

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

REGIANE ALVES PINTO

**EFEITOS DA OVARECTOMIA E DO TREINAMENTO  
RESISTIDO SOBRE A FUNÇÃO E METABOLISMO  
ENERGÉTICO MITOCONDRIAL DOS  
CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO**

SÃO CARLOS - SP  
2025

REGIANE ALVES PINTO

**EFEITOS DA OVARECTOMIA E DO TREINAMENTO  
RESISTIDO SOBRE A FUNÇÃO E METABOLISMO  
ENERGÉTICO MITOCONDRIAL DOS  
CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO**

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

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto

SÃO CARLOS - SP

2025



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Regiane Alves Pinto, realizada em 01/09/2025.

### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Alice Fusco de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Uliana Sbeguen Stotzer (PM-Paulínia)

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

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação de mestrado ao meu pai Aparecido Luiz Alves Pinto e minha mãe Antônia Silei Rozendo Pinto, por sempre me mostrarem que o conhecimento é o caminho de grandes conquistas.

## AGRADECIMENTOS

“Você é mais forte do que pensa e será mais feliz do que imagina.”

*(Caminho da Fé)*

Agradeço primeiramente a Deus e à minha devoção à Nossa Senhora Aparecida, por me concederem caminhos de superação, por me sustentarem nas batalhas diárias e por fazerem da fé uma presença constante em todos os momentos da minha vida. Agradeço por segurarem minha mão nas horas em que me senti frágil, por acreditarem que as dificuldades me fariam crescer e, especialmente, por cada vez que caí, permitirem que eu me levantasse com confiança e coragem. Com o coração cheio de saudade e gratidão, agradeço à minha avó Conceição Pereira da Silva (*in memoriam*), por me ensinar o valor da devoção, da fé que alimenta a alma e que nos torna verdadeiros e felizes. Aos meus pais, Aparecido Luiz e Antônia Silei, minha eterna gratidão por todas as conversas, por me encorajarem nos momentos de dúvida e por sempre me lembrarem que “o mais difícil eu já havia superado”.

Aos meus irmãos, Luís Adriano, Aline e Josiane, obrigada por me ouvirem tantas vezes e por serem minha inspiração fundamental em toda a minha trajetória. Ao meu namorado Thiago Picon, que chegou quando eu mais precisava e com sua presença e palavras, fortaleceu-me a cada dia compartilhado. Ao Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto, minha sincera gratidão por confiar em meu potencial, por me conceder a oportunidade de desenvolver este projeto e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo da jornada. Estendo meus agradecimentos ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi e ao Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, por gentilmente abrirem as portas de seus laboratórios na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas e contribuírem decisivamente com as análises deste estudo. Ao meu colega de laboratório e amigo, Christopher Barsaque, muito obrigada pelo apoio, pela colaboração diária e pelo companheirismo científico e humano.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o período do mestrado, bem como ao PIPGCF (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – UFSCAR/UNESP), por me permitir contribuir com a ciência dentro de um ambiente de excelência acadêmica. Aos colegas dos laboratórios vizinhos, obrigada pela amizade e parceria. Por fim, registro meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, estiveram presentes nesta jornada de crescimento pessoal, profissional e acadêmico. Levo cada gesto, palavra e incentivo no coração.

## **EPIGRAFE**

***“Se houver 1% de chance, terei 99% de Fé. Nunca se dê por vencido sem antes ter lutado” (Caminho da Fé).***

## RESUMO

**Contextualização:** A menopausa caracteriza-se por um processo fisiológico marcado pelo fim da menstruação e ocorre entre a quarta e a quinta década de vida da mulher. A principal característica deste período é a queda abrupta nos níveis de  $17\beta$ -estradiol (E2), hormônio que tem efeito cardioprotetor. Os hormônios ovarianos estão associados a alterações bioquímicas e funcionais que incluem o comprometimento da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e da produção de ATP, o que favorece o comprometimento da função mitocondrial e o maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs). O treinamento resistido tem se consolidado como uma intervenção não farmacológica eficaz na atenuação dos efeitos deletérios da menopausa, promovendo melhorias na função mitocondrial, nos parâmetros hemodinâmicos e na plasticidade cardiovascular. **Objetivo:** Este estudo investigou os impactos da ovariectomia como modelo experimental sobre a bioenergética mitocondrial nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratas Wistar, como a eficácia do Treinamento Resistido (TR) como estratégia terapêutica para diminuir os efeitos acarretados pela diminuição dos hormônios ovarianos. **Metodologia:** Foram utilizadas 20 ratas Wistar 5 em cada grupo experimental: INT-SED (intacto sedentário), INT-RT (intacto treinado), OVX-SED (ovariectomizado sedentário) e OVX-RT (ovariectomizado treinado). As análises incluíram: expressão gênica por RT-qPCR dos complexos mitocondriais (C1, C2, C3, C4 e ATP sintase) e da Citrato Sintase (CS), Respiração mitocondrial de alta resolução (Oroboros®) e Carga Máxima de Carregamento. **Resultados:** A ovariectomia comprometeu significativamente a função mitocondrial dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo, bem como diminuiu significativamente o consumo de oxigênio nos estados respiratórios acoplados (S3 e S3Suc), além da diminuição da expressão dos complexos da CTE. Em contrapartida o treinamento resistido (TR) foi capaz de promover melhorias funcionais e moleculares com aumento significativo no consumo de  $O_2$  e na recuperação da expressão dos complexos mitocondriais.

**Palavras-chave:** ovariectomia, bioenergética mitocondrial, cardiomiócitos, ventrículo esquerdo, menopausa, treinamento resistido.

## ABSTRACT

**Background:** Menopause is characterized as a physiological process marked by the cessation of menstruation, typically occurring between the fourth and fifth decades of a woman's life. The main feature of this period is the abrupt decline in  $17\beta$ -estradiol (E2) levels, a hormone with cardioprotective effects. Ovarian hormones are associated with biochemical and functional changes, including impairment of the electron transport chain (CTE) and reduced ATP production, which contribute to mitochondrial dysfunction and increase the risk of developing cardiovascular diseases (DCVs). Resistance training has emerged as an effective non-pharmacological intervention for attenuating the deleterious effects of menopause, promoting improvements in mitochondrial function, hemodynamic parameters, and cardiovascular plasticity. **Objective:** This study investigated the impacts of ovariectomy, as an experimental model, on mitochondrial bioenergetics in left ventricular cardiomyocytes of Wistar rats, as well as the efficacy of Resistance Training (RT) as a therapeutic strategy to mitigate the effects caused by the reduction of ovarian hormones. **Methodology:** Twenty Wistar rats were used, divided into four experimental groups (five animals per group): INT-SED (intact sedentary), INT-RT (intact trained), OVX-SED (ovariectomized sedentary), and OVX-RT (ovariectomized trained). The analyses included: gene expression by RT-qPCR of mitochondrial complexes (C1, C2, C3, C4, and ATP synthase) and citrate synthase (CS); high-resolution mitochondrial respiration (Oroboros®); and maximum loading capacity. **Results:** Ovariectomy significantly impaired mitochondrial function in the left ventricular cardiomyocytes, as well as markedly reduced oxygen consumption in coupled respiratory states (S3 and S3Suc), in addition to decreasing the expression of CTE complexes. Conversely, resistance training (RT) was able to promote both functional and molecular improvements, with a significant increase in  $O_2$  consumption and recovery of mitochondrial complex expression.

**Keywords:** ovariectomy, mitochondrial bioenergetics, cardiomyocytes, left ventricle, menopause, resistance training.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Relação Temporal durante os diferentes períodos em torno da menopausa ....	23
Figura 2- Visão abrangente dos sintomas durante a perimenopausa .....	24
Figura 3- A teoria do “Endotélio Saudável” .....	28
Figura 4- Representação Esquemática da Arquitetura Mitocondrial .....	33
Figura 5- Mitocôndrias Cardíacas .....	35
Figura 6- Esquemática do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (Ciclo de Krebs) .....	40
Figura 7- Processo de Fosforilação Oxidativa (OXPHOS) .....	41
Figura 8- O vazamento de Prótons .....	44
Figura 9- Organização dos grupos experimentais .....	52
Figura 10- Equipamentos de utilização para o Treinamento Resistido .....	54
Figura 11- Planejamento Experimental .....	55
Figura 12- Titulação de Respirimetria de Alta Resolução .....	58
Figura 13- Estabilidade da expressão dos genes de referência no coração .....	62
Figura 14- Diluição seriada para análises de eficiência .....	63
Figura 15- Curva Padrão utilizada para determinação da eficiência dos primers .....	64
Figura 16- Curva de Melting para especificidade do produto amplificado .....	64
Figura 17- Análise Comparativa macroscópica do tecido uterino .....	69
Figura 18- Análise Expressão Gênica dos genes PSMC4 da CTE .....	71
Figura 19- Análise Expressão Gênica da ATPs, PiC e ANT1 .....	73
Figura 20- Análise Respiração Mitocondrial acoplada S3, S3 SUCC e RCR .....	75
Figura 21- Análise Respiração Mitocondrial desacoplada UCR, Vmax .....	77
Figura 22- Análise Respiração de vazamento mitocondrial S2, S4 e RCR .....	78
Figura 23- Análise Atividade Citrato Sintase .....	79

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Distribuição Semanal do Treinamento Resistido .....	55
Tabela 2- Matriz para a padronização da concentração de primers .....	63
Tabela 3- Evolução da Carga de Carregamento (CMC, CMA, CMR) .....	66
Tabela 4- Massa Corporal e Massa Uterina.....	68

## LISTA DE SIGLAS

- ADP** - Adenosina Difosfato
- AMPK** - Proteína Quinase Ativada por AMP
- ANT** - Adenina Nucleotídeo Translocase
- ANT1** - Isoforma cardíaca e muscular
- ANT2** - Isoforma sistêmica e induzível
- ANT3** - Isoforma sistêmica
- ANT4** - Isoforma testicular
- ATP** - Trifosfato de Adenosina
- BERKo** - Camundongos knockout para ER $\beta$
- Ca<sup>2+</sup>** - Cálcio (íon)
- CAMs** - Moléculas de Adesão Celular
- CJs** - Junções de Cristas
- CMS** - Células Musculares Lisas
- CO<sub>2</sub>** - Dióxido de Carbono
- CS** - Citrato Sintase
- CTE** - Cadeia Transportadora de Elétrons
- DC** - Débito Cardíaco
- DCVs** - Doenças Cardiovasculares
- DDVE** - Disfunção Diastólica do Ventrículo Esquerdo
- E1** - Estrona
- E2** - Estradiol
- E3** - Estriol
- EIM** - Espaço Intermembranar
- ER $\alpha$**  - Receptor de Estrogênio alfa
- ER $\beta$**  - Receptor de Estrogênio beta
- ERKo** - Camundongos knockout para ER $\alpha$
- EROs** - Espécies Reativas de Oxigênio
- ERs** - Receptores de Estrogênio
- FADH** - Flavina Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)
- FAO** - Oxidação de Ácidos Graxos (Fatty Acid Oxidation)

**FEVE** - Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo

**FSH** - Hormônio Folículo Estimulante

**GnRH** - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

**IC** - Insuficiência Cardíaca

**ICFEr** - Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Reduzida

**ICFEp** - Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Preservada

**IFM** - Mitocôndrias Interfibrilares

**Inh A** - Inibina A

**Inh B** - Inibina B

**LDL** - Lipoproteína de Baixa Densidade

**LH** - Hormônio Luteinizante

**mRNA** - RNA Mensageiro

**MLI** - Membrana Limite Interna

**MME** - Membrana Mitocondrial Externa

**MMI** - Membrana Mitocondrial Interna

**MMPs** - Metaloproteinases de Matriz

**MPA** - Acetato de Medroxiprogesterona

**mtDNA** - DNA Mitocondrial

**NADH** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)

**NDPH-transidrogenase** - Nicotinamida Nucleotídeo Transidrogenase

**O<sub>2</sub>** - Oxigênio Molecular

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**OXPHOS** - Fosforilação Oxidativa

**OVX** - Ovariectomia

**PCr** - Fosfocreatina

**PGC-1 $\alpha$**  - Coativador 1-alfa do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma

**PiC** - Transportador de Fosfato Mitocondrial (Mitochondrial Phosphate Carrier)

**PNM** - Mitocôndrias Perinucleares

**PMF** - Período Menstrual Final

**PPAR $\alpha$**  - Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma alfa

**PPAR $\beta/\delta$**  - Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma beta/delta

**PPAR $\gamma$**  - Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma gama

**ROS** - Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species)

**RXRs** - Receptores de Ácido 9-cis Retinóico

**SLC25A3** - Gene que codifica o PiC

**SNA** - Sistema Nervoso Autônomo

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SSM** - Mitocôndrias Subsarcolemais

**TH** - Terapia Hormonal

**THM** - Terapia Hormonal da Menopausa

**UCPs** - Proteínas Desacopladoras Mitocondriais (Uncoupling Proteins)

**UCP1** - Proteína desacopladora 1 (tecido adiposo marrom)

**UCP2** - Proteína desacopladora 2 (coração e outros tecidos)

**UCP3** - Proteína desacopladora 3 (músculo esquelético)

**VDACs** - Canais de Ânion Dependentes de Voltagem

**VE** - Ventrículo Esquerdo

**WHI** - Iniciativa de Saúde da Mulher (Women's Health Initiative)

$\Delta G$  - Energia Livre de Gibbs

$\Delta \Psi_m$  - Gradiente Eletroquímico de Potencial de Membrana

$\Delta pH$  - Gradiente de Ph

**CEUA**- Comitê de Ética de Uso de Animais

**UFSCAR**- Universidade Federal de São Carlos

**CEUA/UFSCAR**- Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade de São Carlos

**CONCEA**- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

**DBCA**- Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica

**DCF**- Departamento de Ciências Fisiológicas

**INT- SED**- Intactas Sedentárias

**INT-RT** Intactas Treinadas

**OVX**- Ovariectomia

**OVX-SED**- Ovariectomizada Sedentária

**OVX-RT** Ovariectomizada Treinada

**CMC**- Carga Máxima de Carregamento

**HRR**- Respirimetria de Alta Resolução

**BIOPS-** Buffer de preservação com composição específica para tecidos

**MiR05-** Meio respiratório mitocondrial número 5

**GLU-** Glutamato

**MAL-** Malato

**SUCC-** Succinato

**CYTC-** Citocromo C

**OLIGO-** Oligomicina

**ROX-** Consumo Residual de Oxigênio

**FCCP-** Carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona

**ETS-** Capacidade do Sistema de Transporte de Elétrons

**RT-qPCR-** Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

**NTC-** Controle Negativo da Reação

**DEPC-** Água tratada com Dietilpirocarbonato

**EDTA-** Ácido Etilenodiaminotetracético

**DNTP-** Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

**NCBI-** National Center for Biotechnology Information

**BLAST-** Basic Local Alignment Search Tool

**CPX1-** NADH-desidrogenase

**CPX2-** Succinato desidrogenase

**CPX3-** Ubiquinona: citocromo c oxidorreductase

**CPX4-** Citocromo c oxidase

**ATPS-** ATP-sintase

**CS-** Citrato Sintase

**REFSEQ-** Sequência de Referência de Gene

**TNB-** Ácido tionitrobenzóico

**DTNB-** 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)

**CoASH-** Coenzima A na forma livre (tiol)

**TRIS-HCl-** Tris (hidroximetil) aminometano com ácido clorídrico

**DP-** Desvio Padrão

**ANOVA-** Análise de Variância

**CMCR-** Carga Máxima de Carregamento Relativa

**CTE-** Cadeia Transportadora de Elétrons

**PSMC4-** Proteasome 26S Subunit, ATPase 4 – Gene de referência

**UA- Unidades Arbitrárias**

## LISTA DE SÍMBOLOS

**°C**- Graus Celsius unidade de temperatura

**μL**- Microlitro- unidade de volume ( $10^{-6}$  L)

**μM**- Micromolar- unidade de concentração molar

**g**- Grama- unidade de massa

**mg**- Miligrama- unidade de massa ( $10^{-3}$  g)

**mL**- Mililitro- unidade de volume ( $10^{-3}$  L)

**nm**- Nanômetro- unidade de comprimento ( $10^{-9}$  m)

**xg**- Força relativa centrífuga (multiplicador da gravidade)

**%**- Porcentagem- valor relativo por cem unidades

**p**- Valor de probabilidade estatística

**±**- Intervalo de variação (usado com média desvio padrão)

**$2^{-\Delta\Delta Cq}$** - Fórmula da análise relativa da expressão gênica por qPCR

**R<sup>2</sup>**- Coeficiente de determinação (ajuste da curva padrão)

**V<sub>máx</sub>**- Velocidade máxima de respiração mitocondrial não acoplada

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>22</b>
2.1 MENOPAUSA .....	22
2.1.1 Ciclo Menstrual e Hormônios .....	
2.1.2 RECEPTORES DO 17 $\beta$ -ESTRADIOL E ESTROGÊNIO NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL CARDÍACA.....	24
2.1.3 TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL (TRH) .....	25
2.1.4 MENOPAUSA E MODELO EXPERIMENTAL OVARIECTOMIA .....	28
2.1.5 DOENÇAS CARDIOVASCULARES (DCVs).....	29
2.2 MITOCÔNDRIAS.....	30
2.2.1 MITOCÔNDRIAS CARDÍACAS .....	33
2.2.2 A BIOENERGÉTICA DO METABOLISMO DOS CARDIOMIÓCITOS .....	35
2.2.3 PRODUÇÃO DE ENERGIA E SUBSTRATO MITOCONDRIAL.....	36
2.2.4 Via Glicolítica .....	37
2.2.5 Ciclo de Ácido Cítrico (Ciclo de Krebs).....	38
2.2.6 Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) .....	39
2.2.8 ADENINA-NUCLEOTÍDEO-TRANSLOCASE (ANT) .....	42
2.2.9 TRANSPORTADOR DE FOSFATO MITOCONDRIAL (PiC).....	44
2.3.0 CS- Citrato Sintase na Bioenergética Celular .....	44
2.3.1 Disfunção Mitocondrial, Menopausa e Doenças Cardiovasculares .....	45
2.3.2 DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	45
2.3.3 EXERCÍCIO FÍSICO .....	46
3 HIPÓTESES .....	48
4. OBJETIVOS .....	49
4.1 OBJETIVO GERAL .....	49
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
5 MATERIAIS E MÉTODOS .....	50

5.2 ESPÉCIES UTILIZADAS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO .....	50
5.3 INGESTÃO DE ALIMENTOS E MASSA CORPORAL .....	51
5.4 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	51
5.5. PROCEDIMENTO CIRÚRISCO: OVARECTOMIA .....	52
5.6 TREINAMENTO RESISTIDO (TR).....	52
5.6.1 Adaptação ao Protocolo de Treinamento Resistido .....	52
5.6.2 Determinação da Carga Máxima de Carregamento (CMC).....	53
5.6.3 Protocolo de Treinamento Resistido .....	54
5.7 RESUMO DO DESENHO EXPERIMENTAL .....	55
5.8 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DOS TECIDOS .....	55
5.9.1 Coleta e Preparação das Amostras .....	55
5.9.2 Permeabilização Mecânica e Química .....	56
5.9.3 ANÁLISE DA FUNÇÃO RESPIRATÓRIA.....	56
5.10 EXPRESSÃO GÊNICA.....	57
5.10.1 CUIDADOS GERAIS.....	57
5.10.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL.....	58
5.10.3 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL .....	59
5.10.4 INTEGRIDADE DO RNA TOTAL .....	59
5.10.5 TRANSCRIÇÃO REVERSA- DNA COMPLEMENTAR (CDNA).....	59
5.10.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – TEMPO REAL (QPCR).....	59
5.10.7 CONTROLE DE QUALIDADE, CONCENTRAÇÃO E EFICIÊNCIA DOS PRIMERS.....	60
5.11 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE .....	63
5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	64
6 RESULTADOS .....	64
6.1 EVOLUÇÃO DAS CARGAS DE CARREGAMENTO .....	64
6.2 EVOLUÇÃO PONDERAL DA MASSA CORPORAL E MASSA UTERINA .....	66
6.3 EXPRESSÃO GÊNICA.....	69

6.3.1 EXPRESSÃO DOS GENES PSMC4 RELACIONADO À CTE (CI A CIV) NOS CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	69
6.3.2 EXPRESSÃO DOS GENES PSMC4 RELACIONADO À OXPHOS (ATPS, PiC, ANT1) NOS CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	70
6.4 ANÁLISES RESPIROMÉTRICAS.....	72
6.4.1 EFICIÊNCIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL ACOPLADA EM BIÓPSIA DO CORAÇÃO .....	72
6.4.2 RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL DESACOPLADA EM BIÓPSIA DO CORAÇÃO (UCR, VMÁX).....	75
6.4.3 RESPIRAÇÃO DE VAZAMENTO MITOCONDRIAL EM BIÓPSIA DO CORAÇÃO (S2, S4 E RCR).....	76
6.5 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE .....	77
7.0 DISCUSSÃO .....	78
7.2 ANÁLISES RESPIROMÉTRICAS.....	80
7.2.1 EFICIÊNCIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL ACOPLADA EM BIÓPSIA DO CORAÇÃO (S3 CI, S3 CI + CII E RCR) .....	81
7.2.2 EFICIÊNCIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL DESACOPLADA EM BIÓPSIA DO CORAÇÃO (VMÁX-UCR).....	82
7.2.3 EFICIÊNCIA RESPIRATÓRIA DE VAZAMENTO MITOCONDRIAL EM BIÓPSIA DO CORAÇÃO (S2 E S4 E RCR) .....	83
7.3 EXPRESSÃO GÊNICA.....	84
7.3.1 EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADA À CTE (CI, CII, CIII, CIV).....	84
8.0 CONCLUSÃO .....	86
10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

## 1 INTRODUÇÃO

A menopausa representa uma fase natural na vida da mulher, caracterizada pela interrupção permanente da menstruação após 12 meses consecutivos sem ciclos menstruais. Esse evento marca o fim da capacidade reprodutiva e como resultado a queda nos níveis de estrogênios. Essa deficiência de estrogênios tem como consequência a perda da função reprodutiva (HARLOW *et al.*, 2012; REES *et al.*, 2020). Além da função reprodutiva os estrogênios, em especial o estradiol (E2), exerce papéis fundamentais para a saúde da mulher. Esse hormônio está envolvido na proteção cardiovascular, modulação do perfil lipídico, manutenção óssea e regulação da função cerebral, afetando aspectos como: temperamento, memória e cognição (BASSUK; MANSON, 2014). Em nível celular o estrogênio é reconhecido por desempenhar uma série de efeitos benéficos em uma variedade de células, influenciando processos como o metabolismo celular, proliferação, diferenciação, desenvolvimento e a homeostase (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013).

É relevante enfatizar que com o avanço da idade e a redução estrogênica, há um aumento expressivo da mortalidade por doenças cardiovasculares (DCVs) em mulheres, considerando um fator de risco significativo nesse período de vida (ROGER *et al.*, 2012; ROCCA *et al.*, 2013). Pesquisas recentes em biologia molecular indicam que as mitocôndrias são um ponto focal na sinalização de proteção cardíaca mediada pelos estrogênios, destacando várias vias de sinalização associadas ao E2 sendo convertida para essa organela (MURPHY, 2004; KLINGE, 2017). Entre esses mecanismos destaca-se a função mitocondrial que são frequentemente referidas como as “usinas de energia” das células, onde desempenham um papel essencial na produção de energia através de um processo bioquímico chamado fosforilação oxidativa (WISNOVSKY *et al.*, 2016). No coração a elevada demanda metabólica é sustentada por uma abundância de mitocôndria e pelo suprimento contínuo de oxigênio (BERGMANN, 2009).

Ao longo da transição para a menopausa, observam-se alterações cardiometabólicas relevantes, incluindo modificações na distribuição da composição corporal, desequilíbrios no perfil lipídico e variações nos biomarcadores associados à função endotelial (KOU DHARI, 2017). Há evidências que sustentam a sólida conexão entre o núcleo celular e a função mitocondrial, desempenhando um papel essencial no controle da expressão de genes fundamentais associados às doenças cardiovasculares (DCVs) (NORTH; SINCLAIR, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2017).

Algumas proteínas, incluindo o coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ), a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e genes associados à cadeia de transporte de elétrons (CTE), são modulados por hormônios sexuais, especialmente pela sinalização estrogênica (LYNCH *et al.*, 2020). Estudos com modelos animais mostram que o estradiol pode reduzir o estresse oxidativo e promover o aumento de proteínas mitocondriais em cérebros de ratas submetidas à ovariectomia (STIRONE *et al.*, 2005). Em estudos adicionais em contexto de dieta hiper lipídica, a ausência de estradiol foi associada a disfunção mitocondrial e redução da capacidade cardíaca (SIVASINPRASASN *et al.*, 2015).

As abordagens para a prescrição da Terapia Reposição Hormonal (TRH) durante a menopausa passaram por transformações significativas, influenciadas pela evolução na compreensão dos riscos e benefícios desse tratamento. Antes dos resultados do ensaio clínico da Iniciativa de Saúde da Mulher (WHI) em 2002, a TRH era geralmente considerada apropriada e segura tanto para aliviar os sintomas da menopausa quanto para prevenir doenças crônicas, incluindo DCV. O uso da TRH pode apresentar benefícios cardioprotetores para mulheres com idade inferior a 60 anos dentro de um período de 10 anos da menopausa, especialmente para aquelas com útero intacto. No entanto, é crucial destacar que seu uso não deve visar especificamente à redução do risco cardiovascular, a menos que existam contraindicações. Mulheres que passaram pela menopausa precoce são aconselhadas a aderir à TRH até atingirem a idade média da menopausa (LI *et al.*, 2021; THURSTON *et al.*, 2008; FAUBION *et al.*, 2015).

Diante dessas alterações o exercício físico regular ganha destaque por oferecer diversas vantagens para a saúde, incluindo a redução do risco de DCVs, síndrome metabólica, obesidade, câncer, osteoporose e depressão, condições que se tornam mais prevalentes durante a menopausa (PHYSICAL ACTIVITY GUIDELINES ADVISORY COMMITTEE REPORT, 2009). A prática regular de atividade física tem um impacto significativo na redução dos sintomas da menopausa, ajudando a manter a massa muscular esquelética (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006; GOLD, 2000). Um exemplo notável é a eficácia de um programa de treinamento aeróbico de intensidade moderada a vigorosa na preservação da massa magra (MASON *et al.*, 2013), além disso, a prática regular de treinamento resistido reduz tanto a frequência cardíaca quanto a intensidade das ondas de calor durante a menopausa (BERIN *et al.*, 2019). Destaca-se também que os efeitos do exercício incluem melhorias no equilíbrio do sistema nervoso autônomo (SNA), na regulação hormonal relacionada ao estresse e na resposta do corpo ao controle da temperatura (ATAPATTU *et al.*, 2015). A prática regular do exercício físico induz uma série

de adaptações fisiológicas que contribuem para preservar a integridade e a funcionalidade da musculatura esquelética ao longo do envelhecimento, incluindo a prevenção ou atenuação de disfunções mitocondriais (CARTEE *et al.*, 2016). O TR em particular, tem emergido como uma intervenção promissora para a saúde cardiovascular da mulher. O exercício físico é amplamente reconhecido como uma abordagem estratégica e não farmacológica eficaz para a prevenção e controle de doenças metabólicas (COLBERG *et al.*, 2010).

Na musculatura esquelética essas adaptações ocorrem em grande parte pelo aumento da expressão do coativador-1 $\alpha$  do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ) considerado um regulador chave da biogênese mitocondrial (WU *et al.*, 1999). A redução do PGC-1 $\alpha$  compromete a função mitocondrial, fenômeno já descrito em músculo esquelético de ratas ovariectomizadas (CAMPBELL & FEBBRAIO, 2001; CAMPBELL *et al.*, 2003; CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

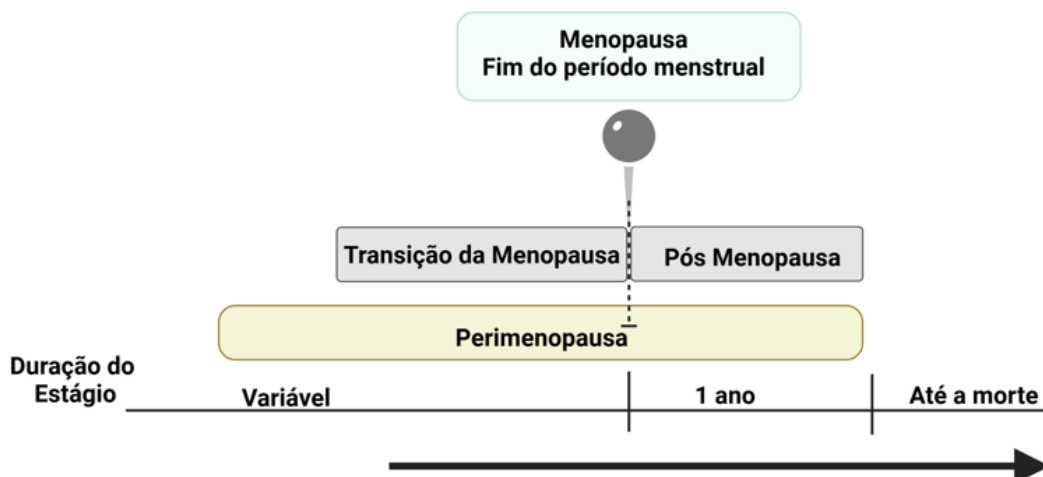
O presente estudo busca investigar o treinamento resistido como intervenção não farmacológica capaz de modular os efeitos deletérios dos hormônios ovarianos sobre a função mitocondrial cardíaca. Para isso serão analisados parâmetros da respiração mitocondrial e a expressão de genes envolvidos na Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE), como ATP-sintase, PiC e ANT1 em ratas submetidas a ovariectomia. Espera-se que os resultados contribuam para ampliar o entendimento sobre os mecanismos de adaptação mitocondrial induzidos pelo TR, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas voltadas à saúde cardiovascular da mulher no período pós menopausa.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 MENOPAUSA

A menopausa é um período significativo na vida da mulher, que sinaliza o fim da capacidade reprodutiva, para algumas se torna libertador devido a fortes desconfortos nos órgãos reprodutivo durante a menstruação e para algumas soa como a chegada do envelhecimento. Há estudos de revisões que destacam a dificuldade do entendimento deste período na vida das mulheres, entre nomenclaturas e definições sobre menopausa (AMBIKAIRAJAH; WALSH; CHERBUIN, 2022). Independente das circunstâncias causadas, a transição deste período é seguida por diversos sintomas influenciando a saúde e bem-estar de todas as mulheres, ela é definida pelo início dos ciclos menstruais irregulares e conhecida como climatério (SANTEN *et al.*, 2019). Esse período compreende a transição da fase reprodutiva e não reprodutiva na vida da mulher, marcando a passagem do período fértil para o não fértil. O termo “pré-menopausa” é utilizado para abranger todo o período reprodutivo até o Período Menstrual Final (PMF), que é o momento em que cessa definitivamente a menstruação. A perimenopausa corresponde ao intervalo imediatamente anterior ao PMF, quando surgem alterações endocrinológicas, biológicas e clínicas que sinalizam a proximidade da menopausa. Essa fase inclui também o primeiro ano após a menopausa (OMS, 1990).

**Figura 1.** Apresentação que ilustra a relação temporal durante os diferentes períodos em torno da menopausa: delimitado pelo Grupo Científico de Pesquisa em Menopausa da Organização Mundial da Saúde (OMS).

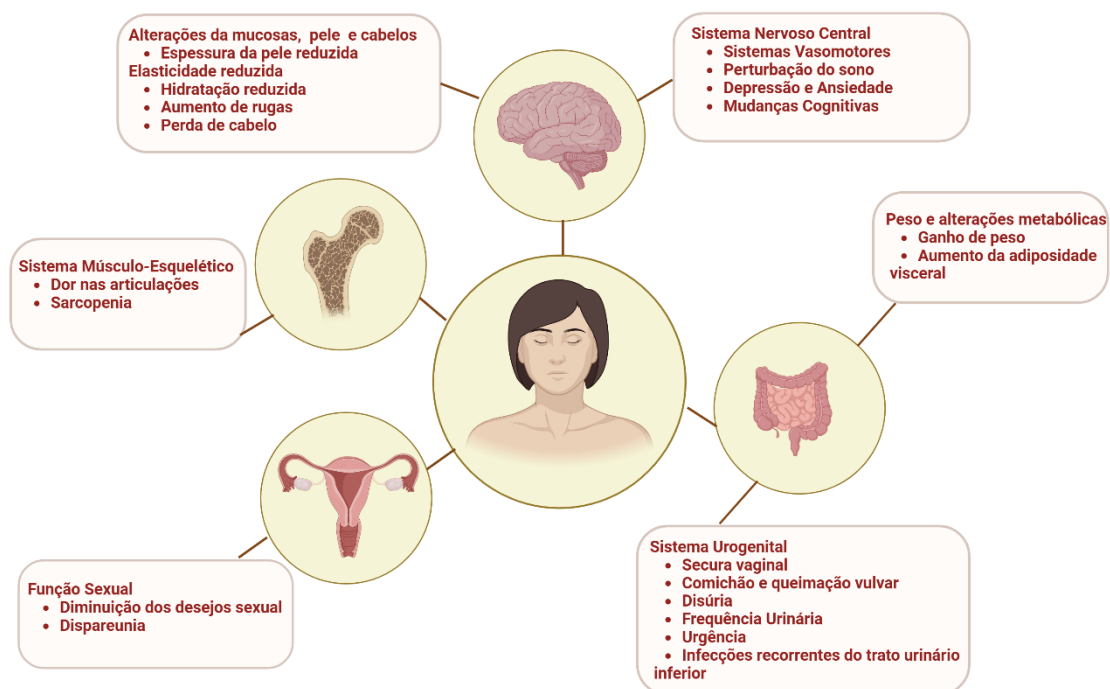


Fonte: Elaborado pelo autor (2024). Criado com BioRender.com.

Os sintomas predominantes são os “vasomotores”, caracterizados por episódios de calor intenso e sudorese noturna, afetando cerca de 65% das mulheres. Essas ondas aquecidas são

descritas como súbitas sensações de calor, geralmente sentidas no peito, pescoço e rosto, acompanhadas por transpiração, calafrios e ocasionalmente, palpitações e ansiedade. Normalmente, duram menos de 5 minutos, mas em alguns casos podem estender-se até 30 minutos, sendo desencadeadas por fatores como ambientes quentes, estresse ou consumo de alimentos e bebidas quentes (HEIDI, 2008). Além dos sintomas vasomotores essas alterações endócrinas são frequentemente associadas a condições sérias durante a menopausa, como distúrbios do sono, do humor, e geniturinários (TAKAHASHI; JOHNSON, 2015). Os sinais da menopausa envolvem uma gama de alterações (Figura 2) que impactam o sistema nervoso central (SNC), o corpo, a saúde cardíaca, a estrutura muscular e óssea, além de afetar área como a genitália e a pele, resultando também na disfunção sexual. Durante a perimenopausa, fase que antecede a menopausa, observa-se uma intensificação dos sintomas devido a mudanças neuroquímicas no sistema nervoso central, resultando em sintomas vasomotores intensos, perturbações do sono e depressão, que podem influenciar a função cognitiva. Com o passar do tempo, a redução definitiva dos níveis de estrogênio contribui para a atrofia urogenital e o envelhecimento da pele, enquanto condições como osteoporose e sarcopenia podem se desenvolver no período pós-menopausa (MANTELEONE *et al.*, 2018).

**Figura 2.** Visão abrangente dos sintomas durante a perimenopausa.



**Descrição:** destacando as manifestações típicas durante a transição para a menopausa, neste período as mulheres podem experimentar todos os sintomas, alguns ou até mesmo nenhum deles. Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Criado com BioRender.com.

Os estrogênios constituem-se em uma classe de hormônios esteroides que englobam o estradiol (E2), o estriol (E3) e a estrona (E1). O estradiol ou 17 $\beta$ -estradiol (E2), é produzido principalmente pelo ovário (KIM *et al.*, 2014). No organismo humano, o estradiol destaca-se como o principal hormônio estrogênio em circulação, responsável por modular os sinais por meio do núcleo intracelular, do plasma e dos receptores de estrogênio associados à membrana (ERs). Essas descobertas confirmam que o estrogênio desempenha um papel fundamental na regulação da homeostase energética feminina (FANG *et al.*, 2018). O estradiol destaca-se como um dos hormônios mais cruciais no organismo feminino, desempenhando um papel essencial na iniciação, desenvolvimento e manutenção das funções reprodutivas e fisiológicas em todo os tecidos do corpo (KINGLE, 2020). O sistema bioenergético central é principalmente influenciado pela sinalização de E2, que regula (1) o metabolismo da glicose, sendo a preferência predominante do cérebro, fornecendo ATP e precursores essenciais para sustentar a função cerebral fisiológica, e (2) controla o equilíbrio entre gasto e consumo de energia (GUOYUAN; YASHI; YIN, 2020). A falta do E2 afeta o funcionamento do coração de duas maneiras: primeiro, interfere no relaxamento das células musculares cardíacas durante a fase de enchimento do coração (diástole precoce) regulando níveis de cálcio no organismo; segundo, influencia a capacidade do coração de se expandir adequadamente durante a fase de enchimento, principalmente em estágios posteriores da diástole, devido ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e fibrose (SHUMIN, ANISHA; 2017).

#### 2.1.2 RECEPTORES DO 17 $\beta$ -ESTRADIOL E ESTROGÊNIO NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL CARDÍACA

O coração contém uma grande quantidade de mitocôndrias, que são a principal fonte de ATP e de EROs. Estas organelas desempenham um papel fundamental na regulação da contração cardíaca, fornecendo ATP, e no equilíbrio homeostático do Ca<sup>2+</sup>. As DCVs estão frequentemente associadas a alterações na estrutura e função mitocondrial. Nesse contexto, o E2 exerce um papel essencial, promovendo a respiração mitocondrial para otimizar a produção de ATP, ao mesmo tempo em que reduz a formação de EROs, que podem induzir danos celulares (PELZER *et al.*, 2005; CHITIAKOV *et al.*, 2018). Vários estudos destacam a influência do E2, mostrando que, por meio de seus receptores, ele impacta diretamente as mitocôndrias cardíacas, modulando a expressão gênica e proteica mitocondrial (YANG *et al.*, 2004).

Os receptores de estrogênios conhecidos como ER $\alpha$  (alfa) e ER $\beta$  (beta), são proteínas presentes nas células que tem a capacidade de se ligar ao hormônio estrogênio. Estudos evidenciam que camundongos *ERKo* machos e fêmeas com deficiência de ER $\alpha$  (alfa) são obesos em todo o corpo e apresentam resistência à insulina em seu estado basal, ou seja, isso demonstra o papel importante do receptor de ER $\alpha$  (alfa) na regulação da massa corporal e da sensibilidade à insulina (HEINE *et al.*, 2000). Essa deficiência também resulta em uma alteração metabólica no coração dos camundongos, levando a uma redução na capacidade do coração de utilizar glicose como substrato energético, fato que indica que o ER $\alpha$  (alfa) é necessário para manter o metabolismo normal de glicose no coração (LOZA *et al.*, 2012). Enquanto os camundongos com deficiência de ER $\beta$  (*BERKo*) exibem um fenótipo metabólico distinto, caracterizado por um aumento na formação óssea cortical e uma redução do osso trabecular em comparação com os camundongos *ERKo*, eles também demonstram uma proteção contra a resistência à insulina e a intolerância à glicose induzidas pela dieta (OHLSSON *et al.*, 2000). Este padrão indica um papel crucial do receptor de estrogênio  $\beta$  na regulação do metabolismo ósseo e do metabolismo da glicose, sugerindo potenciais alvos terapêuticos para condições relacionadas, como osteoporose e diabetes tipo 2 (FORYST-LUDWIG *et al.*, 2008). Com o avanço da idade, os ratos *BERKo* apresentam hipertrofia cardíaca, como também desenvolvem hipertensão e problemas em diferentes células, além das do coração. Essa mudança faz parte do processo de envelhecimento e pode estar relacionada a uma série de fatores como a diminuição da função celular e danos causados ao longo do tempo (KREGGE *et al.*, 1998; ZHU *et al.*, 2002). Fliegner *et al.* (2009) identificaram em camundongos machos com deficiência do receptor de estrogênio ER $\beta$  (beta), um notável aumento na hipertrofia dos cardiomiócitos além de um aumento significativo do apoptose desses miócitos, sendo associada a uma progressão em direção a insuficiência cardíaca, contudo essa sobrecarga de perda de ER $\beta$  é importante tanto para mulheres como para os homens.

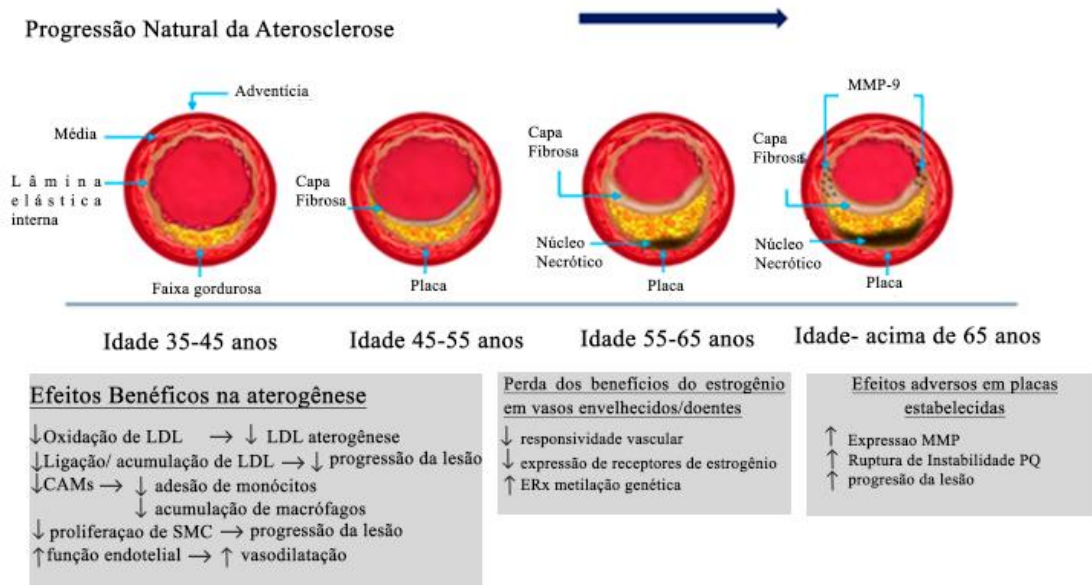
### 2.1.3 Terapia de Reposição Hormonal (TRH)

A Terapia de Reposição Hormonal (TRH) continua sendo o tratamento mais eficaz para os sintomas vasomotores (HAMODA *et al.*, 2020), assim como para uma melhora significativa nos sintomas atróficos vaginais e urogenitais (TAKAHASHI; JOHNSON, 2015). Com a evolução dos estudos marcados pela história e mudanças na suplementação de estrogênio e da

TRH ao longo do tempo. Em meados de 1970 a utilização do estrogênio foi prejudicada ao ser assimilada com um aumento considerável no risco de câncer endometrial. Essa preocupação foi amenizada com a adição de progestina em mulheres com útero, resultando no renascimento do uso da TRH. Na década de 1990, o estudo *Women's Health Initiative* (WHI) envolvendo mais de 16 mil mulheres na pós menopausa utilizaram estrogênio conjugado com MPA, relatando aumentos nos riscos de câncer de mama, embolia pulmonar, acidente vascular cerebral e doença cardíaca coronariana. O impacto em longo prazo do WHI influenciou significativamente a prescrição de TRH ao longo da década de 2000 e 2009, resultando em uma preferência por formulações orais ou vaginais em doses baixas (KOPERA, 1991; BABER; PANAY; FENTON, 2016; KOHN *et al.*, 2019). Estudos sugerem para que haja vantagens significativas no controle dos sintomas e na prevenção de doenças em relação aos riscos, é recomendável que as mulheres iniciem a TRH em até 10 anos após a menopausa, ou até os 60 anos de idade. Caso isso não ocorra, a TRH pode desencadear de formas contraproducentes diversos processos biológicos no endotélio vascular, células musculares lisas e células inflamatórias na presença de aterosclerose, resultando em um aumento dos riscos de DCVs (MENDELSON; KARAS, 2005; PRABAKARAN; SCHWARTZ; LUNDBERG, 2021).

Essas considerações são embasadas na “hipótese do endotélio saudável”, que explica os diferentes efeitos do estrogênio durante a progressão da aterosclerose. De acordo com essa teoria, o estrogênio pode ter efeitos positivos iniciais na saúde do revestimento interno dos vasos sanguíneos quando utilizado na TRH, mas pode ter efeitos negativos em placas de aterosclerose já existentes (HODIS *et al.*, 2001).

**Figura 3.** A teoria do “Endotélio Saudável”.



**Descrição:** explicação de como o estrogênio afeta a progressão da aterosclerose em contrapartida as vantagens em fazer a Terapia de Reposição Hormonal em mulheres mais jovens e demonstra os efeitos adversos do estrogênio em placas de aterosclerose já formadas, o que tende a ser mais comuns em idades mais avançadas. Outros elementos envolvidos nesse processo, incluindo enzimas como as metaloproteinases de matriz (MMPs), lipoproteínas como o LDL, moléculas de adesão celular (CAMs), células musculares lisas (CMS), o receptor alfa de estrogênio (ER $\alpha$ ) e as próprias placas de aterosclerose. Fonte: Adaptado de Hodis (2003).

Em relação à IC, os estudos mostram que a deficiência dos estrogênios pode intensificar a hipertrofia ventricular esquerda (SABBATINI; KARARIGAS, 2020). No entanto, também há evidências de que o uso está relacionado a uma redução na mortalidade total e cardíaca, bem como as maiores taxas de sobrevivência em mulheres pós-menopáusicas com insuficiência cardíaca (REIS *et al.*, 2000; LINDENFELD *et al.*, 2003).

Por outro lado, uma revisão de ensaios clínicos realizados por Chen, Wu e Huang (2012, p.181) diz não haver uma relação clara entre terapia de reposição de estrogênio e a Insuficiência Cardíaca. No entanto esse estudo revelou que em análises dos subgrupos deste mesmo ensaio enfatizou um menor risco de IC em mulheres com reposição de estrogênio logo no início da menopausa comparado com mulheres na menopausa tardia (dez anos). Além disso, o estudo de Sophonsritsuk *et al.* (2013) mostrou que após um mês de uso de estrogênio, houve uma melhora no desempenho diastólico do ventrículo esquerdo e um retardo no início da insuficiência cardíaca.

#### 2.1.4 MENOPAUSA E MODELO EXPERIMENTAL OVARIECTOMIA

A importância do estudo translacional em modelos animais é evidente, pois permite distinguir os riscos e benefícios de diferentes intervenções terapêuticas, além de prever os resultados e desenvolver novas estratégias para a promoção da saúde (BRINTON, 2012). O envelhecimento natural, tanto em humanos quanto em animais, resulta em diversas variações fisiológicas no cérebro e no corpo. Nos mamíferos, as fêmeas experienciam essa senilidade natural geralmente na meia-idade ou no final da vida. Durante a transição da menopausa, os aspectos biológicos podem ser difíceis de avaliar de forma precisa em humanos, devido às variações heterogêneas em fatores como idade, status socioeconômico, características genéticas e fenômenos ambientais (KOEBELE, BIMONTE-NELSON, 2016).

Dentro desses aspectos, o modelo animal vem sendo fundamental na avaliação dos efeitos hormonais gonadais na função do corpo incluindo processos de desenvolvimento e cognição trazendo uma análise mais homogênea nos estudos laboratoriais (BIMONTE, 2015), contudo, modelos de roedores, entre eles ratos e camundongos de laboratório, são particularmente essenciais e úteis devido ao seu processo de envelhecimento bem documentado, além das características definidas de seus cérebros e sistemas reprodutivos, que atendem à demanda de experimentos precisos e assertivos (NATIONAL INSTITUTE ON AGING, 2015). No roedor idoso há um acúmulo potente de folículos ovulatórios que é a diferença principal entre o humano. Os roedores apresentam determinada depleção folicular ovariana natural (GOSDEN *et al.*, 1983) enquanto a característica da menopausa humana é a falência ovariana completa.

Durante o ciclo é notável algumas diferenças encontradas entre os humanos e os roedores: o ciclo dos roedores é denominado como ciclo estral que difere do ciclo menstrual humano. Nos roedores o revestimento uterino é reabsorvido ao invés de ser eliminado na menstruação, e a cada 4 a 5 dias acontece o ciclo estral que consiste em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, que circundam flutuações hormonais ovarianas semelhantes às do ciclo menstrual de 28 dias (JOHNSON *et al.*, 2004; KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016).

A ovariectomia é o modelo padrão como referência em avaliação pré-clínica dos efeitos hormonais gonadais nos animais fêmeas ou retirada cirúrgica dos ovários, descrita como OVX. O procedimento da OVX elimina bilateralmente os ovários, ovidutos (as trompas de falópio) e pontas dos cornos uterinos da cavidade peritoneal, deixando os cornos uterinos ligados intactos (BRUCE; OLSON, 1986). O corno uterino dos roedores é bifurcado, e consegue acomodar

ninhadas grandes (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016). O procedimento de OVX proporciona uma recuperação total em aproximadamente uma semana. Este modelo é recomendado para avaliar os efeitos da privação hormonal gonadal, bem como para examinar tratamentos hormonais exógenos nos sistemas nervoso central e periférico. Ele cria uma placa em branco de hormônios gonadais, permitindo a administração por exemplo, de estrogênios após a OVX (KOEBELE, BIMONTE-NELSON, 2016).

### 2.1.5 DOENÇAS CARDIOVASCULARES (DCVs)

As DCVs continuam sendo as principais causas de morte em todo o mundo, representando uma ameaça significativa à saúde pública. A IC, em particular, está associada a alta morbidade, com uma taxa de sobrevivência de apenas 50% cinco anos após o diagnóstico (HAY *et al.*, 2016). A IC é uma condição predominantemente associada aos idosos, como evidenciado por uma análise de estudos ecocardiográficos recentes, que estimou uma prevalência de 11,8% entre indivíduos com 65 anos ou mais (RIET *et al.*, 2016). Segundo as diretrizes da Sociedade Europeia de Cardiologia (2021), a IC é caracterizada por sintomas como falta de ar, fadiga e inchaço nos tornozelos, sendo causada por anormalidades estruturais ou funcionais no coração, que resultam em pressões cardíacas elevadas e/ou débito cardíaco inadequado, tanto em repouso quanto durante o exercício.

A condição pode envolver disfunção miocárdica, tanto sistólica quanto diastólica, e é dividida em diferentes fenótipos (MECDONAGH *et al.*, 2022), com base na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), essa abordagem é justificada pelo fato da FEVE ser um indicador robusto da fisiopatologia subjacente e influenciar a resposta à terapia medicamentosa. A fração de ejeção (FE) é um parâmetro importante na determinação do diagnóstico e da resposta dos pacientes ao tratamento da IC. Ela fornece informações cruciais sobre a função do coração e permite classificar a condição de Fração de Ejeção Reduzida (ICFEr, FEVE < 40%), Fração de Ejeção Intermediária (FEVE entre 40-49%) ou Fração de Ejeção Preservada (ICFEp, FEVE > 50%). Estudos indicam que metade dos pacientes é diagnosticada com ICFEp (DUNLAY; ROGÉRIO; REDFIELD, 2017), sendo esta condição mais comum em mulheres. Fatores de risco prevalentes incluem hipertensão, obesidade, hiperlipidemia e diabetes mellitus (YOON; EOM, 2019).

O diagnóstico de ICFEp baseia-se em evidências clínicas apresentadas pelo coração, alertando para dificuldades no bombeamento do sangue, mesmo com a fração de ejeção normal.

Esses sinais podem ser diagnosticados por exames médicos para avaliar a função cardíaca, e, quando identificados, remetem à definição de ICFEp, relacionada à hemodinâmica, ou seja, à maneira como o sangue flui dentro do coração e dos vasos sanguíneos (PFEFFER, 2019).

Entre as funções cardíacas, destacam-se a contração e o relaxamento do ventrículo esquerdo (VE). Na fase sistólica, ocorre a contração para bombear o sangue do VE para o corpo, enquanto na fase diastólica, o VE relaxa para se encher de sangue. A disfunção diastólica do ventrículo esquerdo (DDVE) está associada a anormalidades no relaxamento ativo e no enchimento passivo do VE, devido à rigidez miocárdica, o que pode comprometer o débito cardíaco (DC) (OWAN *et al.*, 2006)."

## 2.2 MITOCÔNDRIAS

As mitocôndrias distinguem-se por suas características específicas, tendo uma variação com o tipo celular, exercem diversas funções que estão interligadas e se adaptam-se frequentemente a diferentes demandas fisiológicas, com ajustes dinâmicos que muitas vezes podem ser revertidos (MONZEL; ENRÍQUEZ; PICARD, 2023). Essas organelas formam uma família que vai além da fosforilação oxidativa (OXPHOS), desempenhando papéis essenciais para a sobrevivência de organismos multicelulares. Assim como as células compartilham funções fundamentais para o seu funcionamento eficiente como a expressão gênica (produção de RNA e proteínas a partir do DNA), a síntese de proteínas (fabricação de moléculas essenciais para várias atividades celulares) e a transdução de sinais (comunicação celular e resposta a estímulos), todas as mitocôndrias possuem uma estrutura central essencial chamada de OXPHOS. Esse sistema é o responsável pela produção de energia nas mitocôndrias, tornando-o uma característica comum e indispensável em todas elas, ele é composto por cinco complexos multiproteicos, sendo quatro deles conhecidos como a cadeia transportadora de elétrons (CTE). Esses complexos disparam elétrons de equivalentes redutores para o oxigênio molecular, utilizando a energia livre gerada ( $\Delta G$ ) para criar um gradiente eletroquímico ( $\Delta\Psi_m + \Delta pH$ ) na membrana mitocondrial interna (MMI) (MRÁCEK; DRAHOTA; HOUSTEK, 2013).

O coração, apesar de representar apenas 0,5% da massa corporal, é responsável por cerca de 8% do consumo total de ATP. Este órgão armazena apenas a energia suficiente para sustentar o bombeamento durante um batimento cardíaco, renovando completamente seus compostos metabólicos a cada 10 segundos. Além disso, o coração contém a maior

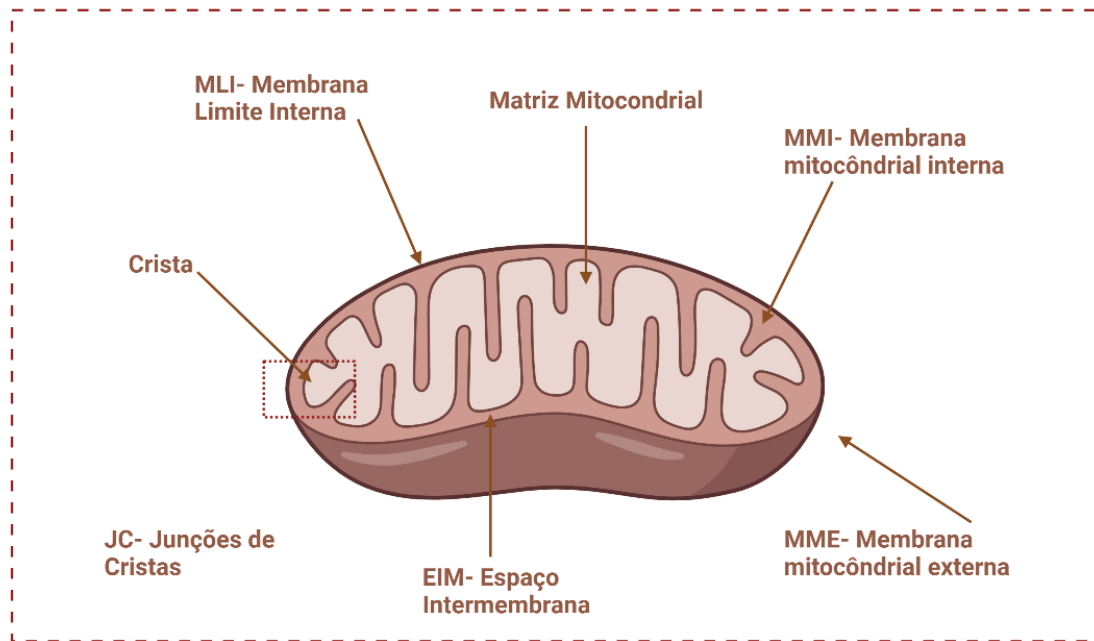
concentração de mitocôndrias em comparação com qualquer outro tecido, sendo o órgão metabolicamente mais ativo do corpo (BALABAN, 2002).

As mitocôndrias, fundamentais para o metabolismo cardíaco, são envolvidas por duas membranas compostas por fosfolipídios: a membrana mitocondrial externa (MME) e a membrana mitocondrial interna (MMI). Essas membranas separam a organela em dois compartimentos distintos: a matriz mitocondrial e o espaço intermembranar (EIM) (KUHLEBRANDT, 2002). A MME, semelhante às membranas das células eucarióticas, atua como uma barreira externa, enquanto a MMI, com características mais próximas às membranas bacterianas, contém cardiolipina, um componente essencial para a função mitocondrial (SMITH, 2006).

A MMI destaca-se por sua alta proporção de proteínas em relação aos lipídios e por apresentar dobras em direção à matriz, conhecidas como cristas (ERNSTER; SCHATZ, 1981). As cristas abrigam as principais proteínas responsáveis pelo processo de OXPHOS, funcionando como espaços especializados que concentram as ferramentas necessárias para a produção de energia. Parte da MMI que não se projeta para a matriz segue um caminho paralelo à MME, sendo conhecida como membrana limite interna (MLI). A interconexão entre as cristas e a MLI é feita por estruturas estreitas e tubulares denominadas junções de cristas (CJs), que mantêm a arquitetura mitocondrial organizada e funcional para a produção de energia (PALADE, 1953).

Além disso, as membranas mitocondriais diferem quanto à sua permeabilidade. A MME permite a passagem de íons e pequenas moléculas por meio de canais aniônicos específicos, conhecidos como VDACs, cuja abertura é controlada pela voltagem (COLOMBINI, 1989). Em contraste, a MMI é mais seletiva, permitindo a passagem livre apenas de água, oxigênio ( $O_2$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Essas características estruturais e funcionais das membranas mitocondriais são essenciais para o desempenho eficiente das mitocôndrias e, consequentemente, para o metabolismo energético do coração.

**Figura 4.** Representação esquemática da arquitetura mitocondrial.



**Descrição:** inclui a (MME) membrana mitocondrial externa; (MMI) membrana mitocondrial interna; (MLI) membrana limite interna, as (JC) junções de cristas; (EIM) espaço intermembrana; as cristas e a matriz mitocondrial. Fonte: Adaptado de Protasoni & Zeviane (2021).

Os estudos pioneiros sobre o trabalho cardíaco e a produção de ATP mitocondrial evidenciam que a produção de ATP mitocondrial está diretamente ligada à hidrólise de ATP nas miofibrilas e aos eventos de transporte ativo de íons relacionados à contração. A remoção do oxigênio é substancialmente constante, existindo assim uma forte ligação entre o fluxo sanguíneo tecidual, a respiração mitocondrial e o trabalho cardíaco. No estudo de Khouri, Gregg, Rayford (1965, p.427-437), sobre exercício do cão acordado sendo trabalhado em esteira, foi analisado uma relação contínua entre trabalho, consumo de oxigênio e fluxo de sangue coronariano. Em estudo revisado sobre o aumento do trabalho do miocárdio há contribuições relacionadas a frequência cardíaca (~ 60%), contratilidade (20%) e volume diastólico final (*Starling*) (20%), impulsionando linearmente o consumo de oxigênio do miocárdio. Alguns mecanismos celulares para esses processos de controle mantêm-se desconhecidos (DUNCKER; BACHE, 2008). Há muito tempo que se sabe que nas mitocôndrias a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  pode desempenhar um papel tanto no suporte ao metabolismo celular quanto na indução da morte celular (DELTON, 2009). Estudos demonstram que no início da contração muscular, uma série de eventos rápidos ocorrem. Dois desses eventos estão associados à formação das mitocôndrias: a sinalização  $\text{Ca}^{2+}$  e a renovação do ATP. Quando o  $\text{Ca}^{2+}$  é liberado do retículo sarcoplasmático e desempenha sua função na interação entre as

proteínas actina e miosina, ele não apenas participa desse processo, como também ativa várias quinases ( $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina quinase II e PKC) e fosfatases. Estas enzimas transmitem sinais para o núcleo da célula, modificando a taxa de transcrição genética. Além disso, é conhecido que aumentos nos níveis citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  têm impacto nas mitocôndrias, melhorando diretamente a taxa de respiração mitocondrial. Este efeito ocorre pela ativação de desidrogenases, enzimas que requerem  $\text{Ca}^{2+}$  para atingir sua máxima atividade. Também foi observado que a ATP-sintase mitocondrial, responsável pela produção de ATP, é ativada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (BALABAN, 2002).

### 2.2.1 MITOCÔNDRIAS CARDÍACAS

Os cardiomiócitos maduros são as células musculares do coração já desenvolvidas, as mitocôndrias são estruturas notáveis que desempenham um papel crucial na produção de energia, elas são organizadas de forma específicas (SPARAGNA; LESNEFSKY, 2009). As mitocôndrias subsarcolemais (SSM) se encontram estrategicamente abaixo da membrana celular, as mitocôndrias interfibrilares (IFM) residem em fileiras entre as miofibrilas e as mitocôndrias perinucleares (PNM) estão localizadas ao redor dos núcleos (CHEN *et al.*, 2012). Estudos evidenciam que essas subpopulações mitocondriais parecem ser influenciadas de forma desigual durante anomalias cardíacas apresentadas como isquemia/reperfusão, insuficiência cardíaca, envelhecimento, exercício físico e Diabetes *Melittus* (HOLLANDER, THAPA, SHEPHERD; 2014).

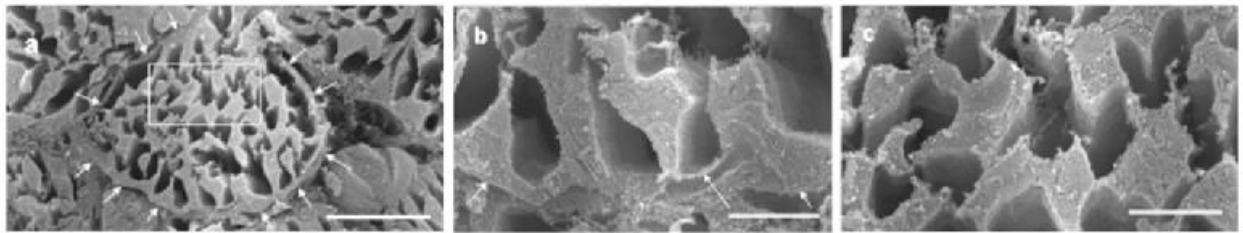
Essas formas desiguais podem ser disparidades estruturais e funcionais específicas, contudo podem ser efeito dessas influências entre subpopulações mitocondriais afim de que o estresse causado por um determinado afrontamento cardíaco impacta diferencialmente os locais subcelulares e incluindo as mitocôndrias contidas nele (HOLLANDER; THAPA; SHEPHERD, 2014). As diferenças morfológicas situam-se nas cristas, com uma estrutura lameliforme no SSM enquanto uma estrutura tubular é encontrada no IFM (HOPPELL *et al.*, 2009). As mitocôndrias perinucleares apresentam-se como elementos chave na organização e funcionamento dos cardiomiócitos (LUKYANENKO; CHIKANDO; LEDERER, 2009).

De acordo com o estudo de Riva *et al.* (2005) realizado em miócitos de coração de ratos Sprague- Dawley com massa corporal 330-690 g que foram eutanasiados por decapitação (quatro corações foram removidos), no qual o objetivo foi demonstrar se existiam diferenças

em duas populações mitocondriais bioquimicamente e topologicamente definidas. Utilizaram microscopia eletrônica de varredura de alta resolução para examinar o interior dessas organelas. Na Figura 5 é demonstrado uma fibra muscular cardíaca em corte transversal do ventrículo esquerdo, esses quatro corações foram utilizados para isolar as mitocôndrias subsarcolemais (SSM) e mitocôndrias interfibrilares (IFM) de acordo com Palmer *et al.* (1977). De acordo com a Figura 5a, as lacunas entre as colunas das mitocôndrias representam o espaço originalmente ocupado pelas miofibrilas, as mitocôndrias abaixo e adjacentes ao sarcolema correspondem ao SSM (Figura 5b). Em contrapartida as mitocôndrias situadas entre as lacunas correspondem ao IFM (Figura 5c).

Dessa análise, 77% do SSM apresentavam cristas lameliformes e janelas completas que são unidas à membrana limite por numerosas junções de cristas para utilizar a terminologia de Perkins *et al.* (2000).

**Figura 5.** Mitocôndrias cardíacas.



**Descrição:** (a)- um cardiomiócito é apresentado, extraído de maneira transversal e identificado pelo sarcolema, destacado por uma série de setas. No interior do sarcolema, encontram-se as (b)- mitocôndrias subsarcolemais (SSM), enquanto (c)- as organelas centrais são representadas pelas mitocôndrias interfibrilares (IFM). Os espaços entre as IFM, anteriormente ocupados por miofibrilas, foram removidos. Fonte: Adaptado de Riva *et al.* (2005).

As mitocôndrias interfibrilares (IFM) demonstram maior vulnerabilidade aos efeitos do diabetes (DABROWSKI; GALAS, 2019) e desempenham um papel crucial na estimulação da apoptose no coração diabético (WILLIAMSON *et al.*, 2010). Além disso, foi identificado que a perda de cardioplipina está associada à cardiomiopatia dilatada em humanos e à IC hipertensiva espontânea em ratos. Essa redução de cardioplipina foi correlacionada com a diminuição da atividade do complexo IV em ambas as populações de mitocôndrias cardíacas (SPARAGNA *et al.*, 2007).

Estudo de revisão de Rosca e Hoppel (2012) evidencia a diminuição da produção de energia mitocondrial como um fator chave na progressão de IC. Até o momento, estudos abordam a importância de examinar a função mitocondrial medindo a fosforilação oxidativa em subsarcolemais (SSM) e interfibrilares (IFM) as atividades dos complexos da CTE, enzimas

marcadoras nas mitocôndrias e homogeneizados preparados a partir do tecido cardíaco e esquelético. Neste mesmo estudo, ao investigar a função mitocondrial ao longo da progressão da doença, os autores concluíram que a hipertrofia cardíaca compensatória está associada a um aumento da capacidade oxidativa mitocondrial cardíaca, enquanto, na insuficiência cardíaca, congestiva, as mitocôndrias apresentam disfunção acentuada. A fisiopatologia da insuficiência cardíaca é considerada complexa, em razão dos seus efeitos fisiológicos, que levam à apoptose dos cardiomiócitos e desempenham um papel indispensável na gênese da doença (TANAI; FRANTZ, 2015).

### 2.2.2 A BIOENERGÉTICA DO METABOLISMO DOS CARDIOMIÓCITOS

Nos corações saudáveis, cerca de 70% do ATP é produzido por meio da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (FAO), sendo essa via metabólica predominante em comparação com a oxidação da glicose (ASHRAFIAN *et al.*, 2007). A fosfocreatina (PCr) atua como um reservatório de tampão de ATP, que diminui à medida que a insuficiência cardíaca progride. Ela é uma molécula energética essencial nas células, fornecendo fosfato de alta energia que é transferido das mitocôndrias para a estrutura miofibrilar (NEUBAUER *et al.*, 1997). Na IC, especialmente em estágios terminais, ocorrem mudanças significativas nas modificações químicas. As atividades de enzimas redox, como NADPH-transidrogenase, além de enzimas do ciclo de Krebs, como a isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e aconitase, são drasticamente reduzidas (PEPE; SHEERAN, 2017). No coração humano acometido pela insuficiência cardíaca (IC), a capacidade de replicação do DNA mitocondrial (mtDNA) encontra-se gravemente comprometida. Esse comprometimento resulta na depleção do mtDNA e na consequente redução significativa das proteínas por ele codificadas. Como efeito, há uma perturbação na biogênese mitocondrial, a qual contribui para a disfunção das mitocôndrias no miocárdio doente e acelera a progressão da IC (KARAMANLIDIS *et al.*, 2014)

Em alguns outros estudos o coração com a IC “sem energia” já foi extensivamente revisado como conceito (INGWALL, 2006). As alterações no metabolismo energético do coração têm várias consequências incluindo uma redução na capacidade e eficiência da respiração mitocondrial e na produção de ATP (AUBERT; VEGA; KELLY, 2013). Na DCV o aumento do estresse oxidativo acontece devido o desequilíbrio funcional das mitocôndrias cardíacas, diminuição da produção de ATP e abastecimento de energia, aumento do apoptose

celular, como também comprometimento dos mecanismos autofágicos (DOMINIC *et al.*, 2014).

### 2.2.3 PRODUÇÃO DE ENERGIA E SUBSTRATO MITOCONDRIAL

De acordo com a sua demanda, o coração utiliza diferentes substratos para a produção de energia. Em um coração adulto saudável, o substrato predominante utilizado é a oxidação mitocondrial de ácidos graxos (FAO), sendo responsável por 60-80% da produção cardíaca de ATP, após são observadas menores contribuições de glicose, lactato e corpos cetônicos (KELLY; VEGA; AUBERT, 2013). Para se adaptar a condições fisiológica e específicas, o coração pode alterar sua contribuição proporcional num momento de esforço relativo (WILCOX *et al.*, 2015).

O coração deficiente, como na IC, pode mudar sua fonte de ação predominante, deixando a oxidação mitocondrial de ácidos graxos e passando a contribuir através das vias glicolíticas. Essa mudança é mais evidente na IC tardia e terminal (STANLEY *et al.*, 2005). Estudos demonstram que essa mudança se torna até 30% mais eficiente energeticamente na insuficiência cardíaca devido a maior quantidade de ATP a ser produzida por mol de oxigênio durante a oxidação de carboidratos (FUENTES, 2003). Essa diminuição na ação predominante de ácidos graxos na IC, pode estar relacionada ao defeito no metabolismo lipídico promovida pela alteração na ação do fator de transcrição do receptor  $\alpha$  ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR $\alpha$ ), que é essencial no controle do metabolismo de ácidos graxos. Foram encontrados no coração de camundongos nocautes para PPAR $\alpha$  aspectos anormais baixos de vários transportadores de ácidos graxos e enzimas mitocondriais que metabolizam ácidos graxos (WATANABE *et al.*, 2000).

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR) fazem parte de uma família de receptores hormonais nucleares que são abundantes em tecidos metabolicamente ativos. Existem três subtipos principais de PPARs denominados,  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ . O PPAR $\alpha$  foi o primeiro subtipo a ser descoberto, e destaca-se por sua capacidade única de promover a proliferação de peroxissomos, que são organelas dentro das células envolvidas em processos oxidativos, incluindo o metabolismo de ácidos graxos (ROBINSON; GRIEVE, 2009). Assim como também outros receptores hormonais, os PPARs conectam aos ligantes (ácidos graxos) no citoplasma que se deslocam para o núcleo da célula, uma vez conectado ao núcleo eles se associam a outros receptores chamados RXRs (receptores de ácido 9-cis retinóico) para formar

duplas e se conectarem às regiões de controle de genes conhecidas como regiões promotoras (KLIEWER *et al.*, 1992).

#### 2.2.4 Via Glicolítica

Estudos demonstram que a maior utilização de glicose no miocárdio pode aumentar a eficiência energética do coração, uma vez que essa via metabólica produz mais ATP por molécula de oxigênio consumida. Esse fenômeno é especialmente relevante durante episódios de isquemia e em casos de IC avançada (STANLEY *et al.*, 1997; DÁVILA-ROMAN, 2002).

Na transição de um coração saudável para um comprometido, ocorre uma mudança metabólica significativa: o uso predominante da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos é reduzido, enquanto a dependência da glicólise aumenta. Esse padrão reflete uma adaptação para um fenótipo metabólico glicolítico. A literatura científica é consistente ao apontar que, na IC, o coração prioriza a glicose como principal fonte de energia em detrimento dos ácidos graxos (HOLLANDER; BASELER; DABKOWSKI, 2011). Para garantir uma contração cardíaca eficaz, o coração utiliza diversas fontes de energia, incluindo ácidos graxos, glicose, lactato, cetonas, piruvato e aminoácidos. A maior parte dessa energia é gerada por meio da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, um processo altamente dependente de oxigênio. Isso faz do coração um dos órgãos mais metabolicamente ativos por unidade de peso. Entretanto, qualquer interrupção nessa via pode comprometer a função cardíaca, como observado em condições de IC (LOPASCHUK, 2010; NEUBAUER, 2007). Quando a produção de energia é prejudicada, surgem consequências como a restrição do metabolismo oxidativo mitocondrial, alterações nos tipos de substratos utilizados e uma redução na eficiência energética do coração (STANLEY, 2005; NEUBAUER *et al.*, 1997).

No metabolismo energético, a glicólise desempenha um papel essencial como via inicial de degradação da glicose. Nesse processo, que ocorre no citosol, uma molécula de glicose é quebrada em uma série de reações químicas independentes das mitocôndrias e do oxigênio, caracterizando-se como uma etapa anaeróbica. O produto final da glicólise são duas moléculas de piruvato, acompanhadas da produção líquida de duas moléculas de ATP e de equivalentes redutores (NADH), fundamentais para o suprimento energético celular. Posteriormente a presença de oxigênio, o piruvato pode ser transportado para a mitocôndria e convertido em acetil-CoA, iniciando o ciclo do ácido cítrico. Assim, a glicólise constitui uma via metabólica

indispensável para o fornecimento rápido de energia e para a manutenção da homeostase celular (ALBERTS *et al.*, 2003).

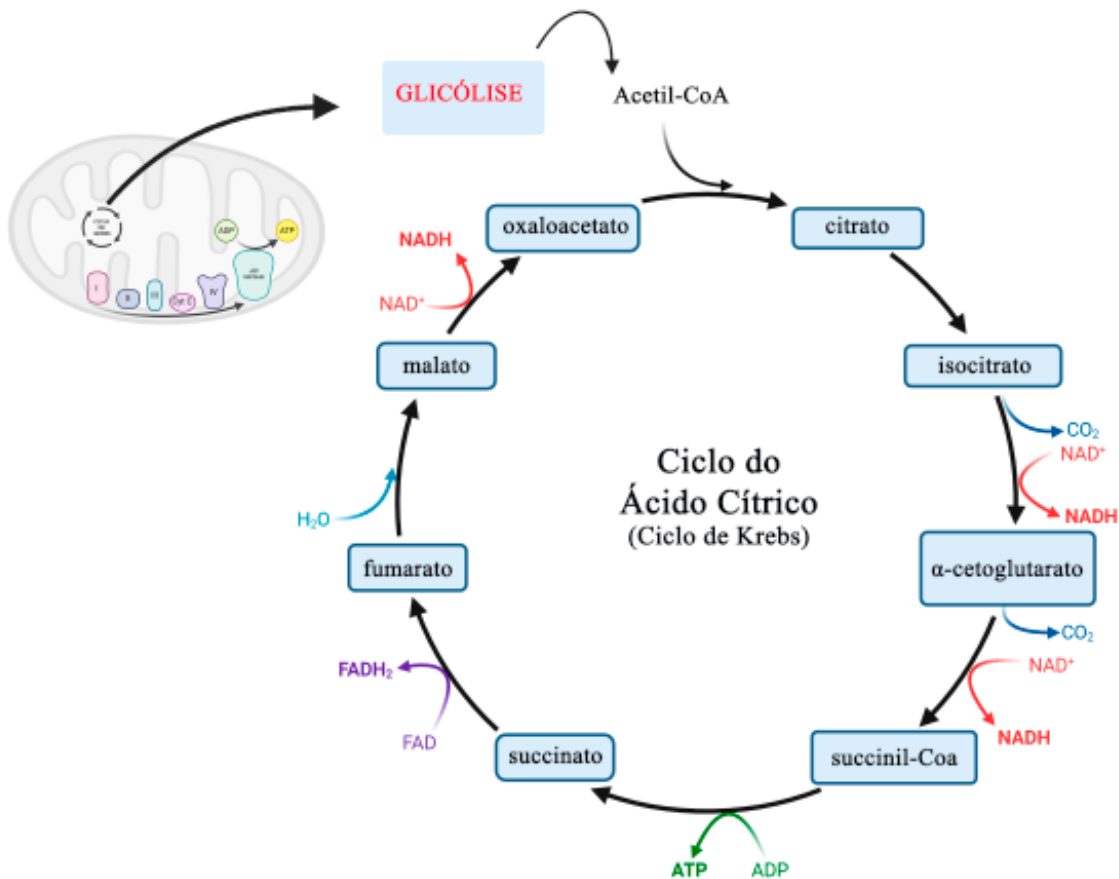
### 2.2.5 Ciclo de Ácido Cítrico (Ciclo de Krebs)

Uma interconexão acontece para potencializar a produção de ATP, a glicólise é conectada a uma segunda via, conhecida como ciclo do ácido cítrico ou Ciclo de Krebs (Figura 7), que ocorre nas mitocôndrias e é aeróbia, constituído por nove etapas, cada uma envolvendo uma ação específica das enzimas. Nesse processo acontece a execução do ciclo por três vezes, em cada etapa do ciclo são geradas moléculas que transportam energia, a cada vez que o ciclo é completado são produzidas três moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), uma unidade de flavina adenina dinucleotídeo (FADH<sub>2</sub>) e uma unidade de guanosina trifosfato (GTP). A glicólise processa cada molécula de glicose e gera duas moléculas de piruvato, um composto classificado como cetoácido piruvato. O piruvato resultante da glicólise penetra na matriz mitocondrial através do Transportador Mitocondrial de Piruvato (MPC). Essa “estrutura” atua como um canal de entrada, permitindo que o piruvato atravesse a membrana mitocondrial e chegue ao interior da mitocôndria (HERZING *et al.*, 2012). Dentro da mitocôndria, o piruvato é submetido a um processo de descarboxilação e oxidação, seguido de sua ligação à coenzima A, catalisado pela enzima piruvato desidrogenase (PDH), resultando na formação de acetil-CoA; portanto, as duas moléculas de acetil-CoA derivadas de glicose na matriz mitocondrial iniciam um ciclo catabólico complexo, o ciclo de Krebs, que dá origem a duas moléculas de CO<sub>2</sub>, enquanto seus equivalentes eletrônicos (átomos de hidrogênio) são removidos e usados para produzirem no total seis NADH, dois FADH e dois GTP. Essas substâncias carregam consigo a energia necessária para as etapas subsequentes da produção de ATP, que é a principal fonte de energia nas células.

Após o Ciclo de Krebs, as moléculas de NADH e FADH<sub>2</sub> que acumularam energia durante as etapas anteriores do metabolismo, tornam-se peças fundamentais no processo chamado fosforilação oxidativa. Nesse estágio, a maior parte de energia armazenada é finalmente convertida em ATP, esse processo da fosforilação oxidativa envolve a transferência de elétrons dos NADH e FADH para um acceptor final, o “oxigênio” através da Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE). Esse processo é conhecido como respiração celular, pois requer oxigênio molecular como um receptor final ou destino para transferência de elétrons. A

respiração celular está acoplada à produção de ATP pelo ATP-sintase também conhecido como complexo V da cadeia transportadora de elétrons. São formadas aproximadamente 30 moléculas de ATP a cada oxidação completa de uma única glicose (BERG; TIMOCZKO; STRYER, 2002).

**Figura 6.** Esquemática visual do processo biológico conhecido como Ciclo do Ácido Tricarboxílico (Ciclo de Krebs).



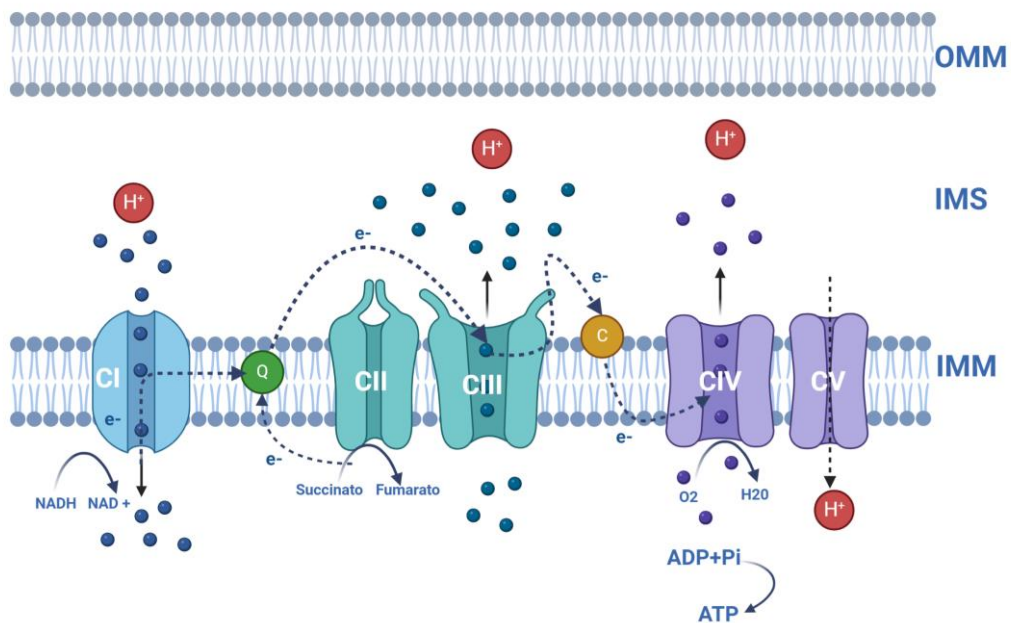
**Descrição:** ilustrando as etapas e interações das moléculas envolvidas neste importante ciclo metabólico. Fonte. Elaborado pelo autor (2024). Criado com BioRender.com.

### 2.2.6 Cadeia Transportadora de Elétron (CTE)

Para facilitar o processo essencial chamado Fosforilação Oxidativa (OXPHOS), as mitocôndrias utilizam por volta de 90% do oxigênio consumido pela célula. O ATP, principal fonte de energia, está diretamente envolvida nesse processo. Durante a OXPHOS, os elétrons liberados após a oxidação de NADH e FADH<sub>2</sub> que são os principais produtos do Ciclo de Krebs, são transferidos ao longo da CTE. Esse processo complementa na entrega dos elétrons ao oxigênio, que atua como um aceptor final de elétrons. Essa transferência de elétrons ao longo da cadeia de transporte de elétrons é essencial para a eficiente produção de ATP (BRAND; NICHOLLS, 2011).

A CTE é composta por quatro complexos enzimáticos classificados como I, II, III e IV que estão agrupados na membrana mitocondrial interna (MMI), mais especificamente nas cristas e por transportadores de elétrons solúveis, o citocromo c e a coenzima Q (GENOVA; BIANCHI; LENAIZ, 2003). Segundo a Teoria Quimiosmótica de Peter Mitchell (MITCHELL; 1961) o processo de transferência de elétrons resulta na criação de um gradiente de prótons ( $\Delta\text{pH}$ ) por meio da (MMI). Esse gradiente é formado por uma maior concentração de prótons no lado externo da membrana em comparação ao lado interno, enquanto íons hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) se acumula no lado interno. A combinação do gradiente de prótons ( $\Delta\text{pH}$ ), com o gradiente elétrico ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) forma uma força motriz de prótons ( $\Delta\text{p}$  também denotada como  $\Delta\mu\text{H}$ ). Essa força motriz de prótons é essencial para impulsionar a síntese de ATP a partir de difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico ( $\text{P}_i$ ). Esse processo é mediado pela enzima  $\text{F}_1\text{F}_0$  ATP sintase (complexo V) (BERNARD; ROSSIGNOL, 2008). Há aberrações na cadeia respiratória em indivíduos com IC que demonstram estar relacionadas com a diminuição da atividade dos complexos I e IV (ARBUSTINI *et al.*, 1998).

**Figura 7.** Visão esquemática do Processo de Fosforilação Oxidativa (OXPHOS).



**Descrição:** no decorrer das fases prévias da glicólise e do Ciclo de Krebs, as moléculas de NADH e FADH<sub>2</sub> são oxidadas por meio do complexo I (CI) e complexo II (CII), respectivamente. Os elétrons resultantes são transferidos para a ubiquinona (Q), que por sua vez, os conduz para o complexo III (CIII). Nesta etapa, os elétrons são transferidos para o citocromo c (C) em seguida para o complexo IV (CIV), onde são empregados na redução de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Paralelamente à transferência de elétrons, prótons são bombeados da matriz (indicado por setas vermelhas) para o espaço intermembrana (IMS). A força motriz gerada pelos prótons é então utilizada pelo complexo V (CV) para sintetizar ATP. Elaborado pelo autor (2024). Criado com BioRender.com.

Complexo I: NADH desidrogenase também conhecida como complexo I (CI), é a primeira parte da “corrente elétrica” nas células. A primeira etapa é como a energia é extraída. Este complexo é como uma máquina com 44 peças diferentes chamadas subunidades, organizados em três partes: um “braço” da membrana (chamado módulo P) e dois “domínios” salientes para dentro da célula (módulo N e Q). O módulo N contém algo chamado FMN, que desempenha um papel importante ao ligar e oxidar o NADH, uma molécula cheia de energia. Enquanto isso o módulo Q tem a função de se ligar à ubiquinona, outra molécula chave no transporte de elétrons. A transferência de elétrons entre esses dois módulos ocorre em aglomerados de ferro/enxofre, algo como pequenos pontos de transferência de energia. O “braço” periférico do Complexo I é formado por proteínas que têm códigos dentro do núcleo da célula, que inclui 7 peças centrais e outras 30 peças acessórias que ajudam a estabilizar a máquina e a protegê-la contra possíveis danos causados por substâncias reativas de oxigênio. Desta forma o Complexo I é uma máquina complexa, mas essencial, que inicia o processo de obtenção de energia nas células (VARTAK; SEMWA; BAI, 2014).

Complexo II: A succinato desidrogenase (SDH), também conhecido como complexo II (CII), é uma estrutura integrada à membrana. Esta enzima desempenha papéis essenciais tanto no ciclo do ácido cítrico (TCA) quanto na cadeia de transporte de elétrons (CTE) nas mitocôndrias, sua principal função é catalisar a oxidação do succinato para fumarato, uma etapa central no ciclo de ácido cítrico. Durante esse processo, o FAD (flavinaadeninedinucleotídeo) é reduzido a FADH<sub>2</sub>, que por sua vez reduz a ubiquinona para ubiquinol (RUTTER; SCHIFFMAN, 2010).

Complexo III: A ubiquinol: citocromo c oxidorreductase, também conhecida como citocromo bc1 ou complexo III (CIII), desempenha um papel importante no coração do processo de respiração celular. Este complexo é como o ponto central de uma cadeia de eventos que envolvem a transferência de elétrons. Na levedura, é composto por 10 peças diferentes e nos mamíferos uma subunidade extra foi identificada. Essa subunidade extra é como um “endereço” específico da proteína, chamada Rieske/UQCRFS1, que permanece ancorada ao complexo mesmo depois de passar por um processo de clivagem proteolítica. Esse complexo tende ser uma central elétrica nas células, onde a energia passa por uma série de pontos de controle, sendo a ubiquinol: citocromo c oxidorreductase um desses pontos cruciais. Ele coordena a transferência eficiente de elétrons, contribuindo para o processo contínuo de produção de energia nas mitocôndrias (BRANDT *et al.*, 1993).

Complexo IV: O citocromo c oxidase (COX), também conhecida como complexo IV (CIV) é a última etapa necessária da cadeia de transporte de elétrons (CTE). Essa enzima tem uma massa molecular de cerca de 200 KD e nos mamíferos é composta por 13 peças diferentes. Dessas 10 são codificadas no núcleo da célula e 3 são codificadas pelo DNA mitocondrial (MTCO1, MTCO2 e MTCO3), formando o núcleo funcional do complexo. Consideramos o COX como a peça final de um circuito elétrico nas nossas células. Ele recebe os elétrons passados por toda cadeia e realiza o processo final de redução de oxigênio para água, essencial para completar o ciclo de produção de energia na respiração celular. Essa descoberta recente adiciona uma camada de complexidade à nossa compreensão da máquina bioquímica que impulsiona a vida celular (ZONG *et al.*, 2018).

Complexo V (ATP Sintase): A enzima responsável por facilitar a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato é também conhecida como complexo V. Essa complexa estrutura é constituída por dois domínios principais, o domínio F<sub>1</sub>, orientado em direção a matriz mitocondrial e o domínio F<sub>0</sub> localizado na membrana mitocondrial interna (MMI). No organismo humano o complexo V é composto por 29 proteínas distintas, pertencentes a 18 tipos diferentes, sendo notável que apenas 2 dessas proteínas são codificadas pelo DNA mitocondrial (mtDNA) nomeados ATP6 e ATP8 (JONCKHEERE; SMEITINK; RODENBURH, 2012; ABRAHAMS *et al.*, 1994).

#### 2.2.8 Adenina-nucleotídeo-translocase (ANT)

Nos últimos vinte anos foi observado um aumento no vazamento de prótons nas mitocôndrias relacionado ao envelhecimento em diversos tecidos e tipos de células como coração, fígado, rim (SERVIDIO *et al.*, 2007), músculo esquelético (ASAMI *et al.*, 2008; LAL *et al.*, 2001), testículos (AMARAL *et al.*, 2008) e microvasos cerebrais (SAKAMURI *et al.*, 2022) em roedores e invertebrados (PHILIPP, PORTNER, 2005).

A Adenina Nucleotídeo Translocase -1 (ANT1) é uma proteína essencial localizada na membrana interna das mitocôndrias, responsável por regular a produção de energia na célula, sua função primordial é facilitar o transporte de moléculas de adenosina trifosfato (ATP) do interior das mitocôndrias para o citoplasma celular, enquanto simultaneamente importa moléculas de adenosina difosfato (ADP) da célula para dentro das mitocôndrias. Essa atividade é essencial para a geração de energia celular (RUPRECHT *et al.*, 2019).

Nos seres humanos existem quatro isoformas da proteína translocadora de nucleotídeos de Adenina (ANT) (STEPIEN *et al.*, 1992, DUPONT *et al.*, 2012). A ANT1 é



### 2.2.9 Transportador de Fosfato Mitocondrial (PiC)

O transportador de fosfato mitocondrial (PiC) é uma proteína transportadora de soluto mitocondrial, que é codificada por SLC25A3 em humanos. PiC é um importante substrato usado na produção de energia, através da membrana mitocondrial interna (MMI) onde ocorre a respiração celular. Isso é essencial para a produção de ATP, a molécula de energia das células, além disso o PiC desempenha um papel na regulação do cálcio dentro das mitocôndrias, também foi observado que o PiC influencia os processos de sobrevivência celular possivelmente interagindo com outras proteínas envolvidas na regulação do apoptose (SEIFERT *et al.*, 2015).

Poucos estudos se concentraram em entender o papel específico do PiC na OXPHOS, em vez disso os pesquisadores já sabiam que o fosfato externo (Pi exógeno) era necessário para a produção de energia e usavam a respiração celular como uma medida para estudar como o fosfato é transportado através da membrana interna (MMI). No entanto, um estudo conduzido por Fonyo e Ligeti (1978) explorou o papel do fosfato na captura de íons usando substâncias chamadas Mersalil e NEM. Nesse estudo descobriram que o PiC desempenha um papel essencial na doação de íons de hidrogênio ( $H^+$ ) durante o processo de respiração celular (FONYO; LIGETI, 1978).

### 2.3.0 CS- Citrato Sintase na Bioenergética Celular

A citrato sintase (CS) é produzida no ribossomo citoplasmático e desloca-se para a matriz mitocondrial, onde a CS desempenha uma função essencial no Ciclo de Krebs também conhecido como Ciclo do Ácido Cítrico (CHHIMPA *et al.*, 2023). A CS é uma enzima cuja atividade é utilizada como biomarcador para medir a quantidade e a saúde das mitocôndrias (JACOBS, 2012).

No músculo esquelético, a atividade da CS está envolvida na glicólise aeróbia, sendo crucial para a produção de energia e eficiência no uso do oxigênio (LARSEN, 2012). O piruvato desidrogenase, produzido durante a glicólise, converte o piruvato em Acetil-CoA na mitocôndria. No Ciclo de Krebs, a citrato sintase promove a união do acetato do acetil-CoA com o oxaloacetato, formando citrato (WIEGAND & REMINGTON, 1986). Dentro do Ciclo de Krebs, o citrato é utilizado para a formação de 2 NADH, 1 FADH e 1 ATP, que serão

posteriormente utilizados na Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE), gerando mais ATPs por fosforilação oxidativa através do complexo IV (ANDERSON *et al.*, 2018).

Após o treinamento de resistência, há uma melhora significativa na capacidade oxidativa do corpo humano, acompanhada por um aumento proporcional na atividade do citrato sintase muscular. Ou seja, à medida que o corpo melhora o consumo de oxigênio devido o treinamento, há um aumento correspondente na atividade da CS (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

### 2.3.1 Disfunção Mitocondrial, Menopausa e Doenças Cardiovasculares

A principal fonte de energia do coração adulto provém da  $\beta$ -oxidação mitocondrial de ácidos graxos, que corresponde a aproximadamente 50% a 70% do total (ZHANG *et al.*, 2010). No entanto, essa preferência pode variar de acordo com os nutrientes disponíveis, permitindo que o músculo cardíaco ajuste dinamicamente seu metabolismo. Por exemplo, ele pode transitar de uma maior utilização de lipídios para uma dependência predominante de glicose como fonte de energia, a fim de manter uma produção estável de ATP (STANLEY, 2005).

Em situações de disfunção mitocondrial, a CTE pode ser comprometida, resultando na redução da síntese de ATP e no aumento do estresse oxidativo. Esses desequilíbrios podem desencadear o mecanismo intrínseco de apoptose nos cardiomiócitos, contribuindo para a progressão de danos cardíacos (GREEN; REED, 1998).

A menopausa representa um marco significativo da mulher, potencialmente contribuindo para o surgimento de DCVs. Esse período está associado a mudanças no perfil de risco cardiovascular de saúde metabólica e a presença subclínica de aterosclerose (WELLONS *et al.*, 2012). As ações dos hormônios sexuais femininos no coração podem ter como alvo principal as mitocôndrias. É amplamente reconhecido que essas estruturas desempenham uma função essencial na supervisão dos processos vitais para a sobrevivência celular, como a produção de ATP, a formação de EROs, a mobilização de cálcio intracelular e o controle do processo de apoptose celular (WALLACE, 2005; MADAMANCHI; RUNGE, 2007; GUNTER; PFEIFFER, 1990).

### 2.3.2 Disfunção Mitocondrial

Os estrogênios desempenham uma função de proteção nas mitocôndrias por meio de efeitos tantos diretos quanto indiretos em diversos tecidos (KLINGE, 2017; CHEN *et al.*, 2009).

Estudos demonstraram que a regulação estrogênica da quantidade e desempenho das mitocôndrias contribui para a preservação da integridade nos tecidos vasculares, cardíacos e neurais (DUCKLES *et al.*, 2006; VELARDE, 2014). Os estrogênios aparentam influenciar diferentes aspectos da função mitocondrial, abrangendo a produção de ATP, a geração de EROs, as defesas antioxidantes, o potencial de membrana mitocondrial e a regulação do cálcio (SIMPKINS *et al.*, 2008) como também desempenha um papel nas disparidades observadas na incidência de doenças cardiovasculares, entre homens e mulheres, bem como entre mulheres na pré e pós-menopausa (MOSCA *et al.*, 2011). Foi demonstrado que mulheres na pós menopausa têm uma probabilidade mais elevada de apresentar Disfunção Diastólica do Ventrículo Esquerdo (DDVE), em comparação com homens da mesma idade. Isso sugere uma associação bastante significativa entre a DDVE e a falta do E2 (GOKCE *et al.*, 2003; VOUTILAINEN *et al.*, 1993).

### 2.3.3 EXERCÍCIO FÍSICO

A perda de massa magra é dos efeitos naturais do envelhecimento (THOMAZ *et al.*, 2021). A massa muscular diminui progressivamente entre 3 e 8% a cada década após os 20 anos, podendo chegar a 5-10% a partir dos 50 anos em ambos os sexos (VOLPI, NAZIMI, FUJITA, 2004). Durante a menopausa, as mulheres enfrentam mudanças fisiológicas significativas, incluindo a redução da taxa metabólica basal, a perda de massa magra e o aumento de peso característico da meia-idade. No entanto, esse ganho ponderal está mais fortemente relacionado ao processo de envelhecimento do que propriamente à menopausa (LOVEJOY; SAINSBURY, 2009).

O envelhecimento promove alterações progressivas que prejudicam a aptidão cardiorrespiratória, contribuindo para o surgimento de distúrbios cardiometabólicos, como aterosclerose, diabetes e insuficiência cardíaca (CHU *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2019; QIU *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2020). A prática regular de exercícios é uma abordagem não farmacológica eficaz para amenizar esses efeitos, promovendo melhorias na composição corporal e na função mitocondrial (ASIKAINEN; KUKKONEN; MIILUNPALO, 2021; MENDOZA *et al.*, 2016). O treinamento resistido destaca-se por aumentar a força, a capacidade funcional e a função hemodinâmica, mesmo em pacientes cardíacos (BENTON, 2007). Eleva o volume mitocondrial em idosas (MANFREDI *et al.*, 2013), melhora o metabolismo basal e a capacidade oxidativa muscular (KOKKINOS *et al.*, 2000). O treinamento aeróbico também se evidencia nos

benefícios da qualidade de vida ampliando o  $VO_2$  e reduzindo gordura corporal mais que o treino de resistência (POLLOCK *et al.*, 2000), melhora a contratilidade cardíaca, a circulação microvascular e a extração de oxigênio (MANUSETO *et al.*, 2015; BENNO *et al.*, 2006). Além disso o exercício melhora a função endotelial e a vasodilatação em pacientes com insuficiência cardíaca, aumentando a produção de óxido nítrico e reduzindo radicais livres (HAMBRECHT *et al.*, 1998). A aptidão cardiorrespiratória na meia-idade é um preditor relevante de insuficiência cardíaca (MOZAFFARIAN *et al.*, 2015). O exercício é reconhecido como terapia essencial para essa condição (FLEG *et al.*, 2015), sendo considerado um “medicamento” para 25 doenças crônicas, conforme Pedersen e Saltin (2015). Arena (2015) reforça que a capacidade funcional é um indicador vital e o exercício, uma forma de tratamento.

O sedentarismo e a hipertensão arterial (HA) permanecem como fatores que contribuem para as doenças cardiovasculares aumentando assim o grau de mortalidade global (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A prática regular de atividade física constitui uma estratégia de intervenção em saúde pública, elevando os índices de qualidade de vida relacionado à saúde, a redução dos sintomas depressivos e ao aprimoramento do controle hemodinâmico como a pressão arterial (MELO *et al.*, 2014), atualmente tem sido reconhecida como um determinante comportamental de grande relevância, exercendo efeitos volumosos sobre a saúde física, cerebral, nos processos cognitivos e o bem-estar mental ao longo do ciclo vital (KATZMARZYK *et al.*, 2022; DOMINGOS *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2023; ERICKSON *et al.*, 2019).

### 3 HIPÓTESES

A principal hipótese deste estudo baseou-se no efeito da ovariectomia, que poderia comprometer a função mitocondrial dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo, causando alterações nos estados respiratórios acoplados a partir de substratos que ativam a CTE a partir dos complexos I e II, e, conseqüentemente, diminuir a produção de ATP, o que poderia ser o fator essencial para o surgimento de disfunções cardíacas associadas à menopausa.

A partir da hipótese principal, também podemos destacar as seguintes hipóteses secundárias:

a) a diminuição dos hormônios ovarianos poderia comprometer a expressão de genes e proteínas envolvidas no metabolismo bioenergético mitocondrial, afetando os complexos da Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) e do transporte de substratos essenciais à OXPHOS (como PiC e ANT1), resultando em prejuízos à eficiência mitocondrial dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo;

b) o treinamento resistido exerceria um efeito protetor sobre a função mitocondrial cardíaca, sendo capaz de restaurar ou preservar os estados respiratórios mitocondriais além de modular a expressão gênica de marcadores associados à biogênese mitocondrial e a produção de energia de ambos os grupos treinados;

c) a melhora da função mitocondrial promovida pelo exercício resistido poderia representar uma estratégia terapêutica não farmacológica eficaz para prevenir ou diminuir os efeitos cardiovasculares associados à perda dos hormônios ovarianos, contribuindo para a manutenção da saúde cardíaca das mulheres

Essas hipóteses buscaram esclarecer os mecanismos fisiológicos na interação entre menopausa, disfunção mitocondrial e doenças cardiovasculares, além disso propõe integrar o exercício físico como uma intervenção terapêutica contribuindo para a compreensão e prevenção de complicações cardiovasculares associadas a deficiência de estrogênio (E2).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Este estudo buscou investigar os efeitos da ovariectomia (OVX) e do Treinamento Resistido (TR) sobre a função e o metabolismo bioenergético mitocondrial de biópsia de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratas maduras jovens.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Investigar e comparar os efeitos da OVX e do TR sobre a função respiratória mitocondrial (estados respiratórios) de biópsia em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de grupos sedentários e treinados;
- b) Analisar e comprar a expressão gênica das proteínas dos cardiomiócitos envolvidas na cadeia transportadora de elétrons (CTE) e na Fosforilação Oxidativa (OXPHOS) em ratas maduras jovens submetidas à OVX, sedentarismo e TR;

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os procedimentos experimentais realizados deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar), sob o protocolo nº 4381011222. A pesquisa seguiu rigorosamente os princípios éticos estabelecidos no Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011), na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica- DBCA (Resolução Normativa CONCEA 55, 2023), e no Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (CONCEA, 2023). Para que o bem-estar no animal fosse assegurado, seguimos as conformidades dos padrões legais e éticos de experimentação, o pesquisador responsável participou e concluiu com êxito a Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório, sendo reconhecido pelo certificado (nº YVZ6-YKL9-9R6F-5KF7). Este curso capacitou os fundamentos do manuseio ético do animal, além dos princípios dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição), visando minimizar o sofrimento do animal e garantir qualidade nos dados científicos obtidos.

### 5.2 ESPÉCIES UTILIZADAS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

A amostra consistiu em 20 ratas *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*, todas adultas jovens, provenientes do Biotério Central da UFSCar após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar). Ao longo de todo o período experimental, as ratas foram alojadas em caixas de polipropileno com dimensões de 41 cm x 34 cm x 17,5 cm, contendo leito de maravalha, com no máximo cinco ratas por caixa. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF/UFSCar), em condições controladas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar (55% a 65%) e iluminação em ciclo invertido de 12 horas (6-18h escuro e 18h-06h claro). Os animais tinham acesso a água filtrada e receberam uma dieta *ad libitum*. A higiene das caixas era realizada três vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira) às 7h, com verificações das condições dos animais aos fins de semana e feriado. Os animais chegaram ao biotério do laboratório de Fisiologia do Exercício UFSCar com oito semanas de vida, onde foram separados e distribuídos em quatro grupos diferentes, onde passaram por aclimação ao biotério e ciclo invertido por um período de três semanas.

### 5.3 INGESTÃO DE ALIMENTOS E MASSA CORPORAL

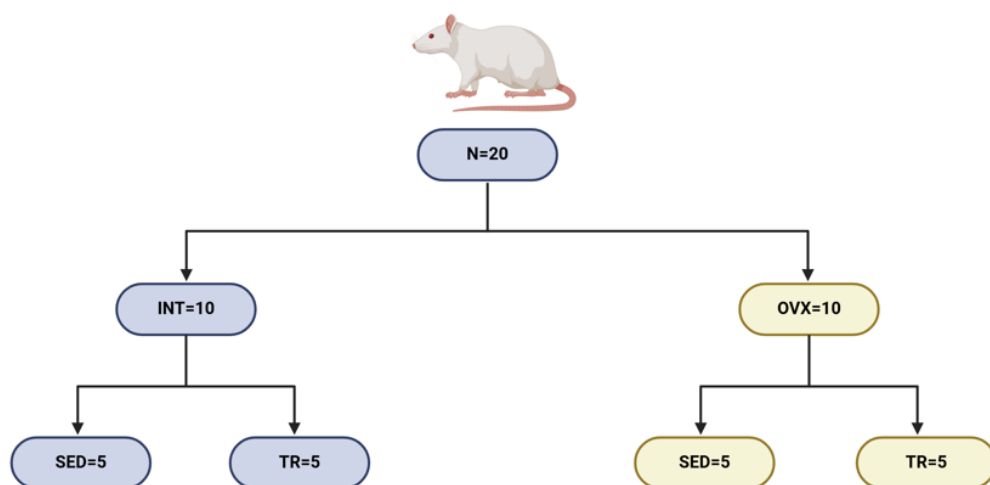
A supervisão diária da quantidade de alimentos consumidos pelos animais ocorreu às 7 h, com a administração da ração peletizada (SOCIL/ADM) em conformidade com as diretrizes do *American Institute of Nutrition* (AIN) para animais adultos AIN-93M (COSTA *et al.*, 2014). A distribuição equitativa da ração foi assegurada em todos os grupos, a avaliação da massa corporal (MC) foi conduzida semanalmente, às 8 h de todas as sextas-feiras, ao longo de todo o período experimental, utilizando uma balança eletrônica com precisão de 0,5 g (BEL Engineering®), após o período de aclimação.

### 5.4 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram alocados de maneira randomizada em quatro grupos diferentes (n= 5 ratas por grupo) a fim de minimizar vieses de seleção e garantir homogeneidade entre os grupos. Em seguida foi realizado através de sorteio utilizando o programa Excel (*Microsoft Corporation*) a partir da fórmula: = ALEATÓRIO (), para atribuição de cada grupo experimental:

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

**Figura 9.** Organização dos grupos experimentais.



**Descrição:** n: número de ratas; INT: ratas intactas; OVX: ratas ovariectomizadas; SED: sedentário; TR: treinamento resistido. Elaborado pelo autor (2024). Criado com BioRender.com.

## 5.5. PROCEDIMENTO CIRÚRISCO: OVARIECTOMIA

Os animais pertencentes ao grupo OVX foram submetidos ao procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral após atingirem 13 semanas de idade, seguindo o protocolo proposto por (KALU, 1991), apresentando uma massa corporal média de  $281,9 \pm 13,6$  g. A anestesia foi induzida pela combinação de xilazina (10 mg/kg de peso corporal) e ketamina base (5 mg/kg de peso corporal), administradas por via intraperitoneal. Após a anestesia, as ratas foram colocadas na mesa cirúrgica em posição de decúbito lateral, em seguida foi realizada uma pequena incisão bilateral (1,0-1,5 cm) na pele e na camada muscular, aproximadamente 1 cm abaixo da última costela e perpendicular ao corpo do animal utilizando tesoura e pinça cirúrgica. Após abrir a cavidade peritoneal, os ovários foram localizados e removidos, com a ligadura realizada com fio de poliéster (Coats) sob a fimbria, previamente tratado com iodo. Após a remoção, as incisões musculares e cutâneas foram suturadas com fio de seda 4-0 estéril (*Shalon Medical*), e foi administrado Pentabiótico® (0,1 mL/kg) e Tramadol (1mg/kg) por via intramuscular.

As ratas foram então monitoradas em gaiolas isoladas durante a recuperação da anestesia. Os animais dos grupos INT-SED e INT-RT não passaram pela ovariectomia. O Treinamento Resistido (TR) teve início uma semana após a cirurgia, conforme recomendado por Brinton (2012), que sugere esse intervalo para que os níveis de  $17\beta$ -estradiol no plasma atinjam valores baixos ou quase indetectáveis.

## 5.6 TREINAMENTO RESISTIDO (TR)

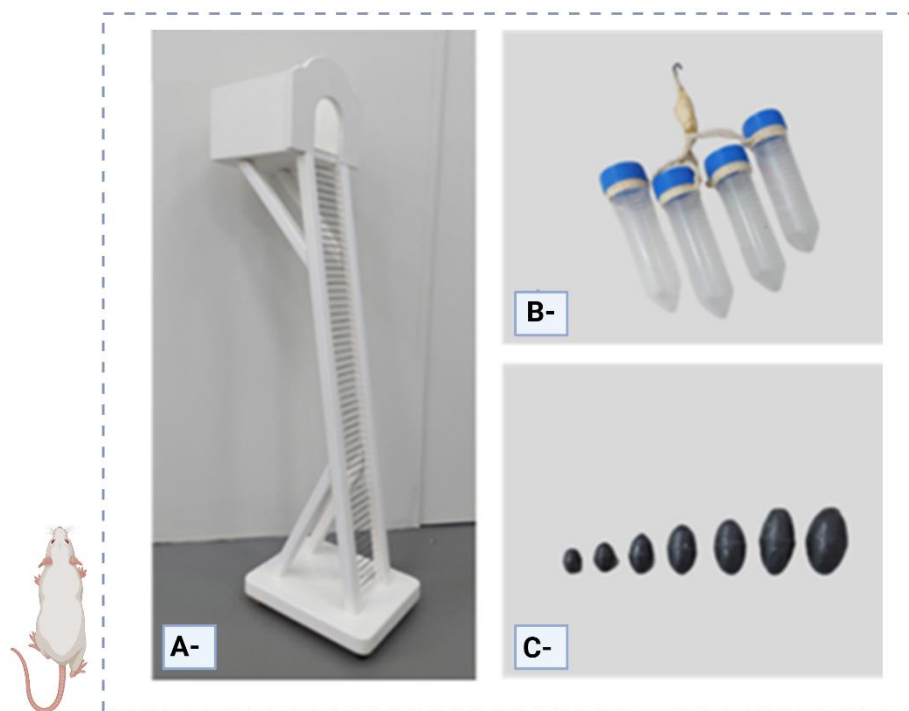
### 5.6.1 Adaptação ao Protocolo de Treinamento Resistido

Os animais do grupo treinado foram submetidos a sessões de familiarização com o protocolo de Treinamento Resistido (TR). Essas sessões ocorreram ao longo de três dias consecutivos durante os quais os animais foram desafiados a escalar uma escada vertical com dimensões de 1,1 m x 0,18 m, com espaçamento entre os degraus de (2 cm) e inclinação de 80°. Inicialmente foram realizadas três subidas abordando diferentes seções da escada (Figura 12a): a primeira próxima ao topo (1/3 superior), a segunda a partir do meio da escada, e a terceira a partir da base (1/3 inferior). Após essas três escaladas iniciais, os animais subiram mais três vezes percorrendo os 57 degraus da escada até atingirem o topo.

Ao iniciar o processo de adaptação no primeiro dia, as ratas executaram todas as escaladas sem fita adesiva fixada na cauda e sem o dispositivo de carga. Já no segundo dia de

adaptação, as subidas foram realizadas exclusivamente com a fita adesiva presa à cauda. No terceiro dia de adaptação, as escaladas foram conduzidas com o aparato de carga vazio fixado na cauda (Figura 12b). Os aparatos de carga foram projetados pelos pesquisadores do laboratório a partir de tubos de polipropileno do tipo falcon de 50 mL. As cargas aplicadas nesses dispositivos consistem em chumbos para pesca de diversos tamanhos e massas (Figura 12c). O dispositivo de carga foi fixado na porção mais próxima da cauda dos animais usando fita adesiva (3M Brasil), e esses animais foram posicionados no início da escada (parte inferior), com a tarefa de escalar até o topo da escada (parte superior). Quando necessário, o pesquisador podia aplicar um estímulo na ponta da cauda dos animais, utilizando os dedos polegar e indicador no formato de pinça, para iniciar o movimento de escalada. A extensão total da escada permitia que os animais realizassem entre 8 e 12 movimentos em cada subida. No topo da escada, havia uma câmara de alojamento em formato de casa com dimensões de (20 cm<sup>3</sup>), onde os animais descansavam por um período máximo de 120 segundos após escalarem todos os degraus.

**Figura 10.** Equipamentos utilizados para o TR.



**Descrição:** a-escada; b-aparato de carga; c-pesos de diferentes massas. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

### 5.6.2 Determinação da Carga Máxima de Carregamento (CMC)

Após as sessões de familiarização dos animais com o protocolo de TR, a primeira subida envolveu carregar uma carga equivalente a 80% da massa corporal do animal. Após um período

de recuperação de 120 segundos, a segunda subida foi realizada com um acréscimo de peso de 30 g. Essa progressão no aumento da carga em 30 g foi repetida em cada subida por quatro vezes, ou até atingir uma carga na qual os animais não pudessem percorrer toda a escada. A carga máxima carregada ao longo de todo percurso da escada foi considerada a Carga Máxima de Carregamento (CMC) da rata.

A determinação de CMC foi sempre realizada na primeira sessão semanal, que ocorria às segundas-feiras, iniciando com 80% e incluindo incrementos de 30 g. Essa padronização nas sessões de treinamento foi mantida ao longo de todo o experimento.

### 5.6.3 Protocolo de Treinamento Resistido

O protocolo de TR foi elaborado com base no modelo proposto por Hornberger e Farrar (2004) e adaptado por Queiroz *et al.* (2025). As sessões de TR consistiram em cinco subidas com cargas progressivas de 65%, 70%, 75%, 80% e 85% da Carga Máxima de Carregamento (CMC) de cada animal. Essas sessões foram conduzidas duas vezes por semana (quarta e sexta-feira) às 13:00 horas com um intervalo de 48 horas entre as sessões (Tabela 1). Todas as sessões de treinamento ocorreram no Laboratório de Fisiologia do Exercício da UFSCar, com uma duração média de cerca de 2 horas, com ciclo invertido de 12/12 horas em um ambiente escurecido (6h-18h) e iluminado (18h-6h) por luz vermelha de 150 W para facilitar a visualização dos pesquisadores. As sessões de treinamento foram realizadas de forma sistemática ao longo de 20 semanas totalizando 59 sessões de TR ao término do experimento. Na semana 20, foram realizadas a CMC e apenas uma sessão de TR (quarta-feira).

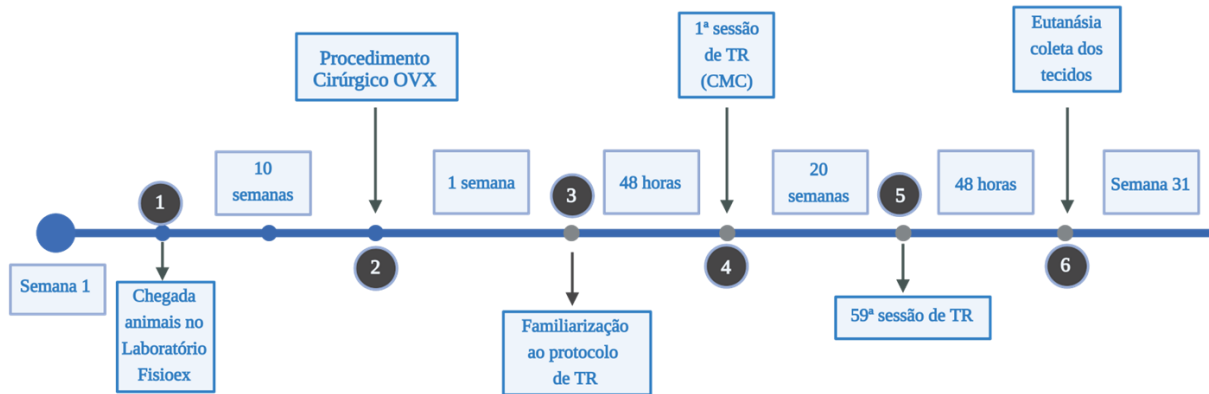
**Tabela 1-Distribuição semanal de treinamento.**

Grupos	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta
<b>INT-TR</b>	<b>CMC</b>	<b>X</b>	<b>Treino</b>	<b>X</b>	<b>Treino</b>
<b>OVX-TR</b>	<b>CMC</b>	<b>X</b>	<b>Treino</b>	<b>X</b>	<b>Treino</b>

**Descrição:** Cronograma de treinamento semanal dos grupos INT-RT e OVX-RT após três sessões de adaptação. CMC: Carga Máxima de Carregamento. Elaborado pelo autor (2025).

## 5.7 RESUMO DO DESENHO EXPERIMENTAL

**Figura 11.** Planejamento experimental.



**Descrição:** Cronograma das etapas realizadas desde a chegada dos animais ao biotério do laboratório até a eutanásia. OVX: ovariectomia; TR: treinamento resistido; CMC: carga máxima de carregamento. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

## 5.8 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DOS TECIDOS

Ao término do experimento, todos os animais foram submetidos à eutanásia por meio do método de decapitação, realizada sob leve efeito anestésico com isoflurano seguindo as diretrizes estabelecidas pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica- DBCA (RESOLUÇÃO NORMATIVA 55 DO CONCEA, 2023). Esse procedimento ocorreu 48 horas após a última sessão de treinamento. Os tecidos foram coletados por meio de biópsia imediatamente após a eutanásia, logo em seguida congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) para análises de expressão gênica. As amostras destinadas à respirometria foram encaminhadas imediatamente com reagente para análise, seguindo o protocolo estabelecido. Os tecidos utilizados para este estudo foram os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo onde se encontra os maiores números de mitocôndrias cardíacas. O útero também foi examinado para avaliar e comparar a massa e o tamanho entre os grupos INT e OVX.

## 5.9 ANÁLISE DA FUNÇÃO RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

### 5.9.1 Coleta e Preparação das Amostras

Os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo foram cuidadosamente coletados e imersos imediatamente em solução preservadora, composta pelos seguintes componentes: BIOPS:

(tampão Ca-EGTA 10mM, cálcio livre 0,1  $\mu$ M, imidazol 20 mM, taurina 20 mM, K-MÊS 50 mM, DTT 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 6,56 mM, ATP 5,77 mM, fosfocreatina 15mM, pH 7,1) por 5 minutos no gelo (LETELLIER *et al.*, 1992). Após esse período os tecidos foram dissecados para possibilitar a remoção de duas amostras dos cardiomiócitos com massa úmida pesando em torno de 4-6mg.

### 5.9.2 Permeabilização Mecânica e Química

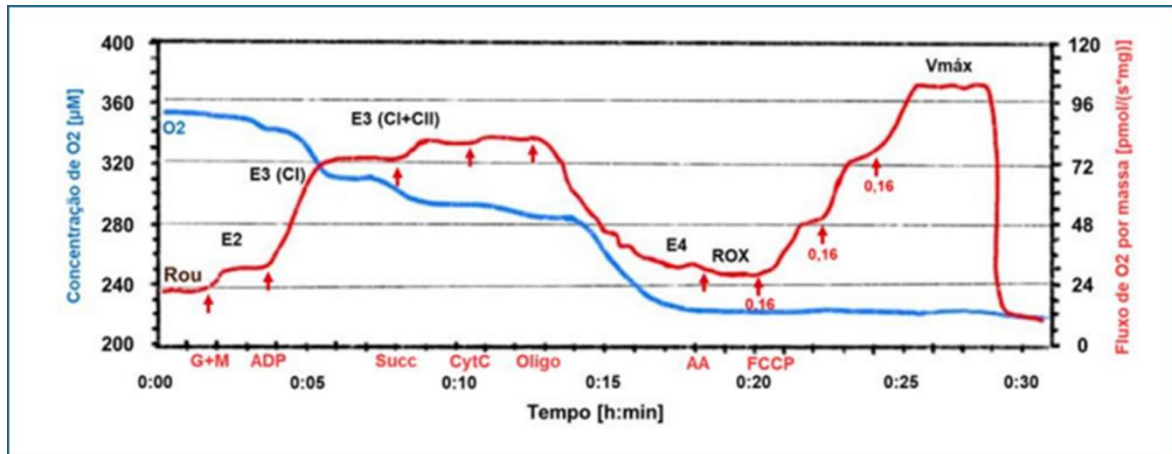
As amostras dos tecidos dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo passaram pelo procedimento de permeabilização mecânica, utilizando uma pinça histológica e uma agulha sobre gelo em uma placa de Petri. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma permeabilização química, permanecendo por dez minutos em uma solução gelada de BIOPS, que continha 5 mg/mL de saponina, sendo agitadas suavemente em uma câmara refrigerada. Posteriormente ainda em agitação leve, os tecidos foram transferidos para uma solução respiratória mitocondrial número 5 (MiR05) por 15 minutos (GNAIGER, 2012).

### 5.9.3 Análise da Função Respiratória

O consumo de oxigênio das amostras permeabilizadas foi medido por meio da técnica de Respirometria de Alta Resolução (HRR) no oxígrafo OROBOROS® (*Innsbruck, Áustria*). As amostras foram colocadas em cubas separadas no equipamento (cubas A e B) em meio de análise respiratória mitocondrial contendo 2 mL de MiR05 (0,5 mmol/L EGTA, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, ácido lactobiônico 60 mmol/L, taurina 20 mmol/L, 10 mM/L KH 2 PO 4, 20 mmol/L de HEPES, 110 mmol/L de sacarose, 1 g/L de BSA, pH = 7,0). As titulações realizadas para a análise da respiração mitocondrial foram adaptadas do protocolo proposto por Kuznetsov *et al.* (2008) com as seguintes adições: 10 mmol/mL de glutamato (Glu) e 5 mmol/mL de malato (Mal) em ambas as cubas para estimular a respiração de repouso sem estímulo (respiração de fuga ou Estado 2); adição de 500  $\mu$ M de ADP para estimular o Complexo I da cadeia respiratória (respiração acoplada ou Estado 3); adição de 10  $\mu$ M de succinato (Succ) para estimular o Complexo II da cadeia respiratória; adição de 10  $\mu$ M de citocromo c (CytC) para teste de integridade da membrana externa mitocondrial (TEPP *et al.*, 2011); após o alcance do limiar máximo de estímulo e estabilização, adição de 1  $\mu$ M de oligomicina (Oligo) para inibir o Complexo V da cadeia respiratória (respiração com vazamento experimental ou Estado 4); para identificar o consumo residual de oxigênio (ROX) foi adicionado 2,5 mM de antimicina A; para finalizar a análise e adicionado incrementos (titulações graduais) em 0,5  $\mu$ M de carbonilcianeto-

p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) com o intuito de obter um estado respiratório experimentalmente não acoplado máximo para avaliação da capacidade respiratória através do sistema de transferência de elétrons (capacidade ETS) (CHANCE; WILLIAMS, 1955; GNAIGER, 2012).

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



**Descrição:** Linha Azul: consumo de oxigênio da cuba; Linha Vermelha: velocidade de consumo de oxigênio do tecido; G+M: glutamato + malato; ADP: adenosina difosfato; Succ: succinato; Oligo: oligomicina; AA: antimicina A; FCCP: carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona; ROU: routine ou estado inicial sem estímulo; E2: estado 2; E3: estado 3; E4: estado 4; ROX: consumo residual de oxigênio; Vmax: estado respiratório não acoplado máximo. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

## 5.10 EXPRESSÃO GÊNICA

A avaliação da expressão gênica foi conduzida através da mensuração do RNA utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR), precedida pela etapa de Transcrição Reversa. Este procedimento foi executado nos Laboratórios de Bioquímica e Genética Aplicada, bem como no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos localizados na Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR). O experimento seguiu as orientações estabelecidas nas Diretrizes de Informações Mínimas para Publicação de Experimentos Quantitativos de PCR em Tempo Real (MIQE). O objetivo é assegurar a confiabilidade, integridade e consistência dos resultados obtidos, promovendo uma abordagem transparente no desenvolvimento experimental (BUSTIN *et al.*, 2009).

### 5.10.1 Cuidados Gerais

Para prevenir a presença de ácidos ribonucleases (RNAses) e outras possíveis contaminações nos tecidos analisados, foram implementados cuidados rigorosos ao longo de todo o experimento. Isso incluiu medidas como a esterilização por autoclavagem de materiais descartáveis, microtubos, ponteiras, instrumentos cirúrgicos e vidrarias. Além disso, foi

realizado uma limpeza frequente de todas as superfícies, abrangendo bancadas, equipamentos e pipetas, utilizando uma solução de etanol 70%, água destilada e agente de descontaminação de superfícies (*RNaseZap - Invitrogen™*); Todos os procedimentos foram conduzidos utilizando luvas descartáveis e máscara, dentro da capela de exaustão, garantindo um ambiente seguro e controlado livre de contaminações.

#### 5.10.2 Extração e Purificação do RNA total

O processo de extração e purificação do RNA total seguiu o protocolo do TRI Reagent Protocolo: 50 mg de tecido muscular cardíaco foi colocado em microtubos de 2 mL com tampa de rosca (*FastPrep*), contendo 3 esferas de aço inoxidável de 3mm (*Lysing Matrix S, Bulk, MP Biomedicals, Solon, Ohio, EUA*) em 1 mL de TRI Reagent® (Sigma, EUA). As amostras foram homogeneizadas usando os instrumentos *FastPrep® - 24 Classic (MP Biomedicals, Solon, Ohio, EUA)* em 1 mL de TRI Reagent® em rotação por 30 segundos com intervalos de 1 minuto, retirando os microtubos periodicamente e mantendo-os em gelo 3 vezes, totalizando 3 ciclos de 30 segundos de rotação com 2 intervalos de 1 minuto no gelo.

Após a homogeneização completa, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionado mL (200 µL) de clorofórmio com agitação por 15 segundos no Vórtex K45-2810 (KASVI, BR), seguido de incubação por 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas na Sigma 1-14k (*Sigma Laborzentrifugen, Alemanha*) a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa contendo RNA) foi transferido para microtubos vazios de 1,5 mL tipo Ependorf, acrescido de 0,5 mL (500 µL) de isopropanol. As amostras foram agitadas manualmente e permaneceram à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos a 4°C para precipitar o RNA, formando um pellet no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado manualmente em um recipiente apropriado, e 1 mL de etanol 75% foi adicionado a cada amostra para lavagem. O sobrenadante foi novamente descartado, e os microtubos deixados para secar ao ar ambiente por 5 a 10 minutos, garantindo uma secagem adequada do pellet. Após a completa secagem foi adicionado 20 µL de água livre de RNase (*Invitrogen*). As amostras foram incubadas em estufa a 42°C por 10 minutos e em seguida armazenadas em um freezers a -80°C.

### 5.10.3 Quantificação do RNA total

A avaliação quantitativa do RNA presente nas amostras foi conduzida utilizando o método de espectrofotometria com o NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*<sup>TM</sup>). Este procedimento consiste em determinar a absorbância nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. A pureza das amostras, em relação à possível contaminação por proteínas, foi avaliada pela razão  $A_{260/280}$ , sendo considerados adequados os valores situados entre 1,9 e 2,1. Quanto a outros agentes contaminantes, a pureza será avaliada pela razão  $A_{260/230}$ , sendo considerado valores adequados aqueles entre 1,5 e 1,8.

### 5.10.4 Integridade do RNA total

A integridade do RNA foi confirmada por meio da visualização em luz ultravioleta das bandas ribossomais 28S e 18S do padrão de eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2%. As amostras foram coradas utilizando brometo de etídio.

### 5.10.5 Transcrição Reversa- DNA Complementar (cDNA)

Para prevenir possíveis contaminações com moléculas de DNA genômico, as amostras de RNA foram submetidas ao tratamento com DNase I, Amplification Grade (*Invitrogen Corporation*), seguindo as instruções do fabricante. Em microtubos de 0,2 mL foram combinados os seguintes componentes: 7 µl de água tratada com DEPC, 1 µl de RNA (amostra), 1 µL de Buffer com MgCl<sub>2</sub> 10X e 1 µL de DNase I. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 µL de EDTA, e as amostras colocadas no Termociclador C1000<sup>TM</sup> ThermalCycler (*Bio-Rad*) por 10 minutos a 65°C. Para a etapa seguinte, foram adicionados 4,2 µL de água tratada com DEPC e 1 µL de Primer Oligo dT (*Promega Corporation*). As amostras foram novamente incubadas no Termociclador por 5 minutos a 65°C. Na sequência, adicionados 1 µL de 10X RT Random Primers, 2 µL de 10X RT Buffer, 0,8 µL de 25X dNTP mix e 1 µL de Transcriptase Reversa (*MultiScribe*<sup>TM</sup>). A síntese de cDNA ocorreu em 25°C por 10 minutos, seguido por incubação a 37°C por um tempo total de 120 minutos. A reação foi paralisada por meio da incubação a 85°C por 5 minutos.

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

Para realizar as reações de qPCR, foram empregadas microplacas de 0,1 mL MicroAmp<sup>®</sup> Fast 96-well (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>), as quais possuem 96 poços livres de RNase e tampas plásticas que permitem a passagem de luz. Em cada poço, foram adicionados os

seguintes reagentes: 3  $\mu\text{L}$  de Primer Forward e Reverse, 3  $\mu\text{L}$  de cDNA e 6  $\mu\text{L}$  de GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (*Promega*). As amostras foram submetidas a uma centrifugação a 2.000 rpm por 2 minutos a uma temperatura de 25°C e, em seguida, processadas no sistema de detecção por PCR em tempo real QuantStudio™ 6 Flex (Applied Biosystems). O programa de ciclagem térmica foi estabelecido com uma etapa inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A curva de melting foi determinada através da variação da temperatura em 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. Após a corrida, a temperatura de melting dos primers foi analisada para confirmar a especificidade da amplificação. Todas as amostras foram amplificadas em duplicata, e em todas as análises incluídas controles negativos (NTC), nos quais a água estéril substituiu a amostra. A análise comparativa dos resultados foi conduzida com base na derivação da fórmula  $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os dados de Cq foram exportados e analisados em planilha por meio do programa Excel (Microsoft Corporation). O  $\Delta Cq$  foi calculado subtraindo  $\Delta Cq$  pela média de  $\Delta Cq$  (grupo controle - INT-SED). O resultado negativo ( $-\Delta\Delta Cq$ ) foi então elevado à potência de 2 ( $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ ).

#### 5.10.7 Controle de qualidade, concentração e eficiência dos Primers

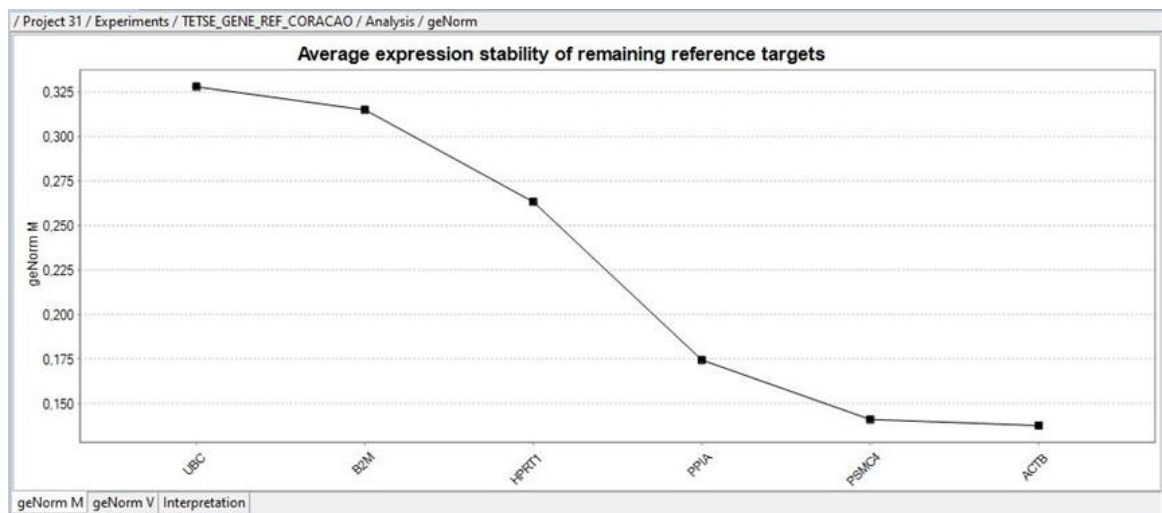
Os genes analisados foram obtidos por meio do National Center for Biotechnology Information (NCBI), sendo também realizado um BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) como forma de garantir a amplificação correta e específica dos genes utilizados na pesquisa.

Para a normalização dos dados de expressão gênica obtidos por RT-qPCR foi indicado o gene de referência PSMC4 (proteasome 26S subunit ATPase 4) e o ACTB ( $\beta$ -actina) por aparecerem mais estável entre os genes testados, sendo candidatos ideais para a normalização em análises de expressão gênica.

A escolha seguiu o protocolo descrito por Vandesomepele *et al.* (2002), utilizando o algoritmo geNorm para avaliar a estabilidade de expressão de seis genes candidatos específicos para o tecido cardíaco. Inicialmente, as amostras de todos os grupos experimentais INT-SED, INT-TR, OVX-SED e OVX-TR foram analisados quanto à expressão desses genes candidatos. Os valores obtidos foram processados no software qbase+, que aplica o geNorm para calcular o índice de estabilidade (valor M) e classificar os genes do mais estável ao menos estável. O *PSMC4* e o *ACTB* apresentaram o menor valor M, indicando expressão altamente consistente. A estabilidade observada garante a confiabilidade da normalização e minimiza vieses na comparação nos níveis de expressão dos genes-alvo.

O gene alvo utilizados de RT-qPCR, foram selecionados com base nos objetivos do nosso estudo. Para analisar a expressão gênica da CTE, escolhemos os genes relacionados aos complexos I, II, III, IV e V (ATPS). Também escolhemos os genes da PiC e ANT1, que em conjunto com os complexos da CTE, representam as principais proteínas envolvidas no processo da OXPHOS. A expressão gênica da enzima CS foi analisada a fim de investigar se as alterações dos componentes da OXPHOS se refletem em mudanças na capacidade oxidativa total, bem como verificar se o treinamento resistido é capaz de preservar ou restaurar o conteúdo mitocondrial induzida pela OVX.

**Figura 13.** Estabilidade da expressão dos genes de referência no coração.



**Descrição:** Análise de estabilidade dos genes de referência no tecido cardíaco, sendo escolhido pelo algoritmo gNorm os genes PSMC4- Proteasome 26S subunit, ATPase 4 e ACTB – Actin, beta ( $\beta$ -actina) Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

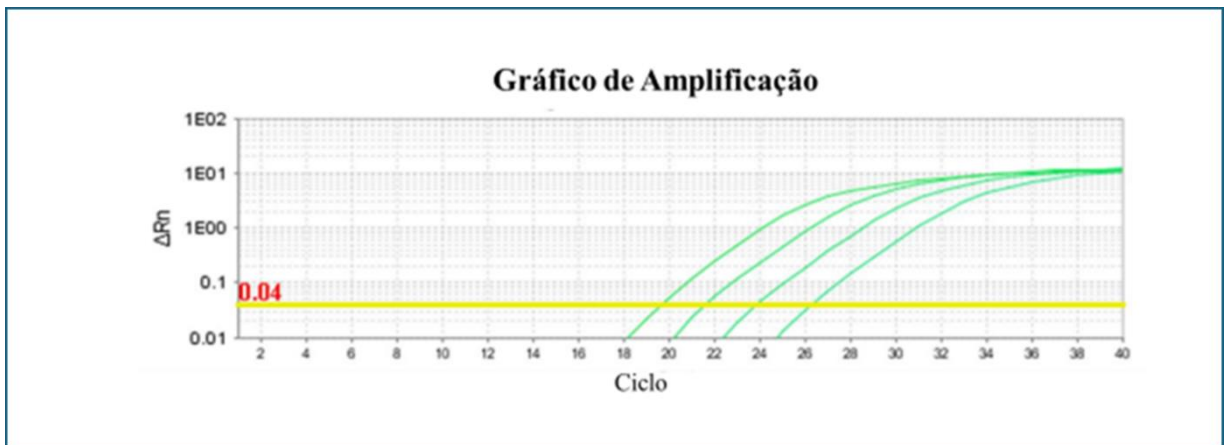
Para determinar a concentração ideal de cada primer utilizado na qPCR, foi realizada uma padronização a partir de uma matriz pré-estabelecida. Inicialmente, os primers foram testados em uma concentração definida para a avaliação da eficiência da reação.

**Tabela 2.** Matriz para padronização da concentração de primers forward e reverse em nanomolar (nM).

Primer Forward (nM)	Primer Reverse (nM)			
	100	150	300	
100	100/100	100/150	100/300	
150	150/100	150/150	150/300	
300	300/100	300/150	300/300	

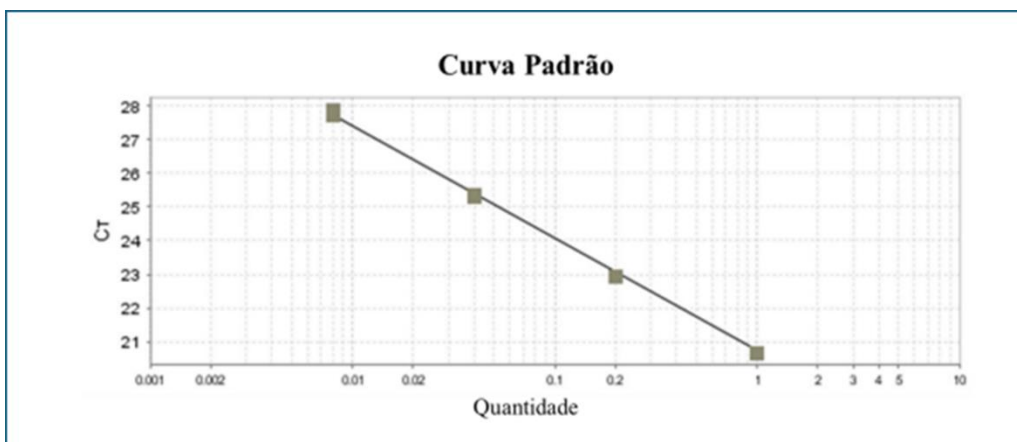
Para avaliar a eficiência das reações, foram realizadas diluições seriadas de uma amostra conhecida, sendo indicada pela inclinação (slope) da curva padrão, foram realizadas também diluições seriadas de amostras do grupo controle. Uma reação com 100% de eficiência resulta em uma curva padrão com slope de -3,32. A eficiência de amplificação é dada pela fórmula  $E = 10(-1/\text{slope}) - 1$ . Outros parâmetros como R2 e Y- intercept (ponto em que a curva corta o eixo Y) também foram obtidos neste experimento e foram cuidadosamente avaliados. Para ser considerado “eficiente”, um primer deve apresentar valor de eficiência entre 95-105%. As figuras 14, 15 e 16 mostram um exemplo destas análises.

**Figura 14.** Diluição seriada.



**Descrição:** realização de diluições seriadas para análise de eficiência das reações. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

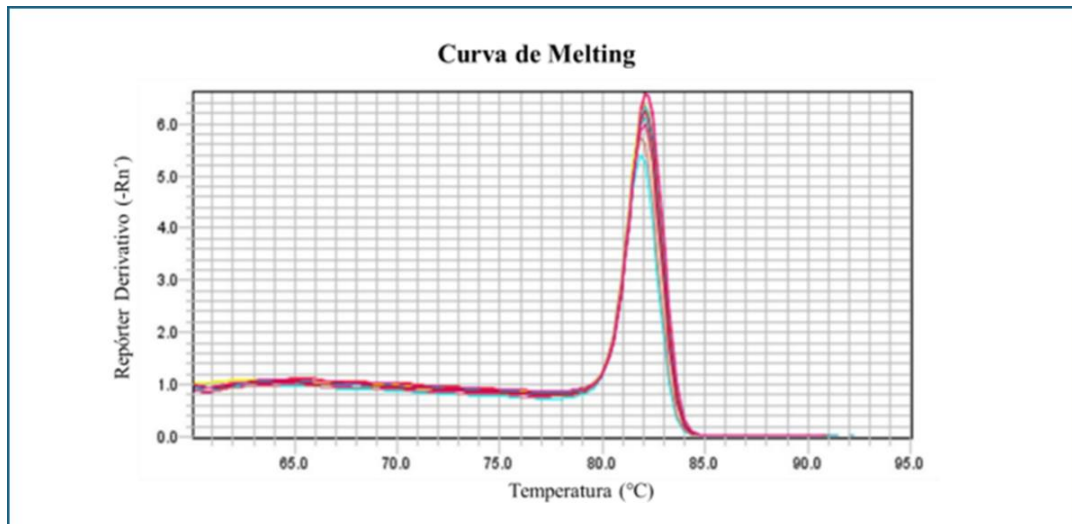
**Figura 15.** Curva padrão.



**Descrição:** exemplo de curva padrão utilizada para determinação da eficiência dos primers. O valor de eficiência deve estar entre 95 e 105%. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A Curva de Melting também foi analisada para verificar uma possível formação de dímeros ou amplificações inespecíficas, representadas pelo aparecimento de mais de um pico (Figura 16).

**Figura 16.** Curva de Melting.



**Descrição:** Exemplo de Curva de Melting utilizada para determinação da especificidade do produto amplificado. Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 5.11 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE

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

## 5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*, seguido pela aplicação da análise de variância ANOVA *One-Way*. Posteriormente, foram conduzidos os testes de comparações múltiplas de Tukey e Fisher, estabelecendo um nível de significância estatística de ( $p < 0,05$ ). No que diz respeito à comparação da Carga Máxima de Carregamento (CMC) e massa corporal dos animais, foi empregado o teste t de student, também considerando um nível de significância estatística de ( $p < 0,05$ ). A apresentação dos resultados foi realizada por meio da média  $\pm$  Desvio Padrão (DP), e tanto a análise estatística quanto a plotagem dos gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prisma 8.2.1.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 EVOLUÇÃO DAS CARGAS DE CARREGAMENTO

A Tabela 3 apresenta a evolução da carga máxima de carregamento (CMC), da carga absoluta de carregamento (CAC) e da carga relativa de carregamento (CRC) ao longo das 20 semanas de treinamento resistido nos grupos INT-TR e OVX-TR.

No grupo INT-TR, a CMC aumentou progressivamente de ( $343,60 \pm 41,45$  g) na semana 1 para ( $788,53 \pm 1,43$  g) na semana 20. Foram observadas diferenças significativas a partir da semana 5 ( $506,16 \pm 21,75$  g) em relação à semana 1, na semana 10 ( $653,96 \pm 9,65$  g) em relação à 5, na semana 15 ( $760,70 \pm 4,28$  g) em relação à semana 10 e a semana 20 ( $788,53 \pm 1,43$  g) em relação a 15, evidenciando um aumento consistente da força muscular ao longo do período de treinamento. O aumento da CMC demonstra melhoria contínua na capacidade de carga até a 20ª semana.

De forma semelhante o grupo OVX-TR também apresentou aumento progressivo da CMC, partindo de ( $369,60 \pm 13,58$  g) na semana 1 para ( $790,20 \pm 44,44$  g) na semana 20. Foram observadas diferenças significativas a partir da semana 5 ( $516,48 \pm 1,53$  g) em relação à semana 1, na semana 10 ( $657,27 \pm 2,23$  g) em relação à 5, na semana 15 ( $761,47 \pm 1,10$  g) em relação à 10 e a semana 20 ( $790,20 \pm 4,44$  g) em relação à 15. Ao comparar os grupos, nota-se que o OVX-TR apresentou um desempenho semelhante ao grupo INT-TR praticamente em todas as semanas sugerindo que o TR foi capaz de compensar os efeitos da deficiência estrogênica, permitindo ganhos expressivos de força mesmo na ausência de estrogênio.

Na carga absoluta de carregamento (CAC) apresentou padrão de evolução semelhante à CMC. No grupo INT-TR houve aumento de  $(603,20 \pm 61,36 \text{ g})$  na semana 1, para  $(1078,33 \pm 22,12 \text{ g})$  na semana 20. Foram observadas diferenças significativas a partir da semana 5  $(782,16 \pm 32,09 \text{ g})$  em relação à semana 1, na semana 10  $(936,96 \pm 22,60 \text{ g})$  em relação a semana 5, na semana 15  $(1049,50 \pm 15,48 \text{ g})$  em relação à 10, a semana 20  $(1078,33 \pm 22,12 \text{ g})$  em relação a 15 promovendo progresso na carga absoluta com o avanço do treinamento. No grupo OVX-TR, a CAC também aumentou significativamente, considerando de  $(658,00 \pm 30,56 \text{ g})$  na semana 1 para  $(1130,00 \pm 24,84 \text{ g})$  na semana 20. As diferenças significativas também foram observadas a partir da semana 5  $(826,08 \pm 23,79 \text{ g})$  em relação à semana 1, na semana 10  $(978,4 \pm 28,74 \text{ g})$  em relação à 5, na semana 15  $(1097,47 \pm 37,65 \text{ g})$  em relação à 10 e a semana 20  $(1130,00 \pm 24,84 \text{ g})$  em relação à semana 15. Assim como observado para a CMC, o grupo OVX-TR apresentou valores muito próximos ao INT-TR, reforçando que o TR promove ganhos de força, independente do estado ovariano.

Na carga relativa de carregamento (CRC) apresenta a relação entre a carga levantada e a massa corporal, também apresentou um aumento significativo ao longo das 20 semanas em ambos os grupos. O grupo INT-TR apresentou aumento de  $(1,32 \pm 0,08 \text{ g/g})$  na semana 1 para  $(2,73 \pm 0,18 \text{ g/g})$  na semana 20, com diferenças significativas a partir da semana 5  $(1,84 \pm 0,10 \text{ g/g})$  em relação à semana 1, a semana 10  $(2,32 \pm 0,13 \text{ g/g})$  em relação à 5, a semana 15  $(2,64 \pm 0,11 \text{ g/g})$  em relação à semana 10 e a semana 20  $(2,73 \pm 0,18 \text{ g/g})$  em relação à 15. O grupo OVX-TR apresentou também um aumento de  $(1,28 \pm 0,07 \text{ g/g})$  na semana 1 e  $(2,34 \pm 0,17 \text{ g/g})$  na semana 20, com diferenças significativas a partir da semana 5  $(1,65 \pm 0,12 \text{ g/g})$  em relação à semana 1, a semana 10  $(2,06 \pm 0,19 \text{ g/g})$  em relação à 5, a semana 15  $(2,29 \pm 0,26 \text{ g/g})$  em relação à semana. Embora ambos os grupos tenham demonstrado evolução expressiva da carga relativa, o INT-TR manteve valores ligeiramente superiores de CRC nas semanas finais, indicando melhor eficiência relativa de força nos animais intactos, em função da manutenção do perfil hormonal fisiológico.

Esses resultados confirmam que o treinamento resistido foi eficaz em promover adaptações positivas, mesmo em condições fisiológicas como a ausência de estrogênio. Esses dados confirmam a importância do TR como estratégia terapêutica para mitigar a perda de força e massa muscular em modelos experimentais na menopausa.

**Tabela 3.** Evolução da Carga Máxima de Carregamento (CMC), Carga Absoluta de Carregamento (CAC), e Carga Relativa de Carregamento (CRC).

Evolução da CMC, CAC e CRC (g) do Treinamento Resistido (TR)										
Semanas	Sem 1		Sem 5		Sem 10		Sem 15		Sem 20	
GRUPOS	INT-TR	OVX-TR	INT-TR	OVX-TR	INT-TR	OVX-TR	INT-TR	OVX-TR	INT-TR	OVX-TR
CMC	343,60	369,60	506,16	516,48	653,96	657,27	760,70	761,47	788,53	790,20
	± 41,45	± 13,58	± 21,75 <sup>a</sup>	± 1,53 <sup>a</sup>	± 9,65 <sup>a,b</sup>	± 2,23 <sup>a,b</sup>	± 4,28 <sup>a,b,c</sup>	± 1,10 <sup>a,b,c</sup>	± 1,43 <sup>a,b,c,d</sup>	± 4,44 <sup>a,b,c,d</sup>
CMA	603,20	658,00	782,16	826,08	936,96	978,4	1049,50	1097,47	1078,33	1130,00
	± 61,36	± 30,56	± 32,09 <sup>a</sup>	± 23,79 <sup>a</sup>	± 22,60 <sup>a,b</sup>	± 28,74 <sup>a,b</sup>	± 15,48 <sup>a,b,c</sup>	± 37,65 <sup>a,b,c</sup>	± 22,12 <sup>a,b,c,d</sup>	± 24,84 <sup>a,b,c,d</sup>
CMR	1,32	1,28	1,84	1,68	2,32	2,06	2,64	2,29	2,73	2,34
	± 0,08	± 0,07	± 0,10 <sup>a</sup>	± 0,12 <sup>a</sup>	± 0,13 <sup>a,b</sup>	± 0,19 <sup>a,b</sup>	± 0,11 <sup>a,b,c,*</sup>	± 0,26 <sup>a,b,c</sup>	± 0,18 <sup>a,b,c,*</sup>	± 0,17 <sup>a,b,c</sup>

**Descrição:** Letras sobrescritas indicam diferenças significativas entre as semanas: (a) em relação à semana, (b) em relação à semana 5, (c) em relação à semana 10, (d) em relação à semana 15 ( $p < 0,005$ ). Símbolo: \* diferença significativa para o grupo OVX-TR ( $p < 0,05$ ).

## 6.2 EVOLUÇÃO PONDERAL DA MASSA CORPORAL E MASSA UTERINA FINAL

Na Tabela 4 apresenta-se a evolução da massa corporal (g) dos grupos experimentais INT-SED (intacto sedentário), INT-TR (intacto treinado), OVX-SED (ovariectomizado sedentário) e OVX-TR (ovariectomizado treinado) ao longo das semanas 1, 5, 10, 15 e 20 de experimento, bem como a massa uterina (g) aferida ao término do protocolo experimental. Observou-se um aumento progressivo da massa corporal em todos os grupos ao longo do período experimental, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as semanas específicas, indicadas pelas letras sobrescritas na tabela, e entre os diferentes grupos analisados.

No grupo INT-SED, a massa corporal aumentou progressivamente de  $260,40 \pm 9,86$  g na semana 1 para  $294,00 \pm 10,75$  g na semana 20. Foram observadas diferenças significativas a partir da semana 10 ( $272,60 \pm 13,16$  g) em relação à semana 1, bem como nas semanas 15 ( $283,40 \pm 11,44$  g) e 20 ( $294,00 \pm 10,75$  g), indicando um ganho de peso contínuo ao longo do período experimental. Além disso, o grupo INT-SED apresentou diferenças significativas em todas as semanas quando comparado ao grupo OVX-SED e, a partir da semana 5, também apresentou diferença significativa em relação ao grupo OVX-TR, demonstrando que os animais intactos mantiveram peso corporal inferior aos ovariectomizados ao longo do estudo.

De forma semelhante, o grupo INT-TR apresentou aumento progressivo da massa corporal, passando de  $270,00 \pm 23,61$  g na semana 1 para  $296,00 \pm 23,16$  g na semana 20. Foram

observadas diferenças significativas a partir da semana 10 ( $284,40 \pm 18,94$  g) em relação à semana 1, mantendo-se nas semanas 15 ( $285,60 \pm 12,78$  g) e 20 ( $296,00 \pm 23,16$  g). Também foram observadas diferenças significativas entre as semanas 15 e 5, e 20 e 5, indicando um padrão de aumento corporal semelhante ao observado no grupo sedentário, embora com leve modulação promovida pelo treinamento físico. Assim como o INT-SED, o grupo INT-TR apresentou diferenças significativas em todas as semanas quando comparado ao grupo OVX-SED, e a partir da semana 5 em relação ao grupo OVX-TR, confirmando o efeito do estado ovariano sobre a regulação do peso corporal.

O grupo OVX-SED apresentou o maior ganho de massa corporal entre todos os grupos experimentais, aumentando de  $296,00 \pm 9,76$  g na semana 1 para  $377,33 \pm 22,54$  g na semana 20. Foram observadas diferenças significativas a partir da semana 5, indicando um aumento progressivo e consistente ao longo do período experimental. Esse resultado reflete o impacto da ausência de estrogênio na regulação metabólica e no controle do peso corporal. Além disso, o grupo OVX-SED apresentou valores significativamente maiores em relação a todos os demais grupos em todas as semanas analisadas, confirmando que a ovariectomia promove um ganho ponderal acentuado.

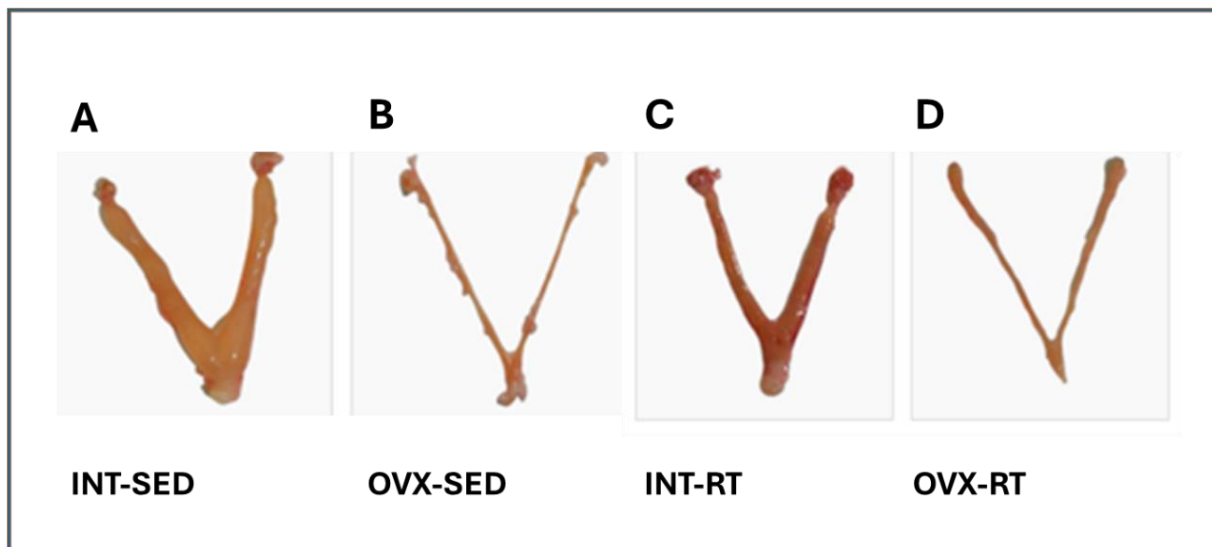
Já o grupo OVX-TR também apresentou aumento significativo da massa corporal, passando de  $287,00 \pm 17,34$  g na semana 1 para  $344,75 \pm 27,60$  g na semana 20. Foram observadas diferenças significativas a partir da semana 5 ( $318,25 \pm 26,18$  g), mantendo-se nas semanas 10 ( $331,25 \pm 27,75$  g), 15 ( $344,25 \pm 36,37$  g) e 20 ( $344,75 \pm 27,60$  g) em relação à semana 1, caracterizando um ganho de peso progressivo, porém em menor magnitude que o observado no grupo OVX-SED. Esses achados indicam que o treinamento físico atenuou o ganho ponderal induzido pela ovariectomia, embora não tenha sido suficiente para restaurar o padrão observado nos grupos intactos.

Quanto à massa uterina, o grupo OVX-SED ( $0,17 \pm 0,04$  g), e OVX-TR ( $0,22 \pm 0,03$ g) apresentaram valores significativamente menores em comparação aos grupos INT-SED ( $0,88 \pm 0,08$  g) e INT-TR ( $0,86 \pm 0,06$  g). Essa diferença confirma a eficácia do procedimento de ovariectomia na indução da atrofia uterina decorrente da privação estrogênica.

**Tabela 4.** Evolução Ponderal da Massa corporal (g) e massa uterina (g).

GRUPOS	Massa Corporal (g)					Massa do Útero (g)
	Semanas					
	SEM 1	SEM 5	SEM 10	SEM 15	SEM 20	
<b>INT-SED</b>	260,40 ± 9,86*	265,80 ± 9,34* <sup>#</sup>	272,60 ± 13,16 <sup>a,*</sup> <sup>#</sup>	283,40 ± 11,44 <sup>a,*</sup> <sup>#</sup>	294,00 ± 10,75 <sup>a,b,*</sup> <sup>#</sup>	0,88 ± 0,08* <sup>#</sup>
<b>INT-TR</b>	270,00 ± 23,61	279,00 ± 21,82* <sup>#</sup>	284,40 ± 18,94 <sup>a,*</sup> <sup>#</sup>	285,60 ± 12,78 <sup>a,b,*</sup> <sup>#</sup>	296,00 ± 23,16 <sup>a,b,*</sup> <sup>#</sup>	0,86 ± 0,06* <sup>#</sup>
<b>OVX-SED</b>	296,00 ± 9,76	335,50 ± 16,50 <sup>a</sup>	359,00 ± 15,25 <sup>a,b</sup>	352,00 ± 27,25 <sup>a,b</sup>	377,33 ± 2,52 <sup>a,b</sup>	0,17 ± 0,04
<b>OVX-TR</b>	287,00 ± 17,34	318,25 ± 26,18 <sup>a</sup>	331,25 ± 27,75 <sup>a,b</sup>	344,25 ± 36,37 <sup>a,b</sup>	344,75 ± 27,66 <sup>a,b</sup>	0,22 ± 0,03

**Descrição:** Letras sobrescritas indicam diferenças significativas entre as semanas: (a) em relação à semana, (b) em relação à semana 5, (c) em relação à semana 10, (d) em relação à semana 15 ( $p < 0,005$ ). Símbolos: \* diferença significativa para o grupo OVX-SED, e # diferença significativa para o grupo OVX-TR ( $p < 0,05$ ).

**Figura 17.** Análise comparativa macroscópica do tecido uterino entre os grupos experimentais.

**Descrição:** A: INT-SED intacto sedentário, B: OVX-SED ovariectomizado sedentário, C: INT-RT intacto treinamento resistido, D: OVX-RT ovariectomizado treinado. Fonte: próprio autor (2024).

A Figura 17 apresenta a análise comparativa macroscópica dos diferentes grupos experimentais, a fim de ilustrar visualmente os efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre o tecido uterino. Esta análise, ainda que de natureza qualitativa, permite observar as diferenças evidentes entre os grupos experimentais como alterações no volume, espessura e coloração do útero. Observa-se na Figura 17A o grupo INT-SED um útero com aspecto preservado, apresentando maior espessura e coloração mais intensa, a Figura 17B o grupo OVX-SED demonstra evidentemente uma redução da massa e do volume tecidual, além da

coloração mais pálida e afinamento das estruturas, a Figura 17C o grupo INT-RT manteve a estrutura preservada, a figura 17D o grupo OVX-RT demonstra aumento discreto da massa uterina. Essas figuras contribuem para a compreensão dos efeitos da ovariectomia e do treinamento resistido sobre o tecido uterino.

### 6.3 EXPRESSÃO GÊNICA

#### 6.3.1 Expressão dos genes PSMC4 relacionado à CTE (CI a CIV) nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo

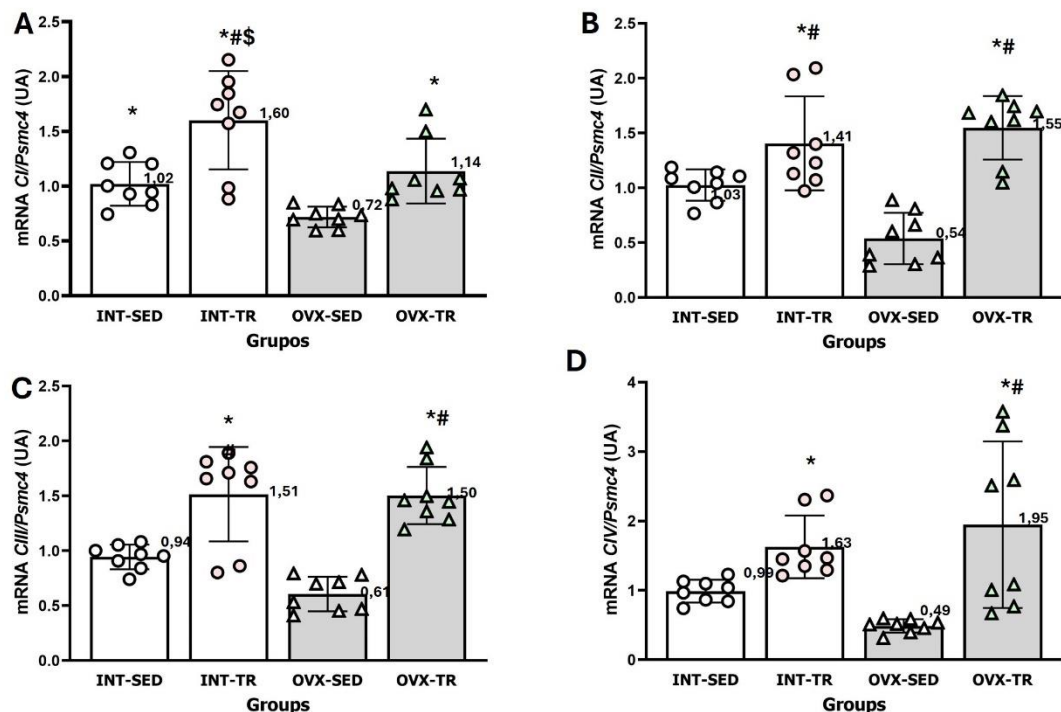
A Figura 18A, demonstra a expressão gênica no complexo I que foi significativamente reduzida no grupo OVX-SED, comprometendo negativamente a regulação gênica mitocondrial. Em contrapartida, os grupos treinados promoveram um aumento na expressão INT-RT ( $p = 0,0001$ ) quanto no OVX-RT ( $p = 0,0351$ ), sendo a resposta mais pronunciada no grupo INT-RT. Os grupos treinados (INT-RT e OVX-RT) promoveram um aumento significativo na expressão gênica do Complexo I. O grupo INT-RT e o OVX-RT demonstraram aumento significativo ( $p = 0,0023$ ) e ( $p = 0,0173$ ) quando comparado ao INT-SED, além disso o grupo INT-RT teve um aumento significativo quando comparado ao OVX-SED ( $p = 0,0002$ ).

Na Figura 18B, o succinato desidrogenase (CII) foi significativamente reduzido no grupo OVX-SED em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ), este complexo integra tanto a CTE quanto o Ciclo de Krebs, sendo essencial para a oxidação do succinato em fumarato e transferência de elétrons para a ubiquinona, a baixa expressão sugere disfunção no acoplamento metabólico energético. Por outro lado, os grupos treinados promoveram um aumento significativo na expressão de CII no grupo INT-RT ( $p = 0,0123$ ) quando comparado ao INT-SED, e o OVX-RT ( $p = 0,0001$ ) quando comparado ao OVX-SED. Além disso, o grupo INT-RT apresentou maiores níveis de significância quando comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0002$ ), enquanto o OVX-RT também apresentou maiores níveis de significância quando comparado ao INT-SED ( $p = 0,0069$ ) e ao OVX-SED ( $p = 0,0001$ ).

Na Figura 18C, a expressão do gene CIII/Psmc4 foi significativamente reduzida no grupo OVX-SED quando comparado aos demais grupos. Observamos um aumento na expressão gênica dos grupos treinados, o grupo INT-RT apresentou diferenças significativas quando comparado ao grupo INT-SED ( $p = 0,0013$ ) e OVX-SED ( $p = 0,0002$ ), enquanto o grupo OVX-RT teve uma diferença significativa tanto do INT-SED ( $p = 0,0016$ ) quanto do OVX-SED ( $p = 0,0001$ ).

Na Figura 18D, o citocromo c oxidase (complexo IV) a expressão gênica foi reduzida significativamente no grupo OVX-SED quando comparado aos grupos treinados. Essa enzima representa a última etapa da cadeia transportadora de elétrons e sua baixa expressão pode indicar prejuízos na capacidade da fosforilação oxidativa. O grupo INT-RT apresentou um aumento na expressão em relação ao OVX-SED ( $p = 0,0078$ ). O grupo OVX-RT demonstrou os níveis mais elevados de expressão com diferenças significativas tanto em relação a OVX-SED ( $p = 0,0007$ ) quanto ao INT-SED ( $p = 0,297$ ).

**Figura 18.** Análise por RT-qPCR da expressão dos genes relacionados à CTE dos complexos I ao IV dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo.



**Descrição:** Proteasome 26S Subunit, ATPase 4 (PSMC4) gene de referência endógeno. A: CI, NADH-desidrogenase; B: CII, succinato desidrogenase; C: CIII, ubiquinona, citocromo c oxidorreductase; e D: CIV, citocromo e oxidase. UA unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-RT, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-RT, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média Desvio Padrão  $\pm$ . Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste post hoc Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED, (#) diferença significativa para o grupo INT-SED, (\$) diferença significativa para o grupo OVX-RT.

### 6.3.2 Expressão dos genes PSMC4 relacionado à OXPHOS (ATPS, PiC, ANT1) nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo

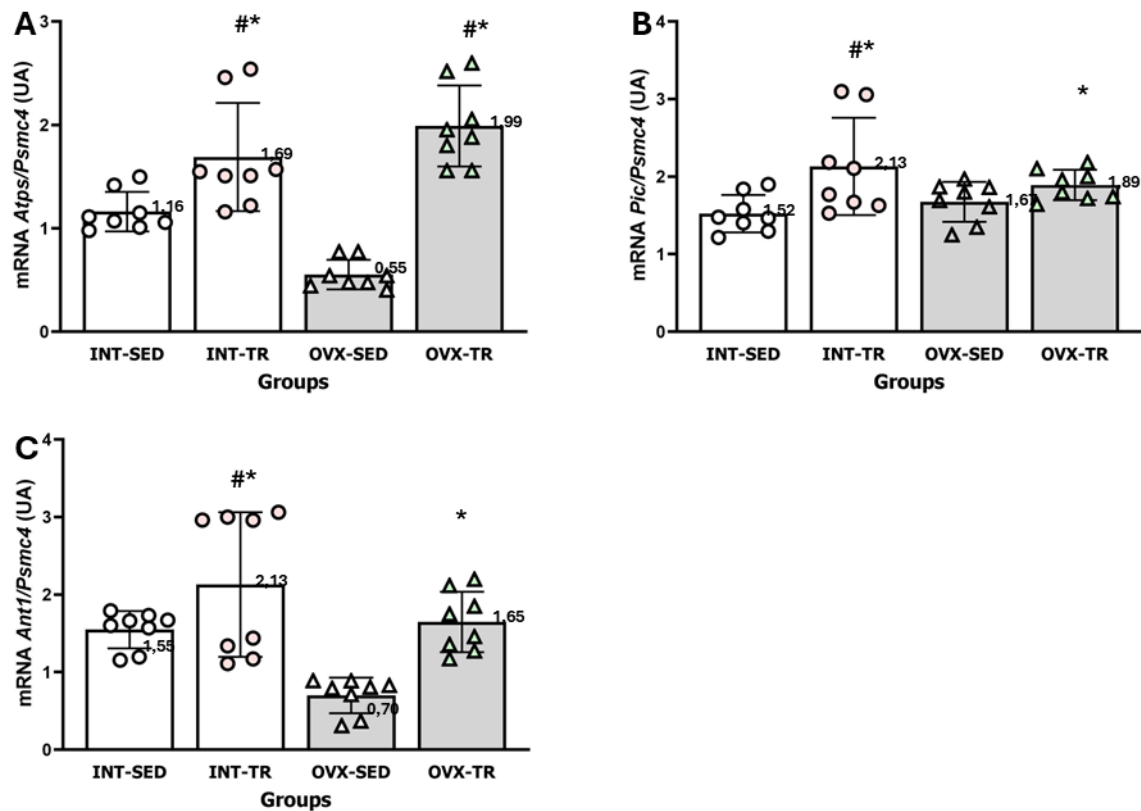
Na Figura 19A, a ATP-sintase (ATPS) é a enzima responsável por catalisar a fosforilação do ADP em ATP durante a fosforilação oxidativa. O grupo OVX-SED apresentou níveis significativamente reduzidos de expressão gênica do complexo ATPS em comparação

ao grupo INT-SED ( $p = 0,0083$ ), sugerindo que a ovariectomia pode comprometer a regulação dessa via energética. No entanto nos grupos treinados foram capazes de aumentar a expressão desse gene tanto nos grupos INT-RT ( $p = 0,0002$ ) quanto OVX-RT ( $p = 0,0001$ ), sendo que ambos os grupos treinados apresentaram níveis significativamente superior ao grupo OVX-SED.

Na Figura 19B, o carreador de fosfato mitocondrial (PiC) apresentou o grupo INT-RT níveis significativamente maiores de expressão gênica quando comparado aos grupos INT-SED ( $p = 0,0144$ ) e OVX-SED ( $p = 0,0917$ ) indicando efeito positivo do treinamento resistido mesmo em animais intactos. O grupo OVX-RT também apresentou expressão significativamente maior em relação ao grupo OVX-SED, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,6517$ ).

Na Figura 19C, A Adenine Nucleotide Translocator 1 (ANT1) aumentou significativamente a expressão de ANT1 nos grupos INT-RT e OVX-RT quando comparado aos respectivos grupos sedentários. O maior nível de expressão foi observado no grupo INT-RT que apresentou diferença significativa tanto no grupo INT-SED ( $p = 0,1505$ ) quanto do OVX-SED ( $p = 0,0002$ ). O grupo OVX-RT aumentou significativamente a expressão gênica quando comparado ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0069$ ), indicando que o exercício foi capaz de restaurar a expressão de ANT1 mesmo em condições de ovariectomia. No entanto não houve diferença significativa quando comparado os grupos OVX-RT e INT-SED ( $p = 0,9818$ ).

**Figura 19.** Análise por RT-qPCR da expressão dos genes relacionados à OXPHOS dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo.



**Descrição:** ATPs (*Psmc4*) gene de referência endógeno, PiC (carreador de fosfato mitocondrial), ANT1 (Adenine Nucleotide Translocator 1), UA unidades arbitrárias. Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-RT, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-RT, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média Desvio Padrão  $\pm$ . Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste post hoc Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED, (#) diferença significativa para o grupo INT-SED, (\$) diferença significativa para o grupo OVX-RT.

## 6.4 ANÁLISES RESPIROMÉTRICAS

### 6.4.1 Eficiência Respiratória Mitocondrial acoplada em biópsia do Coração

A Figura 20 mostra o consumo de oxigênio mitocondrial acoplado, também chamado de Estado Respiratório 3 (S3), que reflete a taxa de consumo de oxigênio quando a fosforilação oxidativa está ativa, ou seja, na presença de ADP e substratos específicos que alimentam a cadeia respiratória. Esse consumo é medido em  $[(\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg}))]$ , indicando a quantidade de oxigênio consumido por segundo por miligrama de tecido. O consumo de oxigênio foi avaliado usando (malato + glutamato), substrato que alimentam diretamente o Complexo I da cadeia respiratória inicialmente. Na figura 20A o grupo OVX-SED apresentou significativamente um consumo menor de oxigênio em relação ao INT-SED ( $p = 0,0019$ ). No entanto os grupos treinados (INT-TR e OVX-TR) apresentaram valores maiores de consumo de oxigênio que o

OVX-SED ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,0001$ ). Os grupos OVX-TR e INT-TR apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo INT-SED.

A Figura 20B, analisa o consumo de oxigênio mitocondrial acoplado no Estado Respiratório 3 (S3) na presença de substratos que alimentam os complexos I e II da cadeia respiratória (malato + glutamato) para o Complexo I e (succinato) para o Complexo II. No entanto, o grupo OVX-SED apresentou um consumo de oxigênio significativamente reduzido em comparação ao INT-SED ( $p = 0,0016$ ). O grupo OVX-TR apresentou aumento significativo em relação ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0002$ ) atingindo valores semelhantes ao grupo INT-TR, sem diferença significativa entre eles. No entanto, o grupo INT-TR apresentou valores superiores em relação ao INT-SED, indicando efeito positivo no treinamento nos animais intactos.

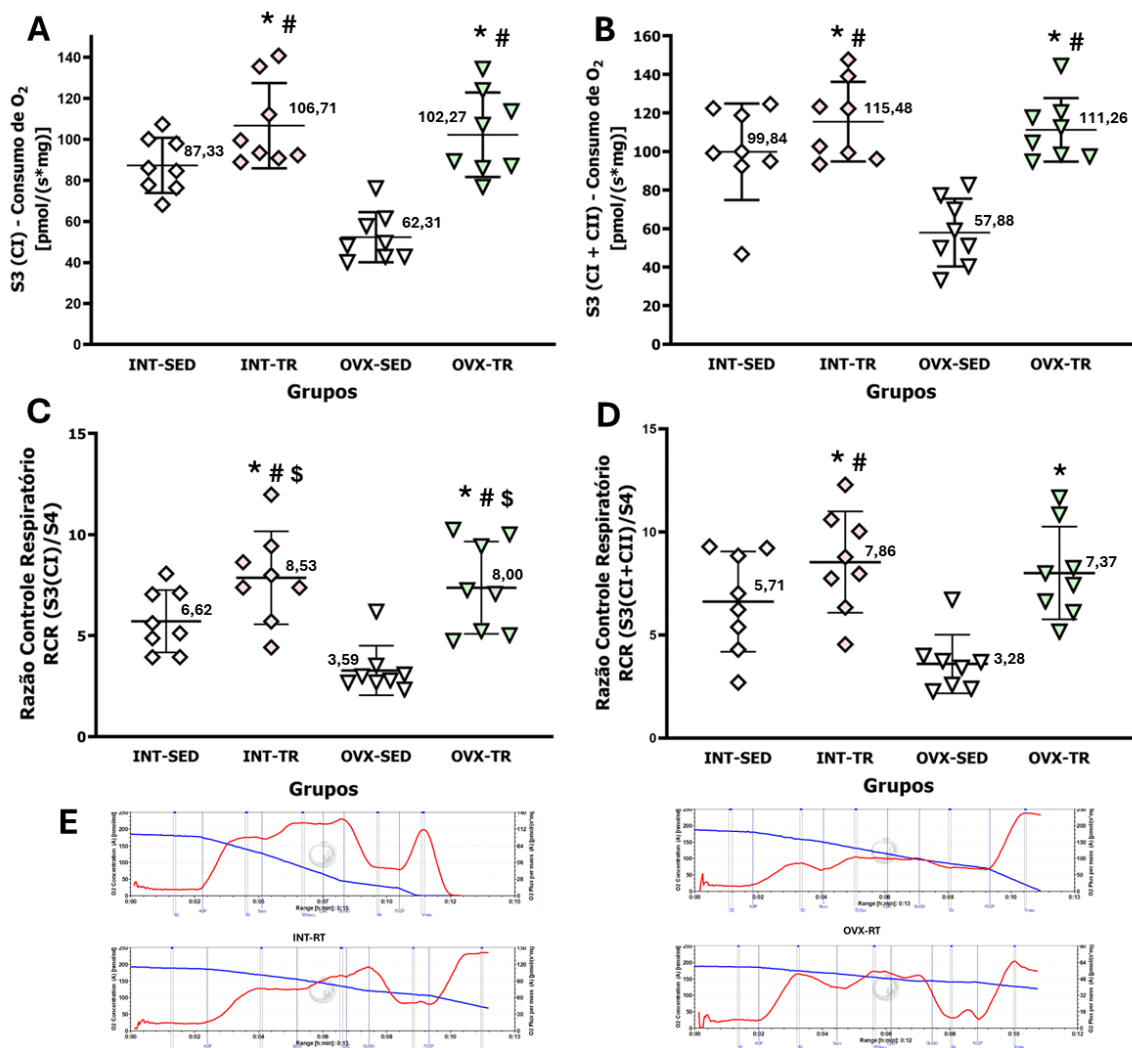
A Figura 20C, apresenta a Razão de controle respiratório (RCR), obtida pela relação entre o consumo de oxigênio no Estado 3 e no Estado 4. O grupo OVX-SED apresentou redução expressiva no RCR quando comparado aos demais grupos INT-SED ( $p = 0,0457$ ), INT-TR ( $p = 0,0006$ ) e OVX-TR ( $p = 0,0021$ ). No entanto o grupo OVX-TR apresentou aumento significativo que o OVX-SED ( $p = 0,0021$ ), não apresentando diferença significativa quando comparado aos grupos INT-SED e INT-TR. O grupo INT-TR apresentou aumento significativo em relação ao OVX-SED e ao INT-SED, atingindo a maior média observada. De forma semelhante, o grupo OVX-TR apresentou valores significativamente maiores em relação ao OVX-SED, além de diferir do INT-SED, não havendo diferença em relação ao INT-TR.

A Figura 20D, razão de controle respiratório (RCR), utilizado como marcados da eficiência mitocondrial e da integridade da organela. O grupo OVX-SED apresentou uma redução significativa de RCR em comparação aos grupos treinados INT-TR e OVX-TR com valor de  $p$  iguais (0,0004 e 0,0010). O treinamento foi capaz de restaurar a RCR do grupo OVX atingindo valores semelhantes aos grupos controle. O grupo INT-TR apresentou o maior aumento de RCR quando comparado aos grupos INT-SED e OVX-SED. O grupo OVX-TR mostrou aumento significativo em relação ao OVX-SED, não apresentando diferença em relação ao grupo INT-TR.

Na Figura 20E observa-se a análise da respirometria de alta resolução nos diferentes grupos experimentais (INT-SED, INT-TR, OVX-SED e OVX-TR). As curvas traçadas em vermelho indicam a taxa de consumo de oxigênio contida na amostra do tecido, enquanto as curvas traçadas em azul representam a concentração de oxigênio contida na cuba. Nos animais do grupo OVX-SED observa-se um traçado com padrão de consumo reduzido, contendo uma

menor capacidade respiratória mitocondrial. Os grupos INT-TR e OVX-TR apresentaram curvas mais estáveis e com maior amplitude de resposta após a adição dos substratos, indicando melhora na eficiência mitocondrial decorrente do treinamento físico. O grupo INT-SED apresentou um perfil intermediário, com consumo de oxigênio mais preservado em relação ao OVX-SED, mas inferior aos animais treinados. Esses resultados confirmam que o treinamento físico é capaz de restaurar a capacidade respiratória mitocondrial.

**Figura 20.** Respiração Mitocondrial acoplada de biópsia de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo.



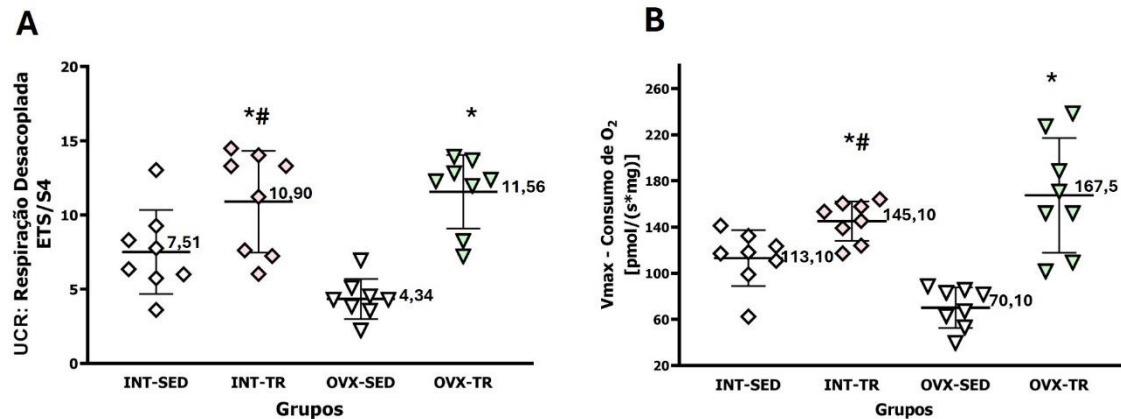
**Descrição:** A: S3/CI: consumo de oxigênio pelos substratos do complexo I (respiração acoplada ou Estado 3 CI); B: S3/CI + CII: consumo de oxigênio determinado pelos substratos dos complexos I e II (Estado 3 CI+CII); C: RCR: razão de controle respiratório; D: representação das corridas e titulações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

#### 6.4.2 Respiração Mitocondrial desacoplada em biópsia do Coração (UCR, Vmax)

Na Figura 21 é apresentado a análise do consumo de oxigênio em estado respiratório desacoplado. Na Figura 21A a UCR (ETS/S4) é a razão entre a capacidade do sistema de transporte de elétrons desacoplado da mitocôndria (ETS) e o estado 4 de respiração (S4). Esse índice reflete o quanto a mitocôndria consegue operar independentemente da síntese de ATP, funcionando como um marcador da capacidade máxima do sistema transportador de elétrons. O grupo OVX-SED apresentou uma redução significativa quando comparado ao grupo INT-RT ( $p = 0,0003$ ) e ao OVX-RT ( $p = 0,0227$ ), indicando prejuízo na função mitocondrial após a ovariectomia. Por outro lado, o grupo OVX-RT demonstrou valores significativamente maiores do que o INT-SED ( $p = 0,0227$ ) e estatisticamente semelhante ao grupo INT-RT ( $p = 0,958$ ). Portanto a comparação entre INT-RT e INT-SED demonstrou aumento da UCR, mas sem atingir significância estatística ( $p = 0,0695$ ).

Na Figura 21B, a Vmax, que é um indicador da capacidade respiratória mitocondrial total, demonstrou diferenças significativas entre os grupos. O grupo OVX-SED apresentou o menor valor de Vmax, significativamente inferior a todos os demais grupos. INT-SED ( $p = 0,0394$ ), INT-TR ( $p = 0,0003$ ), OVX-RT ( $p = 0,0001$ ). Esses dados indicam que a ovariectomia reduziu significativamente a capacidade mitocondrial máxima do consumo de oxigênio. O grupo OVX-RT, por outro lado apresentou os maiores valores de Vmax e foram significativamente maiores ao grupo OVX-SED ( $p = 0,0001$ ) e ao grupo INT-SED ( $p = 0,064$ ). O OVX-RT não teve diferença significativa quando comparado ao grupo INT-RT ( $p = 0,4652$ ), indicando que o treinamento foi capaz de recuperar a função respiratória mesmo prejudicada pela ovariectomia.

**Figura 21.** Respiração Mitocondrial desacoplada do coração (UCR, Vmax).



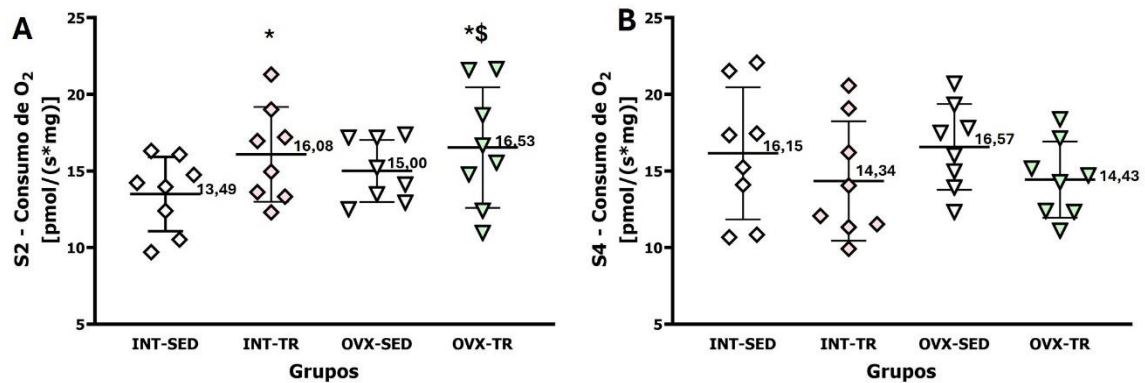
**Descrição:** A: UCR: razão de controle desacoplado determinada pelo ETS/S4. B: Vmax: estado respiratório experimentalmente não acoplado máximo; Grupos: INT-SED (intacto sedentário), INT-RT (intacto- treinamento resistido), OVX-SED (ovariectomia- sedentário) e OVX-RT (ovariectomia-treinamento resistido). Os valores são expressos como Média Desvio Padrão  $\pm$  (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA one-way seguida por teste post hoc Fisher com ( $p < 0,05$ ).

#### 6.4.3 Respiração de vazamento Mitocondrial em biópsia do Coração (S2, S4 e RCR)

Na Figura 22 trata-se da análise da respiração de vazamento mitocondrial expressa em [pmol/(s\*mg)]. Na Figura 24A, o estado 2 (S2) reflete o consumo de oxigênio basal na presença de substratos, mas na ausência de ADP, sendo considerado um marcador da atividade mitocondrial em repouso antes da fosforilação. A análise não indicou diferença significativa entre os grupos, o consumo de O<sub>2</sub> foi menor no grupo INT-SED em comparação com os demais grupos INT-RT ( $p = 0,3189$ ), OVX-SED ( $p = 0,7422$ ), OVX-RT ( $p = 0,1944$ ), no entanto nenhuma dessas diferenças atingiram significância estatística. Esses dados reforçam que a atividade mitocondrial em repouso antes da adição de ADP, não é um marcador sensível das alterações bioenergéticas induzidas pela ovariectomia ou pelo treinamento, sugerindo que o S2 permanece constante diante dos processos fisiológicos causados.

Na Figura 22B refere-se aos dados do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial que representa o consumo máximo de O<sub>2</sub> após fosforilação oxidativa de ADP, quando os níveis de ATP estão elevados e a atividade respiratória diminui. Esse estado reflete no fluxo de prótons de retorno e o grau de acoplamento da membrana mitocondrial, sendo um marcador de integridade e funcionalidade da organela. Os dados apresentados no S4 foram semelhantes em todos os grupos o que indica que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas e indica que a respiração mitocondrial permaneceu estável neste estado.

**Figura 22.** Respiração de vazamento mitocondrial em biópsia tecidual do ventrículo esquerdo.

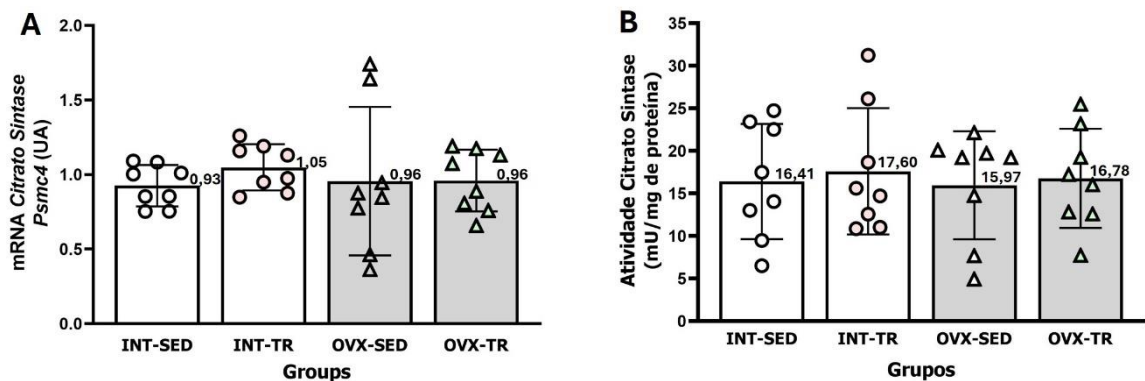


**Descrição:** A: S2: respiração em repouso (respiração de fuga ou Estado 2); B: S4: respiração com vazamento experimental (Estado 4); C: RCR: Índice de controle Respiratório; Grupos: INT-SED (intacto sedentário), INT-RT (intacto- treinamento resistido), OVX-SED (ovariectomia- sedentário) e OVX-RT (ovariectomia-treinamento resistido). Os valores são expressos como Média Desvio Padrão  $\pm$  (DP). Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA One-Way seguida por teste post hoc Fisher com ( $p < 0,05$ ).

## 6.5 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE

Na Figura 23A apresenta a expressão gênica do mRNA da Citrato Sintase e a Figura 23B apresenta a análise da atividade enzimática da Citrato Sintase, ambas não apresentaram estatisticamente diferenças significativas entre os grupos. Os dados indicam que nem a ovariectomia e nem o treinamento resistido alteraram a densidade mitocondrial dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo.

**Figura 23.** Atividade e Expressão Gênica da enzima citrato sintase cardiomiócitos do ventrículo esquerdo.



**Descrição:** Grupos: INT-SED, intacto sedentário; INT-RT, intacto treinamento resistido; OVX-SED, ovariectomia sedentário; e OVX-RT, ovariectomizado treinamento resistido. Os valores são expressos como Média Desvio Padrão  $\pm$ . Os símbolos acima do DP representam a diferença estatística entre os grupos por ANOVA One-ay seguida por teste post hoc Fisher com ( $p < 0,05$ ). (\*) diferença significativa para o grupo OVX-SED, (#) diferença significativa para o grupo INT-SED, (\$) diferença significativa para o grupo OVX-RT.

## 7.0 DISCUSSÃO

### 7.1 ANÁLISE DA CARGA DE CARREGAMENTO, MASSA CORPORAL E MASSA UTERINA

O protocolo de treinamento resistido (TR) foi estruturado a partir do modelo proposto por Hornberger e Farrar (2004), amplamente utilizado em experimentos com animais para avaliar as adaptações musculares e posteriormente adaptado por Queiroz *et al.* (2025) para atender as hipóteses deste estudo em modelos experimentais com diferentes perfis fisiológicos. Cada sessão consistiam em cinco subidas consecutivas com cargas progressivas correspondendo a 65%,70%,80% e 85% da CMC previamente determinada para cada animal. Nesta condição possibilita a aplicação de sobrecarga progressiva dentro de uma mesma sessão, garantindo recrutamento crescente das fibras musculares e estímulo tanto de força quanto de resistência, estratégia também adotada por Tamaki *et al.* (1992) e Carbone *et al.* (2012). O período total de treinamento do nosso estudo foi de 20 semanas, porém para a análises de carga de carregamento selecionamos cinco semanas ao longo do período (semanas 1, 5, 10, 15 e 20).

Na tabela 3 apresenta a evolução da Carga Máxima de Carregamento (CMC), Carga Absoluta de Carregamento (CAC) e Carga Relativa de Carregamento (CRC) ao longo de 20 semanas de treinamento resistido (TR) nos grupos INT-TR e OVX=TR. Observou-se um aumento progressivo e significativo em todas as variáveis de carga em ambos os grupos, indicando uma adaptação positiva ao treinamento e melhora gradativa da capacidade funcional.

Na CMC, houve incremento expressivo nas duas condições experimentais. O grupo INT-TR demonstrou diferenças significativas ao longo das semanas com variações significativas nas semanas 10,15 e 20 ( $p < 0,05$ ). Já o grupo OVX-TR apresentou aumento entre as semanas, embora sem diferenças significativas entre as semanas. Ao final do protocolo foi observada diferença significativa entre os grupos, com melhor desempenho do grupo INT-TR, o que sugere maior eficiência adaptativa em animais com função ovariana preservada.

A CAC também apresentou comportamento crescente durante o período experimental, evidenciando o desenvolvimento da força absoluta. O grupo INT-TR apresentou aumento da semana 1 para a semana 20 com diferenças significativas a partir da semana 5 e mantidas até a semana 20. O grupo OVX-TR apresentou evolução similar confirmando que o TR foi capaz de promover adaptações consistentes, mesmo sob a influência da deficiência estrogênica.

A CRC seguiu o mesmo padrão de incremento, demonstrando que o treinamento foi efetivo em ajustar as cargas relativas à massa corporal. O grupo INT-TR apresentou diferenças

significativas em todas as semanas, enquanto o grupo OVX-TR teve um aumento progressivo, porém com menor magnitude. Essa evolução reflete uma melhor adaptação neuromuscular e metabólica, indicando que o TR foi capaz de otimizar a eficiência do sistema contrátil e o aproveitamento energético, mesmo sob condições de hipoestrogenismo.

Esses achados corroboram com os resultados descritos por *Queiroz et al. (2025)* e *Marin et al. (2023)*, que também observaram aumento gradativo na carga de carregamento e na adaptação metabólica em modelos OVX submetidos ao TR. Tais estudos reforçam a hipótese de que o TR promove ajustes funcionais e bioenergéticos, incluindo a melhoria da força muscular e da capacidade oxidativa, atenuando os efeitos deletérios da deficiência estrogênica sobre o sistema musculoesquelético, desta forma os resultados obtidos neste estudo confirmam a eficácia do treinamento resistido como estratégia terapêutica para mitigar a perda de força e massa muscular associadas à menopausa sendo uma intervenção segura e eficiente para promover adaptações fisiológicas favoráveis nas condições de hipoestrogenismo.

Os resultados da tabela 4 demonstraram que a OVX promoveu um aumento significativo na massa corporal ao longo do tempo nos grupos OVX-SED e OVX-TR em comparação aos grupos INT-SED e INT-TR. Esse achado está em concordância com a literatura que descreve a OVX como um modelo experimental de deficiência estrogênica, levando ao aumento do peso corporal devido à redução do metabolismo basal e aumento da ingestão alimentar. Segundo *Lovejoy et al. (2008)*, a deficiência de estrogênio está associada a um aumento da adiposidade corporal e redistribuição do tecido adiposo, contribuindo para o ganho de peso observado após a menopausa ou ovariectomia. Além disso, a evolução ponderal dos grupos experimentais ao longo das semanas reforça o efeito cumulativo da ausência estrogênica. O grupo OVX-SED apresentou os maiores valores de massa corporal desde a 5ª semana até o final do experimento, indicando que a ausência de estrogênio, associada à inatividade física, potencializa o acúmulo de tecido adiposo. Em contrapartida o grupo OVX-TR apresentou aumento menos acentuado, sugerindo que o TR exerceu efeito atenuante sobre o ganho de peso, mesmo na condição de deficiência hormonal. Esses resultados corroboram com os achados de *Corriveau et al. (2008)*, que demonstraram que o exercício resistido reduz a deposição de gordura corporal e melhora parâmetros metabólicos em ratas OVX, mesmo sem normalizar completamente o peso corporal. Segundo o estudo, o estímulo mecânico do treinamento atua sobre vias de sinalização que aumentam a oxidação de ácidos graxos e preservam a massa muscular, contribuindo para a regulação da composição corporal.

Em relação à massa uterina, observou-se uma redução significativa nos grupos OVX em comparação aos grupos INT, confirmando a eficácia da cirurgia e a consequente deficiência estrogênica. A redução da massa uterina é um marcador biológico amplamente utilizado para validar a ovariectomia conforme descrito por *Yousefzadeh et al.* (2020), que destacam a atrofia uterina como uma resposta direta à ausência de estrogênio circulante.

## 7.2 ANÁLISES RESPIROMÉTRICAS

O sistema cardiovascular é constituído por estruturas especializadas como miocárdio, artérias, veias e capilares que é essencial para a homeostase metabólica e o transporte eficiente de oxigênio, nutrientes e metabólitos. Alterações funcionais ou estruturais nesse sistema pode culminar em um espectro de doenças cardiovasculares (DCVs) incluindo insuficiência cardíaca, entre outras patologias (ARNETT *et al.*, 2019). As mitocôndrias são organelas de dupla membrana externa lisa e interna dobrada onde estão localizadas as enzimas da cadeia transportadora de elétrons, fundamentais para a manutenção da respiração aeróbica e para o suprimento energético celular por meio da fosforilação oxidativa (OXPHOS). Sua disfunção é ocasionada frequentemente pela redução da eficiência da cadeia transportadora de elétrons (CTE). No coração, onde existe uma alta demanda energética, as mitocôndrias desempenham papel principal no fornecimento de ATP necessário para a contração e relaxamento dos cardiomiócitos. O acúmulo de mitocôndrias comprometidas funcionalmente está associado ao desenvolvimento de DCVs (MANOLIS *et al.*, 2020). Nas condições da insuficiência cardíaca, a dependência do miocárdio por OXPHOS eficiente torna-se ainda mais crítica, evidenciando a fragilidade do tecido à disfunção mitocondrial (LOPASCHUCK *et al.*, 2021).

Para avaliar a função mitocondrial do tecido dos cardiomiócitos, realizamos a técnica por meio da Respirimetria de Alta Resolução, que permite analisar o consumo de oxigênio em tempo real dos diferentes estados respiratório da Cadeia Transportadora de Elétrons e sua capacidade máxima tornando possível identificar alterações na eficiência da OXPHOS e disfunções nos complexos da CTE.

### 7.2.1 Eficiência Respiratória Mitocondrial acoplada em biópsia do Coração (S3 CI, S3 CI + CII E RCR)

No presente estudo observamos uma redução significativa na respiração mitocondrial no Estado 3 via complexo I (S3 CI) no grupo OVX-SED em relação ao INT-SED, evidenciando comprometimento da fosforilação oxidativa (OXPHOS), conseqüentemente limitação na geração de ATP. Esse achado é consistente com Flegner *et al.* (2023), que também reportaram redução do consumo de O<sub>2</sub> no Estado 3 em fibras cardíacas permeabilizadas de camundongos OVX, reforçando a sensibilidade do miocárdio à deficiência estrogênica e sugerindo possível envolvimento de alterações do Complexo I e no controle do fluxo de NADH.

No estado 3 via complexos I + II (S3 CI+CII) observamos uma queda significativa no OVX-SED em comparação ao INT-SED, indicando que a disfunção mitocondrial se estende por diferentes pontos da cadeia transportadora de elétrons. Em contrapartida o grupo OVX-RT apresentou recuperação na respiração mitocondrial nesse estado, com valores comparáveis aos do INT-RT. Esses resultados se alinham com os dados de Laurindo *et al.* (2021), que demonstraram preservação da função mitocondrial no coração de ratos obesos submetidos a treinamento resistido.

Na razão de controle respiratório (RCR), um parâmetro sensível e amplamente utilizado para avaliar o acoplamento mitocondrial, observamos redução acentuada no OVX-SED, indicando desacoplamento e ineficiência respiratória. O OVX-RT, por sua vez, apresentou aumento expressivo de RCR, superando o INT-SED e aproximando-se dos níveis do INT-RT, sugerindo recuperação e até otimização da eficiência mitocondrial. Isso reforça o papel do TR como modulador da bioenergética cardíaca, fato também relatado por Schulman-Geltzer *et al.* (2024), que observaram elevação significativa da RCR mitocondrial no miocárdio de camundongos na primeira semana pós-parto, em comparação ao final da gestação, interpretada como adaptação bioenergética ao coração. Essa análise quando comparado aos nossos estudos confirma a alta plasticidade mitocondrial cardíaca em resposta à privação estrogênica, reforçando o papel do estrogênio na modulação do acoplamento respiratório e da eficiência energética.

Além disso, nossos métodos de avaliação (S3 e RCR) foi encontrado no trabalho de Krajčová *et al.* (2020), que validaram a alta reprodutibilidade dessas medidas em homogenatos de músculo cardíaco humano, mesmo com amostras pequenas, demonstrando robustez e aplicabilidade clínica. Por outro lado, a relevância clínica dos nossos resultados é reforçada

pelo estudo de Scheiber *et al.* (2019), que observaram reduções marcantes de S3 e RCR em biópsias ventriculares de pacientes com insuficiência cardíaca, associadas a desacoplamento mitocondrial. A semelhança dos padrões observados sugere que a disfunção mitocondrial cardíaca induzida pela deficiência estrogênica pode compartilhar mecanismos com doenças cardíacas, incluindo aumento do estresse oxidativo, desequilíbrio na oferta e demanda de ATP, além do comprometimento da cadeia respiratória.

Uma das hipóteses iniciais do nosso estudo era de que a ovariectomia seria capaz de promover a disfunção mitocondrial nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo, tecido altamente dependente de ATP, e que o TR poderia atuar como um potencial regulador mitocondrial. Os resultados obtidos confirmam essa hipótese, uma vez que observamos reduções significativas nos parâmetros da respiração mitocondrial acoplada do S3/CI e S3 /CI+CII e RCR nos grupos OVX. O TR foi capaz de promover melhora expressiva nesses parâmetros respiratórios, promovendo um efeito modulador sobre a função mitocondrial cardíaca revertendo assim o papel da disfunção mitocondrial pós menopausa.

#### 7.2.2 Eficiência Respiratória Mitocondrial desacoplada em biópsia do Coração ( $V_{max}$ -UCR)

A ovariectomia prejudica a função mitocondrial cardíaca reduzindo a capacidade respiratória máxima das mitocôndrias e alterações estruturais (BAEZA *et al.*, 2014). O consumo de oxigênio do  $V_{max}$  foi medido através do desacoplador (FCCP) que rompe o acoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons (ETS) e a produção de ATP (PESTA; GNAIGER, 2012).

No presente estudo observamos uma redução significativa no grupo OVX-SED, demonstrando comprometimento na capacidade respiratória máxima das mitocôndrias cardíacas. Por outro lado, os grupos submetidos ao treinamento resistido (OVX-RT e INT-RT) exibiram elevação expressiva do  $V_{max}$ , com destaque para o OVX-RT, indicando que o TR é capaz de restaurar ou até potencializar a função desacoplada, mesmo na ausência de estrogênio.

Na Razão de Controle Desacoplado ( $UCR = ETS/S_4$ ), observamos redução significativa no grupo OVX-SED em comparação aos demais. Essa diminuição sinaliza perda de capacidade respiratória máxima acima da basal, ou seja, uma limitação na eficiência metabólica mitocondrial. O TR restaurou a UCR no grupo OVX-RT, reafirmando sua habilidade em reestabelecer a potência disponível para geração de energia sob demanda. No entanto o protocolo utilizado do treinamento resistido em nosso estudo com sobrecarga progressiva

demonstrou-se eficiente em reverter a redução provocada pela ovariectomia, reforçando seu papel essencial como estratégia de preservação da função mitocondrial cardíaca.

### 7.2.3 Eficiência Respiratória de vazamento mitocondrial em biópsia do Coração (S2 e S4 e RCR)

O estado 2 é uma das cinco fases do estado respiratório, que representa o consumo de  $O_2$  pelas mitocôndrias isoladas, a velocidade do consumo de  $O_2$  é o que determina a respiração basal da mitocôndria. Essa respiração é conhecida como “leak respiration” que é o pequeno vazamento de prótons que retorna para a matriz mitocondrial sem passar pela ATPsintase (CHANCE; WILLIAMS, 1955). O nosso resultado demonstrou que a respiração de vazamento mitocondrial (S2) refletida pelo consumo de  $O_2$  na ausência de ADP, foi significativamente aumentada nos grupos treinados (INT-RT e OVX-RT) em comparação ao grupo (INT-SED). Esse aumento pode representar uma adaptação fisiológica ao treinamento resistido. Por outro lado, o grupo (OVX-SED) não apresentou diferença significativa na respiração de vazamento observada nas mitocôndrias cardíacas do grupo OVX-SED quando comparado ao grupo INT-SED.

O estado 4 mostra como a mitocôndria respira quando não está produzindo ATP ativamente, é um estado que representa uma condição não fosforilativa em que a cadeia transportadora de elétrons permanece ativa, mas a síntese de ATP está inibida, seja por ADP ou inibidores envolvidos na ATP sintase. Essa condição permite avaliar o consumo de oxigênio basal mitocondrial relacionado principalmente à atividade de vazamento de prótons através da membrana mitocondrial interna e à integridade da membrana. No presente estudo foi observado maior consumo de  $O_2$  no grupo OVX-SED.

O RCR, calculado pela razão entre as taxas respiratórias nos estados 3 e 4, é um marcador sensível da eficiência mitocondrial e da integridade da membrana interna. Em nosso estudo observou-se uma redução significativa no grupo OVX-SED sugerindo que a OVX compromete o acoplamento entre a CTE e a OXPHOS, possivelmente por um aumento no vazamento de prótons ou por alterações estruturais na membrana mitocondrial. Em contrapartida o TR restaurou o RCR nos animais OVX indicando que essa intervenção pode reverter prejuízos bioenergéticos, favorecendo o restabelecimento do acoplamento respiratório. Nos grupos INT-RT e INT-SED reforça a ideia de que o TR mantém a função mitocondrial estável, atuando principalmente como fator frente a condições adversas.

## 7.3 EXPRESSÃO GÊNICA

### 7.3.1 Expressão Gênica relacionada à CTE (CI, CII, CIII, CIV)

A ovariectomia (OVX) é utilizada como modelo experimental de menopausa, contudo tem sido associada à disfunção mitocondrial em diferentes tecidos, incluindo o coração. Estudos anteriores demonstraram que a OVX compromete a expressão de proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons (CTE), na fosforilação oxidativa (OXPHOS) e em vias relacionada ao metabolismo de lipídios e carboidratos. O estudo de Ventura-Clapier *et al.* (2019) demonstrou que ratas ovariectomizadas apresentaram uma redução notável de proteínas mitocondriais cardíacas com impactos diretos sobre a bioenergética e integridade funcional do miocárdio.

Nossa hipótese foi de que a ovariectomia induziria prejuízos na função mitocondrial dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e que o treinamento resistido seria capaz de reverter eficientemente tais alterações melhorando a expressão gênica. Essa hipótese foi confirmada em nosso estudo demonstrando alterações significativas na expressão dos genes da CTE (complexo I a IV) em resposta a OVX e ao TR.

A análise foi conduzida utilizando o gene de referência *Psmc4*, que se manteve estável entre os grupos, validando seu uso no RT-qPCR. Observamos que o grupo OVX-SED apresentou redução significativa na expressão gênica dos complexos I a IV, o que pode comprometer o fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons e prejudicar a produção de ATP. Em contrapartida, o grupo INT-RT apresentou aumento significativo na expressão desses genes quando comparado ao grupo sedentário, e o grupo OVX-RT também demonstrou aumento expressivo, indicando que o TR contribuiu eficientemente para a respiração mitocondrial. Esses achados corroboram com o estudo De Morra *et al.* (2021) que observaram que o treinamento aeróbio em ratas OVX promoveu disfunções significativas na bioenergética cardíaca, incluindo diminuição na capacidade mitocondrial, alterações no controle do cálcio intracelular, aumento do estresse oxidativo e redução na contratilidade miocárdica.

### 7.3.2 Expressão dos Genes relacionado à OXPHOS (ATPs, PiC, ANT1)

A fosforilação oxidativa (OXPHOS) é o principal processo mitocondrial de produção de ATP, envolvendo proteínas que atuam de forma coordenada, como a ATP sintase (ATPs), o carreador de fosfato inorgânico (PiC) e a translocase de ADP/ATP (ANT1). Essas proteínas podem se organizar no chamado ATP synthasome, um supercomplexo que conecta fisicamente

a síntese e a exportação de ATP, tornando o processo mais eficiente e seguro (NUSKOVÁ *et al.*, 2015).

No presente estudo, o grupo OVX-SED apresentou redução significativa na expressão dos genes ATPs, PiC e ANT1 em relação ao grupo não INT-SED e INT-TR sugerindo comprometimento do acoplamento entre transporte de elétrons e síntese de ATP em condições de hipoestrogenismo. Em contrapartida, os grupos OVX-RT e INT-RT mostraram aumento significativo na expressão desses genes, indicando que o TR exerceu um efeito restaurador sobre a bioenergética mitocondrial. Esses achados sugerem que o TR pode ter favorecido a reorganização funcional do ATP synthasome nos cardiomiócitos contribuindo para a preservação da capacidade energética mesmo em condições de OVX.

Na expressão da PiC observamos que sua expressão, normalizada pelo gene de referência PSMC4, foi significativamente maior no grupo INT-RT comparado ao INT-SED, demonstrando um efeito positivo do TR na regulação dessa proteína. Contudo nos grupos OVX-SED e OVX-TR, a resposta adaptativa ao TR foi substancialmente atenuada, com valores próximos aos do OVX-SED indicando que a ovariectomia compromete a indução da PiC mesmo diante de estímulo físico. Esses achados estão alinhados com o estudo de Foster *et al.* (2021), que demonstrou que a perda funcional da PiC leva à falha na OXPHOS e ao desenvolvimento de cardiomiopatia.

De forma semelhante, a ANT1 apresentou aumento significativo na expressão do gene n grupo INT-RT em comparação ao INT-SED evidenciando que a presença de estrogênio favorece a indução dessa proteína fundamental para a troca de ADP/ATP na membrana mitocondrial interna. Nos grupos OVX, embora o TR tenha promovido aumento de ANT1 em relação ao OVX-SED, a magnitude dessa resposta foi inferior à observada nos grupos intactos. A importância da ANT1 na fisiologia cardíaca é corroborada por Schaefer *et al.* (2022), que relataram que camundongos deficientes nesta proteína desenvolvem cardiomiopatia, intolerância ao exercício e disfunção mitocondrial associada à superproliferação de organelas disfuncionais.

Em conjunto, nossos resultados indicam que o TR é capaz de restaurar parcialmente a expressão coordenada de genes essenciais para a OXPHOS, favorecendo a eficiência da produção e exportação de ATP no coração. No entanto em condições de hipoestrogenismo, essa resposta adaptativa é atenuada, o que pode aumentar a vulnerabilidade do miocárdio frente a sobrecargas energéticas e reduzir a capacidade de adaptação funcional.

## 7.4 CITRATO SINTASE

### 7.4.1 Expressão do gene (mRNA e atividade enzimática)

No presente estudo, tanto a expressão gênica do mRNA (Figura 25A) quanto a atividade enzimática Citrato Sintase (Figura 25B) não apresentaram diferença significativa entre os grupos, indicando que tanto a ovariectomia como o treinamento resistido não promoveram alterações na densidade mitocondrial do ventrículo esquerdo. Considerando que essa enzima é um marcador clássico do conteúdo mitocondrial, os achados sugerem que as adaptações induzidas pelo treinamento foram predominantemente funcionais. De forma semelhante, Widacha *et al.* (2025) relataram que, em camundongos com insuficiência cardíaca submetidos a exercício aeróbio moderado, ocorreram ajustes metabólicos cardíacos sem alterações na densidade mitocondrial. Apesar de serem modelos de estudos distintos, o aspecto comparado é que em ambos a densidade mitocondrial foi preservada.

## 8.0 CONCLUSÃO

Os resultados do estudo demonstraram que a ovariectomia (OVX) causou prejuízos significativos na função mitocondrial, comprometendo a respiração dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo nos estados acoplados S3 e S3Suc, que refletem a atividade dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons (CTE). Essa disfunção bioenergética foi acompanhada por uma redução significativa na expressão gênica dos complexos I a IV. Desta forma o resultado indica a perda da capacidade respiratória mitocondrial associada a ovariectomia (OVX) comprometendo de forma significativa a capacidade oxidativa dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo, refletindo assim uma menor eficiência metabólica. Observou-se também a redução significativa na expressão dos genes relacionados à fosforilação oxidativa (OXPHOS) ATPs, PiC e ANT1, esses genes codificam proteínas fundamentais para a produção e o transporte eficiente de ATP na mitocôndria, quando há uma diminuição simultânea desses três genes ocorre uma desestruturação funcional comprometendo assim diretamente a contratilidade provocada pela ineficiência das mitocôndrias.

Portanto o treinamento resistido atua como estratégia não farmacológica, e demonstrou um aumento significativo no consumo de oxigênio mitocondrial bem como aumento expressivo nos complexos da CTE e dos principais genes da OXPHOS. Estes resultados confirmam que o treinamento resistido foi capaz de restaurar a função mitocondrial prejudicada pela OVX e ficou

evidente que a ovariectomia compromete a bioenergética mitocondrial dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo, enquanto o treinamento resistido atua como estratégia terapêutica e potencial assim de preservar e proteger o sistema cardiovascular em condições de menopausa e privação hormonal.

## 9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMAS, J. P. et al. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **London**, v. 370, p. 621–628, ago. 1994.
- ADAMS, V.; SCHULER, G. Insuficiência cardíaca: treinamento de exercícios – uma bala mágica para insuficiência cardíaca crônica? *Nature Reviews Cardiology*, v. 9, p. 677–678, 2012. DOI: 10.1038/nrcardio.2012.153.
- ALBERTS, B. et al. Molecular Biology of the Cell. *Annals of Botany*, **Oxford**, v. 91, n. 3, p. 401, fev. 2003.
- ALMEIDA, A. J. P. et al. Aging: Molecular Pathways and Implications on the Cardiovascular System. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [S.l.], v. 2017, ago. 2017.
- AMBIKAIKAJAH, A.; WALSH, E.; CHERBUIN, N. A review of menopause nomenclature. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [S.l.], v. 8, 2020, fev. 2022.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION PROFESSIONAL PRACTICE COMMITTEE. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes and Associated Comorbidities: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*, **Arlington**, v. 45, n. 1, p. S39–S45, dez. 2022.
- ARBUSTINI, E. et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *The American Journal of Pathology*, New York, v. 153, n. 5, p. 1501–1510, nov. 1998.
- ARENA, R. A. Functional capacity and exercise training have earned a primary role in the assessment and treatment of patients with heart failure. *Heart Failure Clinics*, **Philadelphia**, v. 11, n. 1, p. 15–17, jan. 2015.
- ARIAS-LOZA, P.A et al. O receptor alfa de estrogênio é necessário e suficiente para manter a captação fisiológica de glicose no coração do camundongo. *Hypertension*, vol. 60, p. 1070–1077, 2012. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.190389.
- ARNETT, D. K. et al. Diretriz ACC/AHA de 2019 sobre prevenção primária de doenças cardiovasculares: Resumo executivo: Um relatório da Força-Tarefa do Colégio Americano de Cardiologia/Associação Americana do Coração sobre Diretrizes de Prática Clínica. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 74, p. 1376–1414, 2019.
- ASHRAFIAN, H. et al. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation*, Dallas, v. 116, n. 4, p. 434–448, jul. 2007.
- ASIKAINEN, T. M.; KUKKONEN-HARJULA, K.; MIILUNPALO, S. Exercise for health for early postmenopausal women: a systematic review of randomised controlled trials. *Sports Medicine*, Auckland, v. 34, n. 11, p. 753–778, set. 2012.
- AUBERT, G.; VEGA, B. R.; KELLY, D. P. Perturbations in the gene regulatory pathways controlling mitochondrial energy production in the failing heart. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1833, n. 4, p. 840–847, abr. 2013.
- BABER, R. J.; PANAY, N. IMS Recommendations on women’s midlife health and menopause hormone therapy. *Climacteric*, Abingdon, v. 19, n. 2, p. 109–150, fev. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3109/13697137.2015.1129166>.

BALABAN, R. S. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **London**, v. 34, n. 10, p. 1259–1271, out. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2082>.

BASSUK, S. S. MANSON, J. E. Menopausal hormone therapy and cardiovascular disease risk: utility of biomarkers and clinical factors for risk stratification. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 60, n. 1, p. 68–77, jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.202556>.

BELARDINELLI, R.; GEORGIU, D.; CIANCI, G.; PURCARO, A. Treinamento de exercícios de 10 anos em insuficiência cardíaca crônica: um ensaio clínico randomizado. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 60, p. 1521–1528, 2012.

BENTON, M. J. Safety and efficacy of resistance training in patients with chronic heart failure: research-based evidence. **Progress in Cardiovascular Nursing**, **Boston**, v. 20, n. 1, p. 17–23, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0889-7204.2005.03888.x>.

BERG, J. M.; TIMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Biochemistry*. 9. ed. **New York**: Freeman, 2002.

BERGMANN, O. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, **New York**, v. 324, n. 5923, p. 98–102, abr. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1164680>.

BERNARD, G.; ROSSIGNOL, R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxidants & Redox Signaling*, **New Rochelle**, v. 10, n. 8, p. 1313–1342, jun. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2007.2000>.

BIMONTE, N. Theories, practice, and protocols for testing rodent cognition. **The Maze Book**, [S.l.], v. 94, p. 3–36, mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2159-1>.

BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, **London**, v. 435, n. 2, p. 297–312, mar. 2011.

BRANDT, U. et al. The mitochondrial targeting presequence of the Rieske iron-sulfur protein is processed in a single step after insertion into the cytochrome bc1 complex in mammals and retained as a subunit in the complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 12, p. 8387–8390, abr. 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)52883-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)52883-0).

BRINTON, R. D. Minireview: Translational animal models of human menopause: Challenges and emerging opportunities. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3571–3578, ago. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1210/en.2012-1340>.

BRUCE, J.; OLSON, M. E. Ovariectomy, Ovariohysterectomy and Orchidectomy in Rodents and Rabbits. **Canadian Veterinary Journal**, v. 27, n. 12, p. 523–527, dez. 1986. PMC1680421.

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

CALABRIA, Elisa et al. Defeitos mitocondriais relacionados ao diabetes tipo 2 em células sanguíneas mononucleadas periféricas de mulheres pós-menopáusicas com sobrepeso. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 11, p. 3465, 2022.

CAMPBELL, S. E.; FEBBRAIO, M. A. Effect of the ovarian hormones on mitochondrial enzyme activity in the fat oxidation pathway of skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 281, n. 4, p. E803-E808, out. 2001. DOI: 10.1152/ajpendo.2001.281.4. E803.

CAPLLONCH-AMER, G. et al. Efeitos opostos do 17- $\beta$  estradiol e da testosterona na biogênese mitocondrial e na síntese de adiponectina em adipócitos brancos. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 52, p. 203–214, 2014. DOI: 10.1530/JME-13-0155.

CARTEE, G.D.; HEPPLER, R.T.; BAMMAN, M.M.; ZIERATH, R. O exercício promove o envelhecimento saudável do músculo esquelético. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 1028–1032, jun. 2016. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.05.007.

CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE, J. P. A et al. Role of estrogen on skeletal muscle mitochondrial function in ovariectomized rats: a time course study in different fiber types. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 306, n. 8, p. E868-E878, abr. 2014. DOI: 10.1152/ajpendo.00050.2013.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 217, n. 1, p. 387-394, 1955.

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

CHEN, J. Q. et al. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, n. 10, p. 1540–1570, out. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.06.001>.

CHEN, Y. et al. Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca<sup>2+</sup> crosstalk. **Circulation Research**, v. 111, n. 7, p. 863–875, set. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.266585>.

CHISTIYAKOV, D.A.; SHUKRAT, T.P.; MELNICHENKO, A.A.; GRECHKO, A.V.; OREKHOV, A.N. O papel da disfunção mitocondrial nas doenças cardiovasculares: uma breve revisão. **Annals of Medicine**, vol. 50, p. 121–127, 2018. DOI: 10.1080/07853890.2017.1417631.

CHITIYAKOV, D. A. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. **Annals of Medicine**, v. 50, n. 2, p. 121–127, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1417631>.

CHOI, J. et al. Physical Activity, Weight, and Waist Circumference in Midlife Women. **Health Care for Women International**, v. 33, n. 12, p. 1086–1095, fev. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1080/07399332.2012.673658>.

CHU, D. J. et al. A relação entre aptidão cardiorrespiratória, fatores de risco cardiovascular e aterosclerose. **Aterosclerose**, v. 304, p. 44-52, 2020.

COLBERG, Sheri R et al. Exercise and Type 2 Diabetes: The American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: Joint Position Statement. **Diabetes Care**, v. 33, n. 12, p. e147–e167, dez. 2010. DOI: 10.2337/dc10-9990

COLOMBINI, M. Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. **The Journal of Membrane Biology**, v. 111, n. 2, p. 103–111, out. 1989. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01871775>.

CONCEA – CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica**. Brasília, DF: CONCEA, 2016.

CONRAADS, V. M. et al. O treinamento combinado de resistência reduz os níveis plasmáticos do receptor TNF-alfa em pacientes com insuficiência cardíaca crônica e doença arterial coronariana. **European Heart Journal**, v. 23, p. 1854–1860, 2002.

COSMAN, F. et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10, p. 2359–2381, ago. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2794-2>.

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

DABROWSKA-GALAS, M. et al. High Physical Activity Level May Reduce Menopausal Symptoms. **Medicina**, v. 55, n. 8, p. 466, ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina55080466>.

DALEY, A. et al. Factors associated with the use of complementary medicine and non-pharmacological interventions in symptomatic menopausal women. *Climacteric*: **The Journal of the International Menopause Society**, v. 9, n. 5, p. 336–346, fev. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/13697130600864074>.

DENTON, M. D. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1787, n. 11, p. 1309–1316, nov. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.005>.

DOMINGOS, C.; PÊGO, J. M.; SANTOS, N. C. Efeitos da atividade física na função e estrutura cerebral em idosos: uma revisão sistemática. **Behavioural Brain Research**, v. 402, 113061, 2021. DOI: 10.1016/j.bbr.2020.113061.

DOMINIC, E. A. et al. Mitochondrial cytopathies and cardiovascular disease. **Heart**, v. 100, n. 8, p. 611–618, abr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-304657>.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421–431, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-i](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-i).

DUCKLES, S. P. et al. Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection. **Molecular Interventions**, v. 6, n. 1, p. 26–35, fev. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1124/mi.6.1.6>.

DUNCKER, D. J.; BACHE, R. J. Regulation of coronary blood flow during exercise. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 3, p. 1009–1086, jul. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2006>.

DUNLAY, S. M.; ROGÉRIO, V. L.; REDFIELD, M. M. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. **Nature Reviews Cardiology**, v. 14, p. 591–602, maio 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.65>.

DÁVILA-RÓMAN, V. G. et al. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 2, p. 271–277, jul. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(02\)01967-8](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(02)01967-8).

ERICKSON, K. I. et al. Atividade física, cognição e resultados cerebrais: uma revisão das diretrizes de atividade física de 2018. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 51, p. 1242–1251, 2019. DOI: 10.1249/MSS.0000000000001936.

ERNSTER, L.; SCHATZ, G. Mitochondria: a historical review. **The Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 3, p. 227–255, dez. 1981. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.227s>.

FANG, H. et al. How to best assess abdominal obesity. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 21, n. 5, p. 360–365, set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000485>.

FAUBION, S. S. et al. Long-term health consequences of premature or early menopause and considerations for management. Climacteric: **The Journal of the International Menopause Society**, v. 18, n. 4, p. 483–491, fev. 2015. DOI: 10.3109/13697137.2015.1020484.

FARHAT, F. et al. Diferenças dependentes de gênero na função mitocondrial e no estresse oxidativo no músculo esquelético de ratos em repouso e após treinamento físico. **Redox Report**, v. 22, p. 508–514, 2017. DOI: 10.1080/13510002.2017.1354704.

FLEG, J. L. et al. Exercise training as therapy for heart failure: current status and future directions. **Circulation Heart Failure**, v. 8, n. 1, p. 209–220, jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.001420>.

FLIEGNER, D et al. O sexo feminino e o receptor beta de estrogênio atenuam a remodelação cardíaca e a apoptose na sobrecarga pressórica. **American Journal of Physiology**, vol. 298, p. R1597–R1606, 2010. DOI: 10.1152/ajpregu.00825.2009.

FUENTES, L. de las et al. Myocardial fatty acid metabolism: independent predictor of left ventricular mass in hypertensive heart disease. **Hypertension**, v. 41, n. 1, p. 83–87, jan. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000047668.48494.39>.

GENOVA, M. L.; BIANCHI, C.; LENAZ, G. Structural organization of the mitochondrial respiratory chain. **The Italian Journal of Biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 58–61, mar. 2003. DOI: 12833641.

GNAIGER, E. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis. Innsbruck: **MitochondrPhysiol Network**, v. 17, n. 18, p. 1–64, 2012.

GOKCE, M. et al. Left ventricular diastolic function assessment by tissue Doppler echocardiography in relation to hormonal replacement therapy in postmenopausal women with diastolic dysfunction. **American Journal of Therapeutics**, v. 10, n. 2, p. 104–111, mar. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1097/00045391-200303000-00005>.

- GOLD, E. B. et al. Relation of demographic and lifestyle factors to symptoms in a multi-racial/ethnic population of women 40–55 years of age. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, n. 5, p. 463–473, set. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1093/aje/152.5.463>.
- GOSDEN, R. G. et al. Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 2, p. 255–260, mar. 1983. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod28.2.255>.
- GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1309–1312, ago. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>.
- GROENNEBAEK, T. et al. Skeletal muscle mitochondrial function in young and older untrained and resistance trained men. **Journal of Physiology**, v. 596, n. 19, p. 4723–4736, 2018. DOI: 10.1113/JP276778.
- CONCEA. *Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica*. 1ª. Edição, Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2023.
- GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **The American Journal of Physiology**, v. 258, n. 5, p. C755–C786, maio 1990. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1990.258.5.C755>.
- GUOYAUAN, Q.; YASHI, M.; YIN, F. Cellular specificity and inter-cellular coordination in the brain bioenergetic system: Implications for aging and neurodegeneration. **Frontiers in Physiology**, v. 10, jan. 2020.
- GUTIÉRREZ, M. et al. Quality of life of rural menopausal women in response to a customized exercise programme. **Journal of Advanced Nursing**, v. 54, n. 1, p. 11–19, abr. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2648.2006.03784.x>.
- HALL, J. Endocrinology of the menopause. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 44, n. 3, p. 485–496, set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2015.05.010>.
- HAMBRECHT, R. et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. **Circulation**, v. 98, n. 24, p. 2709–2715, dez. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.24.2709>.
- HAMODA, H. et al. The British Menopause Society & Women's Health Concern 2020 recommendations on hormone replacement therapy in menopausal women. **Post Reproductive Health**, v. 26, n. 4, p. 181–209, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1177/2053369120957514>.
- HAN, G. S.; KIM, S. R. Efeitos do exercício de resistência na função mitocondrial em camundongos. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 25, p. 1317–1319, 2013. DOI: 10.1589/jpts.25.1317.
- HARLOW, S. D. et al. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop +10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *\*Menopause\**, v. 19, n. 4, p. 387–395, abr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e31824d8f40>.
- HAY, S. I. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**,

v. 390, n. 10100, p. 1260–1344, set. 2017. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32130-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32130-X).

HEIDENREICH, P. A. et al. 2022 AHA/ACC/HFSA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. **Circulation**, v. 145, n. 18, p. e895–e1032, abr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001063>.

HEIDI, N. et al. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. **JAMA**, v. 288, n. 7, p. 872–881, ago. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.288.7.872>.

HEINE, P.A et al. Aumento do tecido adiposo em camundongos knockout para receptor de estrogênio alfa machos e fêmeas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 97, p. 12729–12734, 2000. DOI: [10.1073/pnas.97.23.12729](https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12729).

HERZING, S. et al. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. **Science**, v. 337, n. 6090, p. 93–96, maio 2012. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1218530>.

HOLLANDER, J. M.; BASELER, W. A.; DABKOWSKI, E. R. Proteomic remodeling of mitochondria in heart failure. **Congestive Heart Failure**, v. 17, n. 6, p. 262–268, out. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7133.2011.00254.x>.

HOLLANDER, J. M.; THAPA, D.; SHEPHERD, D. L. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 307, p. H1–H14, abr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00747.2013>.

HOLLANDER, John M.; THAPA, Dharendra; SHEPHERD, Danielle L. Diferenças fisiológicas e estruturais em subpopulações espacialmente distintas de mitocôndrias cardíacas: influência de patologias cardíacas. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 306, n. 4, p. H529–H537, 2014. DOI: [10.1152/ajpheart.00747.2013](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00747.2013).

HONIGBERG, M. C. et al. Association of premature natural and surgical menopause with incident cardiovascular disease. **JAMA Network Open**, v. 322, n. 24, p. 2411–2421, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2019.19191>.

HOPPEL, C. L. et al. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 10, p. 1949–1956, out. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.05.004>.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 29, n. 1, p. 16–31, 2004. Disponível em: <https://www.nrcresearchpress.com>.

HORSEFIELD, S. T.; NEUTZE, R. Opening and closing the metabolite gate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 50, p. 19565–19566, dez. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0810654106>.

HU, H. et al. Whole-body vibration training mitigates mitochondrial dysfunction in ovariectomized mice by improving mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, 2024. DOI: [10.3389/fendo.2024.1356312](https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1356312)

IGNANELLI, C. et al. Resistance training improves mitochondrial respiration and skeletal muscle function in older adults. **Aging Cell**, v. 19, n. 4, e13138, 2020. DOI: 10.1111/ace1.13138.

INGWALL, J. S. On the hypothesis that the failing heart is energy starved: lessons learned from the metabolism of ATP and creatine. **Current Hypertension Reports**, v. 8, n. 6, p. 457–464, dez. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11906-006-0023-x>.

INNES, K. E.; SELFE, T. K.; TAYLOR, A. G. Menopausa, síndrome metabólica e terapias mente-corpo. **Menopause**, v. 15, p. 1005–1013, 2008.

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RALF, M. C. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742–758, nov. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.033>.

JONCKHEERE, A.I; SMEITINK, J.A.M; RODENBURG, R.J.T. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. **Journal of inherited metabolic disease**, vol. 35, n. 2, p. 211-225, aug. 2011. DOI: 10.1007/s10545-011-9382-9.

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

KARAMANLIDIS, G et al. Promoting PGC-1 $\alpha$ -driven mitochondrial biogenesis is detrimental in pressure-overloaded mouse hearts. **American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology**, vol. 307, n. 9, p. H1307-H1316, apr. 2014. DOI: 10.1152/ajpheart.00280.2014.

KATZMARZYK, P. T. et al. Inatividade física e carga de doenças crônicas não transmissíveis em países de baixa, média e alta renda. **British Journal of Sports Medicine**, v. 56, p. 101–116, 2022. DOI: 10.1136/bjsports-2020-103640.

KHOURI, E.M; GREGG, D.E; RAYFORD, D.E. Effect of exercise on cardiac output, left coronary flow and myocardial metabolism in the unanesthetized dog. **Circulation Research**, vol. 17, n. 5, p. 427-437, nov. 1965. DOI: 10.1161/01.res.17.5.427.

KIM, J.H; CHO, H.T; KIM, J.K. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. **Endocrine Journal**, vol. 61, n. 11, p. 1055-1067, aug.2014. DOI: 10.1507/endocrj.ej14-0262.

KINGLE, C.M. Estrogenic control of mitochondrial function. **Redox Biology**, vol. 31, p. 2213-2317, jan. 2020. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101435.

KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Diferenças sexuais nas respostas imunes. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 626–638, 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.90.

KLIEWER, S.A et al. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**, vol. 358, n. 6389, p. 771-774, aug. 1992. DOI: 10.1038/358771a0.

KLINGE, C.M. Estrogens regulate life and death in mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, vol. 49, n. 4, p. 307-324, apr. 2017. DOI: 10.1007/s10863-017-9704-1.

- KOEBELE, V.B.; BIMONTE-NELSON, A. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. **Maturitas**, vol. 87, p. p5-17, may. 2016. DOI: 10.1016/j.maturitas.2016.01.015.
- KOHN et al. The History of Estrogen Therapy. **Sexual Medicine Reviews**, vol. 7, n. 3, p. 416-421, jul. 2019. DOI: 10.1016/j.sxmr.2019.03.006.
- KOKKINOS, P.F. et al. Chronic heart failure and exercise. *American Heart Journal*, vol. 140, n. 1, p. 21-28, jul. 2000. DOI: 10.1067/mhj.2000.106916.
- KOPERA, H. The dawn of hormone replacement therapy. **Maturitas**, vol. 13, n. 3, p. 187-188. sep. 1991. DOI: 10.1177/2053369120957514.
- KWONG, J. Q. et al. Cardiac-specific deletion of the mitochondrial phosphate carrier induces metabolic remodeling and dilated cardiomyopathy. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 320, n. 4, p. C597-C611, 2014. DOI: 10.1086/511788
- KUHLBRANDT, W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, vol. 34, n. 10, p. 1259-1271, oct. 2002. DOI: 10.1006/jmcc.2002.2082.
- KUZNETSOV, A. V. et al. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 965-976, may 2008.
- LAURINDO, C. P. et al. Resistance training attenuates hepatocardiac alterations and skeletal muscle mitochondrial protein reductions in diet-induced obese rats. **Heliyon**, v. 7, n. 11, e08374, 2021. DOI: 10.1016/j.heliyon. 2021.e08374.
- LEE, J. et al. Associação da aptidão cardiorrespiratória na meia-idade com aterosclerose carotídea na vida adulta: Estudo Longitudinal do Cooper Center. **Aterosclerose**, v. 282, p. 137-142, 2019.
- LETELLIER, T. et al. Mitochondrial Myopathy Studies on Permeabilized Muscle Fibers1. **Pediatric Research**, v. 32, n. 1, p. 17-22, jan. 1992.
- LI, Q. et al. High Circulating Follicle-Stimulating Hormone Level Is a Potential Risk Factor for Renal Dysfunction in Post-Menopausal Women. *Frontiers in Endocrinology*, vol. 12, mar. 2021. DOI: 10.3389/fendo.2021.627903.
- LI, Shumin; GUPTE, Anisha A. The role of estrogen in cardiac metabolism and diastolic function. **Methodist DeBakey Cardiovascular Journal, Houston**, v. 13, n. 1, p. 4-8, jan. 2017. DOI: 10.14797/mdcj-13-1-4.
- LIVAK, N. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using **RealTime Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method**. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, dec. 2001.
- LLOYD et al. Life's Essential 8: Updating and Enhancing the American Heart Association's Construct of Cardiovascular Health: A Presidential Advisory From the American Heart Association. **Circulation**, vol. 146, n. 5, p. e-18-e-43, jun.2022. DOI: 10.1161/CIR.0000000000001078.
- LOPASCHUK, G. D. et al. Metabolismo energético cardíaco na insuficiência cardíaca. **Circulation Research**, v. 128, p. 1487-1513, 2021.

LOVEJOY, J.C.; SAINSBURY, A. Sex differences in obesity and the regulation of energy homeostasis. **Obesity Reviews**, vol. 10, n. 2, p. 154-167, mar. 2009. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2008.00529.x.

LOVEJOY, J. C. et al. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 6, p. 949–958, 2008. DOI: 10.1038/ijo.2008.25

LUKYANENKO, V; CHIKANDO, L; LEDERER, W.J. Mitochondria in cardiomyocyte Ca<sup>2+</sup> signaling. **The International Journal of biochemistry & cell biology**, vol. 41, n. 10, p. 1957-1971, oct. 2009. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.03.011.

LYNCH, S et al. Sex Hormone Regulation of Proteins Modulating Mitochondrial Metabolism, Dynamics and Inter-Organellar Cross Talk in Cardiovascular Disease. **Frontiers**, vol. 8, feb. 2021. DOI: 10.3389/fcell.2020.610516.

MADAMANCHI, N.R; RUNGE, M.S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation Research**, vol. 100, n. 4, p. 460-473, mar. 2007. DOI:10.1161/01.RES.0000258450.44413.96

MALTAIS, M.L; DESROCHES, J; DIONNE, I.J. Changes in muscle mass and strength after menopause. **Journal of Musculo skeletal & Neuronal Interact**, vol. 9, n. 4, p. 186-197, dec. 2009. 19949277.

MANOLIS, A. S. et al. Disfunção mitocondrial em doenças cardiovasculares: Estado atual da pesquisa translacional/implicações clínicas e terapêuticas. **Medical Review**, v. 41, p. 275–313, 2020.

MANTELEONE, P et al. Symptoms of menopause - global prevalence, physiology and implications. *Nature Reviews* **Endocrinology**, vol. 14, p. 199-215, feb. 2018. DOI: 10.1038/nrendo.2017.180.

MARCONA, S. M.; LEMMEY, A. B.; MADDISON, P. J. O treinamento de resistência progressivo pode reverter a caquexia em pacientes com artrite reumatoide? Resultados de um estudo piloto. **The Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 6, p. 1031–1039, 2005.

MASON et al. Influence of diet, exercise, and serum vitamin d on sarcopenia in postmenopausal women. **Medicine and science in Sports and exercise**, vol. 45, n. 4, p. 607-614, apr. 2013. DOI: 10.1249/MSS.0b013e31827aa3fa.

MAUVAIS-JARVIS, F. et al. Resultados de estradiol, progesterona, imunomodulação e COVID-19. **Endocrinology**, v. 161, n. 9, p. bqaal27, 2020. DOI: 10.1210/endoctr/bqaal27.

MAUVAIS-JARVIS, F; CLEGG, D.J, HEVENER, A.L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocrine Reviews**, vol. 34, n. 3, p. 309-338, jun. 2013. DOI: 10.1210/er.2012-1055.

MCDONAGH, T.A et al. Guidelines for the diagnostic and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. **Europa Journal of the heart failure**, vol. 24, n. 1, p. 4-131, jan. 2022. DOI: doi.org/10.1002/ejhf.2333.

- MELO, B. et al. Efeito do treinamento físico na qualidade de vida em idosos com depressão maior. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v. 19, n. 2, p. 205–214, 2014.
- MENDELSON, M.E; KARAS, R.H. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. **Science (New York. N.Y)**, vol. 308, n. 5728, p. 1583- 1587, jun. 2005. DOI: 10.1126/science.1112062.
- MENDOZA, N et al. Benefits of physical exercise in postmenopausal women. **Maturitas**, vol. 93, p. 83-88, nov. 2016. DOI: 10.1016/j.maturitas.2016.04.017.
- MESSINI, L.E. From menarche to regular menstruation: endocrinological background. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 1092, n. 1, p. 49-56, dec. 2006. DOI: 10.1196/annals.1365.004.
- MIELKE, M.M et al. Vascular factors predict rate of progression in Alzheimer disease. **Neurology**, vol. 69, n. 19, p. 1850-1858, nov. 2007. DOI: 10.1212/01.wnl.0000279520.59792.fe.
- MILLER et al. Considering sex as a biological variable in preclinical research. **The FASEB Journal**, vol. 31, n.1, p. 29-34, jan. 2017. DOI: 10.1096/fj.201600781R.
- MILLER et al. Sex-specific risk of Cardiovascular disease and Cognitive decline: Pregnancy and Menopause. **Biology of Sex Differences**, vol. 4, n. 6, p. 4-6, mar. 2013. DOI: 10.1186/2042-6410-4-6.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144–148, 1961. DOI: 10.1038/191144a0.
- MORABIA, A; COSTANZA, M.C. International variability in ages at menarche, first livebirth, and menopause. World Health Organization Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. **American Journal of Epidemiology**, vol. 148, n. 12, p. 1195-1205, dec. 1998. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009609.
- MORI et al. Enhanced cardiac inflammation and fibrosis in ovariectomized hypertensive rats: a possible mechanism of diastolic dysfunction in postmenopausal women. **Hypertension Research**, vol. 34, p. 496-502, jan. 2011. DOI: 10.1038/hr.2010.261.
- MOSCA, L. et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women--2011 update: a guideline from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, n. 11, p. 1243-1262, fev. 2011. DOI: 10.1161/CIR.0b013e31820faaf8.
- MOZAFFARIAN, D. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update. **Circulation**, v. 131, n. 4, p. e29-e322, jan. 2015. DOI: 10.1161/CIR.000000000000152.
- MULLER, W. Subsarcolemmal mitochondria and capillarization of soleus muscle fibers in young rats subjected to an endurance training. A morphometric study of semithin sections. **Cell and Tissue Research**, v. 174, p. 367-389, nov. 1976.
- MUNZEL, T. et al. Impact of oxidative stress on the heart and vasculature: Part 2 of a 3-part series. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 2, p. 212-229, jul. 2017. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.05.035.

MURPHY, E. Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. **Circulation Research**, v. 94, n. 1, p. 7-16, jan. 2004. DOI: 10.1161/01.RES.0000108082.76667.F4.

NATIONAL INSTITUTE ON AGING. **Aged Rodent Colonies Handbook**. Disponível em: <<https://www.nia.nih.gov/research/dab/agedrodent-colonies-handbook>>. Acesso em: mar. 2024.

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

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

NEUBAUER, S et al. A relação fosfocreatina-ATP miocárdica é um preditor de mortalidade em pacientes com cardiomiopatia dilatada. **Circulation**, vol. 96, p. 2190–2196, 1997.

NEUBAUER, S. et al. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. **Circulation**, v. 96, n. 7, p. 2190-2196, out. 1997. DOI: 10.1161/01.cir.96.7.2190.

NI, H.M; WILLIAMS, J.A; DING, W.X. Dinâmica mitocondrial e controle de qualidade mitocondrial. **Redox Biology**, vol. 4, p. 6–13, 2015. DOI: 10.1016/j.redox.2014.11.006.

NIA AGED RODENT COLONIES HANDBOOK. NIH. Disponível em: <https://www.nia.nih.gov/>. Acesso em: 21 fev. 2024.

NIA – NATIONAL INSTITUTE ON AGING. **Aged Rodent Colonies**. Disponível em: <https://www.nia.nih.gov/>.

NICKEL, A.; LOFFLER, J.; MAACK, C. Myocardial energetics in heart failure. **Basic Research in Cardiology**, v. 108, n. 358, p. 108-358, jun. 2013. DOI: 10.1007/s00395-013-0358-9.

NORTH, B. J.; SINCLAIR, D. A. The intersection between aging and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 100, n. 8, p. 1097-1108, abr. 2012. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.246876.

NŮSKOVÁ, Hana et al. Mitochondrial ATP synthasome: expression and structural interaction of its components. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 464, n. 3, p. 787–793, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.034.

OWAN, T.E et al. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. **The New England Journal of Medicine**, vol. 355, n. 3, p. 251-259, jul. 2006. DOI: 10.1056/NEJMoa052256.

PALADE, G.E. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, vol. 1, n. 4, p. 188-211, jul. 1953. DOI: 10.1177/1.4.188.

PALMER, J.W.; TANDLER, B.; HOPPEL, C.L. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 252, n. 23, p. 8731-8739, jul. 1977.

PELLICIA, A et al. Diretrizes ESC 2020 sobre cardiologia esportiva e exercício em pacientes com doenças cardiovasculares. **Revista Europeia do Coração**, vol. 42, n. 1, p. 17-96, jan. 2021. DOI: 10.1093/eurheartj/ehaa605.

PELZER, T et al. The estrogen receptor- $\alpha$  agonist 16 $\alpha$ -LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. **Cardiovascular Research**, vol. 67, n. 4, p. 604-612, sep. 2005. DOI: doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.04.035

PEREIRA, C. L. et al. Resistance training prevents muscle mitochondrial dysfunction induced by ovariectomy in rats. **Biochemical Physiology**, v. 120, n. 2, 2023. DOI: 10.1016/j.cbpa.2023.110387.

PERKINS, G.A.; FREY, T.G. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. **Micron** (Oxford England: 1993), vol. 31, n. 1, p. 91-111, feb. 2000. DOI: 10.1016/s0968-4328(99)00065-7.

Physical Activity Guidelines Advisory Committee report, 2008. To the Secretary of Health and Human Services. Part A: executive summary. **Nutrition Reviews**, vol. 67, n. 1, feb. 2009. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2008.00136.x.

PHYSICAL ACTIVITY GUIDELINES ADVISORY COMMITTEE REPORT, 2008. To the Secretary of Health and Human Services. Part A: executive summary. **Nutrition Reviews**, vol. 67, n. 2, p. 114-120, feb. 2009. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2008.00136.x.

POLLOCK, M.L et al. AHA Science Advisory. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association; Position paper endorsed by the **American College of Sports Medicine**. **Circulation**, vol. 101, n. 7, p. 828-833, feb.2000. DOI: 10.1161/01.cir.101.7.828.

PRABAKARAN, S; SCHWARTZ, A; LUNDBERG, G. Cardiovascular risk in menopausal women and our evolving understanding of menopausal hormone therapy: risks, benefits, and current guidelines for use. **SageJournals**, vol. 12, apr. 2021. DOI: 10.1177/20420188211013917.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. O receptor de estrogênio acoplado à proteína G GPER na saúde e na doença. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, p. 715–726, 2011. DOI: 10.1038/nrendo.2011.122.

QIU, S. et al. Associação entre aptidão cardiorrespiratória e risco de insuficiência cardíaca: uma meta-análise. **Revista de Insuficiência Cardíaca**, v. 25, n. 7, p. 537-544, 2019.

QUEIROZ, A. L. F. et al. Preventive Effects of Resistance Training on Hemodynamics and Kidney Mitochondrial Bioenergetic Function in Ovariectomized Rats. **International J Molecular Sciences**. 26(5), 2131, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26052131>

REES, M et al. The essential menopause curriculum for healthcare professionals: A European Menopause and Andropause Society (EMAS) position statement. **Elsevier**, vol. 158, p. 70-77, April. 2018. DOI: 10.1016/j.maturitas.2021.12.001.

REIS, E. et al. Estrogen is associated with improved survival in aging women with congestive heart failure: analysis of the vesnarinone studies. **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 36, p. 529-533, aug. 2000. DOI: 10.1016/S0735-1097(00)00738-5.

RESEARCH ON THE MENOPAUSE IN THE 1990s. REPORT OF A WHO SCIENTIFIC GROUP. **World Health Organization Technical Report Series**, vol. 1996, n. 866, p. 1-107.

RIET, E.E.S.V et al. Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. **European Journal of Heart Failure**, vol. 18, n. 3, p. 242-252, mar. 2016. DOI: 10.1002/ejhf.483.

RIVA, A et al. Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. **American Journal of Physiology**, vol. 289, n. 2, p. H868-H872, aug. 2005. DOI: 10.1152/ajpheart.00866.2004.

RIVA, A. et al. Structure of cristae in cardiac mitochondria of aged rat. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 12, p. 917-921, dez. 2006. DOI: 10.1016/j.mad.2006.09.002.

ROBINSON, E.; GRIEVE, D. Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, n. 3, p. 246-263, jun. 2009. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.03.003.

ROCCA, G. et al. Premature menopause or early menopause and risk of ischemic stroke. **The Journal of The Menopause**, v. 19, n. 3, p. 272-277, mar. 2013. DOI: 10.1097/gme.0b013e31822a9937.

CORRIVEAU, P.; PAQUETTE, A.; BROCHU, M.; PRUD'HOMME, D.; RABASALHORET, R.; LAVOIE, J-M. Treinamento de resistência previne acúmulo de gordura hepática em ratas ovariectomizadas. **Maturitas**, v. 59, n. 3, p. 259-267, 20 mar. 2008. DOI: 10.1016/j.maturitas.2008.02.005.

ROGER, V. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2012 Update. **Circulation**, v. 125, n. 1, p. e2-e220, jan. 2012. DOI: 10.1161/CIR.0b013e31823ac046.

RUTTER, J.; WINGE, D.R.; SCHIFFMAN, J.D. Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. **Mitochondrion**, v. 10, n. 4, p. 393-401, jun. 2010. DOI: 10.1016/j.mito.2010.03.001.

SABBATINI, A.; KARARIGAS, G. Association between estrogen replacement therapy and heart failure in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. **Preventive Medicine**, v. 181, abr. 2024. DOI: 10.1016/j.ypmed.2024.107909.

SANTORO, N. et al. Menstrual Cycle Hormone Changes in Women Traversing Menopause: Study of Women's Health Across the Nation. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 7, p. 2218-2229, jul. 2017. DOI: 10.1210/jc.2016-4017.

SALVADEGO, D. et al. Effects of resistance training on mitochondrial content and function in young and older men. **European Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 3, p. 631-640, 2013. DOI: 10.1007/s00421-012-2479-x.

SHEERAN, F.L.; PEPE, S. Mitochondrial Bioenergetics and Dysfunction in Failing Heart. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 982, p. 65-80, mai. 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-55330-6\_4.

SHEPHERD, D.; GARLAND, P. B. Citrate synthase from rat liver: [EC 4.1.3.7 Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. **Methods in Enzymology**, v. 13, p. 11-16. DOI: 10.1016/0076-6879(69)13006-2.

SHIMADA, T. et al. Morphological studies of different mitochondrial populations in monkey myocardial cells. **Cell and Tissue Research**, v. 238, p. 577-582, nov. 1984. DOI: 10.1007/BF00219874.

SHUMIN, L.; GUPTE, A.A. The Role of Estrogen in Cardiac Metabolism and Diastolic Function. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, v. 13, n. 1, mar. 2017. DOI: 10.14797/mdcj-13-1-4.

SIMPKINS, J.W. et al. Estrogen actions on mitochondria—physiological and pathological implications. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 290, n. 1-2, p. 51-59, ago. 2008. DOI: 10.1016/j.mce.2008.04.013.

SIVASINPRASASN, S. et al. Obese-insulin resistance accelerates and aggravates cardiometabolic disorders and cardiac mitochondrial dysfunction in estrogen-deprived female rats. **Age**, v. 37, n. 2, abr. 2015. DOI: 10.1007/s11357-015-9766-0.

SMITH, T.C. Origin of mitochondria by intracellular enslavement of a photosynthetic purple bacterium. **Proceedings of National B**, v. 273, p. 1943-1952, abr. 2006. DOI: 10.1038/s12276-019-0323-2.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3 supl. 3, p. 1–103, 2016.

SOPHONSRITSUK, A. et al. Differential effects of estradiol on carotid artery inflammation when administered early versus late after surgical menopause. **Menopause**, v. 20, n. 5, p. 540-547, mai. 2013. DOI: 10.1097/gme.0b013e31827461e0.

SPARAGNA, G.C. et al. Loss of cardiac tetralinoleoyl cardiolipin in human and experimental heart failure. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 7, p. 1559-1570, jul. 2007. DOI: 10.1194/jlr.M600551-JLR200.

SPARAGNA, G.C.; LESNEFSKY, E. Cardiolipin remodeling in the heart. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 209-301, abr. 2009. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31819b5461.

STADLMAN, S. et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress versus cold ischemia-reperfusion: mitochondrial respiratory defects in cultured human endothelial cells. **Transplantation**, v. 74, p. 1800-1803, 2002.

STANLEY, W.C. et al. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. **Cardiovascular Research**, v. 33, n. 2, p. 243-257, fev. 1997. DOI: 10.1016/S0008-6363(96)00245-3.

STANLEY, W.C. Rationale for a metabolic approach in diabetic coronary patients. **Coronary Artery Disease**, v. 16, n. 1, p. S11-S15, nov. 2005. DOI: 10.1097/00019501-200511001-00003.

STANLEY, W.C.; RECCHIA, F.A.; LOPASCHUK, G.D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 3, p. 1093-1129, jul. 2005. DOI: 10.1152/physrev.00006.2004.

STANLEY, W.C; RECCHIA, F.A; LOPASCHUK, G.D. Metabolismo do substrato miocárdico no coração normal e com insuficiência cardíaca. **Physiological Reviews**, vol. 85, p. 1093–1129, 2005.

STERNFELD, B et al. Physical activity and changes in weight and waist circumference in midlife women: findings from the Study of Women's Health Across the Nation. **American Journal of Epidemiology**, vol. 160, n. 9, p. 912-922, nov. 2004. DOI: 10.1093/aje/kwh299.

STIRONE, C et al. Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. **Molecular Pharmacology**, vol. 68, n. 4, p. 959-965, oct. 2005. DOI: 10.1124/mol.105.014662.

STRAUSS, J.F et al. Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology-E-Book: **Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management**. Elsevier Health Science n. 7, p. 141-156, 2013.

TAKAHASHI, T.A; JOHNSON, K.M. Menopause. **Medical Clinics of North America on Science Direct**, vol. 99, n. 3, p. 521-534, may. 2015. DOI: 10.1016/j.mcna.2015.01.006.

TALAUJIKAR, V. Menopause transition: Physiology and symptoms. Best Practice & Research. **Clinical Obstetrics & Gynaecology**, vol. 81, p. 3-7, may.2022. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2022.03.003.

TANAI, E; FRANTZ, S. Pathophysiology of Heart Failure. **Comprehensive Physiology**, vol. 6, n. 1, dec. 2015. DOI: 10.1002/cphy.c140055.

TAO, X-Y et al. Effect of primary ovarian insufficiency and early natural menopause on mortality: a meta-analysis. **Climacteric: the journal of the international Menopause Society**, vol. 19, n. 1, p. 27-36, sep. 2015. DOI: 10.3109/13697137.2015.1094784.

THOMAS, E. et al. O efeito de programas de treinamento de resistência na massa corporal magra em mulheres na pós-menopausa e idosas: uma meta-análise de estudos observacionais. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 33, p. 2941–2952, 2021

THURSTON, R.C et al. Hot flashes and subclinical cardiovascular disease: findings from the Study of Women's Health Across the Nation Heart Study. **Circulation**, vol. 118, n. 12, p. 1234-1240, sep. 2008. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.776823.

URBONAVICIUS, S et al. Proteomic analysis identifies mitochondrial metabolic enzymes as major discriminators between different stages of the failing human myocardium. **Acta Cardiologica**, vol 64, n. 4, p. 511-522, aug. 2009. DOI: 10.2143/AC.64.4.2041617.

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

VARTAK, R.S; SEMWAL M.K; BAI, Y. An update on complex I assembly: the assembly of players. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, vol. 46, n. 4, p. 323-328, jul. 2014. DOI: 10.1007/s10863-014-9564-x.

VASKIVUO et al. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, vol. 86, n. 7, p. 3421-3429, jul. 2001. DOI: doi.org/10.1210/jcem.86.7.7679.

VELARDE, M.C. Mitochondrial and sex steroid hormone crosstalk during aging. **Longevity Healthspan**, vol. 3, n. 1, p. 2046-2395, feb. 2014. DOI: 10.1186/2046-2395-3-2.

VENTURA-CLAPIER, Renée; PIQUEREAU, Jérôme; VEKSLER, Vladimir; GARNIER, Anne; et al. Estrogens, estrogen receptors effects on cardiac and skeletal muscle mitochondria. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 10, p. 557, 2019. DOI: 10.3389/fendo.2019.00557

VITALE, C. Gender differences in the cardiovascular effects of sex hormones. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, vol. 24, n. 6, p. 675-685, dec. 2010. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2010.00817.x.

VOLPI, E.; NAZEMI, R.; FUJITA, S. Alterações no tecido muscular com o envelhecimento. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 7, p. 405–410, 2004.

VOUTILAINEN, S et al. Left ventricular diastolic function by Doppler echocardiography in relation to hormonal replacement therapy in healthy postmenopausal women. **The American Journal of Cardiology**, vol. 71, n. 7, p. P614-617, mar. 1993. DOI: 10.1016/0002-9149(93)90525-h.

WALLACE, D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annual Review of genetics**, vol. 39, p. 359-407, dec. 2005. DOI: 10.1146/annurev.genet.39.110304.095751.

WANG, Y. et al. Aptidão cardiorrespiratória como preditor quantitativo do risco de acidente vascular cerebral: uma meta-análise dose-resposta. **Revista de Neurologia**, v. 267, p. 491-501, 2020.

WATANABE, K et al. Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity. **O Jornal de Química Biológica**, vol. 275, n. 29, p. 22293-22299, jul. 2000. DOI: 10.1074/jbc.M000248200.

WELLONS, M et al. Early menopause predicts future coronary heart disease and stroke: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Menopause**, vol. 19, n. 10, p. 1081-1087, oct. 2012. DOI: 10.1097/gme.0b013e3182517bd0.

WILCOX, J.E. et al. Targeting the Heart" in Heart Failure: Myocardial Recovery in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. **Jacc Heart Failure**, vol. 3, n. 9, p. 661-669, sep. 2015. DOI: 10.1016/j.jchf.2015.04.011.

WIDACHA, L et al; Atividade física de intensidade moderada otimiza o ciclo do citrato miocárdico em modelo murino de insuficiência cardíaca. **Frontiers in Physiology**, v. 16, 1 abr. 2025. DOI: 10.3389/fphys.2025.1568060.

WILLIAMSON, C.L et al. Enhanced apoptotic propensity in diabetic cardiac mitochondria: influence of subcellular spatial location. **American Journal of Physiology**, vol. 298, n. 2, p. H633-H642, feb. 2010. DOI: 10.1152/ajpheart.00668.2009.

WISNOVSKY et al. Mitochondrial Chemical Biology: New Probes Elucidate the Secrets of the Powerhouse of the Cell. *Cell Chemical Biology*, vol. 23, n. 8, p. 917-927, aug. 2016. DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.06.012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global recommendations on physical activity for health. **Genebra**: WHO, 2010.

WU, Z et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, v. 98, n. 1, p. 115-124, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80611](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80611).

WYLLIE, A.H; KERR, J.F; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of cytology**, vol. 68, p. 251-306, 1980. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)62312-8.

YANG, S.H et al. Localização mitocondrial do receptor beta de estrogênio. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 101, p. 4130–4135, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0306948101.

YOO, S. Z. et al. Efeitos do exercício agudo na função mitocondrial, dinâmica e mitofagia em músculos cardíacos e esqueléticos de ratos. **Journal**, v. 23, p. S22–S31, 2019.

YOH, Kenta et al. Functions of Estrogen, Estrogen Receptors and Estrogen-Related Receptors in Skeletal Muscle: Regulation of Mitochondrial Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9263, 2021. DOI: 10.3390/ijms22179263.

YOON, S; EOM, G.H. Heart failure with preserved ejection fraction: present status and future directions. **Experimental & Molecular Medicine**, vol. 51, n. 12, p. 1-9. Dec.2019. DOI: 10.1038/s12276-019-0323-2.

YOUSFEZADEH, N.; KASHFI, K.; JEDDI, S.; GHASEMI, A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 89-107, 2020. DOI: 10.17179/excli2019-1990

ZHANG, L et al. Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. **Biochimica et biophysica acta**, vol. 1801, n. 1, p. 1-22, jan. 2010. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2009.09.014.

ZHANG, M.; JIA, J.; YANG, Y.; ZHANG, L.; WANG, X. Efeitos de intervenções de exercícios nas funções cognitivas em populações saudáveis: uma revisão sistemática e meta-análise. **Ageing Research Reviews**, v. 92, 102116, 2023. DOI: 10.1016/j.arr.2023.102116.

ZONG, S et al. Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase. **Cell Research**, vol. 28, n. 10, p. 1026-1034, oct. 2018. DOI: 10.1038/s41422-018-0071-1.