

**Patrícia Ribeiro do Val Lima**

***EFEITO DA DEFICIÊNCIA DA TESTOSTERONA NAS  
SUBPOPULAÇÕES MITOCÔNDRIAS EM CARDIOMIÓCITOS DE  
RATOS***

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal do Espírito Santo – UFES, para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Vitória  
2017

**Patricia Ribeiro do Val Lima**

***EFEITO DA DEFICIÊNCIA DA TESTOSTERONA NAS  
SUBPOPULAÇÕES MITOCÔNDRIAS EM CARDIOMIÓCITOS DE  
RATOS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Faustino Ribeiro Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo

Vitória

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Educação,  
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Lima, Patrícia Ribeiro do Val, 1968-  
Efeito da deficiência da testosterona nas subpopulações  
mitocondriais em cardiomiócitos de ratos. / Patrícia Ribeiro do  
Val Lima. – 2017  
80 f.

Orientador: Rogério Faustino Ribeiro Júnior  
Coorientador: Dalton Valentim Vassallo  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Espírito  
Santo (UFES), Ciências Fisiológicas.

1. Testosterona. 2. Insuficiência Cardíaca. 3. Mitocôndrias.  
4. Proteínas de Transporte da Membrana Mitocondrial. 5.  
Hormônios Gonodais.

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES**  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO  
TÍTULO DE MESTRE PELO PPGCF/CCS/UFES**  
Nº Matriculada Candidata:



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

**Registro de Julgamento de Dissertação de Mestrado**

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado da candidata **Patrícia Ribeiro do Val Lima**, intitulada "**Efeito da Deficiência da Testosterona nas Subpopulações Mitocondriais em Cardiomiócitos de Ratos**", decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado. Dessa forma, a candidata cumpriu todos os requisitos descritos no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e, portanto, a Comissão Julgadora declara que a aluna faz jus à obtenção do Grau de Mestra em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 1º de junho de 2017.

**Prof.ª Dr.ª. SUELY GOMES DE  
FIGUEIREDO**

Presidente da Comissão Julgadora - Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Fisiológicas

**Prof.ª Dr.ª. ALESSANDRA S. PADILHA**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas

**Prof. Dr. ROGÉRIO FAUSTINO  
RIBEIRO JÚNIOR**  
Orientador

**CÍNTIA SILVA LIRIO**  
Secretária Administrativa - Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Fisiológicas

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES**

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Profa. Dra. Alessandra Simão Padilha

‘Bem-aventurado o homem que acha sabedoria,  
e o homem que adquire conhecimento.’

***Provérbios 3:13***

## Dedicatória

Aos meus queridos pais **Humberto** e **Eliana**, pelo amor sobejamente demonstrado, pelo esforço empreendido em toda minha formação, apoio incondicional e que dignamente me apresentaram o caminho da honestidade e persistência.

Ao meu amado esposo, **Melchior**, pelo carinho, companheirismo e constante incentivo em todas as fases de preparo deste trabalho. Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

Aos meus amados filhos, **Raphael** e **Felipe**, pelo amor e disposição em suportar os momentos de ausência durante o período da Pós-Graduação.

## Agradecimentos

Início, agradecendo a **Deus**, que esteve sempre ao meu lado durante esta caminhada. Muitas vezes o caminho tornou-se áspero a ponto de eu pensar em desistir. Porém, o **Senhor Todo Poderoso**, proveu duas características que estão inseridas em meu ser, que são: persistência e determinação. Contudo, não teria chegado até aqui sem a ajuda de muitos **Anjos e Instituições** que **Ele** colocou ao longo da minha estrada, alguns anônimos, outros, que posso declinar seus nomes, com grande honra, a saber:

Ao meu Digno Orientador, **Prof. Dr. Rogério Faustino Ribeiro Júnior**, pelo apoio, amizade, atenção, motivação, cordialidade e pelas valiosas orientações oferecidas, sem as quais esta Tese não seria possível.

Ao meu Digno Coorientador, **Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo (Chefe)**, por ter-me incentivado e caminhado junto nos estudos do curso de Pós-Graduação, pelo apoio e pelas sugestões apresentadas durante a elaboração desta Tese.

À Insigne **Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular**, órgão da **Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)**, pela existência e manutenção do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, representada pelo seu **Diretor Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo**.

Aos Eméritos **Professores do Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular**, órgão da **Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)**, pela dedicação, pelo esmero e compromisso com a excelência da educação científica, aos dignos **Funcionários** deste Departamento.

A **Amiga Tatiani Botelho** pelo incentivo, apoio e ensinamentos na minha caminhada no curso de Pós-graduação; Adicionalmente, a sua preciosa amizade fez a grande diferença nos meus momentos difíceis.

Aos meus **Colegas Pós-graduandos Laboratório** pela amizade, companheirismo e suporte prestados durante todo o Curso.



As **Professoras Doutoradas Suely Gomes Figueiredo e Maylla Ronacher Simões** pelas sugestões apresentadas durante a elaboração desta Tese e pelo apoio na revisão.

As **Amigas do Grupo Mitocôndria (Elis Aguiar Morra, Karoline Souza Ronconi, Paula Lopes Rodrigues)** pela amizade, pelo incentivo e apoio durante toda a preparação deste trabalho.

A **Rosimeri Mattedi Carvalho** pelo acolhimento, conselhos e disposição em ajudar no curso de Pós-graduação. Eu agradeço do fundo do meu coração.

A todos **Parentes, Amigos e Colegas** que, de alguma forma, contribuíram para que este Trabalho se concretizasse.

Finalmente, de forma muito especial, aos **Animais de Experimentação**, que foram sacrificados em prol do aprimoramento do conhecimento humano.

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
	1.1 Definição da deficiência de testosterona .....	22
	1.2 Testosterona e o sistema cardiovascular, metabolismo e processos inflamatórios .....	23
	1.3 Efeitos da testosterona na função contrátil cardíaca .....	24
	1.4 Mitocôndrias .....	25
	1.5 Fosforilação oxidativa da cadeia respiratória .....	29
	1.6 Potencial de membrana .....	31
	1.7 Dinâmica mitocondrial .....	31
	1.8 Sinalização de cálcio mitocondrial em miócitos cardíacos .....	33
	1.9 Subpopulações mitocondriais .....	34
	1.10 Papel da testosterona na função mitocondrial .....	37
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	39
	2.1 Objetivo específico .....	39
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	40
	3.1 Animais Experimentais .....	40
	3.2 Modelo Experimental .....	40
	3.3 Cirurgia de Castração .....	41
	3.4 Isolamento Mitocondrial .....	41
	3.5 Respiração Mitocondrial .....	43
	3.5.1 Análise funcional da cadeia respiratória mitocondrial – oxidação fosforilativa .....	43
	3.5.2 Medidas do potencial de membrana e tamanho da mitocôndria	43
	3.5.3 Probabilidade de abertura do poro mitocondrial .....	44
	3.5.4 Resistência ao cálcio ( <i>Swelling</i> ) .....	44
	3.6 Expressão dos resultados e análise estatística .....	45
	3.7 Fármacos e reagentes utilizados .....	45
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	47
	4.1 Sobrevida .....	47

4.2	Análise de parâmetro ponderal após 12 semanas de tratamento .....	47
4.3	Yield mitocondrial .....	48
4.4	Função e morfologia – citometria de fluxo .....	49
4.5	Respiração mitocondrial .....	51
4.6	Teste com o substrato glutamato + malato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial das subpopulações interfibrilar e subsarcolemal .....	51
4.7	Teste com o substrato piruvato + malato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial das subpopulações interfibrilar e subsarcolemal .....	52
4.8	Teste com o substrato palmitoil-carnitina para avaliação da $\beta$ -oxidação das subpopulações interfibrilar e subsarcolemal .....	53
4.9	Teste com o substrato succinato + rotenona para avaliação do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial das subpopulações interfibrilar e subsarcolemal .....	54
4.10	Análise da resistência ao cálcio – swelling .....	55
4.11	Probabilidade de abertura do poro mitocondrial .....	56
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>67</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1 Desenho esquemático modificado do artigo “*Testosterone modulates cardiac contraction and calcium homeostasis: cellular and molecular mechanisms*” ilustrando as principais vias gonadais para a biossíntese de testosterona. O hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) secretado pelo hipotálamo, libera hormônio luteinizante (LH) da pituitária. O LH liga-se a receptores de LH em células de Leydig, estimula o Gs e ativa a via do cAMP / proteína quinase A (PKA). A PKA promove o transporte de colesterol em mitocôndrias e aumenta a transcrição de genes envolvidos na biossíntese de testosterona. O colesterol é convertido em pregnenolona, que difunde para o retículo endoplasmático para a biossíntese de testosterona por meio das vias  $\Delta 4$  e  $\Delta 5$ . A testosterona é formada pela  $17\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase 3 (HSD17 $\beta$ 3) na via  $\Delta 4$  e pela  $3\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3 $\beta$ ) na via  $\Delta 5$ . A testosterona é convertida em dihidrotestosterona (DHT) pela  $5\alpha$ -redutase, e alguns são aromatizados em  $17\beta$ -estradiol <sup>(9)</sup> ..... 21
- Figura 2 Desenho esquemático da mitocôndria (adaptado do esquema do site <https://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrion>) ..... 26
- Figura 3 Mitocôndria. A) Fotografia de microscopia eletrônica de uma mitocôndria de coração bovino <sup>(64)</sup>. A membrana externa é lisa e delimita a organela do citosol. A membrana interna possui invaginações (cristas). Os complexos da fosforilação oxidativa são parte integrante desta membrana. Ambas as membranas dão origem ao espaço intermembrana e a matriz. Esta compartimentalização é essencial para o funcionamento da fosforilação oxidativa. B). As mitocôndrias podem formar redes dinâmicas de fusão e fissão. A forma da rede está relacionada com o estado energético das mitocôndrias. A fotografia é tirada a partir do estudo de Gilkerson et al. <sup>(64)</sup> ..... 28
- Figura 4 Fosforilação oxidativa. Os complexos I, III e IV da cadeia respiratória transferem prótons para a membrana mitocondrial interna, conduzida pelas reações redox. Deste modo, os complexos estabelecem um gradiente de prótons que é então utilizado pela ATP sintase para a fosforilação do ADP. Nas vias NADH e succinato ocorrem a entrada de elétrons na cadeia respiratória pelo complexo I e II, respectivamente. A quinona e o citocromo C transportam elétrons entre os complexos. O aceptor final dos elétrons é o oxigênio. Neste desenho esquemático, não são considerados as restrições estequiométricas e o mecanismo do ciclo Q do complexo III ..... 29

Figura 5	Esquema ilustrativo da mensuração da respiração mitocondrial (estado I a IV e a razão estado III / estado IV) pelo consumo de oxigênio (O <sub>2</sub> ). A oligomicina bloqueia a subunidade F <sub>0</sub> .....	30
Figura 6	Esquema ilustrativo do balanço entre os processos de fusão e fissão mitocondrial, e as proteínas envolvidas nesses processos – implicações na morfologia mitocondrial. Drp1 – <i>dynamamin-related protein 1</i> ; Fis1 – <i>fission 1 homologue protein</i> ; Mfn1 – mitofusina 1; Mfn2 – mitofusina 2 e OPA1 – <i>optical atrophy 1</i> (Adaptado de Liesa, Palacin e Zorzano, 2009) <sup>(57)</sup> .....	32
Figura 7	Desenho esquemático de eventos e proteínas sinalizadoras do cálcio em miócitos ventriculares adultos <sup>(82)</sup> .....	34
Figura 8	Tipos de mitocôndria cardíaca em miócitos ventriculares de ratos. Microfotografia eletrônica; Seção ultradelgada longitudinal, fixação convencional. Secção ultrafina longitudinal. (A) Mitocôndrias perinucleares e interfibrilares. (B) Mitocôndrias interfibrilares <sup>(85)</sup> ...	35
Figura 9	Microfotografia eletrônica representativa de coração de murídeo ( <i>Murinae</i> ) adulto que retrata as três subpopulações de mitocôndrias: mitocôndrias perinucleares (PNM); mitocôndria interfibrilar (IFM); e mitocôndria subsarcolemal (SSM) <sup>(86)</sup> .....	35
Figura 10	(A) Yield mitocondrial na subpopulação interfibrilar (IFM), (B) Yield mitocondrial na subpopulação subsarcolemal (SSM) a partir do ventrículo esquerdo do animal, do sexo masculino. SHAM - cirurgia simulada sem remoção dos testículos; OQT - orquiectomia; OQT + T - orquiectomia + testosterona. * P <0,05 em relação ao Grupo SHAM. # P <0,05 em relação ao Grupo OQT. O número de animais está indicado entre parêntesis .....	48
Figura 11	Determinação da função e morfologia das subpopulações mitocondriais distintas chamadas de subsarcolemal (SSM) e interfibrilar (IFM). Grupos estudados: simulado (SHAM), orquiectomizados (OQT), e, orquiectomizados com testosterona (OQT + T) utilizando citometria de fluxo. A, B, C e D - Análise do potencial de membrana; E e F - Análise do tamanho; G e H - Análise da complexidade. Os valores de potencial de membrana, o tamanho e a complexidade são expressos como unidades arbitrárias (UA). * P <0,05 em relação ao Grupo SHAM. # P <0,05 em relação ao Grupo OQT. O número de animais está indicado entre parênteses .....	50

- Figura 12 Teste com glutamato + malato como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial da fração interfibrilar e subsarcolemal de ratos (SHAM – ratos controle, OQT – ratos orquiectomizados e OQT + T – ratos orquiectomizados com reposição de testosterona) por 12 semanas. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA ..... 52
- Figura 13 Teste com piruvato + malato como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial da fração interfibrilar e subsarcolemal de ratos (SHAM – ratos controle, OQT – ratos orquiectomizados e OQT + T – ratos orquiectomizados com reposição de testosterona) por 12 semanas. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA ..... 53
- Figura 14 Teste com palmitoil + carnitina como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial da fração interfibrilar e subsarcolemal de ratos (SHAM – ratos controle, OQT – ratos orquiectomizados e OQT + T – ratos orquiectomizados com reposição de testosterona) por 12 semanas. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA ..... 54
- Figura 15 Teste com rotenona + succinato como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial da fração interfibrilar e subsarcolemal de ratos (SHAM – ratos controle, OQT – ratos orquiectomizados e OQT + T – ratos orquiectomizados com reposição de testosterona) por 12 semanas. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA ..... 55
- Figura 16 Análise da resistência ao cálcio (swelling). Queda da absorbância após adição de cálcio na concentração final de 100 e 500 nM por  $\mu\text{g}$  de proteína em ambas as subpopulações mitocondriais (IFM e SSM) de ratos SHAM, OQT e OQT + T após 12 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA ..... 56
- Figura 17 Captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial das frações [interfibrilar (IFM) e subsarcolemal (SSM)] de ratos SHAM, orquiectomizados (OQT) e orquiectomizados após 12 semanas de tratamento (OQT+T). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA seguido de post hoc de Bonferroni ..... 57

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Resultados da análise de variância dos tratamentos SHAM, OQT e OQT + T .....	47
----------	--	----

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ADP	Difosfato de adenosina
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
ETC	Cadeia transportadora de elétrons
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
IC	Insuficiência cardíaca
IFM	Subpopulação mitocondrial interfibrilar
IMM	Membrana interna mitocondrial
MCU	Canal mitocondrial uniporter
Mfn-2	Mitofusina-2
mNCX	Trocador iônico mitocondrial Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
mPTP	Poros de permeabilidade transicional
mRyR1	Receptor mitocondrial de rianodina tipo 1
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
OMN	Membrana externa mitocondrial
Pi	Fósforo inorgânico
PGC-1	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator</i>
RaM	Modo rápido de captação de cálcio nas mitocôndrias cardíacas
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
SR	Retículo sarcoplasmático
SSM	Subpopulação mitocondrial subsarcolemal
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TFAM	Fator de transcrição mitocondrial
tPTP	Poros de permeabilidade permanente
VO <sub>2</sub>	Consumo máximo de oxigênio



## Resumo

A deficiência de testosterona (hipogonadismo) é um dos fatores de risco para doença cardiovascular. Quando ocorre, provoca redução na contratilidade miocárdica. Considerando que existe estreita correlação entre o metabolismo oxidativo e a contratilidade miocárdica, o presente estudo visou obter novas informações sobre os efeitos da deficiência de testosterona em duas subpopulações mitocondriais cardíacas espacialmente distintas: mitocôndria subsarcolemal (SSM) e interfibrilar (IFM). Utilizou-se modelo animal de ratos machos Wistar (n=30), de linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, para avaliar a função e estrutura dessas subpopulações mitocondriais cardíacas com e sem deficiência de testosterona. A amostra foi dividida de forma randomizada em três grupos: 1) Grupo SHAM (controle); 2) Grupo OQT (orquiectomizados) e 3) Grupo OQT + T (orquiectomizados com reposição de testosterona). Os resultados mostraram quatro achados principais, como segue: a) o rendimento mitocondrial total (*Yield*), na subpopulação subsarcolemal (SSM) do Grupo orquiectomizado (OQT), mostrou maior quantidade de proteína mitocondrial em relação aos Grupos SHAM e OQT+T, porém não houve diferença na fração interfibrilar (IFM); b) o potencial de membrana, o tamanho e a complexidade interna da subpopulação interfibrilar (IFM) do Grupo OQT foram maiores em relação aos Grupos SHAM e OQT+T, porém não houve diferença na fração subsarcolemal (SSM); c) a taxa de fosforilação oxidativa com os substratos glutamato + malato, piruvato + malato, palmitoil + carnitina e rotenona + succinato na subpopulação interfibrilar (IFM) do Grupo OQT foi menor em comparação com os Grupos SHAM e OQT+T, sendo que a reposição de testosterona (OQT+T) foi capaz de restaurar essas alterações; houve diminuição na fosforilação oxidativa no Grupo SSM, com palmitoil + carnitina como substrato; d) o *swelling* mitocondrial não mostrou diferença na capacidade de retenção de cálcio em todos os Grupos nas duas frações (IFM e SSM); além disso, a deficiência de testosterona afetou a captação de cálcio mitocondrial (cálcio *green* 5N), demonstrando que a fração IFM no Grupo OQT apresentou maior capacidade de retenção de cálcio. Em suma, na subpopulação mitocondrial interfibrilar cardíaca ocorreram alterações na fosforilação oxidativa, morfologia e capacidade de retenção de cálcio nos ratos com deficiência de testosterona. A reposição de testosterona foi capaz de restaurar todas as alterações induzidas pela orquiectomia. Portanto, o presente estudo mostrou diferenças específicas nas subpopulações mitocondriais subsarcolemais e interfibrilares cardíacas como resultado da deficiência de testosterona.

**Palavras-chave:** Testosterona; Insuficiência Cardíaca; Mitocôndrias; Proteínas de Transporte da Membrana Mitocondrial; Hormônios Gonadais.

## Abstract

Testosterone deficiency (hypogonadism) is one of the risk factors for cardiovascular disease. When it occurs, it causes reduction in myocardial contractility. Considering that there is a close correlation between oxidative metabolism and myocardial contractility, the present study aimed to obtain new information about the effects of testosterone deficiency on two spatially distinct cardiac mitochondrial subpopulations: subsarcolemmal mitochondria (SSM) and interfibrillar mitochondria (IFM). Male Wistar rats (n = 30), of the albino line *Rattus norvegicus*, were used to evaluate the function and structure of these cardiac mitochondrial subpopulations with and without testosterone deficiency. The sample was randomly divided into three groups: 1) SHAM group (control); 2) OQT group (orchidectomized) and 3) OQT + T group (orchidectomized with testosterone replacement). The results showed four main findings, as follows: a) the total mitochondrial yield in the subsarcolemmal subpopulation (SSM) of the orchidectomized group (OQT) showed a higher amount of mitochondrial protein in relation to the SHAM and OQT + T groups, however there was no difference in interfibrillar fraction (IFM); b) membrane potential, internal size and complexity in the interfibrillar subpopulation (IFM) from the OQT group were higher compared to the SHAM and OQT + T groups, but there was no difference in the subsarcolemmal subpopulation (SSM); c) the rate of oxidative phosphorylation with the substrates glutamate + malate, pyruvate + malate, palmitoyl-L-carnitine and rotenone + succinate in the interfibrillar subpopulation (IFM) of the OQT group was lower in comparison with the SHAM and OQT + T groups, and testosterone replacement (OQT + T) was able to restore these alterations; there was decrease in oxidative phosphorylation in the SSM group, with palmitoyl-L-carnitine as substrate; d) mitochondrial swelling showed no difference in calcium retention capacity in all groups in both subpopulations (IFM and SSM); in addition, testosterone deficiency affected mitochondrial calcium uptake (calcium green 5N assay), demonstrating that the IFM subpopulation from the OQT group had a higher calcium retention capacity. In summary, in the cardiac interfibrillar mitochondrial subpopulation, changes in oxidative phosphorylation, morphology and calcium retention capacity occurred in rats with testosterone deficiency. Testosterone replacement was able to restore all changes induced by orchidectomy. Therefore, the present study showed specific differences in subsarcolemmal and cardiac interfibrillar mitochondrial subpopulations as a result of testosterone deficiency.

**Keywords:** Testosterone; Heart Failure; Mitochondria; Mitochondrial Membrane Transport Proteins; Gonadal Hormones.

## 1 INTRODUÇÃO

As origens descritivas sobre secreção interna vinda dos testículos datam de 1849, quando Berthold, zoologista e fisiologista alemão experimentou a castração em galos com reimplantação testicular <sup>(1)</sup>. Ele observou que alguma substância sérica secretada pelos testículos, confere aos galos suas características biológicas masculinas <sup>(1)</sup>. Berthold realizou a remoção dos testículos dos galos imaturos (capões) e constatou a diminuição de algumas características sexuais secundárias (pente, acácias) e comportamentos masculinos típicos. Capões não cantam, não tentam acasalar, e não lutam de forma agressiva com outros galos. Adicionalmente, Berthold transplantou testículos em capões e verificou que estes animais apresentaram comportamento agressivo normal e características sexuais secundárias. Se o testículo transplantado fosse removido, em seguida, o animal se comportava como um capão. Após a dissecação, constatou que o testículo transplantado tinha estabelecido novas conexões vasculares. Com isto, concluiu que os testículos liberam substância para a corrente sanguínea que afeta o comportamento e a morfologia do animal. Deste modo, desde o seu início, o estudo de hormônios estava focado em secreções gonadais <sup>(1)</sup>. Assim por diante, outros estudos com animais e formas de auto experimentação humana começaram a surgir esporadicamente na literatura médica, numa tentativa de identificar e utilizar esta substância. O fisiologista Eugene Steinach (1920) idealizou um procedimento cirúrgico para tratamento de sintomas, que no futuro, tornaria a ser reconhecido como deficiência da testosterona <sup>(2)</sup>. A "Operação Steinach" baseava-se em vasectomia unilateral, onde Steinach postulava a mudança do equilíbrio funcional dos testículos induzindo aumento da produção hormonal. Apesar dos trabalhos de Steinach não obterem comprovação, eles representaram uma das primeiras intervenções destinadas ao tratamento o hipogonadismo <sup>(2)</sup>. Em 1931, Butenandt isolou 15 mg de androsterona a partir de 15.000 litros de urina de policiais em Berlin <sup>(3)</sup>. Em 1935, Ernest Lacqueur a partir de 100 kg de testículos de touros, extraiu e isolou 10 mg de uma substância androgênica o qual considerou ser mais ativa do que a androsterona, denominado-a de "testosterona"<sup>(4)</sup>.

No gênero masculino, a síntese de testosterona é comandada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal <sup>(5)</sup>. Os neurônios hipotalâmicos sintetizam e secretam na circulação sanguínea o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH)<sup>(6)</sup>. Este por sua

vez, acopla-se aos receptores da glândula pituitária anterior e estimula a síntese e a secreção do hormônio luteinizante (LH) <sup>(5)</sup>. O LH liga-se a receptores específicos nas células de Leydig, que se localizam nos testículos. Esta ligação proteica estimula a proteína G (Gs) com ativação da via AMPc/proteína quinase A (PKA) induzindo o transporte do colesterol para interior das mitocôndrias e promovendo o aumento da ativação transcripcional de enzimas codificadoras de genes para promover a síntese da testosterona <sup>(7)</sup>. Os níveis séricos elevados de testosterona promovem auto regulação por feedback negativo, que bloqueia a liberação do GnRH e do LH<sup>(5)</sup>.

Em decorrência da queda dos níveis séricos de testosterona, o complexo multi-proteína associado ao conjunto da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) transporta o colesterol para a membrana mitocondrial interna <sup>(8)</sup>. A consequência deste caminho é a clivagem da cadeia lateral do colesterol pela enzima citocromo P450 (CYP) também conhecida como CYP11A1 transformando-o em pregnenolona <sup>(8)</sup>. Esta por sua vez, difunde-se para o retículo endoplasmático onde a síntese de testosterona continua por meio das vias  $\Delta 4$  e  $\Delta 5$ <sup>(9)</sup>, como mostrado na Figura 1.

## Principais vias gonadais para a biossíntese de hormônios esteróides

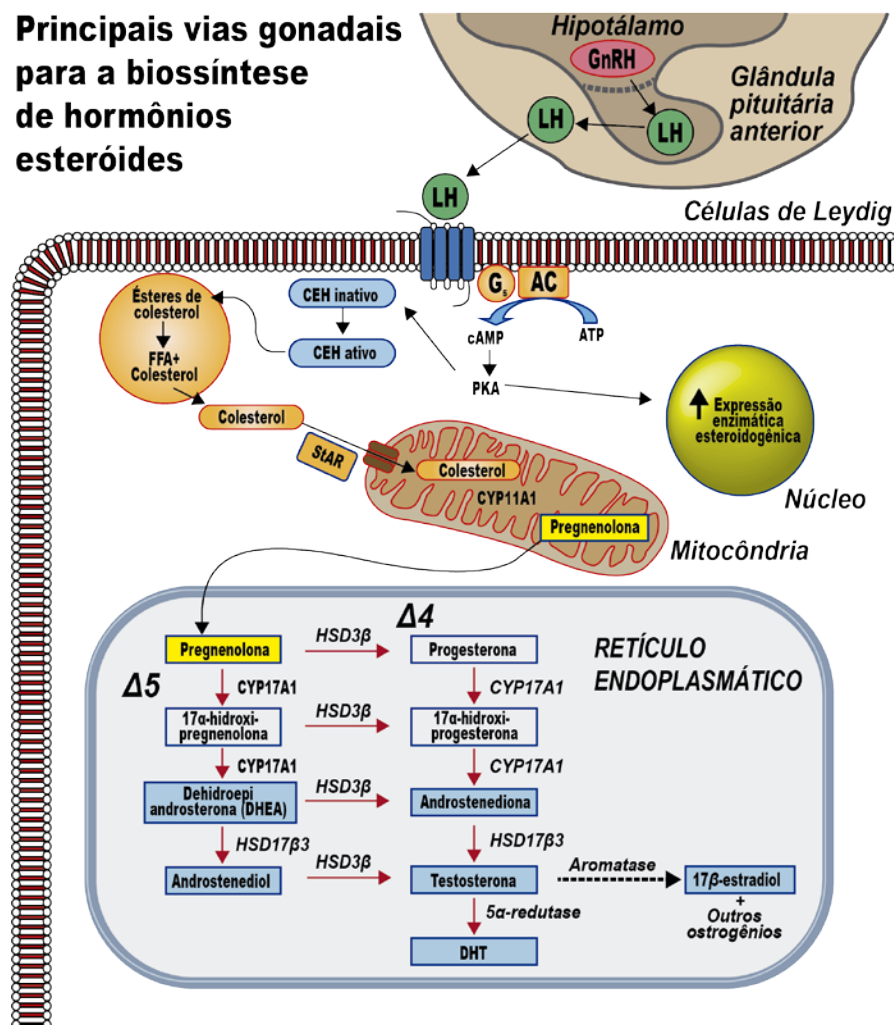


Figura 1 - Desenho esquemático modificado ilustrando as principais vias gonadais para a biossíntese de testosterona. O hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) secretado pelo hipotálamo, libera hormônio luteinizante (LH) da pituitária. O LH liga-se a receptores de LH em células de Leydig, estimula o Gs e ativa a via do cAMP / proteína quinase A (PKA). A PKA promove o transporte de colesterol em mitocôndrias e aumenta a transcrição de genes envolvidos na biossíntese de testosterona. O colesterol é convertido em pregnenolona, que difunde para o retículo endoplasmático para a biossíntese de testosterona por meio das vias  $\Delta 4$  e  $\Delta 5$ . A testosterona é formada pela 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase 3 (HSD17 $\beta$ 3) na via  $\Delta 4$  e pela 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3 $\beta$ ) na via  $\Delta 5$ . A testosterona é convertida em dihidrotestosterona (DHT) pela 5 $\alpha$ -redutase, e alguns são aromatizados em 17 $\beta$ -estradiol (9).

O andrógeno humano testosterona circula no organismo na forma livre e conjugada. Aproximadamente 60 a 70% da testosterona encontra-se na corrente sanguínea ligada à globulina de ligação de hormônios sexuais [*Sex Hormone Binding Globulin (SHBG)*] onde 30% ligada à albumina, e 2 a 3% está sob a forma livre (biodisponível). Sendo esta última, a fração responsável por seus efeitos fisiológicos (10). A produção da testosterona, no gênero masculino, inicia-se geralmente aos 10 a

13 anos de idade, atingindo seu pico sérico máximo na fase adulta. Os níveis séricos da testosterona (formas conjugada e livre) geralmente declinam gradualmente na quarta década de vida <sup>(10)</sup>.

Os hormônios esteroides atuam a nível celular geralmente atravessando a camada lipídica do sarcolema e acoplando-se à receptores citoplasmáticos específicos para então iniciar reações químicas em cascata no citosol por meio de proteínas <sup>(11)</sup>. A associação dos receptores com o hormônio, atua no núcleo promovendo a síntese de RNAm, que no citosol promove síntese de proteínas responsáveis pelo efeito ou ação hormonal.

### **1.1 Deficiência de testosterona**

A deficiência androgênica (hipogonadismo) comumente ocorre na meia idade e em homens mais velhos <sup>(12)</sup>. Acomete também, homens mais jovens com distúrbios hipófise-hipotálamo ou testiculares <sup>(13)</sup>. Clinicamente, a síndrome de deficiência androgênica tem sido definida nas diretrizes atuais da Sociedade Endócrina como uma diversidade de sinais e sintomas específicos acompanhados aos níveis baixos de testosterona sérica <sup>(14)</sup>. A determinação do nível sérico da testosterona total está indicada quando estão presentes sinais específicos, incluindo: anormalidades no desenvolvimento sexual, disfunção sexual, ginecomastia, tamanho testicular pequeno, infertilidade e fraturas ósseas mesmo com baixo impacto <sup>(14)</sup>.

Considera-se também sintomas menos específicos como: problemas de atenção, sono, e humor depressivo <sup>(14)</sup>. O nível sérico da testosterona total matinal deve ser mensurado repetidamente para confirmar o diagnóstico <sup>(14)</sup>. O valor de corte para o nível sérico diminuído da testosterona total deve ser definido como o limite inferior dos valores normais entre homens jovens saudáveis <sup>(14)</sup>. Condições como obesidade, diabetes, disfunção tireoidiana ou fármacos que afetam o nível sérico da *Sex Hormone-Binding Globulin* (SHBG) como por exemplo, anticonvulsivantes, glucocorticosteróides, podem dificultar a interpretação das medidas testosterona total e frações quando estão perto do limite inferior da faixa de referência <sup>(14)</sup>.

## 1.2 Testosterona e o sistema cardiovascular, metabolismo e processos inflamatórios

A testosterona, enzimas que metabolizam a testosterona, e os receptores de andrógenos estão presentes em estruturas do sistema cardiovascular incluindo cardiomiócitos <sup>(15)</sup>. Semelhante aos processos metabólicos que ocorrem nos testículos, na pele e no músculo esquelético, a testosterona no coração também pode ser reduzida a di-hidrotestosterona (DHT) <sup>(16)</sup> e aromatizada ao estradiol <sup>(17)</sup>. A di-hidrotestosterona (DHT) e testosterona exercem efeitos biológicos em cardiomiócitos por meio de ligação com receptores androgênicos <sup>(16)</sup>, e o estradiol derivado de testosterona por meio da interação com receptores estrogênicos <sup>(17)</sup>. Os hormônios esteroides atuam no sistema cardiovascular e no sistema nervoso não apenas por meio do mecanismo genômico, mas também por meio de interações com estruturas citoplasmáticas e de membrana, promovendo mudanças na conformação espacial dos canais de membrana e à modulação da sinalização celular <sup>(18,19)</sup>. Estudos mostraram que animais castrados apresentam menor massa cardíaca <sup>(20)</sup>, disfunção sistólica e diastólica <sup>(20)</sup>, mudanças nas proporções das subunidades das cadeias pesadas de miosina (MHC), com aumento da MHC- $\beta$  e diminuição da MHC- $\alpha$  <sup>(18)</sup>. Consequentemente, tem-se diminuição na quantidade de mRNA para receptores androgênicos, canais de íons  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , canais de cálcio de tipo "L" e receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos em cardiomiócitos <sup>(19,21)</sup>. A suplementação de testosterona normaliza a maioria dos distúrbios acima mencionados <sup>(22)</sup>. A testosterona também modula a atividade elétrica do miocárdio <sup>(23)</sup>, como por exemplo, através do efeito sobre os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  na membrana celular <sup>(24)</sup>. Adicionalmente, este hormônio possui propriedades vasodilatadoras no sistema cardiovascular pulmonar e sistêmico <sup>(25,26)</sup>. A testosterona pode prevenir ou reverter o remodelamento miocárdico patológico em modelos experimentais <sup>(27)</sup>, embora isso não tenha sido confirmado por alguns autores <sup>(28)</sup>. Um potencial efeito benéfico da testosterona sobre o miocárdio pode estar relacionado às suas propriedades anti-inflamatórias <sup>(29)</sup> e antioxidantes <sup>(30)</sup>. A administração de di-hidrotestosterona à ratos machos saudáveis diminui o nível de interleucina-6 no miocárdio <sup>(29)</sup>, enquanto a castração reduz a atividade miocárdica de superóxido dismutase (um importante elemento do sistema antioxidante celular <sup>(30)</sup>) e ativa metaloproteinases de matriz <sup>(31)</sup>. Além disso, um efeito protetor da testosterona

sobre o miocárdio foi mostrado em um modelo experimental de isquemia e reperfusão (32).

### 1.3 Efeitos da testosterona na função contrátil cardíaca

Acredita-se que a testosterona possa conferir um importante papel nas diferenças na contratilidade miocárdica entre os homens e as mulheres (33). Como exemplo, os homens apresentam a fração de ejeção em repouso mais baixa do que as mulheres (34), porém eles respondem ao exercício com um maior aumento na fração de ejeção do que as mulheres (35).

A função miocárdica é um dos processos fisiológicos regulados pelos hormônios andrógenos circulantes por meio da interação com os receptores andrógenos específicos que estão localizados na membrana celular do miócito (36).

Desde a descoberta do receptor de androgênio no cardiomiócitos (36), evidências mostram a atuação da testosterona regulando as funções cardíacas por ação direta sobre o miocárdio (37). Sabe-se também que a deficiência de testosterona é um fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV), tal como, a doença arterial coronariana (DAC) (12).

A deficiência de testosterona tem sido associada com morte súbita (38), hipertrofia cardíaca (39), trombose (40), aumento do índice de progressão da aterosclerose que pode levar à doença arterial coronariana (40) e subsequente isquemia do miocárdio (41). Estudo em animais têm mostrado os efeitos protetores da testosterona (42). Pacientes do sexo masculino com angina (43) ou doença arterial coronariana (DAC) (41) geralmente apresentam níveis de testosterona mais baixos do que os homens sem DAC da mesma idade. A terapia com testosterona alivia os sintomas nos pacientes portadores de DAC (41).

A administração aguda de testosterona mostrou retardar o aparecimento (44) de isquemia do miocárdio induzida por exercício em pacientes do sexo masculino com doenças da artéria coronária. Demonstrou-se experimentalmente que a testosterona induz a citoproteção em miócitos cardíacos (42). Confirmando estes achados, *Zhang e cols.*, demonstraram recentemente que a insuficiência cardíaca induzida por isquemia aguda é acompanhada de uma redução no nível sérico de testosterona, que se correlaciona com a gravidade da disfunção ventricular esquerda (45).



Com isto, o tratamento com testosterona reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, remodelamento ventricular e melhora a função do ventrículo esquerdo, com redução da taxa de mortalidade <sup>(45)</sup>. As observações sugerem que no gênero masculino a testosterona é importante na proteção contra as lesões no mecanismo da isquemia e reperfusão <sup>(44)</sup>.

De modo inverso, administração de testosterona em níveis suprafisiológicos tem mostrado produzir efeitos deletérios <sup>(46)</sup>. Estudos em animais, demonstraram-se que a suplementação de testosterona suprafisiológica aumenta a apoptose <sup>(46)</sup> interferindo na fase precoce do remodelamento, cura e resposta inflamatória exacerbada após infarto do miocárdio <sup>(47)</sup>. Estas observações reforçam a ideia de que a testosterona em níveis fisiológicos é importante para a proteção contra as lesões do miocárdio isquêmico <sup>(48)</sup>.

Recentemente, pesquisadores preocupados com as doenças cardíacas relacionadas com a deficiência de testosterona, aumentam pesquisas sobre a correlação da falta deste hormônio androgênico com a disfunção mitocondrial. *Pongkan* e cols., em 2015, mostraram que a reposição crônica de testosterona exerce cardioproteção por atenuar a disfunção mitocondrial em ratos orquiectomizados <sup>(49)</sup>.

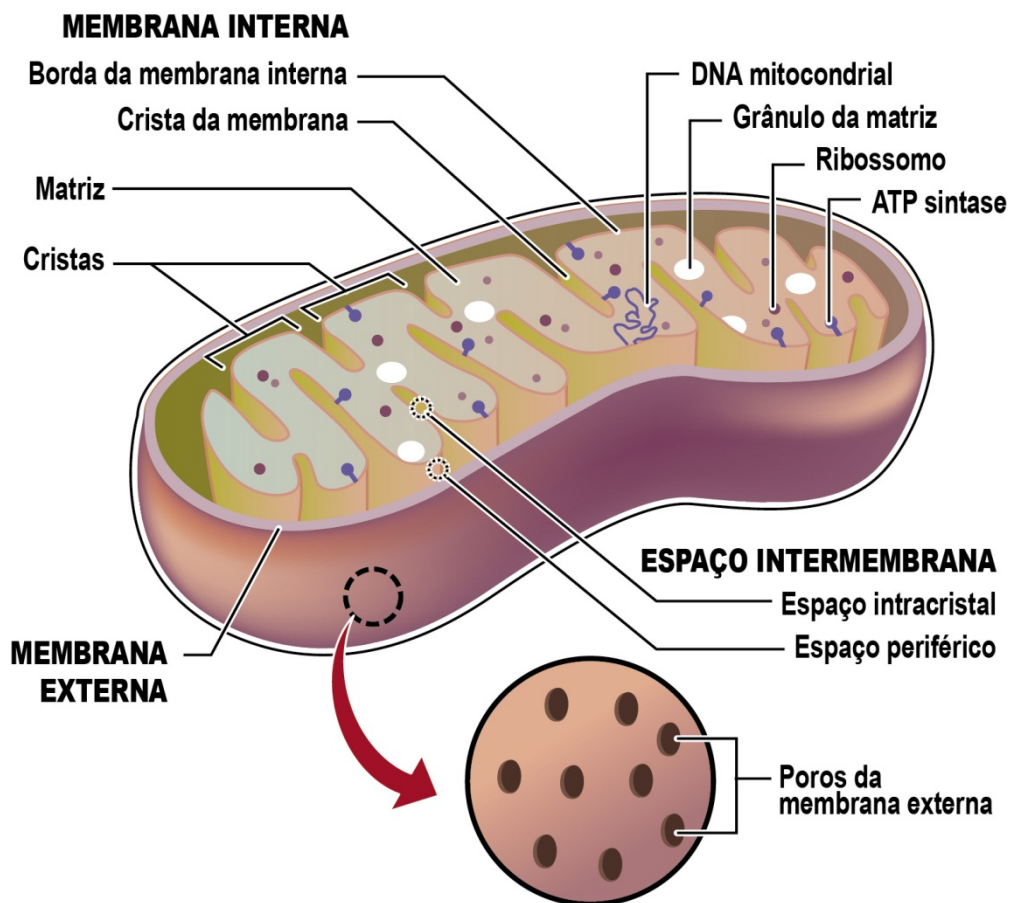
#### **1.4 Mitocôndrias**

A palavra mitocôndria provém da junção de duas palavras gregas: *mitos* e *chondros* que significam linha e grão. A mitocôndria foi descoberta e caracterizada como compartimento citoplasmático granular com membrana própria por Rudolph Albert Von Kolliker em 1857 <sup>(50)</sup>. As mitocôndrias são organelas encontradas em células eucarióticas geralmente em grande número e variadas formas representado de 10 a 30% do volume celular construindo uma rede dinâmica. Existem três tipos de subpopulações de mitocôndrias. As mitocôndrias subsarcolemais (SSMs) são facilmente identificadas nas fibras musculares <sup>(51)</sup> e as mitocôndrias interfibrilares (IFMs) que estão firmemente inseridas entre miofilamentos <sup>(52)</sup>.

Fotografias por meio da microscopia eletrônica mostraram detalhadamente sua estrutura como suas duas membranas (interna e externa), o estreito espaço intermembrana e a matriz (Figura 2). Como os processos oxidativos – ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa – ocorrem na mitocôndria, ficou demonstrado que a produção de energia é a principal função bioquímica da organela.

Adicionalmente, foram mostradas as alterações morfofuncionais mitocondriais decorrentes das mudanças na concentração do íon cálcio <sup>(53)</sup> e a ativação direta de vias pró-apoptóticas <sup>(54)</sup>. A dinâmica mitocondrial foi inicialmente mostrada com a visualização das alterações na morfologia e rearranjo estrutural consequente à diferentes estímulos <sup>(55)</sup>. Uma importante contribuição em 1997 foi a descoberta do primeiro gene relacionado à plasticidade mitocondrial <sup>(56)</sup>. Mais tarde, genes responsáveis pela dinâmica mitocondrial foram descobertos e iniciou-se o desenvolvimento dos primeiros modelos transgênicos <sup>(57)</sup>.

Em relação a morfologia, a distribuição e a atividade pode ser regulada por fusão e fissão <sup>(58)</sup> e é dependente do estado fisiológico da organela.



**Figura 2 - Desenho esquemático da mitocôndria (adaptado do esquema do site <https://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrion>).**

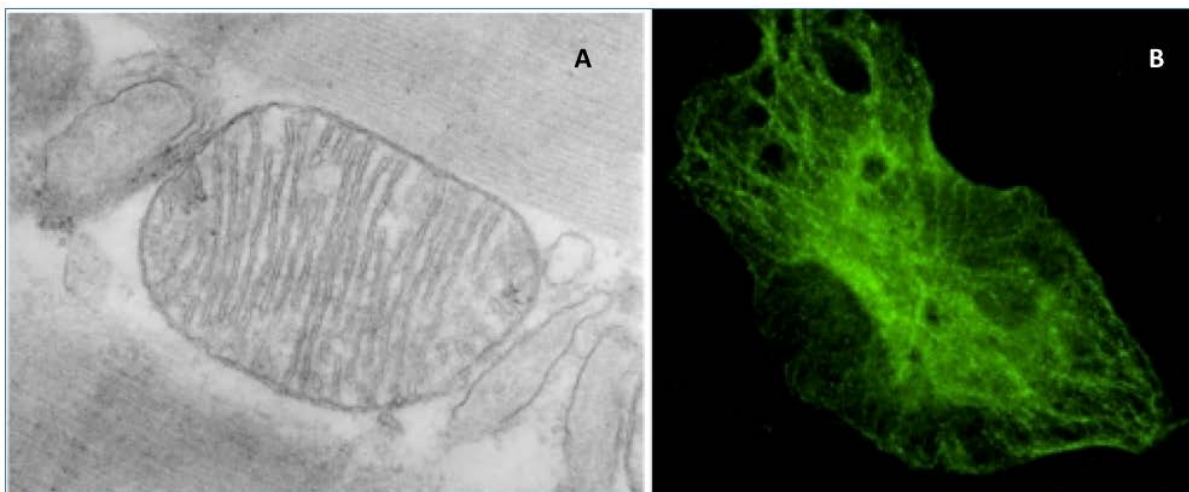
Além dos processos envolvidos no metabolismo energético, em particular a fosforilação oxidativa, as mitocôndrias compreendem muitas reações bioquímicas: elas estão envolvidas na síntese de precursores essenciais para a biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos, etc. Além da apoptose as mitocôndrias

estão envolvidas na sinalização de cálcio <sup>(59)</sup> e na produção de espécies reativas de oxigênio <sup>(60)</sup>.

As duas membranas dão origem a dois compartimentos: o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial, delimitada pela membrana interna, envolvidos em vários processos bioquímicos e de transportes. A membrana interna é essencial para o funcionamento da fosforilação oxidativa dentro das células eucarióticas <sup>(61)</sup>. Apenas O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O podem permear facilmente através dessa membrana. A membrana externa delimita o organelo do citosol contendo porinas, que permitem a entrada de moléculas inespecíficas até 10 kDa, porém impede o citocromo C e outros intermediários da cadeia respiratória com peso molecular cerca de 12 kDa, deixarem o espaço intermembrana (Figura 2) <sup>(62)</sup>.

A membrana interna, possui gradiente eletroquímico de prótons entre a matriz e o espaço intermembrana onde se processa a fosforilação oxidativa, por meio de cinco complexos (enzimas). Os complexos de I a IV integram a cadeia de acionamento do transporte de elétrons cuja função é o de estabelecer um gradiente eletroquímico de prótons sobre esta membrana e o complexo V (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintase). Este último complexo utiliza a força motriz deste gradiente para fosforilar a adenosina difosfato com fosfato inorgânico (ADP+Pi) em adenosina trifosfato (ATP)<sup>(63)</sup>.

Além dos complexos de enzimas da cadeia respiratória, a membrana interna contém várias proteínas que, entre outros, controlam a passagem de ATP, ADP, fosfato, íons e substratos como piruvato. Esta membrana rica em proteínas mostra numerosas invaginações formando cristas, que desta forma, ampliam sua superfície (Figura 3) <sup>(63)</sup>.



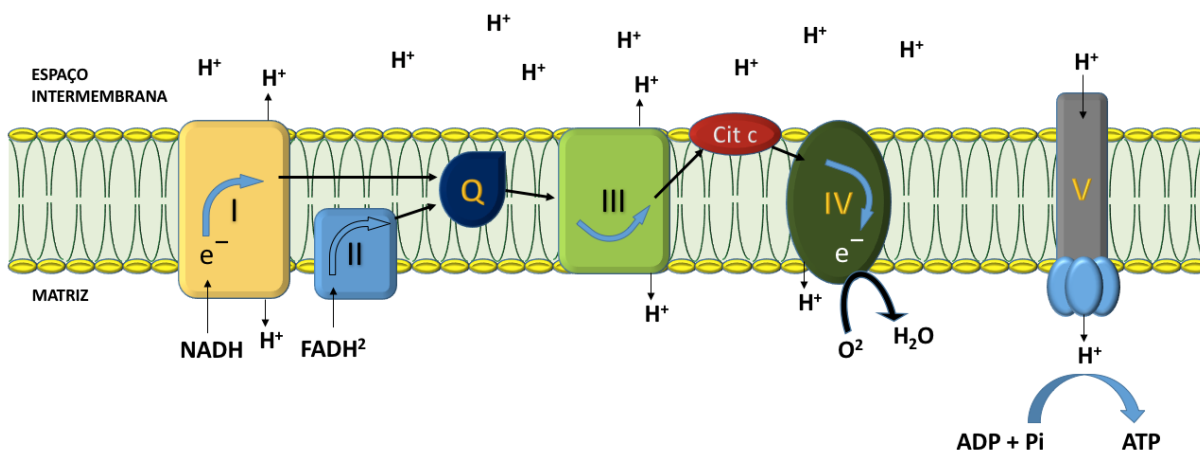
**Figura 3 - Mitocôndria. A) Fotografia de microscopia eletrônica de uma mitocôndria de coração bovino <sup>(64)</sup>. A membrana externa é lisa e delimita a organela do citosol. A membrana interna possui invaginações (cristas). Os complexos da fosforilação oxidativa são parte integrante desta membrana. Ambas as membranas dão origem ao espaço intermembrana e a matriz. Esta compartimentalização é essencial para o funcionamento da fosforilação oxidativa. B) As mitocôndrias podem formar redes dinâmicas de fusão e fissão. A forma da rede está relacionada com o estado energético das mitocôndrias. A fotografia é tirada a partir do estudo de Gilkerson e cols. <sup>(64)</sup>.**

Na matriz mitocondrial é onde ocorre o ciclo de Krebs, que é um sistema de enzimas responsável pela oxidação de certas moléculas como piruvato (produto da glicólise), glutamato, malato e palmitoil, para redução do  $\text{NAD}^+$  e o succinato que reduz o FAD. Além disso, a oxidação de ácidos graxos contribui para alimentar o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória por meio da acetil-CoA e através da formação do NADH e  $\text{FADH}_2$  <sup>(63)</sup>.

O transporte de elétrons na cadeia respiratória é feito por meio de complexos I, II, III e IV e dois componentes independentes dos complexos (ubiquinona e citocromo-C). Os substratos do complexo I é o NADH podendo ser originado do malato, glutamato e piruvato. O NADH é oxidado pelo complexo I, doando 2 elétrons que são depois transportados para a ubiquinona (Q) posteriormente para o complexo III. Então os elétrons são transportados por meio do citocromo C para o complexo IV. O substrato succinato é oxidado no complexo II, cedendo 2 elétrons que serão oxidados pela ubiquinona (Q) e transportados para o complexo III e novamente os elétrons serão transferidos para o complexo IV através do citocromo C aonde vai reduzir o oxigênio para formar água <sup>(63)</sup>.

Na CTE os elétrons podem não alcançar o seu destino final que é o citocromo C oxidase (complexo IV) onde o  $\text{O}_2$  é reduzido em água. Entre os complexos I e III

ocorre extravasamento de elétrons com formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Isto ocorre quando: com o aumento do consumo de  $O_2$ , e/ou com aumento no fluxo de elétrons pela CTE <sup>(65)</sup>, e/ou aumento no potencial de membrana interna mitocondrial <sup>(66)</sup>.

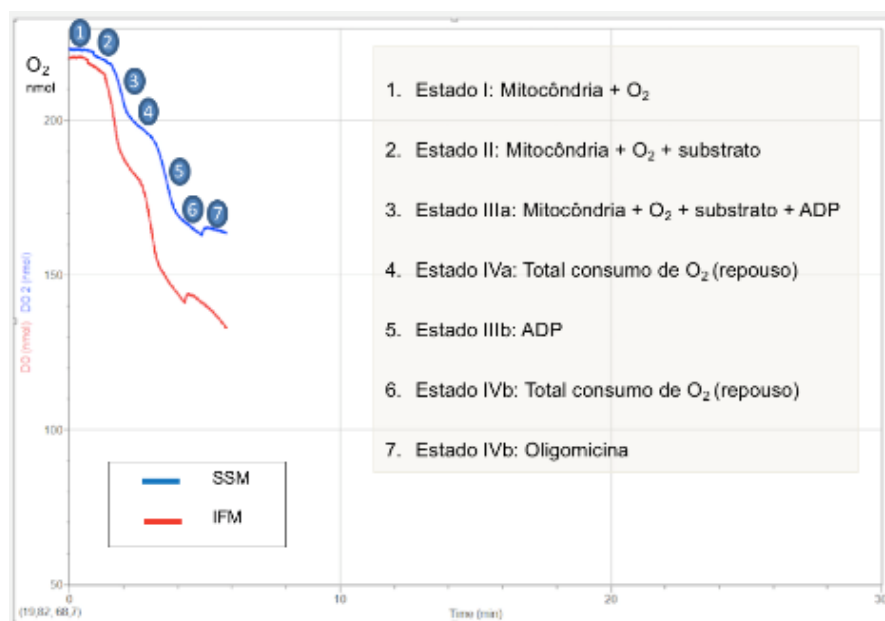


**Figura 4 - Fosforilação oxidativa.** Os complexos I, III e IV da cadeia respiratória transferem prótons para a membrana mitocondrial interna, conduzida pelas reações redox. Deste modo, os complexos estabelecem um gradiente de prótons que é então utilizado pela ATP sintase para a fosforilação do ADP. Nas vias NADH e succinato ocorrem a entrada de elétrons na cadeia respiratória pelo complexo I e II, respectivamente. A quinona e o citocromo C transportam elétrons entre os complexos. O receptor final dos elétrons é o oxigênio. Neste desenho esquemático, não são considerados as restrições estequiométricas e o mecanismo do ciclo Q do complexo III.

### 1.5 Fosforilação oxidativa da cadeia respiratória

A respiração mitocondrial é avaliada pelo consumo de oxigênio ( $O_2$ ) e apresenta duas importantes fases: a) estado III e b) estado IV. O estado III é a velocidade de consumo de oxigênio quando a mitocôndria é colocada em um meio com substrato oxidável e com ADP, produzindo assim o ATP. O estado IV representa o repouso após a mitocôndria já ter consumido todo o ADP disponível. A partir destes dois estados obtemos outro parâmetro que é a razão de controle respiratório (RCR), caracterizado pela divisão do estado III pelo estado IV <sup>(67)</sup>. Um conceito importante a ser analisado é o acoplamento da respiração mitocondrial, que é a capacidade de a mitocôndria desencadear seu processo energético quando exposta ao ADP, ou seja, o acoplamento entre os processos oxidativo e o de fosforilação. Quando ocorre o desacoplamento da organela em situações lesivas, sugere que a membrana interna

pode ter sido afetada, indicando o comprometimento na geração de energia (Figura 4) <sup>(67)</sup>.



**Figura 5 - Esquema ilustrativo da mensuração da respiração mitocondrial (estado I a IV e a razão estado III / estado IV) pelo consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>). A oligomicina bloqueia a subunidade F<sub>0</sub>.**

Para avaliar diferentes componentes funcionais das subpopulações mitocondriais IFM e SSM, afere-se a respiração mitocondrial com diferentes substratos (palmitoil + carnitina, glutamato + malato, succinato + rotenona e piruvato) que utilizam vias oxidativas distintas, transporte mitocondrial e fornecem substratos específicos ao complexo I e ao complexo II. A oxidação de palmitoil + carnitina traduz o transporte mitocondrial de palmitoil + carnitina, a oxidação de palmitato, a atividade da cadeia respiratória (ETC) e o processo de fosforilação.

A combinação de glutamato e malato como substrato produz NADH, fonte de elétrons para o complexo I, permitindo assim o estudo do transporte do ciclo do aspartato <sup>(68)</sup>. No coração, o ciclo malato-aspartato é a via predominante, com a taxa de transporte de elétrons do NADH, produzido no citosol pela via glicolítica para o interior da mitocôndria, é 10 vezes maior do que a via do glicerofosfato <sup>(68)</sup>. O succinato é oxidado no complexo II e a adição de rotenona, um inibidor do Complexo I, permite avaliar a atividade do complexo II <sup>(68)</sup>. Além disso, o piruvato ocupa um papel fundamental na regulação do metabolismo do carbono, pois é o produto final da glicólise e um importante substrato para o ciclo do ácido tricarboxílico nas

mitocôndrias, utilizando o transportador de piruvato mitocondrial como principal entrada nas mitocôndrias <sup>(68)</sup>.

### **1.6 Potencial de membrana**

Sempre que o NADH ou FADH<sub>2</sub> são oxidados pelo complexo I ou II, prótons são transportados a partir da matriz para o espaço intermembrana da mitocôndria. A acumulação de prótons no espaço intermembrana gera potencial eletroquímico. O potencial gerado promove retorno de prótons para a matriz mitocondrial por meio do complexo V ou através do vazamento de prótons pela membrana interna devido ao desacoplamento dos supercomplexos mitocondriais, permitindo assim, a difusão dos mesmos e formação de ânions superóxido e conseqüentemente peróxido de hidrogênio <sup>(69, 70)</sup>.

### **1.7 Dinâmica mitocondrial**

O processo da dinâmica mitocondrial consiste não só na regulação de sua estrutura (morfologia e distribuição) como também em sua conectividade por meio do seu movimento no citoplasma celular. A fusão e a fissão são os mediadores diretos destes processos mitocondriais (Figura 6).

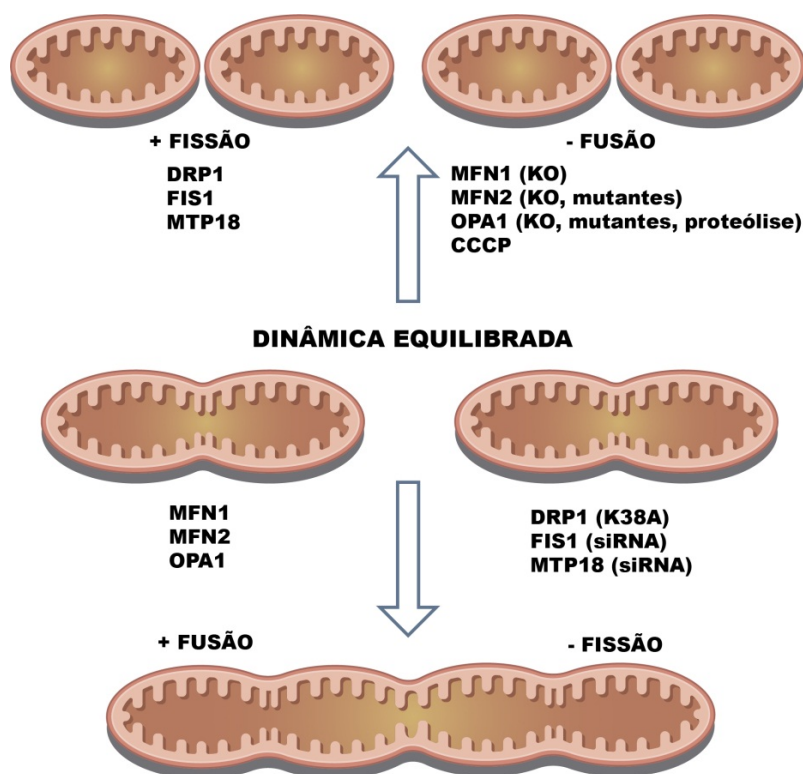


Figura 6 - Esquema ilustrativo do balanço entre os processos de fusão e fissão mitocondrial, e as proteínas envolvidas nesses processos – implicações na morfologia mitocondrial. Drp1 – *dynamin-related protein 1*; Fis1 – *fission 1 homologue protein*; Mfn1 – mitofusina 1; Mfn2 – mitofusina 2 e OPA1 – *optical atrophy 1* (Adaptado de Liesa, Palacin e Zorzano, 2009) <sup>(57)</sup>.

A fusão mitocondrial identifica-se pela adjeção de duas ou mais organelas, sendo regulada pela ação das GTPases: a) mitofusinas 1 e 2 (Mfn1 e Mfn2) e b) *optical atrophy 1* (OPA1). A hidrólise de guanosina trifosfato (GTP) por fosforilação ativa estas proteínas. O GTP é uma purina com função semelhante à do ATP. A fusão mitocondrial acontece em duas fases: a) fusão da membrana externa por meio das mitofusinas; b) fusão da membrana interna por meio da OPA1 (Figura 6) <sup>(57)</sup>.

A fissão mitocondrial é identificada pela cisão de uma mitocôndria em duas ou mais organelas. Este processo facilita o deslocamento da mitocôndria no citosol, atingindo de forma mais rápida regiões com maior demanda energética, ou permitindo o direcionamento para a degradação lisossomal <sup>(71)</sup>. A *dynamin-related protein 1* (Drp1) e a *fission 1 homologue protein* (Fis1) participam da fissão mitocondrial. A Drp1 situa-se principalmente no citosol e participa no processo de fissão sob hidrólise de GTP, similarmente como ocorre com as proteínas de fusão. No processo de fissão, a Drp1 desloca-se do citosol para a membrana externa mitocondrial e acopla-se à



proteína Fis1 (17 kDa). Esse processo parece ser o responsável pela fissão da membrana externa mitocondrial (Figura 6) <sup>(72)</sup>.

### 1.8 Sinalização de cálcio mitocondrial em miócitos cardíacos

A estrutura e as proteínas que constituem as mitocôndrias podem desempenhar um papel importante na sinalização do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Há controvérsias sobre a sinalização e regulação do cálcio mitocondrial cardíaco, uma vez que, as mitocôndrias constituem entre 30-40% do volume de células cardíacas, é possível que esta contribuição possa ser substancial <sup>(73)</sup>.

Para internalização do  $\text{Ca}^{2+}$  na mitocôndria, este atravessa livremente a membrana externa (OMM) alcançando o espaço intermembrana. Subsequentemente, o  $\text{Ca}^{2+}$  necessita atravessar a membrana interna (IMM) por meio de um dos três mecanismos. O primeiro, e talvez o mais importante, é o canal uniporter mitocondrial (MCU) <sup>(74)</sup>. O segundo é o modo rápido de captação de  $\text{Ca}^{2+}$  (RaM) <sup>(75)</sup> e, por último, o receptor rianodina mitocondrial tipo 1 (mRyR1) <sup>(76)</sup>. Em níveis fisiológicos são mais eficientes na sua absorção e em centenas de vezes mais rápido do que a MCU <sup>(75)</sup>.

Como as vias de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  da matriz mitocondrial, foram identificadas três vias de efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ : 1) o trocador iônico mitocondrial  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (mNCX), 2) o trocador iônico mitocondrial  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (HCX) e 3) o poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP). A forma predominante de efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  das mitocôndrias é a forma dependente de  $\text{Na}^{2+}$ , que é o mNCX <sup>(77)</sup>. O PTP é um poro de larga condutância na IMM que tem sido mostrado que libera  $\text{Ca}^{2+}$ , causa despolarização da membrana <sup>(78)</sup> e que pode ser bloqueado pela ciclosporina A <sup>(79)</sup>. Em condições de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  foi demonstrado que o poro pode apresentar duas formas de abertura: a) transitória (tPTP) – de baixa condutância onde apresenta aproximadamente  $57 \pm 5$  s <sup>(80)</sup> de duração que acredita-se ser um mecanismo de defesa contra a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  minimizando a produção de ROS, o que pode fornecer à célula uma sinalização cardioprotetora <sup>(80, 81)</sup>; b) permanente (mPTP) – de alta condutância que mantém o poro aberto por longa duração de modo irreversível conduzindo a célula ao mecanismo de apoptose (Figura 6) <sup>(81)</sup>.

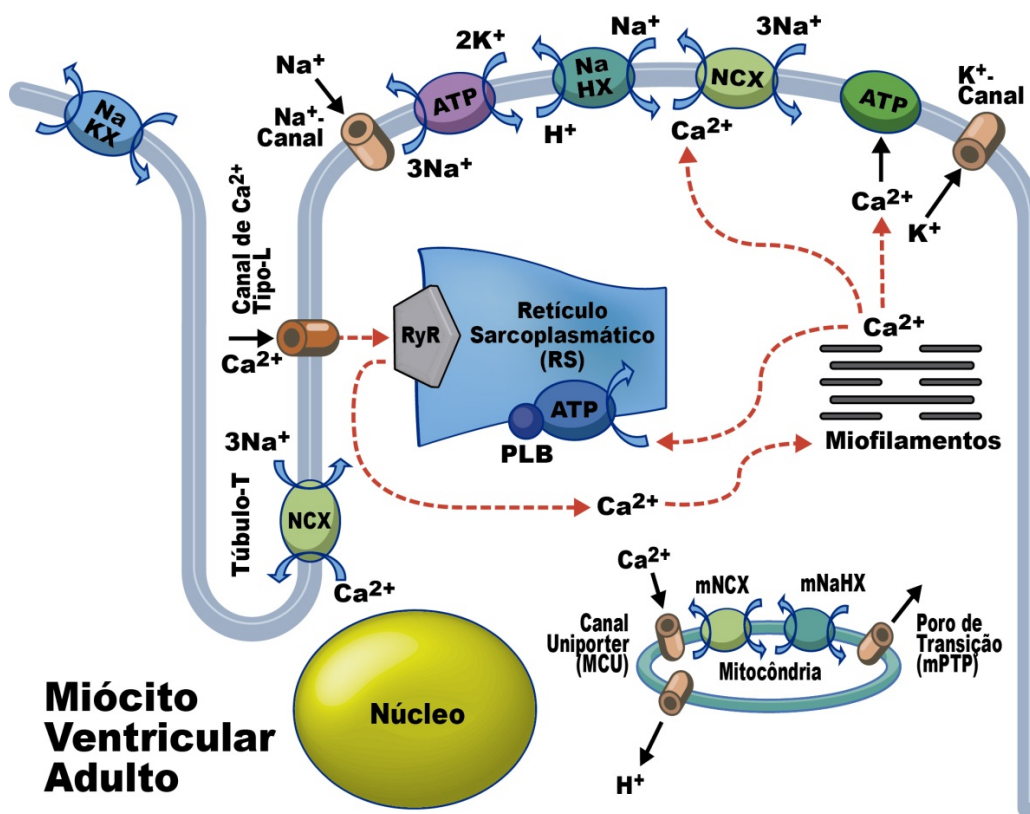


Figura 7 - Desenho esquemático de eventos e proteínas sinalizadoras do cálcio em miócitos ventriculares adultos <sup>(82)</sup>.

### 1.9 Subpopulações mitocondriais

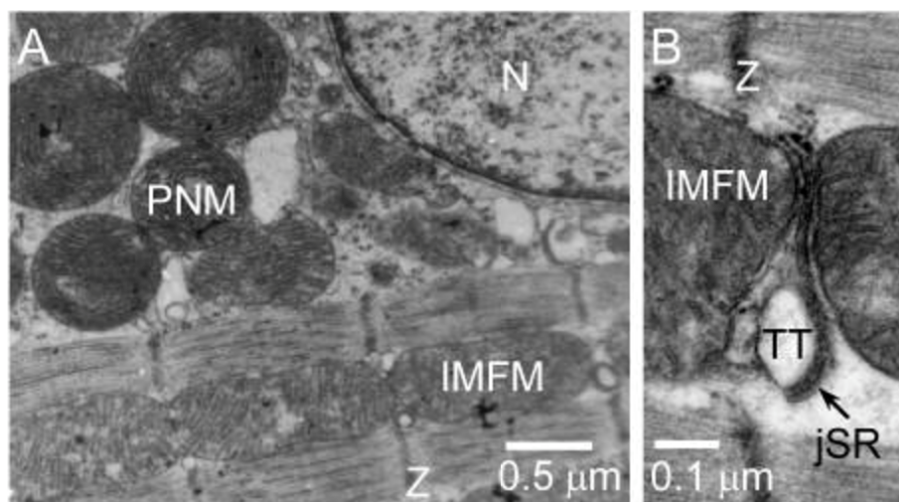
Existem três tipos de subpopulações de mitocôndrias. As mitocôndrias subsarcolemais (SSMs) são facilmente identificadas nas fibras musculares <sup>(51)</sup> e as mitocôndrias interfibrilares (IFMs) que estão firmemente inseridas entre miofilamentos (Figuras 7 e 8) <sup>(52)</sup>.

A subpopulação subsarcolemal (SSM) é conhecida por estar localizada logo abaixo do sarcolema e varia morfológicamente em até 4  $\mu\text{m}$ . Elas estão organizadas aleatoriamente e apresentam a forma oval, esférica e poligonal. Pela íntima localização com o sarcolema entende-se que as SSMs geram ATP para o transporte ativo da membrana <sup>(52)</sup>.

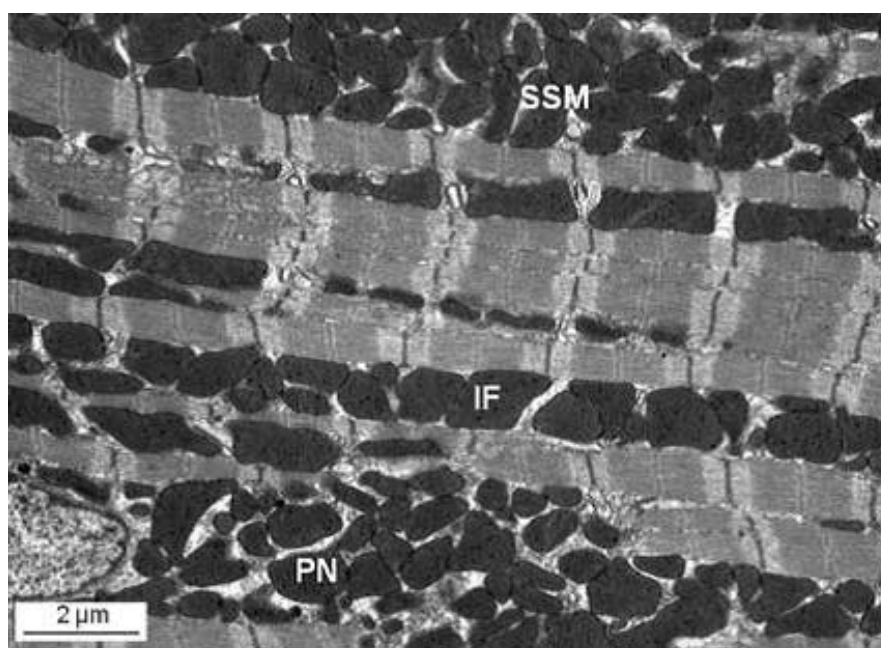
A subpopulação interfibrilar (IFM) está localizada entre as miofibrilas, organizadas longitudinalmente com forma alongada e tamanho de 1,5 a 2  $\mu\text{m}$  <sup>(83, 84)</sup>. Adicionalmente, em relação a localização das SSMs, conclui-se que o ATP gerado é utilizado na contração das miofibrilas <sup>(52)</sup>. As subpopulações mitocondriais

interfibrilares (IFMs) se apresentam em toda extensão do sarcômeros entre as linhas Z e entre as junções do SR <sup>(85)</sup>.

Postula-se que estas subpopulações mitocondriais IFMs estão localizadas mais próximos dos microdomínios de mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, possivelmente interconectado à rede do retículo sarcoplasmático e miofibrilas. O terceiro tipo de subpopulação são as perinucleares (PNMs) que apresentam menor tamanho e forma arredondada em relação às IFMs <sup>(85)</sup>.



**Figura 8 - Tipos de mitocôndria cardíaca em miócitos ventriculares de ratos. Microfotografia eletrônica; Seção ultradelgada longitudinal, fixação convencional. Seção ultrafina longitudinal. (A) Mitocôndrias perinucleares e interfibrilares. (B) Mitocôndrias interfibrilares <sup>(85)</sup>.**



**Figura 9 - Microfotografia eletrônica representativa de coração de murídeo (*Murinae*) adulto que retrata as três subpopulações de mitocôndrias: mitocôndrias perinucleares (PNM); mitocôndria interfibrilar (IF); e mitocôndria subsarcolema (SSM) <sup>(86)</sup>.**

Em 1977, *Palmer e col.*,<sup>(83)</sup> padronizaram um método capaz de isolar as duas subpopulações mitocondriais, *IFM* e *SSM*, com o auxílio de centrifugações e digestão com tripsina. Foi demonstrado que a subpopulação *IFM* possui maior atividade do complexo II e da citrato sintase; e que essa subpopulação oxida todos os substratos 1,5 vezes mais rápido que a subpopulação *SSM*. A subpopulação *SSM* tem a matriz lameliforme ao passo que a subpopulação *IFM* possui uma mistura da matriz tubular e lameliforme. Tal diferença é importante já que a matriz tubular tem menor espaço entre as cristas, acumulando, portanto, uma quantidade maior de prótons que levaria ao aumento da atividade da *ATP* sintase, permitindo fosforilação oxidação mais efetiva<sup>(87)</sup>. A subpopulação *IFM* capta mais cálcio, e é mais resistente a esse íon quando comparada a subpopulação *SSM*<sup>(88-91)</sup>.

As alterações metabólicas ocorridas no miocárdio englobam alterações na fosforilação oxidativa a fim de manter os níveis citosólicos e de hidrólise de *ATP* quando o suporte de oxigênio e/ou substrato é baixo<sup>(92)</sup>. Além disso, a eficiência na produção de energia é baixa quando a mitocôndria está danificada, portanto, limitando a produção de energia para suprir os processos celulares, incluindo a maquinaria contrátil<sup>(93-96)</sup>.

Devido a íntima conexão entre metabolismo oxidativo e contratilidade, alteração no suporte de oxigênio para o miocárdio poderia resultar na redução da contratilidade e do metabolismo oxidativo mitocondrial<sup>(94, 97-99)</sup>. Em humanos, já foi demonstrado redução do transporte de elétrons nos complexos I, III e IV da cadeia respiratória em torno de 30%. Com isto, houve redução da produção de *ATP* pelo complexo V em pacientes com doença isquêmica ou cardiomiopatia dilatada<sup>(100-103)</sup>. As alterações nos complexos da cadeia respiratória limitam a contratilidade cardíaca durante exercício ou ativação adrenérgica<sup>(97, 104)</sup>.

Vários estudos demonstraram que as duas subpopulações respondem de forma diferente aos estímulos de natureza fisiológica ou patológica tais como: envelhecimento, isquemia/reperfusão, exercício, restrição calórica, dieta rica em gordura e insuficiência cardíaca<sup>(105-113)</sup>. *Hoppel e col.*, em 1982, demonstraram redução em 50% da fosforilação oxidativa na subpopulação *IFM* de *Hamsters* que desenvolveram insuficiência cardíaca após 4 meses<sup>(114)</sup>. Outro estudo também demonstrou que existe uma redução da fosforilação oxidativa em ambas subpopulações após o desenvolvimento da IC com redução da atividade da cadeia respiratória mitocondrial<sup>(115)</sup>. Adicionalmente, existe uma redução do estado III no

consumo de oxigênio quando o substrato palmitoil + carnitina é utilizado concomitantemente com a redução da expressão das enzimas da beta oxidação. No modelo de insuficiência cardíaca induzida pela sobrecarga de pressão, *Bugger* e col.,<sup>(116)</sup> demonstraram que a expressão das proteínas da beta oxidação encontra-se reduzida, assim como a bioenergética mitocondrial.

Além disso, *Garnier* e col.,<sup>(117)</sup> demonstraram que a expressão gênica do *PGC-1 $\alpha$*  e  *$\beta$*  (Co-ativador da transcrição gênica) estão reduzidas na IC. Ademais, a deficiência do *PGC-1 $\beta$*  acelera a transição da hipertrofia cardíaca para a IC<sup>(118)</sup>. O *PGC-1 $\alpha$*  e  *$\beta$*  exercem papel fundamental na biogênese mitocondrial. Eles são expressos em tecidos como coração, músculo esquelético e fígado e regulam a expressão gênica das enzimas do metabolismo na mitocôndria e proteínas que constituem a cadeia respiratória mitocondrial<sup>(118)</sup>. *PGC-1 $\alpha$*  e  *$\beta$*  tem papel chave na regulação da função mitocondrial e participam na transdução do estímulo fisiológico para a produção de energia no músculo cardíaco<sup>(117-119)</sup>. A capacidade mitocondrial precisa aumentar proporcionalmente ao crescimento celular a fim de manter as necessidades energéticas da célula<sup>(120)</sup>.

### **1.10 Papel da testosterona na função mitocondrial**

Atualmente existe um grande interesse em pesquisas sobre a disfunção mitocondrial causada pela privação da testosterona<sup>(37,49)</sup>. *Pongkan* e col., em 2015, demonstraram disfunção mitocondrial em ratos submetidos à orquiectomia. Adicionalmente, observaram a resposta protetora contra a disfunção mitocondrial nos ratos orquiectomizados que receberam reposição de testosterona bioidêntica. Estudos prévios evidenciaram que o miocárdio sofre efeito direto da testosterona o qual desempenha um papel benéfico na performance ventricular, melhorando a contratilidade cardíaca e a regulação do cálcio<sup>(121, 122)</sup>.

Existe uma íntima relação entre o estresse oxidativo aumentado com a função miocárdica e a frequência cardíaca deprimidas<sup>(123)</sup>. Adicionalmente, a deficiência da testosterona aumenta o nível do estresse oxidativo no miocárdio<sup>(124, 125)</sup>. A reposição de testosterona desempenha um papel crucial na proteção do desequilíbrio simpátovagal, reduzindo o estresse oxidativo e aumentando o efeito antioxidante cardíaco. Desta forma, ratos orquiectomizados aumentaram a produção de ROS mitocondrial cardíaca e a testosterona atenuou o nível de ROS<sup>(49)</sup>. Neste estudo,

Pongkan e col., descreveram a possibilidade que a diminuição das arritmias devido ao mecanismo envolvido com a fosforilação da conexina 43. Foi evidenciado que a fosforilação da conexina 43 no resíduo da serina 368 atua na comunicação intercelular por meio das junções gap, e que a diminuição da fosforilação da conexina 43 poderia facilitar as arritmias <sup>(126-128)</sup>. A privação da testosterona diminui a fosforilação da conexina 43. A reposição do hormônio testosterona aumentou a fosforilação da conexina 43, trazendo como consequência o aumento da comunicação entre os miócitos, atenuando arritmias durante o período de isquemia e reperfusão <sup>(49)</sup>. A redução do tamanho da área de infarto em ratos orquiectomizados que foram tratados com testosterona pode ser devido à redução do processo apoptótico e da disfunção mitocondrial cardíaca <sup>(49)</sup>.

Devido a escassez de estudos específicos relacionados ao efeito da deficiência da testosterona na função das subpopulações mitocondriais, o presente estudo visa proporcionar novas informações relativas ao desenvolvimento e progressão da disfunção das subpopulações mitocondriais cardíacas subsarcolemal (SSM) e interfibrilar (IFM) devido à deficiência da testosterona. Conhecimento útil para o tratamento contra a disfunção contrátil cardíaca em doentes com baixos níveis de testosterona, particularmente nos pacientes idosos.

## 2 OBJETIVO

Avaliar o efeito da deficiência de testosterona nas subpopulações mitocôndrias subsarcolemais (*SSM*) e interfibrilares (*IFM*) em cardiomiócitos.

### 2.1 Objetivo Específico

- Avaliar as alterações no conteúdo proteico das mitocôndrias entre os grupos (*Yield*);
- Avaliar a função e morfologia mitocondrial das duas subpopulações: subsarcolemal (*SSM*) e interfibrillar (*IFM*), através da citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito da deficiência da testosterona, sobre a bioenergética mitocondrial após 12 semanas com privação de testosterona (*OQT*);
- Investigar possíveis alterações da função da cadeia respiratória mitocondrial com a utilização de substratos específicos para os complexos I e II;
- Avaliar a resistência mitocondrial ao cálcio (*Swelling*);
- Medir a probabilidade de abertura do poro mitocondrial em ratos após 12 semanas de orquiectomia.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Animais Experimentais

Foi utilizado modelo animal de ratos machos Wistar (n=30), de linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, pesando entre 250 a 300 g (média  $\pm$  EP) com idade aproximada de 12 semanas (média  $\pm$  EP) adquiridos no Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob controle de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração.

O protocolo foi aprovado pela comissão de ética em experimentação e uso de animais da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES (CEUA – 072/2012). Estas investigações foram conforme as diretrizes:

- a) CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos <sup>(129)</sup>.
- b) *National Institutes of Health (NIH Publication, Nº 85-23, revised 1996)*.

#### 3.2 Modelo Experimental

Ratos machos da raça Wistar (n= 30) foram divididos de forma randomizada em 3 grupos:

- a) Grupo *SHAM* (controle) – Os animais desse grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico (anestesia e incisão cirúrgica) sem orquiectomia radical.
- b) Grupo OQT (orquiectomia) - Os animais desse grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico com orquiectomia radical (bilateral).
- c) Grupo OQT + T (orquiectomia + testosterona) - Os animais desse grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico com orquiectomia radical (bilateral) associado ao tratamento com Testosterona.



### 3.3 Cirurgia de Castração

Os ratos foram anestesiados com Cetamina 10% (50-100 mg/kg, i.p.; laboratório Pfizer) e Cloridrato de Xilazina a 10% (2 mg/kg, i.p.; Sedomin® do laboratório Kömig). Após verificação dos sinais de estado anestésico, foi realizada uma incisão longitudinal na bolsa escrotal com exposição e extirpação dos testículos. Realizado hemostasia e rafia da bolsa escrotal por sutura simples. Passado o estado anestésico, os animais foram mantidos em gaiolas, sob controle de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12 h, tendo livre acesso à água e ração. Após 24 h iniciou-se a suplementação com dose fisiológica de testosterona (2 mg/kg, IM) diariamente por 12 semanas no Grupo OQT + T.

Após 12 semanas de tratamento com a testosterona, os animais foram anestesiados com Uretana (1.2 mg/kg i.p.). Após verificação dos sinais de estado anestésico, os animais foram eutanaziados e exsanguinados. Em seguida, foi realizada a incisão longitudinal toracoabdominal. Foi coletado amostra sanguínea da aorta abdominal e imediatamente mantido em temperatura de 7 °C e centrifugado para obter o soro. Em seguida, foram removidos e pesados os seguintes tecidos: a) coração; b) gordura do epidídimo; c) gordura retroperitoneal; d) vesícula seminal; e) pulmão; f) fígado; e g) músculo sólio. O comprimento do osso tíbia foi medido para posterior correção.

O coração foi colocado em recipiente contendo solução tampão *Chappel-Perry CP* (100 mM de KCl; 50 mM de MOPS; 5 mM de MgSO<sub>4</sub>; 1 mM de EGTA; e 1 mM de ATP). O recipiente foi mantido sobre gelo. Realizou-se a pesagem do coração após ter sido secado com papel absorvente padrão. A seguir, procedeu-se a remoção dos átrios e a separação dos ventrículos. Foi removido segmento da parede livre do ventrículo esquerdo e estocado a 80 °C negativos para posteriores análises bioquímicas. O restante do ventrículo esquerdo foi mantido em solução tampão gelada a 4 °C de *Chappel-Perry* até o momento da extração mitocondrial.

### 3.4 Isolamento Mitocondrial

Seguindo o protocolo descrito por Palmer e col., em 1977, as duas subpopulações mitocondriais (SSM e IFM) foram isoladas do ventrículo esquerdo<sup>(83)</sup>. Os ventrículos foram lavados, fragmentados e homogeneizados (agitador mecânico e

homogeneizadores – Novatécnica, Brasil e *Digital Overhead Stirrer* – Scilogex, USA) em 22.5 mL do tampão CP1 (*Chappel-Perry*: 100 mM de KCl, 50 mM de Mops, 5 mM de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM de EGTA, 1 mM de ATP, com pH 7.4 a 4 °C). Em seguida, o homogeneizado foi submetido à primeira centrifugação (Centrifuge 5804 R – Eppendorf, Germany) a 580 x *g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante desta primeira centrifugação foi filtrado com auxílio de uma gaze e transferido para um tubo etiquetado SSM.

O *pellet* desta primeira centrifugação foi suspenso em 7.5 mL do mesmo tampão (CP1) e novamente centrifugado a 580 x *g* por 10 min. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi filtrado com auxílio de uma gaze e transferido ao "tubo SSM" contendo o primeiro sobrenadante. Em seguida, este tubo foi novamente centrifugado à 580 x *g* por 7 min. O *pellet* remanescente a essa centrifugação seguiu o protocolo de Palmer e cols. e corresponderá à subpopulação SSM.

O *pellet* remanescente da segunda centrifugação foi suspenso em 9 mL de tampão *Chappel-Perry* e adicionou-se 5 mg de tripsina por grama de tecido dissolvido em 1 mL do mesmo tampão. Após a adição de tripsina, foi feita uma segunda homogeneização e as amostras foram agitadas com o auxílio de um agitador magnético (*ika® c-mag hs10*, USA) em banho de gelo por 10 min. Após agitação, foram adicionados 10 mL de tampão *Chappel-Perry* contendo albumina bovina (*fraction V fatty acid free*) 2 mg/mL e as amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 7.500 x *g* por 10 min a 4 °C. O *pellet* foi novamente suspenso em 7.5 mL do tampão *Chappel-Perry* e centrifugado a 580 x *g* por 7 min a 4 °C. O sobrenadante desta última centrifugação foi filtrado com auxílio de gaze e novamente centrifugado a 3.000 x *g* por 7 min. O *pellet* final corresponde a subpopulação interfibrilar. Os *pellets* correspondentes a subpopulação SSM e IFM foram lavados duas vezes em tampão KME (contendo 100 mM de KCl, 50 mM de Mops e 0,01 M de EGTA) e novamente centrifugados a 3.000 x *g* por 7 min. Os *pellets* foram suspensos em 200 µL de tampão KME e a concentração proteica foi determinada pelo método de *Lowry*<sup>(130)</sup>.

### 3.5 Respiração Mitocondrial

#### 3.5.1 Análise funcional da cadeia respiratória mitocondrial – oxidação fosforilativa

A análise funcional dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foi avaliada com o auxílio de um transdutor para medida de oxigênio (*Clark electrode, Qubit system, Canada*) de acordo com *Palmer* e cols. Amostras das mitocôndrias (250 µg) foram incubadas, em um tampão para respiração mitocondrial (100 mM de KCl, 50 mM de MOPS, 5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM de EGTA e 1 mg/mL de BSA/Fraction V, com pH 7.4) <sup>(83)</sup>.

O estado III significa a velocidade de consumo de oxigênio quando a mitocôndria é colocada em um meio com substrato oxidável com ADP, produzindo assim o ATP. O estado IV que é a velocidade do consumo de  $\text{O}_2$  após a mitocôndria já ter consumido todo o ADP disponível, foram medidos com glutamato + malato (10 e 5 mM, respectivamente), palmitoil + carnitina (40 µM) e rotenona + succinato (7.5 µM e 20 mM, respectivamente). Após a adição dos substratos, foi adicionado ADP para atingir uma concentração final de 200 µM e observou-se um aumento do consumo de oxigênio em função do tempo. Após completa depleção do ADP, observado pelo surgimento do estado IV, adicionou-se oligomicina, inibidor do complexo V (fração F0) da cadeia respiratória. O RCR que é a razão do estado III / estado IV verifica o acoplamento da cadeia respiratória e o ADP:O que é a razão do  $\text{Pi}/\text{O}_2$  é o indicativo de quanto de  $\text{O}_2$  é reduzido em  $\text{H}_2\text{O}$  na fosforilação oxidativa indicando sua eficiência. Os estados III, IV e razão ADP:O foram calculados posteriormente.

#### 3.5.2 Medidas do potencial de membrana e tamanho da mitocôndria

A medida do potencial de membrana foi feita utilizando citometria de fluxo (*Facscan, Becton Dickinson, USA*) como descrito por *Dabkowski* e cols., <sup>(108)</sup>. Amostras das subpopulações (SSM e IFM) foram incubadas em tampão KME (contendo 100 mM de KCl, 50 mM de Mops e 0,01 M de EGTA) com um marcador para potencial de membrana da mitocôndria [*5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide* (300 nM JC-1; *Invitrogen*)] ou *MitoTracker*

*Deep Red 633* por 15 min a 37 °C. Estes marcadores se difundem pela membrana intacta da mitocôndria e são seletivos, porque dependem do potencial para emitir fluorescência vermelha (~ 590 nm). Quando se tem emissão de fluorescência verde (~ 525 nm) corresponde a queda do potencial de membrana. Cada parâmetro foi detectado usando um laser específico e 100.000 eventos foram medidos por amostra fresca. Os resultados foram expressos como a razão da fluorescência vermelha pela verde. Para as medidas de tamanho, o aparelho era calibrado com microesferas (*Invitrogen*) que permitiam medir exatamente o tamanho da mitocôndria. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias.

### **3.5.3 Probabilidade de abertura do poro mitocondrial**

Foi analisada a probabilidade de abertura do poro mitocondrial por meio de aparelho (*Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, USA*) em ambas as subpopulações<sup>(96, 131)</sup>. Foram incubados 25 µg de proteína em 200 µL de tampão livre de cálcio (100 mM de KCl, 50 mM de MOPS, 5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM de EGTA, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de glutamato, e 5 mM de malato à 37 °C) em um fluorímetro com monitoramento constante da fluorescência. Em seguida, foi adicionado um marcador de cálcio (*calcium green-5N, Invitrogen*) com excitação e emissão de 488 e 530 λ, respectivamente. Após a adição do marcador para cálcio, foi adicionado 32 doses de cálcio (5 µL) a cada 7 min<sup>(96, 132)</sup>.

### **3.5.4 Resistência ao cálcio (*Swelling*)**

O teste de tolerância ao cálcio foi realizado como descrito na literatura<sup>(95, 132, 133)</sup>. As proteínas mitocondriais, das duas subpopulações, foram suavemente homogeneizadas em solução tampão cálcio livre (100 mM de KCl, 50 mM de MOPS, 5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM de EGTA, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de glutamato, e 5 mM de malato, em pH 7.4) com concentração final de 2 mg/mL de proteína em uma placa de 96 poços. Em seguida, a placa foi inserida em um leitor de placas (*Elx808 Biotek, USA*) e aquecida a 37 °C. Após atingir 37 °C, foi feita uma leitura de absorbância a 540 nm por 2 min a fim de se obter valores basais de absorbância. Após essa leitura, foi adicionado cloreto de cálcio na concentração final de 100 e 500 nM por µg de proteína mitocondrial e nova leitura foi realizada por 20 min.

### 3.6 Expressão dos resultados e análise estatística

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os valores de “n” representam o número de animais utilizados em cada protocolo experimental. A análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA), uma ou duas vias, medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando a ANOVA apresentava significância estatística o teste *post-hoc* de *Bonferroni* era realizado. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de  $p < 0,05$ .

### 3.7 Fármacos e reagentes utilizados

- Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) (*Plusone*)
- Ácido Etilenoglicoltetracético (*Sigma*)
- Albumina bovina *Fraction V* (*Sigma*)
- Tripsina de Pâncreas Bovina (*Sigma*)
- Cloreto de cálcio (*Sigma*)
- Cloreto de potássio (*Sigma*)
- Cloreto de sódio (*Sigma*)
- Etanol absoluto (*Sigma*)
- Fosfato de potássio (*Sigma*)
- Fosfato de sódio (*Merck*)
- Metanol (*Sigma*)
- 3-(*N-Morpholino*)propanesulfonic acid (*MOPS*)
- Reagente para detecção de *Western Blot* (*ECL*) (*Thermo Scientific*)
- Sulfato de magnésio
- Adenosine 5'-triphosphate (ATP), (*Sigma*)
- Adenosine 5'-diphosphate (ADP), (*Sigma*)
- Hidróxido de potássio (*Sigma*)
- Dihidrogenofosfato de potássio (*Sigma*)
- Cloreto de magnésio (*Sigma*)
- Glutamato (*Sigma*)
- Malato (*Sigma*)

- Rotenona (*Sigma*)
- Succinato (*Sigma*)
- Piruvato
- Palmitoil + carnitina
- Oligomicina
- Cálcio green
- Sulfato de cobre 2% (*Sigma*)
- Carbonato de sódio (*Sigma*)
- Folin & Ciocalteu's phenol reagente (*Sigma*)
- Tartarato
- Aquisição do hormônio testosterona bioidêntica do Laboratório IMAFAR na dose de 150 mg por cápsula e óleo de girassol.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Sobrevida

Com o objetivo de analisarmos efeitos da deficiência de testosterona sobre a sobrevida de animais orquiectomizados, foi avaliada a mortalidade dos animais SHAM, OQT e OQT + T ao longo de 12 semanas. A deficiência de testosterona não provocou a mortalidade no grupo OQT após 84 dias.

### 4.2 Análise de parâmetro ponderal após 12 semanas de tratamento

De acordo com os resultados da análise de variância foi possível identificar diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos Sham, OQT e OQT + T, em relação ao peso do fígado (g) e da vesícula seminal (g). A Tabela 1 apresenta todos os resultados.

**Tabela 1 - Resultados da análise de variância dos tratamentos SHAM, OQT e OQT + T.**

Parâmetros	Média ± Desvio padrão			p-valor
	Experimento SHAM	Experimento OQT	Experimento OQT + T	
Peso Rato (g)	447 ± 48	429 ± 47	437 ± 31	0,6317
Peso Coração (g)	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,4865
Peso VE (g)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,3647
Peso VD (g)	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,03	0,6551
Fígado (g)	15,0 ± 1,5	12,9 ± 1,6*	12,9 ± 1,1*	0,0026
Pulmão (g)	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,3	0,4009
Gordura Epidídimo (g)	7,3 ± 2,9	5,4 ± 1,7	5,5 ± 1	0,0842
Gordura Retroperitoneal (g)	9,9 ± 3,9	12,7 ± 4,1	10,4 ± 3,4	0,2464
Vesícula Seminal (g)	1,1 ± 0,2	0,1 ± 0,02*	0,7 ± 0,2*#	0,0000
Tíbia (mm)	40,3 ± 1,1	39,8 ± 1,3	39,9 ± 0,5	0,4739
Sólio (g)	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,04	0,2463

(\*) A diferença foi significativa ao nível de 5% ( $p$ -valor < 0,05) em relação ao grupo SHAM (controle);

(#) A diferença foi significativa ao nível de 5% ( $p$ -valor < 0,05) em relação ao grupo OQT.

Não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes, entre os tratamentos SHAM, OQT e OQT + T, para os pesos: ratos, coração, VE, VD, pulmão, gordura do epidídimo, gordura retroperitoneal e sólio como também no tamanho da tíbia (Tabela 1).

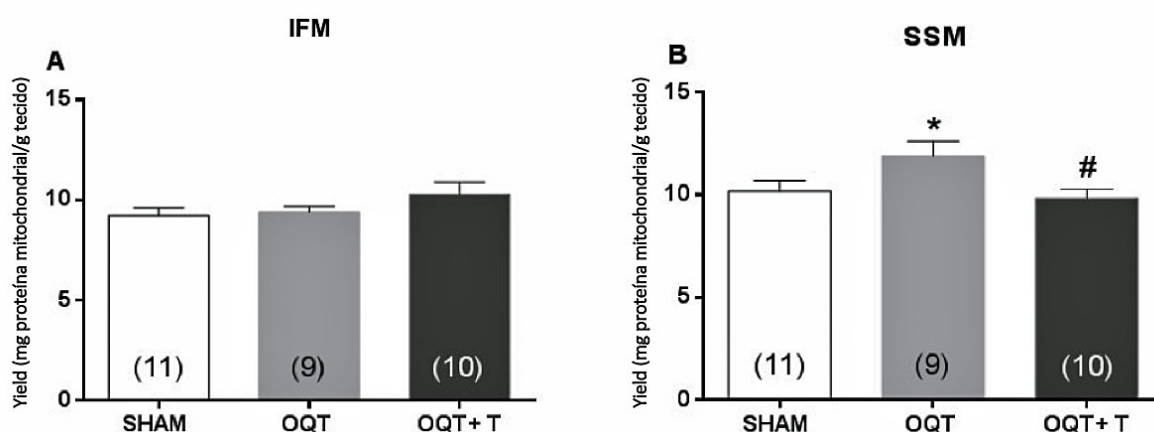
Em relação ao peso do fígado (g), os grupos OQT e OQT + T apresentaram

diferenças significativamente menores ao nível de 5% em relação ao grupo SHAM. Como os tratamentos diferiram estatisticamente entre si foi utilizado o teste estatístico de comparações múltiplas de Bonferroni, ao nível de 5% de significância, para descrever essas diferenças. Os grupos OQT e OQT + T não diferiram estatisticamente entre si ( $p$ -valor  $> 0,05$ ), porém houve diferença significativa destes Grupos em relação ao Grupo SHAM.

Em relação ao peso da vesícula seminal (g), os grupos OQT e OQT + T apresentaram diferenças significativamente menores ao nível de 5% em relação ao grupo SHAM. Adicionalmente, o grupo OQT + T apresentou diferença significativamente maior em relação ao grupo OQT.

### 4.3 Yield mitocondrial

O *Yield* (rendimento mitocondrial) é a quantidade de proteína mitocondrial por grama de tecido. Não houve diferença no rendimento proteico da subpopulação IFM entre os Grupos estudados (SHAM, OQT e OQT + T) como mostrado na Figura 10A. Entretanto, a subpopulação subsarcolemal (SSM) o Grupo OQT apresentou diferença significativamente maior em comparação com os grupos SHAM e OQT + T (Figura 10B). A reposição de testosterona foi capaz de restaurar esses valores para o nível normal (SHAM), como mostra a Figura 10B.



**Figura 10 - (A) Yield mitocondrial na subpopulação interfibrilar (IFM), (B) Yield mitocondrial na subpopulação subsarcolemal (SSM) a partir do ventrículo esquerdo do animal, do sexo masculino. SHAM - cirurgia simulada sem remoção dos testículos; OQT - orquiectomia; OQT + T - orquiectomia + testosterona. \*  $p < 0,05$  em relação ao Grupo SHAM. #  $p < 0,05$  em relação ao Grupo OQT. O número de animais está indicado entre parêntesis.**



#### 4.4 Função e morfologia – citometria de fluxo

O potencial de membrana, tamanho e a complexidade interna entre as subpopulações mitocondriais dos grupos SHAM, OQT e OQT + T, foram avaliados por citometria de fluxo.

A avaliação da luz difusa (*forward-scattered light* – FSC) foi utilizada para estimar o tamanho, enquanto que a avaliação da luz dispersa lateral (*side-scattered light* – SSC) foi usada para estimar a complexidade interna mitocondrial, ambas baseadas em uma escala logarítmica.

O potencial de membrana das mitocôndrias foi analisado nas subpopulações recém isoladas por citometria de fluxo usando o marcador 5,5', 6,6'-tetra-cloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazol iodeto de carbocianina (JC-1) em que a intensidade de fluorescência foi determinada pelo deslocamento da luz verde para a vermelha indicando um aumento no potencial de membrana.

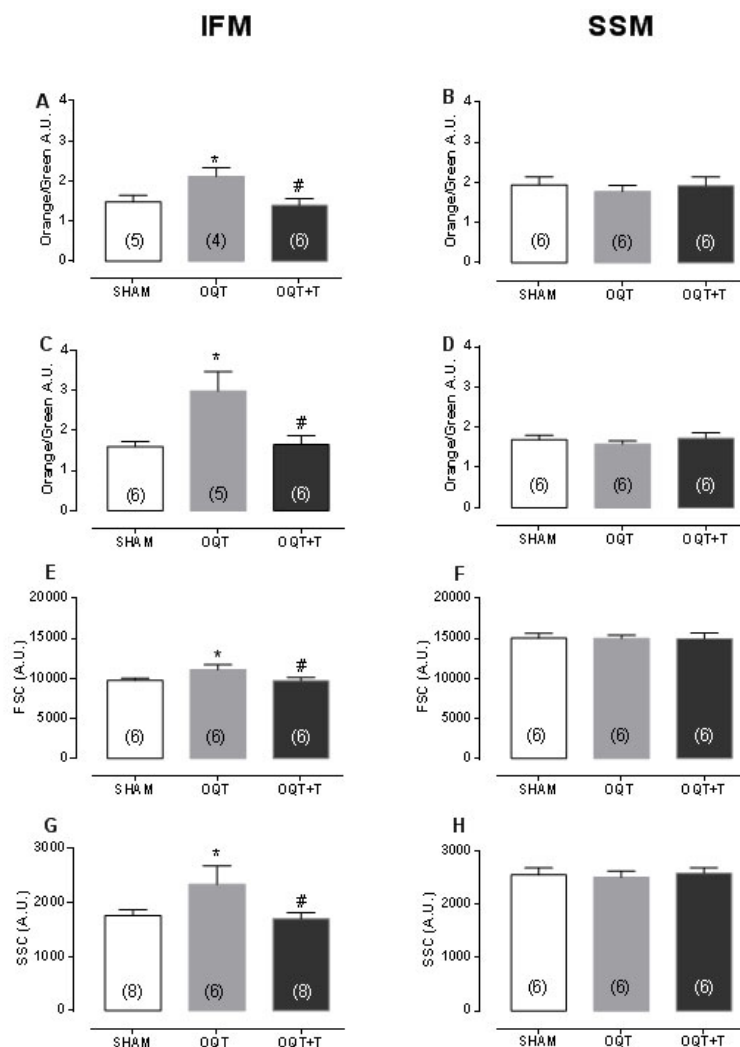
O potencial de membrana mitocondrial basal (com substrato endógeno) estava aumentado significativamente na subpopulação IFM de animais do Grupo OQT em relação ao Grupo SHAM. Adicionalmente, houve diferença significativamente maior entre OQT e OQT+T (Figura 9A). Não houve diferença significativa entre os grupos na subpopulação SSM (Figura 9B). Em seguida, adicionou-se nas amostras os substratos glutamato + malato (10 e 5 mM, respectivamente) para estimular a cadeia transportadora de elétrons (ETC). Da mesma forma que o resultado anterior, houve aumento significativo no potencial de membrana na subpopulação IFM do Grupo OQT em relação ao Grupo SHAM. Adicionalmente, houve diferença significativamente maior entre OQT e OQT+T (Figura 9C). Não houve diferença significativa entre os grupos na subpopulação SSM (Figura 9D).

Este aumento com a adição do substrato foi visualmente maior em relação ao resultado anterior com os substratos endógenos (Figura 9A e 9C). Em relação ao Grupo OQT + T da subpopulação IFM, notou-se que a reposição da testosterona foi capaz de manter o potencial de membrana aos níveis normais (SHAM), como mostrado na Figura 9A e 9C.

A morfologia mitocondrial também foi avaliada por citometria de fluxo. Essas análises ajudaram a mostrar diferenças morfológicas relativas entre as duas subpopulações e validar o sucesso do isolamento. Para avaliar as diferenças no

tamanho absoluto das mitocôndrias, foram utilizadas microesferas (1 a 6  $\mu\text{m}$ ) para servir como referências de tamanho confiáveis.

Na subpopulação IFM o Grupo OQT houve aumento no tamanho (*forward-scattered light* – FSC) como mostrado na Figura 11E, bem como houve aumento da complexidade interna (*side-scattered light* – SSC) mostrado na Figura 11G, quando comparado ao Grupo SHAM. Adicionalmente, houve diferença significativamente maior entre OQT e OQT+T (Figura 11E e 11G). No entanto, na subpopulação SSM não houve diferença significativa no tamanho ou complexidade interna entre os Grupos estudados (Figura 11F e 11H).



**Figura 11 - Determinação da função e morfologia das subpopulações mitocondriais distintas chamadas de subsarcolemal (SSM) e interfibrilar (IFM). Grupos estudados: simulado (SHAM), orquiectomizados (OQT), e, orquiectomizados com testosterona (OQT + T) utilizando citometria de fluxo. A, B, C e D - Análise do potencial de membrana; E e F - Análise do tamanho; G e H - Análise da complexidade. Os valores de potencial de membrana, o tamanho e a complexidade são expressos nas barras como unidades arbitrárias (UA). \*  $p < 0,05$  em relação ao Grupo SHAM. #  $p < 0,05$  em relação ao Grupo OQT. O número de animais está indicado entre parênteses.**

#### **4.5 Respiração mitocondrial**

Para avaliar os efeitos da deficiência da testosterona na bioenergética mitocondrial da subpopulação interfibrilar e subsarcolemal dos Grupos SHAM, OQT e OQT + T, foi mensurado a respiração mitocondrial com diferentes substratos (glutamato + malato, piruvato + malato, palmitoil + carnitina e succinato + rotenona). Estes substratos utilizam vias oxidativas distintas, transporte mitocondrial e fornecem elétrons via NADH<sup>+</sup> e FAD para o Complexo I e II.

#### **4.6 Teste com o substrato glutamato + malato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial das subpopulações interfibrilar e subsarcolemal**

A taxa máxima de respiração mitocondrial (Estado 3) expressa nanoÁtomos de oxigênio por mg de proteína mitocondrial por minuto. A avaliação da subpopulação IFM, utilizando glutamato + malato como substratos, foi menor no Grupo OQT quando comparado com SHAM e OQT + T (Figura 12A). O estado 3 na subpopulação SSM não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 12B). A quantidade de ADP (200 µM) adicionado na câmara para a quantidade total de oxigênio consumido no estado 3 foi encontrado diminuído tanto na subpopulação IFM como no SSM no grupo OQT (Figura 12E e 12F). A reposição de testosterona foi capaz de restaurar esta alteração apenas na subpopulação IFM, embora tenhamos encontrado uma tendência para restaurar na subpopulação SSM ( $p = 0,08$ ) como mostrado na Figura 12F.

### Glutamato + Malato

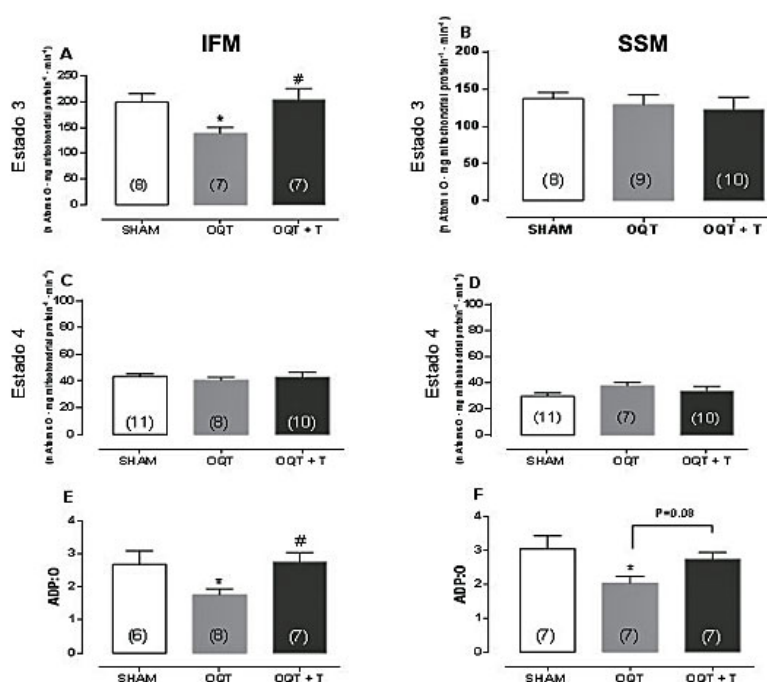
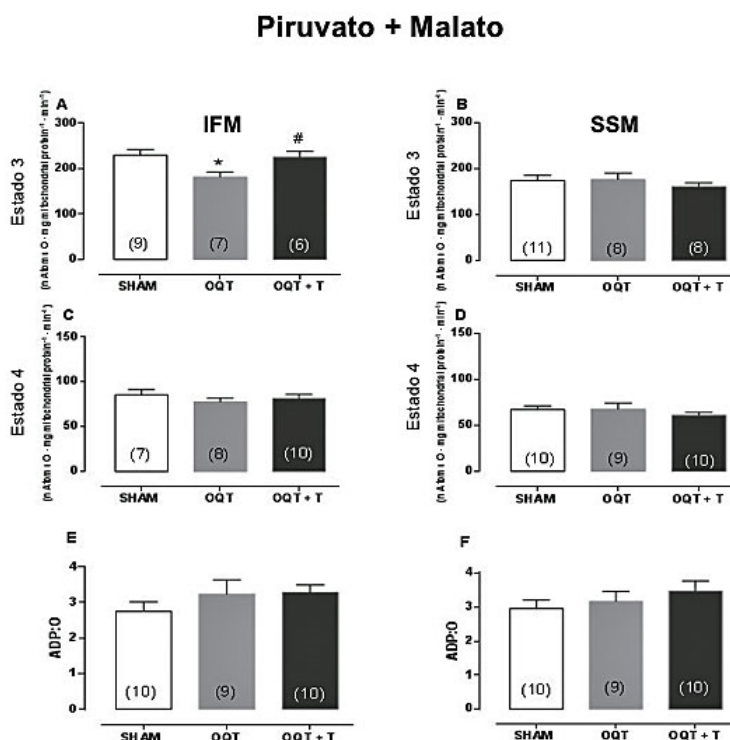


Figura 12 - Teste com glutamato + malato como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial da fração interfibrilar e subsarcolemal de ratos (SHAM – ratos controle, OQT – ratos orquiectomizados e OQT + T – ratos orquiectomizados com reposição de testosterona) por 12 semanas. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA.

#### 4.7 Teste com o substrato piruvato + malato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial das subpopulações interfibrilar e subsarcolemal

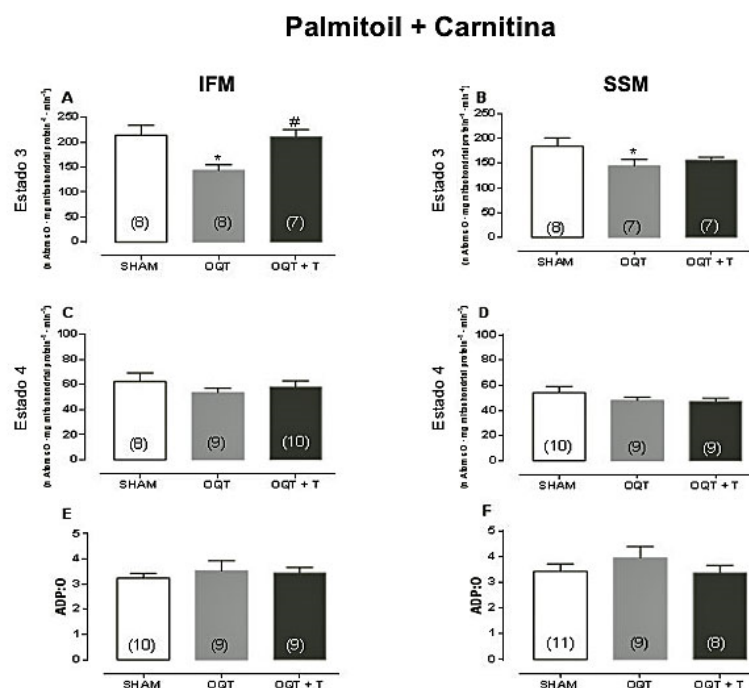
Quando o piruvato + malato foram utilizados como substrato, o estado 3 foi encontrado diminuído na subpopulação IFM do grupo OQT quando comparado com o grupo SHAM. A reposição de testosterona foi capaz de restaurar esta diminuição para os níveis normais observados no grupo SHAM (Figura 13A). Além disso, não foi detectada diferença significativa entre os grupos estudados na subpopulação SSM (Figura 13B). O estado 4, RCR e o índice ADP: O não apresentaram diferenças significantes entre os Grupos estudados (SHAM, OQT e OQT + T), como mostra a Figura 13C, 13D, 13E e 13F.



**Figura 13 - Teste com piruvato + malato como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial da fração interfibrilar e subsarcolemal de ratos (SHAM – ratos controle, OQT – ratos orquiectomizados e OQT + T – ratos orquiectomizados com reposição de testosterona) por 12 semanas. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA.**

#### 4.8 Teste com o substrato palmitoil + carnitina para avaliação da $\beta$ -oxidação das subpopulações interfibrilar e subsarcolemal

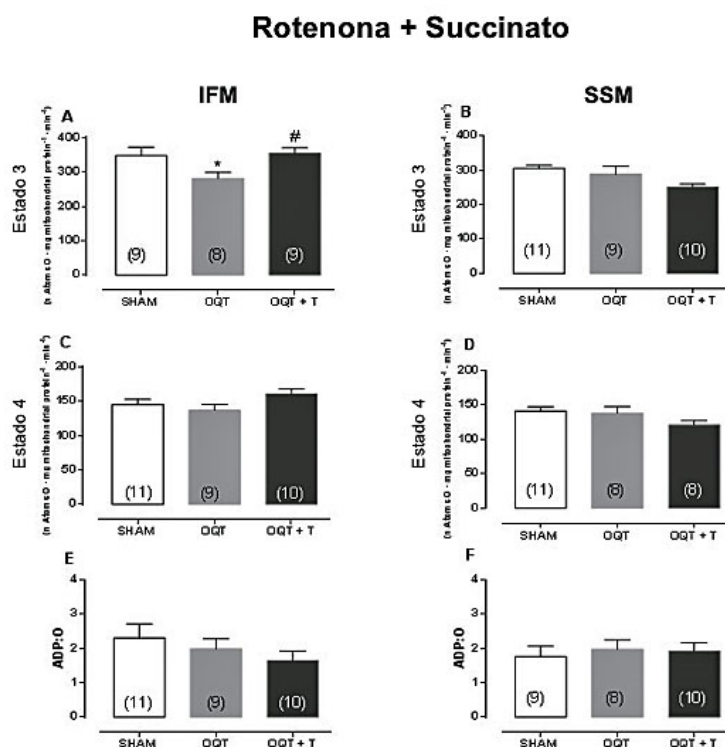
Utilizou-se o palmitoil + carnitina para analisar a  $\beta$ -oxidação, que reflete o transporte mitocondrial de palmitoil + carnitina, a oxidação do palmitato, a atividade da cadeia transportadora de elétrons (ETC) e o processo de fosforilação. As análises dos dados mostraram que tanto na subpopulação IFM quanto na SSM, o estado 3 é significativamente menor no Grupo OQT quando comparado ao Grupo SHAM e, interessante, a reposição de testosterona restabeleceu esta diminuição ao nível do Grupo SHAM apenas no IFM (Figura 14A e 14B). No estado 4, o índice ADP:O não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (SHAM, OQT e OQT + T), como mostra a Figura 14C, 14D, 14E e 14F.



**Figura 14 -** Teste com palmitoil + carnitina como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial da fração interfibrilar e subsarcolemal de ratos (SHAM – ratos controle, OQT – ratos orquiectomizados e OQT + T – ratos orquiectomizados com reposição de testosterona) por 12 semanas. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA.

#### 4.9 Teste com o substrato succinato + rotenona para avaliação do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial das subpopulações interfibrilar e subsarcolemal

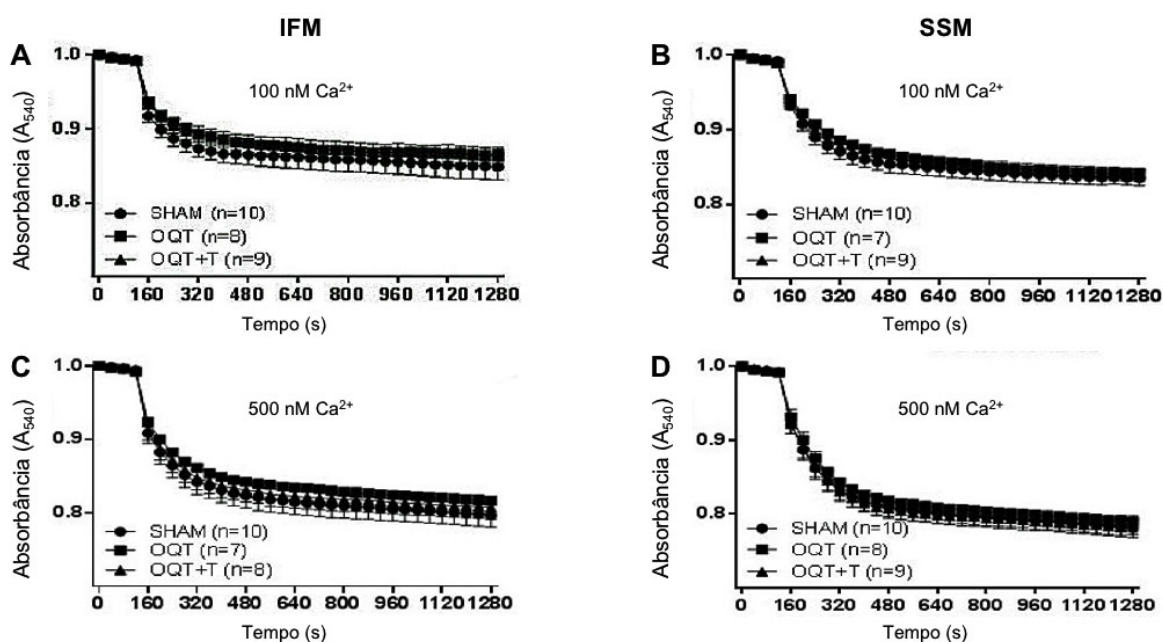
Avaliando a atividade do complexo II, utilizando succinato + rotenona como substratos, o estado 3 mostrou-se significativamente menor na subpopulação IFM. A reposição de testosterona restaurou esta diferença para o nível do grupo controle (SHAM), como mostrado na Figura 15A. A subpopulação SSM, não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (SHAM, OQT e OQT + T), como mostrado na Figura 15B. No estado 4, o índice ADP:O não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (SHAM, OQT e OQT + T), como mostra a Figura 15C, 15D, 15E e 15F.



**Figura 15 -** Teste com rotenona + succinato como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial da fração interfibrilar e subsarcolemal de ratos (SHAM – ratos controle, OQT – ratos orquiectomizados e OQT + T – ratos orquiectomizados com reposição de testosterona) por 12 semanas. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA.

#### 4.10 Análise da resistência ao cálcio – swelling

Dois métodos padronizados foram utilizados para avaliar a mPTP induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  nas mitocôndrias do ventrículo esquerdo (VE). A mPTP foi avaliada a partir do *swelling* mitocondrial induzido pelo  $\text{Ca}^{2+}$  elevado, como refletido pela diminuição da absorbância a 540 nm após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  nas mitocôndrias isoladas. A determinação da absorbância inicial antes da adição de  $\text{Ca}^{2+}$  foi realizada para determinar os valores basais. Houve uma diminuição na absorbância com adição do  $\text{Ca}^{2+}$  por mg de proteína, tanto na concentração de 100 quanto à 500 nmol em todos os grupos estudados (SHAM, OQT e OQT + T). Entretanto, mas não foi encontrada diferença significativa entre os Grupos SHAM, OQT e OQT + T (Figura 16A, 16B, 16C e 16D).



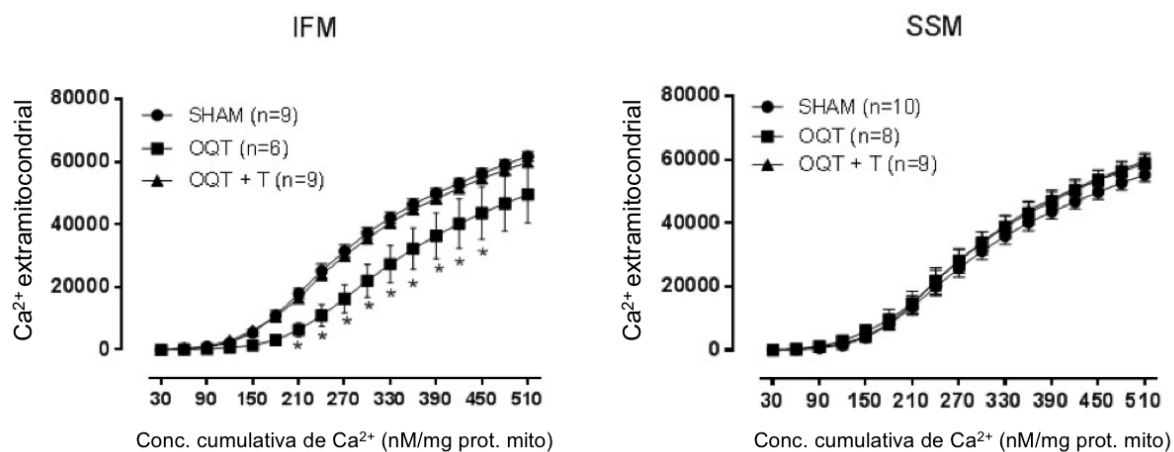
**Figura 16 - Análise da resistência ao cálcio (swelling).** Queda da absorbância após adição de cálcio na concentração final de 100 e 500 nM por  $\mu$ g de proteína em ambas as subpopulações mitocondriais (IFM e SSM) de ratos SHAM, OQT e OQT + T após 12 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA.

#### 4.11 Probabilidade de abertura do poro mitocondrial

Para avaliar a captação de cálcio e abertura do poro mitocondrial entre os grupos estudados, a mitocôndria foi novamente incubada em um tampão cálcio *free* na presença do marcador de cálcio (*calciumgreen 5N*), o qual emite fluorescência verde na presença de cálcio livre. Em seguida, foi adicionado cálcio (25 nM de  $Ca^{2+}$  por  $\mu$ g de proteína mitocondrial). Após a estabilização, iniciou-se a perfusão de cálcio a 3,75  $\mu$ M a cada 7 min por 32 vezes, para indução da abertura do poro mitocondrial.

Como já era esperado, de acordo com a Figura 17A (IFM), observa-se que a deficiência de testosterona aumentou a resistência ao cálcio. Como consequência, houve diferença significativa na sensibilidade entre os valores de 210 a 390 nM/ $\mu$ g de proteína mitocondrial, indicando menor probabilidade de abertura do poro mitocondrial. Porém, não houve diferença significativa na subpopulação subsarcolemal (SSM) entre os grupos estudados (Figura 17B).





**Figura 17 -** Captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial das frações [interfibrilar (IFM) e subsarcolemal (SSM)] de ratos SHAM, orquiectomizados (OQT) e orquiectomizados após 12 semanas de tratamento (OQT+T). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.  $p < 0,05$  ANOVA seguido de post hoc de Bonferroni.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da deficiência de testosterona na função e estrutura das subpopulações mitocondriais cardíacas espacialmente distintas, em ratos Wistar orquiectomizados. Os principais achados neste estudo foram: primeiro, verificou-se que o *yield* (quantidade de proteína mitocondrial por grama de tecido) da subpopulação subsarcolemal (SSM) do grupo orquiectomizado (OQT), foi maior quando comparado aos demais grupos controle (SHAM) e orquiectomizado com reposição de testosterona (OQT + T). Não houve diferença na subpopulação interfibrilar (IFM); segundo, as mitocôndrias interfibrilares (IFM) do grupo OQT apresentaram maior potencial de membrana, tamanho e complexidade interna; terceiro, a taxa de fosforilação oxidativa foi encontrada menor na subpopulação IFM de animais OQT com todos os substratos analisados, para o complexo I e II; quarto, as mitocôndrias interfibrilares dos animais OQT têm maior capacidade de retenção de cálcio.

Sabe-se que as subpopulações cardíacas mitocondriais subsarcolemal (SSM) e interfibrilar (IFM), desempenham papéis diferentes na dinâmica metabólica celular. Estudo anterior mostrou que em determinados estados fisiológicos e patológicos, pode haver alterações de subpopulações de mitocôndrias, tanto de tamanho quanto em quantidade <sup>(83)</sup>. Como consequência, as mitocôndrias podem sofrer mecanismos compensatórios em resposta a lesão celular específica <sup>(83)</sup>. Dependendo do local da injúria celular pode haver a necessidade de rápida migração mitocondrial <sup>(57,134)</sup>. Esta migração é mais efetiva se a mitocôndria for menor em tamanho. Conseqüentemente, pode haver necessidade de remodelamento mitocondrial por meio do processo de fissão da organela. Por outro lado, dependendo do tipo e magnitude da injúria, poderá haver necessidade do processo de fusão mitocondrial <sup>(57, 134)</sup>. Adicionalmente, preconiza-se possível mecanismo de transmissão de energia mitocondrial que facilita o transporte de oxigênio e substratos do capilar sanguíneo, através do sarcolema, para serem utilizados pelas mitocôndrias subsarcolemais <sup>(71)</sup>. Os íons H<sup>+</sup> acoplados à respiração da mitocôndria subsarcolemal difundem-se para o citosol por meio de filamentos mitocondriais comunicando-se com as subpopulações interfibrilares. Ao atingir a mitocôndria interfibrilar, os íons H<sup>+</sup> alcançam a matriz mitocondrial via H<sup>+</sup>-ATP-sintase para formar ATP a partir de ADP e Pi <sup>(71)</sup>. Em relação a estes filamentos,

foi proposto modelo em que a morfologia da rede mitocondrial não é regulada apenas por um equilíbrio dinâmico entre fissão e fusão ao nível interno da organela, mas também com a participação de uma rede pelo citoesqueleto de actina <sup>(71, 73, 135, 136)</sup>.

As mitocôndrias dentro da célula crescem e fundem-se constantemente, gerando uma rede cada vez mais ramificada e interligada <sup>(135)</sup>. Este crescimento estável é contrabalançado por intervalos de eventos de fissão rápidos e espacialmente restritos, dependentes de actina, principalmente em locais de contato retículo endoplasmático mitocondrial <sup>(135)</sup>. Estas afirmações são consistentes com os resultados do presente estudo que demonstraram que as subpopulações subsarcolemais (SSM) do grupo OQT apresentaram quantidade maior de proteínas mitocondriais por grama de tecido (*yield*) quando comparado com os grupos SHAM e OQT+T. Entretanto, não ocorreu diferença significativa na subpopulação IFM nos três grupos estudados (SHAM, OQT e OQT+T).

Em relação ao potencial de membrana, houve aumento no grupo OQT em comparação com os grupos SHAM e OQT+T, indicando que houve acúmulo de íons hidrogênio no espaço intermembrana sem a produção adequada de ATP, sugerindo falha na cadeia respiratória. Além disso, níveis patológicos de ROS são geralmente produzidos em níveis elevados de potencial de membrana mitocondrial <sup>(137)</sup>.

Quando o potencial de membrana excede a -140 mV (membrana hiperpolarizada), ocorrerá aumento exponencial na geração de ROS em ambos os complexos mitocondriais I e III <sup>(137)</sup>.

Os achados do presente estudo demonstraram que a deficiência de testosterona aumenta o tamanho e a complexidade interna mitocondrial após 12 semanas de castração. Tais achados estão de acordo com os encontrados por Wang e cols., <sup>(138)</sup> sobre as mitofusina-2 (Mfn-2) que são proteínas (GTPases) presentes na membrana externa da mitocôndria. Estas proteínas em seres humanos são codificadas pelo gene MFN2. A deficiência de Mfn-2 nos cardiomiócitos conduz a remodelamento morfológico e orientação espacial mitocondrial. Notou-se que, cardiomiócitos com depleção de Mfn-2 são mais tolerantes à sobrecarga de Ca<sup>2+</sup>. A deficiência de Mfn-2 protege as células isoladas do estresse induzido por ROS. Conseqüentemente, protege o miócito contra à injúria causada pelos mecanismos da isquemia-reperfusão. Infere-se que a Mfn-2 pode atuar controlando a abertura do mPTP. Embora a abertura mPTP esteja ligado ao desencadeamento dos eventos ligados à morte celular, evidências sugerem que a Mfn-2 pode estar envolvida em

processos fisiológicos, como a sinalização de ROS <sup>(139)</sup> e a liberação de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial <sup>(140)</sup>. Como as mitocôndrias dos cardiomiócitos maduros possuem limitada locomoção, a Mfn-2 pode funcionar como mediador do mPTP promovendo a comunicação intermitocondrial, permitindo a coordenação do potencial de membrana em condições de estresse como níveis elevados de Ca<sup>2+</sup> ou de ROS <sup>(95, 96)</sup>.

Em relação à fosforilação oxidativa, sabe-se que a testosterona desempenha um papel significativo no acoplamento da contração cardíaca. Sua deficiência diminui a atividade da *sarco/endoplasmatic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase* (SERCA2a) diminuindo a contratilidade miocárdica <sup>(121, 122, 141)</sup>. A geração de força miocárdica depende do fornecimento de energia proveniente do ATP, que é produzido pelas mitocôndrias. Aproximadamente 95% do ATP provêm do processo de fosforilação oxidativa e esta energia é entregue a locais consumidores como a miosina-ATPase (60-70%), SERCA2a (30-40%) e a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase <sup>(142-144)</sup>. A eficiência da performance cardíaca depende do equilíbrio entre a produção e o consumo de energia. Para isto, é crucial a adaptação às mudanças na carga de trabalho cardíaco, envolvendo importantes moléculas e íons como ADP e Ca<sup>2+</sup> <sup>(143, 144)</sup>.

Além disso, o ajuste fino da produção e consumo de energia é regulado também por transcrição gênica <sup>(144)</sup>. Considerando que os fatores de transcrição mitocondrial (TFAM e TFB1M) regulam a produção de ATP, a redução no estado III da subpopulação interfibrilar mitocondrial, com todos os substratos que se encontram descritos no presente estudo, poderia indicar uma redução na expressão no TFAM ou no TFB1M.

Foi proposto que as mitocôndrias interfibrilares geram ATP para o mecanismo contrátil, sugerindo que a geração de força em animais do grupo orquiectomizado (OQT) foi menor. Isto está de acordo aos achados da presente pesquisa, com estado III reduzido. A redução no estado III poderia resultar da diminuição da atividade da citocromo C oxidase, o qual é regulado pela testosterona <sup>(145)</sup>. Em cardiomiócitos, a combinação dos substratos glutamato-malato permite o estudo do ciclo do aspartato, que é a via dominante de transporte de elétrons a partir de NADH <sup>(146-148)</sup>. O NADH citosólico é formado a partir da glicólise da oxidação de lactato. Os elétrons provenientes do NADH citosólico devem ser transferidos para o interior da matriz mitocondrial para entrar na cadeia de transporte de elétrons, de modo a atingir a produção máxima de ATP. Este mecanismo faz com que o transporte do substrato malato-aspartato seja importante para produção de energia no miócito <sup>(146)</sup>.

O piruvato derivado da via glicolítica é um importante substrato para o ciclo de Krebs. Esta molécula é translocada pela piruvato-translocase. Esta proteína está ancorada na membrana mitocondrial interna e transporta especificamente o piruvato do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial em simporte com o H<sup>+</sup>. O piruvato é oxidado a acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase ativado pelo cálcio. O succinato é oxidado no complexo II (sem passar pelo complexo I) e a adição da rotenona, um inibidor do complexo I, permite avaliar a atividade do complexo II. Como a rotenona bloqueia o complexo I impedindo o transporte de elétrons entre NADH e ubiquinona, desfazendo a ligação ferro-enxofre (Fe-S), o succinato entrega elétrons via FADH<sub>2</sub> no complexo II.

O miocárdio humano e de diversas espécies de mamíferos expressa o gene que codifica o receptor de androgênio, que está especificamente expresso no miócito, na condição necessária para que o fenótipo do miocárdio seja regulado diretamente pelos esteroides androgênicos <sup>(36)</sup>. Entretanto, o índice de RNAm não é suficiente para estabelecer de forma conclusiva que o receptor de androgênio funcional está presente. Além disso, tanto a testosterona quanto a di-hidrotestosterona produzem resposta hipertrófica pela ação direta nos miócitos, aumentando a incorporação de aminoácidos na proteína <sup>(36)</sup>. Portanto, no miocárdio são necessárias condições que, potencialmente, induzem modulação direta do fenótipo das células musculares por andrógeno, independente das alterações hemodinâmicas, hipertrofia ventricular ou outras alterações neuro-hormonais.

Outro achado da presente investigação é que a subpopulação IFM de animais orquiectomizados apresentou maior capacidade de retenção de cálcio em comparação ao SHAM, o que não foi observado para a subpopulação SSM. A sinalização de cálcio mitocondrial desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo da energia celular, no acoplamento excitação-contração miocárdica e na geração de ATP para contração. Na matriz mitocondrial, o Ca<sup>2+</sup> desempenha um papel importante na energética, pela ativação da F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub>-ATPase <sup>(149)</sup>. Participam várias desidrogenases sensíveis ao Ca<sup>2+</sup> no ciclo do ácido tricarboxílico, incluindo piruvato desidrogenase, 2-oxoglutarato ( $\alpha$ -cetoglutarato) desidrogenase e NAD acoplado ao isocitrato desidrogenase ligada ao respectivo ligante <sup>(150, 151)</sup>. A ativação dessas enzimas no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) resulta em aumento da produção de NADH, que é fundamental para a adequação do suprimento de energia à demanda durante o aumento da carga de trabalho <sup>(152)</sup>.

O aumento da negatividade do potencial de membrana (-180 mV) gera força motriz suficiente para a entrada de cálcio na matriz mitocondrial a partir do citosol. Este mecanismo se faz por meio do canal uniporter na membrana mitocondrial interna (153).

Esta pesquisa mostrou que o potencial de membrana foi maior no grupo OQT, e este maior potencial de membrana pode ser o responsável pelo aumento da entrada de cálcio nas mitocôndrias interfibrilares. Além disso, a maior quantidade de cálcio na matriz provavelmente não aumenta a produção de NADH devido à diminuição da atividade da citocromo C oxidase que foi relatado anteriormente em animais orquiectomizados (145).

Outro importante achado do presente estudo é que apenas a subpopulação IFM do grupo OQT apresentou maior resistência ao  $\text{Ca}^{2+}$  em comparação com os outros grupos estudados (SHAM e OQT+T). Por outro lado, as mitocôndrias com altas concentrações de cálcio, se tornam edemaciadas e com vazamento de elétrons, formando mais ROS. Assim, ocorre abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP) que, após um excessivo acúmulo de cálcio na matriz, leva à despolarização mitocondrial, a cessação da síntese de ATP e inibição da respiração (154, 155). Recentemente, a literatura mostrou outros componentes essenciais para a formação da mPTP, tais como dímeros de FOF1 da ATP-sintase e ciclofilina D. Um modo transiente (tPTP) também tem sido proposto (80).

Os resultados demonstraram que a deficiência de testosterona aumenta a capacidade de retenção ao cálcio que foi mais pronunciado na subpopulação IFM no grupo OQT. Uma possível razão pode ser que o poro foi sensível ao cálcio e ao estresse oxidativo (96). As células sofrem um processo apoptótico ao experimentar danos mitocondriais que produzem liberação excessiva de cálcio, hiperpolarização do potencial de membrana e aumento significativo na produção de ROS (156). Tem sido demonstrado que a testosterona detém a capacidade de minimizar estes processos de stress oxidativo durante a lesão causada por superóxido (157). Entretanto, outros estudos reportam que a testosterona pode aumentar a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP), devido à formação de ROS na mitocôndria (158). Outra explicação poderia ser o transporte do cálcio para a matriz mitocondrial. O  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial é absorvido através do canal mitocondrial uniporter (MCU) (159). A deficiência de testosterona afeta tanto as mitocôndrias como o cálcio mioplasmático, sugerindo a interação entre estes dois locais intracelulares. Estas mudanças afetam

a contração do miocárdio, comprometendo o desempenho cardíaco especialmente em pacientes com insuficiência cardíaca. Portanto, a deficiência de testosterona causa diminuição: do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  transsarcolemal por meio do canal de cálcio tipo “L”; da recaptção do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático (SR). A membrana celular sob estimulação, libera menos  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS e, conseqüentemente, ocorre redução da força contrátil.

A alta produção de ROS pelos complexos pode inativar diretamente proteínas mitocondriais e/ou contribuir para a oxidação de lipídeos e carboidratos, produzindo disfunção mitocondrial <sup>(160)</sup>. De modo inverso, a toxicidade das ROS pode ser atenuada pelos antioxidantes na matriz mitocondrial, tais como a glutatona e a superóxido dismutase (SOD) que promovem um mecanismo de “defesa celular”. O superóxido dismutase (SOD), catalisa a reação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), reação esta de extrema importância para o balanço estresse oxidativo mitocondrial <sup>(161)</sup>. A mitocôndria participa efetivamente dos processos de envelhecimento e morte celular programada (apoptose), por meio da produção de ROS. Lesões celulares podem deflagrar sinais intracelulares com alteração na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , causando modificações no interior da organela que podem resultar na diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Conseqüentemente, a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) resultando na liberação do citocromo C para o citosol <sup>(162, 163)</sup>.

Alguns camundongos transgênicos que possuem aumento na abertura dos mPTP apresentam fenótipo de envelhecimento acelerado, acompanhado de apoptose e sarcopenia <sup>(164)</sup>. De modo inverso, sugere-se que um leve desacoplamento da membrana mitocondrial pode otimizar a função da organela em diferentes tecidos, com diminuição de ROS e aumento nas taxas respiratórias <sup>(165,166)</sup>. Importantes publicações têm evidenciado o agravamento de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e o Parkinson devido à disfunção mitocondrial <sup>(167,168)</sup>. Esta disfunção mitocondrial também piora os portadores de insuficiência cardíaca <sup>(115, 169-171)</sup>.

Esta pesquisa analisou o impacto da testosterona sobre a função mitocondrial em modelo animal, mostrando dados consistentes sobre as alterações estruturais e funcionais das subpopulações mitocondriais. Os animais foram privados de testosterona por remoção dos testículos e outros animais receberam reposição de testosterona sintética em concentrações semelhantes às encontradas em condições fisiológicas. A ação da testosterona na mitocôndria interfibrilar pode interferir

diretamente na função contrátil cardíaca devido a redução da produção do ATP prejudicando a via de acoplamento de excitação-contração do miócito <sup>(9)</sup>. O prolongamento do potencial de ação observados em gonadectomizados pode retardar a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo SR, aumentando o período da contração e relaxamento do miócito <sup>(9)</sup>. Assim, o prolongamento do potencial de ação pode ajudar a explicar o tempo de relaxamento prolongado observado nos corações de animais gonadectomizados <sup>(9)</sup>. A influência da testosterona na ação do  $\text{Ca}^{2+}$  celular é iniciada quando este íon entra na célula através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo “L” durante a fase 2 do potencial de ação <sup>(9)</sup>. Isto sugere que os animais gonadectomizados apresentaram redução do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  no miócito, interferindo no fluxo iônico transsarcolemal, com efeitos importantes sobre a contratilidade cardíaca <sup>(9)</sup>. Além disso, a testosterona inibe a fosfodiesterase e aumenta os níveis de AMPc nos átrios e ventrículos de ratos <sup>(172)</sup>.

A diminuição no número de cardiomiócitos tem sido mostrado como um fator importante na patogênese da insuficiência cardíaca (IC) <sup>(173)</sup>. As alterações funcionais e estruturais na ultraestrutura responsáveis pela síntese de ATP produzem impacto sobre as organelas por fissão mitocondrial e diminuição na produção de ATP <sup>(173)</sup>. Frequentemente, deficiência de testosterona está relacionada com a diminuição da tolerância ao exercício, podendo exacerbar os sintomas em pacientes com insuficiência cardíaca <sup>(174)</sup>. O declínio dos níveis séricos da testosterona contribui para a piora sintomática na insuficiência cardíaca sendo que seus aspectos fisiológicos ainda não foram devidamente elucidados <sup>(175)</sup>. Em homens com insuficiência cardíaca, a elevação dos níveis de testosterona como terapia de reposição é um importante preditor para o aumento do consumo máximo de oxigênio ( $\text{VO}_2$ ) em testes ergométricos <sup>(175)</sup>. A administração intravenosa de testosterona aumenta agudamente o débito cardíaco e reduz a resistência vascular periférica <sup>(176,177)</sup>. Os resultados da presente investigação mostraram que a deficiência de testosterona, ao longo de 12 semanas, afetou de forma diferenciada a subpopulação mitocondrial interfibrilar sem influenciar a subsarcolemal. A reposição hormonal se mostrou eficaz para restaurar a função mitocondrial.

Por fim, esta pesquisa trouxe informações sobre como a deficiência e a reposição de testosterona afeta diferentemente as subpopulações mitocondriais no cardiomiócito. Porém, são necessárias outras pesquisas para ampliar o conhecimento sobre este tema e sua influência em relação as alterações estruturais e funcionais das subpopulações mitocondriais. A inter-relação entre a queda de testosterona e a



disfunção mitocondrial pode contribuir para um melhor entendimento das patologias que envolvem a contratilidade cardíaca.

## 6 CONCLUSÃO

Evidenciou-se que houve diferenças específicas nas subpopulações mitocondriais subsarcolemais e interfibrilares cardíacas, como resultado da deficiência de testosterona após 12 semanas. A diferença ocorreu na subpopulação mitocondrial interfibrilar onde observou-se alteração no potencial de membrana, tamanho e complexidade interna assim como também na fosforilação oxidativa além de apresentar maior capacidade de retenção de cálcio. Consequentemente, as proteínas mitocondriais dos animais orquiectomizados são mais suscetíveis à abertura de poro de transição de permeabilidade. Entretanto, a reposição hormonal se mostrou eficaz para restaurar toda estrutura e função mitocondrial.

## 7 REFERÊNCIAS

1. Berthold AA. On the transplantation of the testes. *Arch Anat Physiol Wiss Med.* 1849:42-6 (Apud: Nieschlag E, Nieschlag S. Testosterone deficiency: a historical perspective. *Asian J Androl.* 2014;16(2):161-8).
2. Steinach E. Rejuvenation by experimental reactivation of the aging pubertal gland. Berlin: J Springer Verlag. 1920 (Apud: Nieschlag E, Nieschlag S. Testosterone deficiency: a historical perspective. *Asian J Androl.* 2014;16(2):161-8).
3. Butenandt A. Butenandt A. The chemical investigation of the sex hormone. *Z Angew Chem* 1931; 44: 905–8 (Apud: Nieschlag E, Nieschlag S. Testosterone deficiency: a historical perspective. *Asian J Androl.* 2014;16(2):161-8).
4. David K, Dingemanse E, Freud J, Laquer E. Crystalline male hormone from the testes (Testosterone) is more effective than androsterone derived from urine or cholesterol. *Hoppe-Seyler's Z physiol Chem* 1935; 233: 281–2 (Apud: Nieschlag E, Nieschlag S. Testosterone deficiency: a historical perspective. *Asian J Androl.* 2014;16(2):161-8).
5. Borst SE, Mulligan T. Testosterone replacement therapy for older men. *Clin Interv Aging.* 2007;2(4):561-6.
6. Herbison AE, Porteous R, Pape JR, Mora JM, Hurst PR. Gonadotropin-releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation, and fertility. *Endocrinology.* 2008;149(2):597-604.
7. Chen H, Midzak A, Luo L, Zirkin BR. Aging and the decline of androgen production. In: Payne AH, Hardy MP, editors. *The Leydig cell in health and disease.* Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007. p. 117–31.
8. Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;379(1-2):62-73.
9. Ayaz O, Howlett SE. Testosterone modulates cardiac contraction and calcium homeostasis: cellular and molecular mechanisms. *Biology of sex differences.* 2015;6:9.
10. Kaushik M, Sontineni SP, Hunter C. Cardiovascular disease and androgens: a review. *Int J Cardiol.* 2010;142(1):8-14.
11. Pocock G, Richards CD. *Human physiology: the basis of medicine.* 3 rd ed: Oxford: Oxford University Press; 2006.
12. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2016;133(4):e38-e360.

13. Yeap BB. Androgens and cardiovascular disease. Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity. 2010;17(3):269-76.
14. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2010;95(6):2536-59.
15. Schock HW, Herbert Z, Sigusch H, Figulla HR, Jirikowski GF, Lotze U. Expression of androgen-binding protein (ABP) in human cardiac myocytes. Horm Metab Res. 2006;38(4):225-9.
16. Jarrar D, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Mechanisms of the salutary effects of dehydroepiandrosterone after trauma-hemorrhage: direct or indirect effects on cardiac and hepatocellular functions? Arch Surg. 2000;135(4):416-22; discussion 22-3.
17. Horstman AM, Dillon EL, Urban RJ, Sheffield-Moore M. The role of androgens and estrogens on healthy aging and longevity. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2012;67(11):1140-52.
18. Golden KL, Marsh JD, Jiang Y, Moulden J. Gonadectomy alters myosin heavy chain composition in isolated cardiac myocytes. Endocrine. 2004;24(2):137-40.
19. Golden KL, Marsh JD, Jiang Y. Castration reduces mRNA levels for calcium regulatory proteins in rat heart. Endocrine. 2002;19(3):339-44.
20. Schaible TF, Malhotra A, Ciambone G, Scheuer J. The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. Circulation research. 1984;54(1):38-49.
21. Golden KL, Marsh JD, Jiang Y, Brown T, Moulden J. Gonadectomy of adult male rats reduces contractility of isolated cardiac myocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003;285(3):E449-53.
22. Scheuer J, Malhotra A, Schaible TF, Capasso J. Effects of gonadectomy and hormonal replacement on rat hearts. Circulation research. 1987;61(1):12-9.
23. Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blaksley EJ, Valverde E, et al. Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. Am Heart J. 2000;140(4):678-83.
24. James AF, Choisy SC, Hancox JC. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. Prog Biophys Mol Biol. 2007;94(3):265-319.
25. Jones RD, English KM, Pugh PJ, Morice AH, Jones TH, Channer KS. Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action. J Cardiovasc Pharmacol. 2002;39(6):814-23.
26. Jones RD, Hugh Jones T, Channer KS. The influence of testosterone upon vascular reactivity. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies. 2004;151(1):29-37.

27. Nahrendorf M, Frantz S, Hu K, von zur Muhlen C, Tomaszewski M, Scheuermann H, et al. Effect of testosterone on post-myocardial infarction remodeling and function. *Cardiovascular research*. 2003;57(2):370-8.
28. Cavasin MA, Sankey SS, Yu AL, Menon S, Yang XP. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;284(5):H1560-9.
29. Credit SL, Benghuzzi HA, Tucci M, Farah I, Cameron JA. Localization of cytokines in heart ventricular and apex tissues exposed to sustained delivery of AED, T, and DHT using a rat model. *Biomed Sci Instrum*. 2002;38:95-100.
30. Barp J, Araujo AS, Fernandes TR, Rigatto KV, Llesuy S, Bello-Klein A, et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(9):1075-81.
31. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *American journal of physiology Cell physiology*. 2001;280(1):C53-60.
32. Kuhar P, Lunder M, Drevensek G. The role of gender and sex hormones in ischemic-reperfusion injury in isolated rat hearts. *European journal of pharmacology*. 2007;561(1-3):151-9.
33. Parks RJ, Howlett SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2013;465(5):747-63.
34. Buonanno C, Arbustini E, Rossi L, Dander B, Vassanelli C, Paris B, et al. Left ventricular function in men and women. Another difference between sexes. *European heart journal*. 1982;3(6):525-8.
35. Merz CN, Moriel M, Rozanski A, Klein J, Berman DS. Gender-related differences in exercise ventricular function among healthy subjects and patients. *Am Heart J*. 1996;131(4):704-9.
36. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation*. 1998;98(3):256-61.
37. Pongkan W, Pintana H, Sivasinprasan S, Jaiwongkam T, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Testosterone deprivation accelerates cardiac dysfunction in obese male rats. *The Journal of endocrinology*. 2016.
38. Dickerman RD, Schaller F, Prather I, McConathy WJ. Sudden cardiac death in a 20-year-old bodybuilder using anabolic steroids. *Cardiology*. 1995;86(2):172-3.

39. Papamitsou T, Barlagiannis D, Papaliagkas V, Kotanidou E, Dermentzopoulou-Theodoridou M. Testosterone-induced hypertrophy, fibrosis and apoptosis of cardiac cells--an ultrastructural and immunohistochemical study. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2011;17(9):BR266-73.
40. Adams MR, Williams JK, Kaplan JR. Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995;15(5):562-70.
41. Pongkan W, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Roles of Testosterone Replacement in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2016;21(1):27-43.
42. Er F, Michels G, Gassanov N, Rivero F, Hoppe UC. Testosterone induces cytoprotection by activating ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the cardiac mitochondrial inner membrane. *Circulation*. 2004;110(19):3100-7.
43. Malkin CJ, Pugh PJ, Morris PD, Kerry KE, Jones RD, Jones TH, et al. Testosterone replacement in hypogonadal men with angina improves ischaemic threshold and quality of life. *Heart*. 2004;90(8):871-6.
44. English KM, Steeds RP, Jones TH, Diver MJ, Channer KS. Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*. 2000;102(16):1906-11.
45. Zhang YZ, Xing XW, He B, Wang LX. Effects of testosterone on cytokines and left ventricular remodeling following heart failure. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2007;20(6):847-52.
46. Zaugg M, Jamali NZ, Lucchinetti E, Xu W, Alam M, Shafiq SA, et al. Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. *Journal of cellular physiology*. 2001;187(1):90-5.
47. Cavasin MA, Tao ZY, Yu AL, Yang XP. Testosterone enhances early cardiac remodeling after myocardial infarction, causing rupture and degrading cardiac function. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;290(5):H2043-50.
48. Liu J, Tsang S, Wong TM. Testosterone is required for delayed cardioprotection and enhanced heat shock protein 70 expression induced by preconditioning. *Endocrinology*. 2006;147(10):4569-77.
49. Pongkan W, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Chronic testosterone replacement exerts cardioprotection against cardiac ischemia-reperfusion injury by attenuating mitochondrial dysfunction in testosterone-deprived rats. *PloS one*. 2015;10(3):e0122503.

50. Lehninger AL. The Mitochondrion. New York: Benjamin. 1965 (Apud: Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological reviews*. 2009;89(3):799-845).
51. Rambourg A, Segretain D. Three-dimensional electron microscopy of mitochondria and endoplasmic reticulum in the red muscle fiber of the rat diaphragm. *Anat Rec*. 1980;197(1):33-48.
52. Hollander JM, Thapa D, Shepherd DL. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2014;307(1):H1-14.
53. Rossi CS, Lehninger AL. Stoichiometry of Respiratory Stimulation, Accumulation of Ca<sup>++</sup> and Phosphate, and Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 1964;239:3971-80.
54. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
55. Bereiter-Hahn J, Voth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*. 1994;27(3):198-219.
56. Hales KG, Fuller MT. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*. 1997;90(1):121-9.
57. Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological reviews*. 2009;89(3):799-845.
58. Chang DT, Reynolds IJ. Differences in mitochondrial movement and morphology in young and mature primary cortical neurons in culture. *Neuroscience*. 2006;141(2):727-36.
59. Nicholls DG. Mitochondria and calcium signaling. *Cell calcium*. 2005;38(3-4):311-7.
60. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine*. 2000;29(3-4):222-30.
61. Logan DC. The mitochondrial compartment. *Journal of experimental botany*. 2006;57(6):1225-43.
62. Voet JG. Elektronentransport und Oxidative Phosphorylierung. In D. Voet and J. G. Voet, editors, *Biochemie*, chapter 20, pages 527–560. VCH, Weinheim, first edit edition. ISBN 3-527-29249-7. 1994.
63. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(12):1507-38.
64. Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS letters*. 2003;546(2-3):355-8.

65. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of applied physiology*. 1995;79(3):675-86.
66. Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1363(2):100-24.
67. Lai JC, Clark JB. Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondria from mammalian brain. *Methods Enzymol*. 1979;55:51-60.
68. Ribeiro RF, Jr., Ronconi KS, Morra EA, Do Val Lima PR, Porto ML, Vassallo DV, et al. Sex differences in the regulation of spatially distinct cardiac mitochondrial subpopulations. *Molecular and cellular biochemistry*. 2016;419(1-2):41-51.
69. Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell metabolism*. 2005;2(2):85-93.
70. Chen Q, Lesnefsky EJ. Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain. *Free radical biology & medicine*. 2006;40(6):976-82.
71. Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26(1):23-9.
72. James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(38):36373-9.
73. Barth E, Stammler G, Speiser B, Schaper J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1992;24(7):669-81.
74. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011;476(7360):341-5.
75. Bazil JN, Dash RK. A minimal model for the mitochondrial rapid mode of Ca<sup>2+</sup> uptake mechanism. *PloS one*. 2011;6(6):e21324.
76. Ryu SY, Beutner G, Kinnally KW, Dirksen RT, Sheu SS. Single channel characterization of the mitochondrial ryanodine receptor in heart mitoplasts. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(24):21324-9.
77. Carafoli E, Tiozzo R, Lugli G, Crovetti F, Kratzing C. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1974;6(4):361-71.
78. Korge P, Yang L, Yang JH, Wang Y, Qu Z, Weiss JN. Protective role of transient pore openings in calcium handling by cardiac mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(40):34851-7.



79. Weinbrenner C, Liu GS, Downey JM, Cohen MV. Cyclosporine A limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Cardiovascular research*. 1998;38(3):676-84.
80. Lu X, Kwong JQ, Molkentin JD, Bers DM. Individual Cardiac Mitochondria Undergo Rare Transient Permeability Transition Pore Openings. *Circulation research*. 2016;118(5):834-41.
81. Murgia M, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R. Controlling metabolism and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;46(6):781-8.
82. Haviland SS. Calcium signaling in cardiac myocytes: contributions from mitochondria, sodium-calcium exchanger, and ryanodine receptor: Faculty of the Graduate School of Arts and Sciences of Georgetown University; 2013.
83. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *The Journal of biological chemistry*. 1977;252(23):8731-9.
84. Shiojima I, Yefremashvili M, Luo Z, Kureishi Y, Takahashi A, Tao J, et al. Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(40):37670-7.
85. Lukyanenko V, Chikando A, Lederer WJ. Mitochondria in cardiomyocyte Ca<sup>2+</sup> signaling. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41(10):1957-71.
86. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010;121(18):2012-22.
87. Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E, Hoppel C. Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;289(2):H868-72.
88. Asemu G, O'Connell KA, Cox JW, Dabkowski ER, Xu W, Ribeiro RF, Jr., et al. Enhanced resistance to permeability transition in interfibrillar cardiac mitochondria in dogs: effects of aging and long-term aldosterone infusion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013;304(4):H514-28.
89. Honda HM, Ping P. Mitochondrial permeability transition in cardiac cell injury and death. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2006;20(6):425-32.
90. Khairallah RJ, O'Shea KM, Brown BH, Khanna N, Des Rosiers C, Stanley WC. Treatment with docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, delays Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondria permeability transition in normal and hypertrophied myocardium. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;335(1):155-62.

91. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *The American journal of physiology*. 1986;250(5 Pt 2):H741-8.
92. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annual review of physiology*. 1997;59:551-71.
93. Ingwall JS, Weiss RG. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circulation research*. 2004;95(2):135-45.
94. Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeyer H. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev*. 2007;12:331-43.
95. Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, O'Connell KA, Ribeiro RF, Jr., Stanley WC, et al. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302(1):H167-79.
96. Papanicolaou KN, Khairallah RJ, Ngoh GA, Chikando A, Luptak I, O'Shea KM, et al. Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(6):1309-28.
97. Strauer BE. Myocardial oxygen consumption in chronic heart disease: role of wall stress, hypertrophy and coronary reserve. *The American journal of cardiology*. 1979;44(4):730-40.
98. Taegtmeyer H. Glycogen in the heart--an expanded view. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;37(1):7-10.
99. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301(6):H2181-90.
100. Buchwald A, Till H, Unterberg C, Oberschmidt R, Figulla HR, Wiegand V. Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *European heart journal*. 1990;11(6):509-16.
101. Casademont J, Miro O. Electron transport chain defects in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2002;7(2):131-9.
102. Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, et al. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular research*. 2000;45(4):860-5.
103. Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN, et al. Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(12):2174-81.

104. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;287(4):C817-33.
105. Adhietty PJ, Ljubcic V, Menzies KJ, Hood DA. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *American journal of physiology Cell physiology*. 2005;289(4):C994-C1001.
106. Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *American journal of physiology Cell physiology*. 2008;294(2):C460-6.
107. Dabkowski ER, Baseler WA, Williamson CL, Powell M, Razunguzwa TT, Frisbee JC, et al. Mitochondrial dysfunction in the type 2 diabetic heart is associated with alterations in spatially distinct mitochondrial proteomes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;299(2):H529-40.
108. Dabkowski ER, Williamson CL, Bukowski VC, Chapman RS, Leonard SS, Peer CJ, et al. Diabetic cardiomyopathy-associated dysfunction in spatially distinct mitochondrial subpopulations. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009;296(2):H359-69.
109. Fannin SW, Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Hassan MO, Hoppel CL. Aging selectively decreases oxidative capacity in rat heart interfibrillar mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1999;372(2):399-407.
110. Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(3):419-21.
111. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(10):2944-50.
112. Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA, Dupont-Versteegden EE. Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2005;288(5):R1288-96.
113. Lesnefsky EJ, Chen Q, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE, Hassan MO, et al. Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004;287(1):H258-67.
114. Hoppel CL, Tandler B, Parland W, Turkaly JS, Albers LD. Hamster cardiomyopathy. A defect in oxidative phosphorylation in the cardiac interfibrillar mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(3):1540-8.

115. Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W, et al. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovascular research*. 2008;80(1):30-9.
116. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A, Amorim PA, Schoepe M, et al. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovascular research*. 2010;85(2):376-84.
117. Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *The Journal of physiology*. 2003;551(Pt 2):491-501.
118. Riehle C, Wende AR, Zaha VG, Pires KM, Wayment B, Olsen C, et al. PGC-1beta deficiency accelerates the transition to heart failure in pressure overload hypertrophy. *Circulation research*. 2011;109(7):783-93.
119. Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, Allard MF. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev*. 2002;7(2):161-73.
120. Holmuhamedov EL, Oberlin A, Short K, Terzic A, Jahangir A. Cardiac subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria display distinct responsiveness to protection by diazoxide. *PloS one*. 2012;7(9):e44667.
121. Curl CL, Delbridge LM, Canny BJ, Wendt IR. Testosterone modulates cardiomyocyte Ca(2+) handling and contractile function. *Physiological research*. 2009;58(2):293-7.
122. Witayavanitkul N, Woranush W, Bupha-Intr T, Wattanapernpool J. Testosterone regulates cardiac contractile activation by modulating SERCA but not NCX activity. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013;304(3):H465-72.
123. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121(21):2331-78.
124. Chen H, Cangello D, Benson S, Folmer J, Zhu H, Trush MA, et al. Age-related increase in mitochondrial superoxide generation in the testosterone-producing cells of Brown Norway rat testes: relationship to reduced steroidogenic function? *Exp Gerontol*. 2001;36(8):1361-73.
125. Hwang TI, Liao TL, Lin JF, Lin YC, Lee SY, Lai YC, et al. Low-dose testosterone treatment decreases oxidative damage in TM3 Leydig cells. *Asian J Androl*. 2011;13(3):432-7.
126. Chinda K, Sanit J, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor reduces infarct size and preserves cardiac function via mitochondrial protection in ischaemia-reperfusion rat heart. *Diab Vasc Dis Res*. 2014;11(2):75-83.

127. Palee S, Weerateerangkul P, Chinda K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Mechanisms responsible for beneficial and adverse effects of rosiglitazone in a rat model of acute cardiac ischaemia-reperfusion. *Exp Physiol*. 2013;98(5):1028-37.
128. Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol*. 2000;149(7):1503-12.
129. CONCEA CNdCdEA, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. v.1, n.1, p. 1-50. 2013. Brasília: Anvisa. 2013. 50 p. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/arquivo/download/20>. acesso em: 12/06/2014.
130. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
131. Galvao TF, Brown BH, Hecker PA, O'Connell KA, O'Shea KM, Sabbah HN, et al. High intake of saturated fat, but not polyunsaturated fat, improves survival in heart failure despite persistent mitochondrial defects. *Cardiovascular research*. 2012;93(1):24-32.
132. Clarke TE, Vogel HJ. Cadmium-113 and lead-207 NMR spectroscopic studies of calcium-binding proteins. *Methods in molecular biology*. 2002;173:205-15.
133. Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sanglifehrín A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(38):34793-9.
134. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012;337(6098):1062-5.
135. Moore AS, Wong YC, Simpson CL, Holzbaur EL. Dynamic actin cycling through mitochondrial subpopulations locally regulates the fission-fusion balance within mitochondrial networks. *Nat Commun*. 2016;7:12886.
136. Schwarz N, Leube RE. Intermediate Filaments as Organizers of Cellular Space: How They Affect Mitochondrial Structure and Function. *Cells*. 2016;5(3).
137. Liu SS. Cooperation of a "reactive oxygen cycle" with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain--superoxide generating and cycling mechanisms in mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 1999;31(4):367-76.
138. Wang F, Yang J, Sun J, Dong Y, Zhao H, Shi H, et al. Testosterone replacement attenuates mitochondrial damage in a rat model of myocardial infarction. *The Journal of endocrinology*. 2015;225(2):101-11.
139. Wang W, Fang H, Groom L, Cheng A, Zhang W, Liu J, et al. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell*. 2008;134(2):279-90.

140. Elrod JW, Wong R, Mishra S, Vagnozzi RJ, Sakthivel B, Goonasekera SA, et al. Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca<sup>2+</sup> exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(10):3680-7.
141. Vutthasathien P, Wattanapermpool J. Regular exercise improves cardiac contractile activation by modulating MHC isoforms and SERCA activity in orchidectomized rats. *Journal of applied physiology*. 2015;119(7):831-9.
142. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological reviews*. 2010;90(1):207-58.
143. Brandes R, Bers DM. Intracellular Ca<sup>2+</sup> increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circulation research*. 1997;80(1):82-7.
144. Watanabe A, Arai M, Koitabashi N, Niwano K, Ohyama Y, Yamada Y, et al. Mitochondrial transcription factors TFAM and TFB2M regulate Serca2 gene transcription. *Cardiovascular research*. 2011;90(1):57-67.
145. Koenig H, Goldstone A, Lu CY. Testosterone-mediated sexual dimorphism of the rodent heart. Ventricular lysosomes, mitochondria, and cell growth are modulated by androgens. *Circulation research*. 1982;50(6):782-7.
146. Lu M, Zhou L, Stanley WC, Cabrera ME, Saidel GM, Yu X. Role of the malate-aspartate shuttle on the metabolic response to myocardial ischemia. *Journal of theoretical biology*. 2008;254(2):466-75.
147. Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S, et al. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nature biotechnology*. 2003;21(3):281-6.
148. Rupert BE, Segar JL, Schutte BC, Scholz TD. Metabolic adaptation of the hypertrophied heart: role of the malate/aspartate and alpha-glycerophosphate shuttles. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2000;32(12):2287-97.
149. Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS. Ca<sup>2+</sup> activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATPase. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;278(2):C423-35.
150. Denton RM, McCormack JG. Ca<sup>2+</sup> as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annual review of physiology*. 1990;52:451-66.
151. Hansford RG. Relation between cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration and the control of pyruvate dehydrogenase in isolated cardiac myocytes. *The Biochemical journal*. 1987;241(1):145-51.
152. Liu X, Hajnoczky G. Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of mitochondrial dynamics by the Miro-Milton complex. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41(10):1972-6.

153. Boyman L, Chikando AC, Williams GS, Khairallah RJ, Kettlewell S, Ward CW, et al. Calcium movement in cardiac mitochondria. *Biophysical journal*. 2014;107(6):1289-301.
154. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Frontiers in physiology*. 2013;4:95.
155. Milerova M, Drahota Z, Chytilova A, Tauchmannova K, Houstek J, Ostadal B. Sex difference in the sensitivity of cardiac mitochondrial permeability transition pore to calcium load. *Molecular and cellular biochemistry*. 2016;412(1-2):147-54.
156. Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Huttemann M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1655(1-3):400-8.
157. Xiao FY, Nheu L, Komesaroff P, Ling S. Testosterone protects cardiac myocytes from superoxide injury via NF-kappaB signalling pathways. *Life sciences*. 2015;133:45-52.
158. Lopes RA, Neves KB, Pestana CR, Queiroz AL, Zanotto CZ, Chignalia AZ, et al. Testosterone induces apoptosis in vascular smooth muscle cells via extrinsic apoptotic pathway with mitochondria-generated reactive oxygen species involvement. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2014;306(11):H1485-94.
159. Finkel T, Menazza S, Holmstrom KM, Parks RJ, Liu J, Sun J, et al. The ins and outs of mitochondrial calcium. *Circulation research*. 2015;116(11):1810-9.
160. Friguet B, Bulteau AL, Petropoulos I. Mitochondrial protein quality control: implications in ageing. *Biotechnol J*. 2008;3(6):757-64.
161. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 1999;31(4):347-66.
162. Szabadkai G, Simoni AM, Bianchi K, De Stefani D, Leo S, Wieckowski MR, et al. Mitochondrial dynamics and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1763(5-6):442-9.
163. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
164. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 2005;309(5733):481-4.
165. Caldeira da Silva CC, Cerqueira FM, Barbosa LF, Medeiros MH, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell*. 2008;7(4):552-60.

166. Cerqueira FM, Laurindo FR, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, akt and mitochondrial biogenesis. *PLoS one*. 2011;6(3):e18433.
167. Hoekstra JG, Montine KS, Zhang J, Montine TJ. Mitochondrial therapeutics in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2011;3(3):21.
168. Lim KL, Ng XH, Grace LG, Yao TP. Mitochondrial dynamics and Parkinson's disease: focus on parkin. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(9):935-49.
169. Rosca MG, Hoppel CL. New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2009;41(2):107-12.
170. Rosca MG, Hoppel CL. Mitochondria in heart failure. *Cardiovascular research*. 2010;88(1):40-50.
171. Javadov S, Hunter JC, Barreto-Torres G, Parodi-Rullan R. Targeting the mitochondrial permeability transition: cardiac ischemia-reperfusion versus carcinogenesis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2011;27(3-4):179-90.
172. Bordallo J, Cantabrana B, Suarez L, Sanchez M. Testosterone inhibits cAMP-phosphodiesterases in heart extracts from rats and increases cAMP levels in isolated left atria. *Pharmacology*. 2011;87(3-4):155-60.
173. Goldenthal MJ. Mitochondrial involvement in myocyte death and heart failure. *Heart Fail Rev*. 2016;21(2):137-55.
174. Tappler B, Katz M. Pituitary-gonadal dysfunction in low-output cardiac failure. *Clinical endocrinology*. 1979;10(3):219-26.
175. Jankowska EA, Filippatos G, Ponikowska B, Borodulin-Nadziejka L, Anker SD, Banasiak W, et al. Reduction in circulating testosterone relates to exercise capacity in men with chronic heart failure. *Journal of cardiac failure*. 2009;15(5):442-50.
176. Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. Acute haemodynamic effects of testosterone in men with chronic heart failure. *European heart journal*. 2003;24(10):909-15.
177. Toma M, McAlister FA, Coglianese EE, Vidi V, Vasaiwala S, Bakal JA, et al. Testosterone supplementation in heart failure: a meta-analysis. *Circulation Heart failure*. 2012;5(3):315-21.