de oxigênio da cadeia respiratória pela técnica de respirometria de alta resolução em biópsia tecidual, tanto para o córtex pré-frontal como para o músculo Vasto Lateral (VL).

## **7.2. Análise da Função Mitocondrial por meio do Consumo de Oxigênio da Cadeia Transportadora de Elétrons do Córtex Pré-Frontal de do Músculo Vasto Lateral – Respirometria de Alta Resolução**

### **7.2.1. Córtex Pré-Frontal**

Um largo corpo de evidências científicas indica que a disfunção no metabolismo energético mitocondrial desempenha um crítico papel nos mecanismos fisiopatológicos das doenças neurodegenerativas (ATAMNA & FREY 2007; SOANE *et al.*, 2007). Alguns estudos demonstram que a disfunção mitocondrial pode ser a principal determinante nas alterações funcionais neuronais de mulheres pós-menopáusicas (XU *et al.*, 2008), enquanto outros sugerem que o estrogênio, por meio de seus receptores, pode proteger a função e estrutura mitocondrial (CHEN *et al.*, 2009). Nesse contexto, tem sido demonstrado que a ovariectomia altera a morfologia mitocondrial e pode possivelmente prejudicar a função mitocondrial (XU *et al.*, 2008).

A primeira análise da função mitocondrial do córtex pré-frontal deve ser direcionada para o Estado de Repouso (E2). Na ausência de ADP, a respiração de repouso (E2) (CHANCE & WILLIAMS, 1955) é consequência do retorno de prótons via canais voltagem-dependentes (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). Nesse estado respiratório, observou-se velocidade de consumo semelhante entre todos os grupos analisados, demonstrando que tanto a ovariectomia como o TR não provocam alterações na função respiratória mitocondrial do córtex pré-frontal. A adição de uma pequena, mas saturada concentração ADP (1mM) induz a respiração ativa (estado 3 – E3), estado no qual a respiração é ativada pelo fluxo reverso de prótons para a matriz mitocondrial através da ATP sintase (complexo V) e a concomitante queda parcial do gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial interna. Após a exaustão do ADP, que é

fosforilado à ATP, a respiração mitocondrial retorna a um nível de repouso, se a atividade da *ATPase* reciclar ATP para ADP (HÜTTER *et al.*, 2006). Na respiração ativa (E3) ocorreu redução significativa na velocidade de respiração do grupo OVX-SED (Fig. 16A), podendo indicar que a ovariectomia associada ao sedentarismo possivelmente apresenta interferência negativa na atividade da ATP sintase (complexo V) e no gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial interna, prejudicando portanto, o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons e a função mitocondrial (GNAIGER, 2012), problema que foi revertido pelo treinamento resistido, como pode ser observado no resultado do grupo OVX-TR (Fig. 16A).

A respiração ativa pode ser inibida pela adição da oligomicina (1µg/mL), um antibiótico que inibe substratos ligados ao dinitrofenol (DNP), inibindo, portanto, a atividade da ATP sintase, evento que leva a respiração mitocondrial a um nível mínimo (estado 4 = E4) (LARDY *et al.*, 1958). O fluxo de oxigênio medido neste estado de repouso reflete: (a) vazamento de prótons (respiração desacoplada no potencial de repouso de membrana máximo – principal componente), (b) deslizamento de prótons ou elétrons (respiração dissociada – “*dicoupled respiration*” – que inclui desvio de elétrons para vias de produção de EROs), (c) atividade de oxidases mitocondriais e não-mitocondriais (como a citocromo c oxidase, que consome oxigênio e parcialmente contribui para a formação de EROs) (HÜTTER *et al.*, 2006). Neste estado (E4), também não houve diferença na inibição entre todos os grupos experimentais.

A velocidade máxima de consumo ( $V_{max}$  – estado desacoplado) é obtida pela adição de FCCP [carbonil cianeto-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona], com o objetivo de se reproduzir experimentalmente um estado respiratório máximo de referência com a redução do potencial de membrana mitocondrial, para avaliar a capacidade respiratória através da cadeia transportadora de elétrons (GNAIGER, 2012). O FCCP [carbonil cianeto-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona] é um ionóforo transportador de íons móveis que como agente desacoplador na cadeia respiratória mitocondrial, pois interrompe a síntese de ATP ao transportar prótons de hidrogênio através da membrana mitocondrial interna antes de serem utilizados para fornecer a energia para a fosforilação oxidativa (HEYTLER, 1962). Na  $V_{max}$ , é possível observar redução significativa no grupo OVX-SED (Fig. 15A), indicando interferência negativa da falta do estrogênio também nessa condição experimental, novamente revertida pelo TR no grupo OVX-TR. Outro dado importante foi o aumento significativo obtido pelo grupo Sham-TR em relação à todos os outros grupos experimentais, indicando que o TR realizado em condições normais

pode promover alteração positiva e preventiva na função respiratória mitocondrial, gerando, dessa forma, um “background” benéfico para a função e saúde mitocondrial.

Um dos objetivos mais importantes em ensaios respirométricos é a avaliação do estado de acoplamento e desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, medida fornecida pela razão de controle respiratório (RCR). Se a fosforilação oxidativa (não relacionada com desacoplamento), e conseqüentemente a RCR estiverem baixas e/ou diminuídas, é indicativo de que a fosforilação oxidativa do sistema está prejudicando diretamente a capacidade respiratória mitocondrial (GNAIGER, 2012). Os resultados apresentados nas Figuras 16B e 17B demonstraram que a ovariectomia reduziu significativamente a RCR do córtex pré-frontal do grupo OVX-SED, tanto com o estímulo do ADP (Fig. 16B) como com o FCCP (Fig. 17B) ( $p < 0,05$ ). Essa diminuição no controle respiratório ocorrida no córtex das ratas ovariectomizadas sedentárias (OVX-SED) indica alteração negativa da função mitocondrial, que pode modular e/ou alterar outras vias de atuação da mitocôndria, como sinalização das espécies reativas de oxigênio (EROs) e apoptose celular. Novamente aparece o papel importante do TR, mantendo o RCR em condições normais tanto para o estímulo com ADP quanto para o FCCP no grupo OVX-TR, bem alterando positivamente o RCR no estímulo com FCCP para o grupo Sham-TR. Em suma, o TR proposto nesse estudo serve como ferramenta terapêutica para evitar a disfunção mitocondrial do córtex pré-frontal de ratas ovariectomizadas, bem como melhorar a função mitocondrial em condições normais (ratas Sham). Contrastando com nossos resultados em relação ao exercício, trabalho de Sibert *et al.*, (2014) submeteram camundongos ovariectomizados à treinamento aeróbio moderado em esteira para roedores, que não foi capaz de prevenir a diminuição na atividade da COX (citocromo c oxidase). A COX é uma enzima regulatória chave da atividade da cadeia respiratória mitocondrial e importante marcador indireto da função mitocondrial (HUTTEMANN *et al.*, 2012).

### **7.2.2. Músculo Vasto Lateral**

Trofismo muscular e homeostase mitocondrial são governadas por complexas interações entre processos intra e extra musculares. Discernir a exata contribuição de cada fator na patogênese da sarcopenia é um alvo crucial que precisa ser determinado pelos pesquisadores (SHORT *et al.*, 2004). Uma das maiores conseqüências da disfunção mitocondrial relacionada à menopausa e envelhecimento é o declínio na

bioenergética mitocondrial, que pode levar à sarcopenia e dinapenia (MARZETTI *et al.*, 2013). Portanto, avaliar o consumo de oxigênio da cadeia respiratória mitocondrial é uma das formas diretas de avaliação de fatores intrínsecos mitocondriais que estabeleçam a interação entre estrutura e função muscular e função mitocondrial.

No E2 (Fig. 18A) observou-se diminuição significativa no consumo de oxigênio de repouso do músculo Vasto Lateral (VL) em ambos grupos treinados (OVX-TR e Sham-TR) comparado aos grupos sedentários, fato que demonstra a eficiência do TR proposto em otimizar a utilização do oxigênio para produção do ATP em condições de estímulo (ADP e FCCP). Essa otimização na utilização no ATP não ocorreu no E4 (Fig. 18B), pois a inibição promovida pela oligomicina foi idêntica para todos os grupos experimentais.

Tanto para o E3 (estímulo por adição de ADP) quanto para a  $V_{max}$  (estímulo por FCCP), a ovariectomia reduziu significativamente o consumo de oxigênio do VL no grupo sedentário (OVX-SED) comparado aos outros grupos experimentais, indicando efeito deletério da ovariectomia para a função respiratória mitocondrial do músculo analisado nesses parâmetros respiratórios (Fig. 19A e 20A). Também para o músculo esquelético, o TR proposto foi eficaz em impedir e/ou prevenir a disfunção mitocondrial proporcionada pela ovariectomia, pois o grupo OVX-TR apresentou consumo de oxigênio próximo ao consumo do grupo Sham-TR. Acompanhando os resultados do consumo de oxigênio, a RCR do grupo OVX-SED também ficou significativamente abaixo da RCR dos outros grupos experimentais, indicando que também para esse importante parâmetro da função respiratória mitocondrial, a ovariectomia produziu efeitos negativos.

Corroborando aos nossos resultados, o único trabalho encontrado na literatura até o presente momento (CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2014) utilizando a mesma metodologia de avaliação da função mitocondrial (Respirometria de Alta Resolução), demonstrou diminuição no consumo de oxigênio de músculos de ratas ovariectomizadas sedentárias. Convém ressaltar que os músculos avaliados foram diferentes (*soleus* e *gastrocnemius* porção branca), assim como os substratos do protocolo de titulação (piruvato, malato e succinato).

O impacto do declínio da bioenergética mitocondrial e consequente disfunção mitocondrial é confirmado pela correlação existente entre produção de ATP e consumo de oxigênio diminuída em idosos e mulheres pós-menopáusicas, que passam a ter preferência pela velocidade de caminhada (COEN *et al.*, 2013). Um outro aspecto que

estabelece a ligação entre disfunção mitocondrial, sarcopenia e dinapenia é o possível impacto dos baixos estoques de ATP na síntese protéica, que é refletida pela concomitante diminuição da bioenergética mitocondrial e o anabolismo protéico muscular durante o envelhecimento e menopausa (SHORT *et al.*, 2004).

Provavelmente a mais relevante consequência da disfunção mitocondrial é a ativação da apoptose, mecanismo creditado diretamente à mitocôndria e que representa a via final comum da sarcopenia e fragilidade do sistema muscular (MARZETTI & LEEUWENBURGH, 2006). Essa assertiva é suportada pela observação de que a sinalização apoptótica mitocondrial correlaciona-se com diminuição na velocidade de caminhada (dinapenia) e volume muscular reduzido (sarcopenia) em pessoas idosas e mulheres no período pós-menopáusico tardio (MARZETTI *et al.*, 2012).

Essa disfunção mitocondrial encontrada em nível central (córtex pré-frontal) e periférico (VL) pode, em um futuro muito próximo, e alicerçado por análises complementares robustas, ser um início nesta longa caminhada biomolecular para estabelecer uma relação fidedigna e concreta na relação sarcopenia/dinapenia.

## 8. CONCLUSÃO

---

Os resultados encontrados em nosso trabalho permitem-nos concluir que a ovariectomia afeta decisivamente a função mitocondrial do córtex pré-frontal e do músculo Vasto Lateral (VL) de ratas avaliada de forma direta e precisa pelo consumo de oxigênio em biópsia tecidual.

A princípio, parece-nos que o Treinamento Resistido proposto é uma ferramenta terapêutica interessante e eficaz na prevenção dos distúrbios que afetam a cadeia respiratória mitocondrial, e conseqüentemente, a função mitocondrial de ratas ovariectomizadas.

Espera-se, portanto, que nosso estudo apresente caráter translacional, e que alguns conhecimentos gerados possam ser transportados em um futuro próximo para estudos com seres humanos, apresentando como foco a disfunção mitocondrial na fisiopatologia de doenças cada vez mais presentes no período pós-menopáusicas.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ANDREOLLO, N. A. Idade dos ratos versus idade humana: Qual é a relação? *ABCD Arq Bras Cir Dig.* v.25, n.1, p.49-51, 2012.

ATAMNA, H. & FREY, W. H. Mechanismos of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease. *Mitochondrion*, v.7, p.297-310, 2007.

BARBIERI, E.; SESTILL, P.; VALLORANI, L.; GUESCINI, M.; CALCABRINI, C.; GLOACCHINI, A. M.; ANNIBALINI, G.; LUCERTINI, F.; PICCOLL, G.; STOCCHI, V. Mitohormesis in muscle cells: a morphological, molecular, and proteomic approach. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, v.3, n.4, p.254-266, 2013.

BEN, J.; SOARES, F. M. S.; CECHETTI, F.; VUADEN, F. C.; BONAN, C. D.; NETTO, C. A.; WYSE, A. T. S. Exercise effects on activities of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats. *Brain Research*, v.1302, p.248-255, 2009.

BO, H.; JIANG, N.; JI, L.L.; ZHANG, Y. Mitochondrial redox metabolism in aging: Effect of exercise interventions Yong. *Journal of Sport and Health Science*, v.2, p.67-74, 2013.

BORD, S.; HORNER, A.; BEAVAN, S.; COMPSTON, J. Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  are Differentially Expressed in Developing Human Bone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; v.86, n.5, 2001.

BRINTON, R. D. Minireview: Translational Animal Models of Human Menopause: Challenges and Emerging Opportunities. *Endocrinology*, v.153, n.8, p.3571-3578, 2012.

BRINTON, R. D. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. *Trends in Neurosciences*, v.31, p.529-537, 2008.

BROSKEY, N. T.; GREGGIO, C.; BOSS, A.; BOUTANT, M.; DWYER, A.; SCHLUETER, L.; HANS, D.; GREMION, G.; KREIS, R.; BOESCH, C.; CANTO, C.; AMATI, F. Skeletal muscle mitochondria in the elderly: effects of physical fitness and exercise training. *J Clin Endocrinol Metab*, v.3983, p.1-11, 2013.

CAROCHO, M. & FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, pro-oxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future. *Food and Chemical Toxicology*, v.51, p.15-25, 2013.

CARVALHO, H. F. & RECCO-PIMENTEL, C. M. *A Célula*. São Paulo: Manole, 3ª edição, 2013.

CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE, J. P. A.; SALVADOR, I. C.; MARTINS, E. L.; D. JARDIM-MESSEDER, D.; JWERNICK-DE-CASTRO, J. P. S.; GALINA, A.; CARVALHO, D. P. Role of estrogen on skeletal muscle mitochondrial function in ovariectomized rats: a time course study in different fiber types. *J App Physiol*, v.116, n.7, p.779-789, 2014.

CHANCE B. & WILLIAMS G. R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem.*, v.217, n.1, p.383-393, 1955.

CHEN, J. Q.; CAMMARATA, P. R.; BAINES, C. P.; YAGER, J. D. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *BBA*, v.1793, p.1540–1570, 2009.

CLARK, B. C.; MANINI, T. M., BOLANOWSKI, S. J., PLOUTZ-SNYDER, L. L. Adaptations in human neuromuscular function following prolonged unweighting: II. Neurological properties and motor imagery efficacy. *J Appl Physiol*, v.101, p.264–272, 2006.

CLARK, B. C. & MANINI, T. M. Sarcopenia  $\neq$  Dynapenia. *J Gerontol A BiolSci Med Sci.*, v.63, p.829–834, 2008.

CLARK, B. C. & TAYLOR, J. L. Age-Related Changes in Motor Cortical Properties and Voluntary Activation of Skeletal Muscle. *Curr Aging Sci.*, v.4, n.3, p.192-199, 2011.

CLARK, B. C. & MANINI, T. M. Functional consequences of sarcopenia and dynapenia in the elderly. *Curr Opin Nutr Metab Care*, v.13, n.3, p.271-276, 2011.

CRUZ-JENTOFT, A. J.; LANDI, F.; TOPINKOVÁ, E.; MICHEL, J. P. Understanding sarcopenia as a geriatric syndrome. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v.13, p.1-7, 2010A.

CRUZ-JENTOFT, A. J.; BAEYNS, J. P.; BAUER, J. M.; BOIRIE, Y.; CEDERHOLM, T.; LANDI, F.; MARTIN, F. C.; MICHEL, J. P.; ROLLAND, Y.; SCHNEIDER, S. M.; TOPINKOVÁ, E.; ZAMBONI, V. M.; Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing*, v.39, p.412-423, 2010B.

DAI, D.; RABINOVITCH, P. S.; UNGVARI, Z. Mitochondria and Cardiovascular Aging. *Circ Res*, v.110, p.1109-1124, 2012.

DEECHER, D. C. & DORRIES, K. Understanding the pathophysiology of vasomotor symptoms (hot flashes and night sweats) that occur in perimenopause, menopause, and postmenopause life stages. *Archives of women's mental health*, v.10, p.247-257, 2007.

DELBONO, O. Regulation of excitation contraction coupling by insulin-like growth factor-1 in aging skeletal muscle. *J Nutr Health Aging*, v.4, p.162–164, 2000.

DELBONO, O. Expression and regulation of excitation-contraction coupling proteins in aging skeletal muscle. *Curr Aging Sci.*, v.4, n.3, p.248-259, 2011.

DELMONICO, M. J.; HARRIS, T. B.; VISSER, M.; PARK, S. W.; CONROY, M. B.; VELASQUEZ-MIEYER, P.; BOUDREAU, R.; MANINI, T. M.; NEVITT, M.; NEWMAN, A. B.; GOODPASTER, B. H. Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *Am J Clin Nutr.*, v.90, p.1579-1585, 2009.

DING, F.; YAO, J.; ZHAO, L.; MAO, Z.; CHEN, S.; BRINTON, R. B. Ovariectomy Induces a Shift in Fuel Availability and Metabolism in the Hippocampus of the Female Transgenic Model of Familial Alzheimer's. *PLoS ONE*, v.8, n.3, p.e59825, 2013.

FRIED, T. R.; BRADLEY, E. H.; WILLIAMS, C. S.; TINETTI, M. E. Functional disability and health care expenditures for older persons. *Arch Intern Med*, v.161, n.21, p.2602-2607, 2001.

GLOVER, E. I. & PHILLIPS, S. M. Resistance exercise and appropriate nutrition to counteract muscle wasting and promote muscle hypertrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v.13, n.6, p.630-634, 2010.

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

GOLD, E. B.; BROMBERGER, J.; CRAWFORD, S.; SAMUELS, S.; GREENDALE, G. A.; HARLOW, S. D.; SKURNICK, J. Factors Associated with Age at Natural Menopause in a Multiethnic Sample of Midlife Women. *American Journal of Epidemiology*, v.153, n.9, 2001.

GOODPASTER, B. H.; CARLSON, C. L.; VISSER, M.; KELLEY, D. E.; SCHERZINGER, A.; HARRIS, T. B.; STAMM, E.; NEWMAN, A. B. Attenuation of skeletal muscle and strength in the elderly: The Health ABC Study. *J Appl Physiol*, v.90, n.6, p.2157-2165, 2001.

GREENLUND, L. J. & NAIR, K. S. Sarcopenia: consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mech Ageing Dev*, v.124, n.3, p.287-99, 2003.

HAWEL, J. A. Molecular responses to strength and endurance training: Are they incompatible? *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, v.34, p.355-361, 2009.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ed., Oxford University Press: New York, 936p, 1999.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *American Society of Plant Biologists*; v.141, p.312-322, 2006.

HARLOW, B. L.; SIGNORELLO, L. B. Factors associated with early menopause. *Maturitas*, v.35, p.3-9, 2000.

HARMAN, D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol*, v.11, n.3, p.298-300, 1956.

HEPPLE, R. T. Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v.6, p.211, 2014.

HEYTLER, P. G. "A new class of uncoupling agents – Carbonyl cyanide phenyl hydrazones". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.7, n.4, p.272–275, 1962.

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem*, v.242, p.2278-2282, 1967.

HORNBERGER JR, T. A. & FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol.*, v.29, p.16-31, 2004.

HUTTEMANN, M.; HELLING, S.; SANDERSON, T. H.; SINKLER, C.; SAMAVATI, L.; MAHAPATRA, G.; VARUGHESE, A.; LU, G.; LIU, J.; RAMZAN, R.; VOGT, S.; GROSSMAN, L. I.; DOAN, J. W.; MARCUS, K.; LEE, I. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *BBA*, v.1817, p.598-609, 2012.

HÜTTER, E.; UNTERLUGGAUER, H.; GAREDEW, A.; JANSEN-DÜRR, P.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry – a modern tool in aging research. *Exp. Gerontology*, v.41, n.1, p.103-109, 2006.

HVID, L.; AAGAARD, P.; JUSTESEN, L.; BAYER, M. L.; ANDERSEN, J. L.; ORTENBLAND, N.; KJAER, M.; SUETTA, C. Effects of aging on muscle mechanical function and muscle fiber morphology during short-term immobilization and subsequent retraining. *J Appl Physiol*, v.109, p.1628–1634, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em: 15/01/2016.

JAKOBI, J. M. & RICE, C. L. Voluntary muscle activation varies with age and muscle group. *J Appl Physiol.*, v.93, p.457-462, 2002.

JANSSEN, I. Evolution of sarcopenia research. *Appl Physiol Nutr Metab.*, v.35, p.707–712, 2010.

JIMENEZ-MORENO, R.; WANG, Z. M.; GERRING, R. C.; DELBONO, O. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release declines in muscle fibers from aging mice. *Biophys J.*, v.94, p.3178-3188, 2008.

KALU, D. N.; The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*, v.15, p.175-192, 1991.

KEMPEN, T. A. V.; MILNER, T. A.; WATERS, E. M. *Accelerated Ovarian Failure: a novel, chemically-induced animal model of menopause*. National Institutes of Health, v.138, n.3, 863-870, 2012.

KOSTEK, M. C. & DELMONICO, M. J. Age-related changes in adult muscle morphology. *Curr Aging Sci.*, v.4, n.3, p.221-233, 2011.

KRAEMER, W. J. & RATAMESS, N. *Fundamentals of Resistance Training: Progression and Exercise Prescription*. Physical Fitness and Performance, v.36, n.4 p.674-688, 2003.

KUIPER, G. G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Comparison of the lig and binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*,v.138, p.863–870, 1997.

LAMBETH, J.D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radical Biology & Medicine*,v.43, p.319-331, 2007.

LARDY, H. A.; JOHNSON, D.; MCMURRAY, W. C. Antibiotics as tools for metabolic studies. I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphoryl ative and glycolytic systems. *Arch Bioch Biop*, v.78, n.2, p.587-597, 1958.

LEITE, R. D.; PRESTES, J.; BERNARDES, C. F.; SHIGUEMOTO, G. E.; PEREIRA, G. B.; DUARTE, J. O.; DOMINGOS, M. M.; BALDISSERA, V.; PEREZ, S. E. A. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Appl Physiol Nutr Metab*, v.34, n.6, p.1079-86, 2009.

LIN, M. T. & BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress diseases. *Nature*,v.443, n.7113, p.787-95, 2006.

LOBO, R. A.; DAVIS, S. R.; DE VILLIERS, T. J.; GOMPEL, A.; HENDERSON, V. W.; HODIS, H. N.; LUMSDEN, M. A.; MACK, W. J.; SHAPIRO, S.; BABER, R. J. Prevention of diseases after menopause. *Climateric*,v.17, p.1-17, 2014.

LÜ, J.; LIN, P.H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell Mod. Med.*,v.14, p.840–860, 2010.

MALTAIS, M. L.; DESROCHES, J.; DIONNE, I. J. Changes in muscle mass and strength after menopause. *J Musculo skelet Neuronal Interact*, v.9, n.4, p.186–97, 2009.

MANINI, T. M. & CLARK, B. C. Dynapenia and Aging: An Update. *Journal of Gerontology*, v.66, n.3, p.1-9, 2011.

MARZETTI, E. & LEEUWENBURGH, C. Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Exp Gerontol*, v.41, p.1234-1238, 2006.

MARZETTI, E.; LEES, H. A.; MANINI, T. M.; BUFORD, T. W.; ARANDA, J. M.; CALVANI, R.; *et al.* Skeletal muscle apoptotic signaling predicts thigh muscle volume and gait speed in community-d welling older persons: an exploratory study. *PLoS ONE*, v.7, p.e32829, 2012.

MARZETTI, E.; CALVANI, R.; CESARI, M.; THOMAS W. BUFORD, T. W.; LORENZI, M.; BEHNKE, B. J.; LEEUWENBURGH, C. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: From signaling pathways to clinical trials. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.45, p.2288-2301, 2013.

MATTSON, M. P. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res.*, v.886, p.47-53, 2000.

MCCORMICK, K. M.; BURNS, K. L.; PICCONE, C. M.; GOSSELIN, L. E.; BRAZEAU, G. A. Effects of ovariectomy and estrogen on skeletal muscle function in grow in grats. *J Muscle Res Cell Mot*, v.25, p.21-27, 2004.

MERRY, T.L. & RISTOW, M. Mitohormesis in exercise training. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015.

MESSIER, V.; RABASA-LHORETA, R.; BARBAT-ARTIGAS, S.; ELISHA, B.; KARELIS, A. D.; AUBERTIN-LEHEUDRE, M. Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones. *Maturitas*, v.68, p.331-336, 2011.

MIKHED, Y.; DAIBER, A.; STEVEN, S. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.*, p.15918-15953, 2015.

MITCHELL, W. K.; WILLIAMS, J.; ATHERTON, P.; LARVIN, M.; LUND, J.; NARICI, M. Sarcopenia, dinapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review. *Frontiers in Physiology*, v.3, 2012.

MORAN, A. L.; NELSON, S. A.; LANDISCH, R. M.; WARREN, G. L.; LOWE, D. A. Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractil and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol*, v.102, p.1387-1393, 2007.

MORRISON, J. H., BRINTON, R. D., SCHIMIDT, P. J. GORE, A. C. Estrogen, menopause, and the aging brain: how basic neuroscience can inform hormone therapy in women. *The Journal of Neuroscience*, v.26, n.41, p.10332–10348, 2006.

MOSCONI, L.; DE LEON, M. MURRAY, J. E. L.; LU, J.; JAVIER, E.; MCHUGH, P.; SWERDLOW, R. H. Reduced mitochondria cytochrome oxidase activity in adult children of mothers with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v.27, p.483-490, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington, D. C.; National Academy Press, 1996, 140pp.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NICHOLLS, D. G. & FERGUSON, S. J. *Bioenergetics 2*. Academic Press, London, 1992.

NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY. *Promoting women's health at midlife and beyond*, 2016.

NOTOMI, T.; OKIMOTO, N.; OKAZAKI, Y.; NAKAMURA, T.; SUZUKI, M. Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. *J. Bone Miner. Research*, v.18, n.1, p.140-149, 2003.

ORSATTI, F. L.; NAHAS, E. A. P.; NAHAS-NETO, J.; MAESTA, N.; ORSATTI, C. L.; FERNANDES, C. E. Effects of resistance training and soy isoflavones on body composition in post menopausal women. *Obstet Gynecol Int*, v.2010, p.156037, 2010.

ÖSTERLUND, M. K.; HURD, Y. L. Estrogen receptors in the human brain and the relation to neuropsychiatric disorders. *Progress in Neurobiology*, p.251-267, 2001.

PAYNE, B.A.I. & CHINNERY, P.F. Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *BBA*, v.1847, p.1347-1353, 2015.

PESTA, D.; HOPPEL, F.; MACEK, C.; MESSNER, H.; FAULHABER, M.; KOBEL, C.; PARSON, W.; BURTSCHER, M.; SCHOCKE, M.; GNAIGER, E. Similar qualitative and quantitative changes of mitochondrial respiration following strength and endurance training in normoxia and hypoxia in sedentary humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.301, p.R1078-R1087, 2011.

PICARD, M.; CSUKLY, K.; ROBILLARD, M. E.; GODIN, R.; ASCAH, A.; BOURCIER-LUCAS, C. Resistance to Ca<sup>2+</sup>-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* v.295, p.R659-R668, 2008.

PORTAL BRASIL disponível em <http://www.brasil.gov.br/saude/2014/12/expectativa-de-vida-aumenta-em-todo-o-mundo>. Acesso em: 18/01/2016.

PRESTES, J.; DE CASSIA MARQUETI, R.; SHIGUEMOTO, G. E.; LEITE, R. D.; PEREIRA, G. B.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BALDISSERA, V.; DE ANDRADE PEREZ, S. E. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*, v.34, n.4, p.700-706, 2009.

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

REGAN, E. A. Do hormonal control systems produce evolutionary inertia? *Phil. Trans. R. Soc. B*, v.363, p.1599-1609, 2007.

RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Neuroendocrinol*, v.35, n.1, p.8-30. 2013.

ROGELL, B.; DEAN, R.; LEMOS, B.; DOWLING, D. K. Mito-nuclear interactions as drivers of gene movement on and off the X-chromosome. *BMC Genomics*, v.15, n.330, p.2-9, 2014.

ROSENBERG, I. H. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutrition*, v.127, p.990S–991S, 1997.

RUSS, D. W.; GRANDY, J. S., TOMA, K., WARD, C. W. Aging, but not yet senescent, rats exhibit reduced muscle quality and sarcoplasmic reticulum function. *Acta Physiol (Oxf)*, v.201, p.391–403, 2011.

SAENGSIRISUWAN, V.; PONGSEEDA, S.; PRASANNARONG, M.; VICHAIWONG, K.; TOSKULKAO, C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metab. Clin. Exp.*, v.58, p.38–47, 2009.

SAHLIN, K.; SHABALINA, I. G.; MATTSON, C. M.; BAKKMAN, L.; FERNSTRÖM, M.; ROZHDESTVENSKAYA, Z.; ENQVIST, J. K.; NEDERGAARD, J.; EKBLÖM, B.; TONKONOGLI, M. Ultra endurance exercise increases the production of reactive oxygen species in isolated mitochondria from human skeletal muscle. *American Physiological Society*, v.108, p.780–787, 2010.

SAVONENKO, A. V. & MARKOWSKA, A. L. The cognitive effects of ovariectomy and estrogen replacement are modulated by aging. *Neuroscience*, v.119, p.821–830, 2003.

SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondrial disease. *Lancet*; v.368, p.70–82. 2006.

SCHOENAKER, D. A. J. M.; JACKSON, C. A.; ROWLANDS, J., MISHRA, G. D. Socioeconomic position, lifestyle factors and age at natural menopause: a systematic review and meta-analyses of studies across six continents. *International Journal of Epidemiology*, p.1–21, 2014.

SEO, A. Y.; JOSEPH, A.; DUTTA, D.; HWANG, J. C. Y.; ARIS, J. P.; LEEUWENBURGH, C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Science*, v.123, p.2533–2542, 2010.

SHIGUEMOTO, G. E.; ROSSI, E. A.; BALDISSERA, V.; GOUVEIA, C. H.; FONT, G. M.; VARGAS, V.; PEREZ, S. E. A. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. *Maturitas*, v.57, p.261–270, 2007.

SHORT, K. R.; VITTONI, J. L.; BIGELOW, M. L.; PROCTOR, D. N.; NAIR, K. S. Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.286, p.E92–101, 2004.

SIEBERT, C. KOLLING, J.; SCHERER, E. B. S.; SCHMITZ, F.; DA CUNHA, M. J.; MACKEDANZ, V.; ANDRADE, R. B.; WANNMACHER, C. M. D.; WYSE, A. T. S. Effect of physical exercise on changes in activities of creatine kinase, cytochrome c oxidase and ATP levels caused by ovariectomy. *Metab Brain Dis*, v.29, p.825–835, 2014.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem*, v.215, p.213–219, 1993.

SILVA, L. A.; PINHO, C. A.; SCARABELOT, K. S.; FRAGA, D. B.; VOLPATO, A. M. J.; BOECK, C. R.; DE SOUZA, C. T.; STRECK, E. L.; PINHO, R. A. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.*, v.105, p.861-867, 2009.

SOANE, L.; KAHRAMAN, S.; KRISTIAN, T.; FISKUM, G. Mechanisms of impaired mitochondrial energy metabolism in acute and chronic neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res*, v.85, p.3407-3415, 2007.

SOBRAC - Sociedade Brasileira de Climatério, 2004.  
<http://www.sobrac.org.br/media/files/publicacoes/>

STOCKER, R.; KEANEY, J.F. Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*, v.84, n.4, p.1381-478, 2004.

TAAFFE, D. R.; HENWOOD, T. R.; NALLS, M. A.; WALKER, D. G.; LANG, T. F.; HARRIS, T. B. Alterations in muscle attenuation following detraining and retraining in resistance-trained older adults. *Gerontology*, v.55, n.2, p.217-223, 2009.

TATSUTA, T. & LANGER, T. Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. European Molecular Biology Organization, *The EMBO Journal*, v.27, p.306-314, 2008.

THOMAS, D. R. Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relation ship of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clin Nutr*, v.26, n.4, p.389-99, 2007.

THOMPSON, D. D.; SIMMONS, H. A.; PIRIE, C. M.; KE, H. Z. *FDA guidelines and animal models for osteoporosis*, v.17, n.4, p.125S-1335S, 1995.

TRACY, B. L. & ENOKA, R. M. Older adults are less steady during sub maximal isometric contractions with the knee extensor muscles. *J Appl Physiol*, v.92, p.1004-1012, 2002.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLA, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39, p.44-84, 2007.

VAN KEMPEN, T. A.; MILNER, T. A.; WATERS, E. M. Accelerated ovarian failure: a novel, chemically induced animal model of menopause, *Brain Res*, v.1379, p.176-187, 2011.

VERCESI, A. E.; KOWALTOWSKI, A. J.; GRIJALBA, M. T.; MEINICKE, A. R.; CASTILHO, R. F. The Role of Reactive Oxygen Species in Mitochondrial Permeability Transition. *Bioscience reports*, v17, n.1, 1997.

WALLACE, D. C. Mitochondrial DNA in Aging and Disease. *Scientific American*. v.277, p.40-47, 1997.

WALLACE, D. C. Mutations in Disease and Aging. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. v.51, p.440-450. 2010.

WALKER, M. L. & HERNDON, J. G. Menopause in Nonhuman Primates? *Biology of Reproduction*, v.79, p.398-406, 2008.

WANAGAT, J.; CAO, Z.; PATHARE, P.; AIKEN, J.M. Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J.*, v.15, p.322–332, 2001.

XU, X. W.; SHI, C.; HE, Z. Q.; MA, C. M.; CHEN, W. H.; SHEN, Y. P.; GUO, Q.; SHEN, C. J.; XU, J. Effects of phyto estrogen on mitochondrial structure and function of hippocampal CA1 region of ovariectomized rats. *Cell Mol Neurobiol*, v.28, p.875–886, 2008.

ZHAO, L. J.; JIANG, H.; PAPASIAN, C. J.; MAULIK, D.; DREES, B.; HAMILTON, J.; DENG, H. W. Correlation of obesity and osteoporosis: effects of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, v.23, n.1, p.17–29, 2008.