Apocinina e Espironolactona Previnem o Aumento de Estresse Oxidativo Mitocondrial e da Via da NADPH Oxidase e Melhoram a Contratilidade Miocárdica em Ratas Ovariectomizadas

Samya Mere Lima Rodrigues

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

Doutorado em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória-ES, 06 de maio 2019

# UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO Centro de Ciências da Saúde Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

# REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES

## Nº. Matrícula da Candidata: 2014131910

A comissão julgadora que examinou a tese de doutorado, intitulada "Apocinina e espironolactona previnem o aumento de estresse oxidativo mitocondrial e da via da NADPH oxidase e melhoram a contratilidade miocárdica em ratas ovariectomizadas", apresentada e defendida publicamente pela aluna Samya Mere Lima Rodrigues, no dia 06 de maio de 2019, às 09 horas, decidiu, por unanimidade, (aprovar a referida tese de doutorado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas).

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon Orientadora (UFES)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli Membro interno (UFES)

Co orientador (UFES)

Prof. Dr. Rogério Faustino Ribeiro Júnior – Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto Membro externo (EMESCAM)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Simão Padilha -Membro interno (UFES)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aurélia Araújo Fernandes – Membro externo (Departamento de Morfologia- UFES)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Alves Gouvea Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

Vitória, 06 de maio de 2019

Rodrigues, Samya Mere Lima, 1976

Apocinina e Espironolactona previnem o aumento de estresse oxidativo mitocondrial e da via da NADPH oxidase e melhoram a contratilidade miocárdica em ratas ovariectomizadas

Vitória – 2019. xxiii, 109 p., 29,7 cm (UFES, D.Sc., Ciências Fisiológicas, 2019) Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. 1. Ovariectomia, 2. Estrogênio, 3. Mitocôndrias, 4. NADPH oxidase, 5. EROs.

Dedico este trabalho a minha mãe que representa todas as mulheres batalhadoras, rígidas, dedicadas e amorosas. Ao meu filho pelo amor e carinho, a todos que contribuíram de forma direta e indireta. E aos professores que apesar da desvalorização profissional, mantem o brilho nos olhos quando compartilham o conhecimento.

"The most beautiful experience we can have is the mysterious; it is the fundamental emotion that stands at the cradle of true art and true science."

Albert Einstein

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que não evitou as tempestades, mas me transformou para que eu pudesse suportar, pois quando sou fraca é que sou forte. Agradeço ao meu filho maravilhoso, Daniel, pela paciência e compreensão, pelos beijos e demonstrações de amor, além de ser bonito você é muito inteligente tenho orgulho de ser sua mãe. Agradeço aos meus pais Maria de Fátima e José Rodrigues que me ensinaram a nunca desistir, a minha irmã "Doutorinha" Sony Mára pelo cuidado com os dentes da família inteira, a tia Eliane "Nana" minha prima-irmã que aturou meus choros e crises de loucura, a nossa futura Juíza Lara que é minha sobrinha do coração e a minha tia Luíza, que com seu jeito sereno e tranquilo se dedicando a pastoral me ensinou a pensar mais no próximo do que em mim. A toda minha família que me acompanharam nessa longa jornada amo vocês. Aos meus poucos e sinceros amigos Carolina Falcão Ximenes, Fabrício de "Orleans" e Bragança (grata pelos cafés e bolos), Jéssica Spalenza, Gustavo e Anderson pelas conversas sobre os reptilianos e o fim dos tempos, agradeço muito por vocês terem me aturado. Aos colegas do LEMC Maylla, Camila, Sabrina, Patrícia, Taty, Karol Ronconi, Filipe, Marito, Ingridy, Evellyn, Ana Karolina, Vilmar. Aos professores Dalton, Leonardo, Alessandra, Suely, Nazaré, Jones e Silvana pelos ensinamentos e conselhos. Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon por todos os ensinamentos, pelas broncas e discussões, pelo carinho e amizade, tenho uma admiração e gratidão enorme por você. Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Rogério Faustino que além de ser bonito é inteligente, te agradeço imensamente por ter me deixado compartilhar de sua ilustre presença, agradeço pelo bullying, o acid and black humor e outras cositas (keep your friends close and your enemies closer) nos vemos no seu iate em Mykonos. I want to thank Professor Kurt and Professor Martins who received me at LSU, where I was able to learn new

techniques and many interesting researches. I cannot forget to thank Mrs. Karen for the ride and for the king cake. A prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Baroni e famílias linda vocês são muito especiais e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Flávia Souza Smith desejo toda a felicidade a você e sua família, sou grata por tudo o que vocês fizeram por mim. Thank you Rick, my thanks never will be enough. Foi uma jornada cheia de altos e baixos, que valeu cada momento.

Meu agradecimento também a Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo incentivo a pesquisa.

Agradeço a todos vocês que fizeram parte disso e sempre lembrarei de vocês em minhas orações.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	.23
1.1 Previsão epidemiológica das doenças cardiovasculares e a expectativa de v	/ida
feminina	23
1.2 A terapia de reposição hormonal e suas controvérsias	24
1.3 O estrogênio e o sistema cardiovascular	26
1.3.1 O estrogenio e o acoplamento excitação contração	28 31
1.3.3 Função mitocondrial e a NADPH oxidase	.34
1.4 Deficiência de estrogênio e as doenças cardiovasculares	40
2. OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo Geral	43
2.2 Objetivos Específicos	. 43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Animais Experimentais	44
3.2 Grupos Experimentais	44
3.3 Acompanhamento do peso corporal	45
3.4 Mensuração do peso do ventrículo	45
3.5 Avaliação da eficácia da castração	45
3.6 Medida do comprimento da tíbia	45
3.7 Análise da contratilidade miocárdica <i>in vitro</i>	45
3.8 Avaliação "in situ" de O2 <sup>-</sup> no músculo papilar pela técnica de fluorescência	ao
dihidroetídeo (DHE)	50
3.9 Estudo da extração de proteínas e imunoblotting	52
3.10 Função mitocondrial cardíaca	. 53

3.11 Análise funcional da cadeia respiratória mitocondrial – oxidação fosforilativa	55
3.12 Drogas e reagentes químicos	57
3.13 Análise estatística	57
4. RESULTADOS	58
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÃO	90
7. REFERÊNCIAS	91

## LISTA DE TABELA E FIGURAS

Tabela 1 Avaliação Ponderal das ratas Sham, Ovx, Ovx + Apo e Ovx + Espiro ...... 59

Figura 3 Subpopulações mitocondriais em cardiomócitos ventriculares de ratos .......... 54

Figura 6 Efeito do aumento do cálcio extracelular concentrações de 0,62 a 3,75 mM e curva concentração-resposta ao Isoproterenol (10<sup>-7</sup> – 10<sup>-1</sup> M) grupos Sham, Ovx, Ovx + Espiro e Ovx + Apo.

Figura 7 Expressão das proteínas Serca 2a, PLB e Nox4 normalizadas pela GAPDH e
Serca 2a normalizada pela PLB 62
Figura 8 Detecção in situ de ânion superóxido. Micrografia de tecidos do músculo papilar
corados com DHE (fluorescência vermelha) 64
Figura 9 Representação da avaliação da função mitocondrial nas subpopulações IFM e
SSM em resposta ao substrato Glutamato + Malato 66
Figura 10 Representação da avaliação da função mitocondrial nas subpopulações IFM e
SSM em resposta ao substrato Palmitoil L-carnitina 68
Figura 11 Representação da avaliação da função mitocondrial nas subpopulações IFM e
SSM em resposta ao substrato Piruvato + Malato70

Figura 16 Expressão das protéinas carboniladas nas subpopulações IFM e SSM ....... 81

# LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ADP: Difosfato de adenosina
- ADP:O: Razão fosfato inorgânico/oxigênio
- AMP: Monofosfato de adenosina
- AMPK: Proteína quinase ativada por AMP
- ANG II: Angiotensina II
- ATP: Trifosfato de adenosina
- BSA: Albumina bovina
- Ca2+: Cálcio
- CTE: Cadeia transportadora de elétrons
- CyPD: Ciclofilina D
- DCV: Doença Cardiovascular
- DNAmt: DNA mitocondrial
- e<sup>-</sup>: Elétrons
- E2: 17β-Estradiol
- EROs: Espécies reativas de oxigênio
- FAD: Flavina-adenina dinucleotídeo
- FADH2: Flavina-adenina dinucleotídeo reduzida
- F/F0: Transiente de cálcio; variação global de cálcio intracelular
- GAPDH: Gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase
- GPER: Receptor de estrogênio acoplado a proteína G
- GTP: Guanosina trifosfato
- GTPase: Enzimas responsáveis pela hidrólise de GTP

H<sub>2</sub>O: Água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio

- i.p.: Intraperitoneal
- IFM: Subpopulação mitocondrial Intermiofibrilar
- MCU: Cálcio mitocondrial uniporter
- Mn-SOD: Superóxido dismutase manganês
- MET: Microscopia eletrônica de transmissão
- NAD+: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADH: Nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida
- NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NOX-1: Isoforma 1 da NADPH oxidase
- NOX-2: Isoforma 2 da NADPH oxidase
- NOX-4: Isoforma 4 da NADPH oxidase
- NRF1: Fator Nuclear Respiratório
- Ovx: Ovariectomia
- O2: Oxigênio
- O2<sup>-</sup> Ânion superóxido
- PCI: Peso Corporal Inicial
- PCF: Peso Corporal Final
- PGC1-α: Proteína co ativadora reguladora de transcrição gênica
- Pi: Fosfato inorgânico
- PKA: Proteína quinase A
- PLB: Fosfolambam
- PNM: Subpopulação mitocondrial perinuclear
- PTPM: Poros de transição de permeabilidade mitocondrial

RCR: Razão controle respiratório

- RS: Retículo sarcoplasmático
- Serca 2a: Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático
- SOD: Superóxido dismutase
- SRAA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
- SSM: subpopulação mitocondrial subsarcolemal
- TFAM: Fator de transcrição mitocondrial
- VD: Ventrículo direito
- VE: Ventrículo Esquerdo

## Unidades

- °C: Grau(s) Celsius
- µm: Micrômetro
- µm<sup>2</sup>: Micrômetro quadrado
- nm: Nanômetro
- kg: Quilograma
- mg: Miligrama
- µg: Micrograma
- mL: Mililitro
- µL: Microlitro
- M: Molar
- mM: Milimolar
- µM: Micromolar
- nM: Nanomolar
- µmol: Micromole
- nmol: Nanomole
- pH: Potencial hidrogeniônico
- %: Porcentagem

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo identificar se a produção das espécies reativas de oxigênio pela NADPH oxidase e mitocôndrias desencadeiam a disfunção nesse modelo de privação dos hormônios sexuais femininos por 60 dias. Foram utilizadas ratas Wistar,  $com \pm 7$  semanas de idade e divididas aleatoriamente em 4 grupos: Controle (Sham), ovariectomizada (Ovx), Ovx + Apocinina (Ovx + Apo) e Ovx + Espironolactona (Ovx + Espiro). Os resultados mostraram que a Apocinina foi capaz de prevenir o ganho de peso corporal e do ventrículo esquerdo (VE). O tratamento com Espironolactona não foi capaz de prevenir o ganho de peso corporal. O tratamento com Apocinina foi capaz de prevenir a redução da contratilidade miocárdica, induzida pela Ovx, medida em músculos papilares isolados contraindo isometricamente: grupo Sham: 605,4 ± 10,37 g - Ovx: 358,3 ± 21,23\* g/ Ovx + Apo: 622,7 ± 18,69\* g/g, p<0,01). O tratamento com Espironolactona também preveniu o prejuízo na contratilidade (Sham: 712 ± 14,31 g - Ovx: 281,3 ± 7,99\* g/ Ovx + Espiro: 726,1 ± 4,39# g/g, p<0,01). O grupo Ovx apresentou resposta inotrópica positiva ao Ca<sup>2+</sup> e ao Isoproterenol que foi prevenida nos grupos tratados com Apo e Espiro: (Ca<sup>2+1</sup>,25 mM- Sham: 484 ± 20,52 - Ovx: 247 ± 12,23\* g/ Ovx + Apo: 494 ± 32,40# g; Ovx + Espiro: 544,71 ± 57,06# g/g, p<0,01). A resposta ao Isoproterenol no grupo Ovx tratado com Apo foi semelhante ao grupo Sham e os animais Ovx não tratados apresentaram redução na resposta contrátil (Iso Log 10<sup>-3</sup> M: Sham: 592,73 ± 26,59 - Ovx: 345,43 ± 31,12\* g/ Ovx + Apo: 627,51 ± 21,44#; Ovx + Espiro: 666,12 ± 71,24# g/g, p<0,05). A expressão da proteína Serca 2a estava reduzida, e a expressão de fosfolambam (PLB) e Nox4 estavam aumentadas nos animais Ovx comparados com os Sham. Os tratamentos com Apo e/ou Espiro preveniram a redução da expressão da Serca 2a (Sham: 1,39 ± 0,12 - Ovx: 0,86 ± 0,05\*/ Ovx + Apo:1,26 ± 0,08# - Ovx + Espiro: 1,28 ± 0,10# p<0,05) e preveniram o aumento nas expressões de PLB e Nox4 (PLB-Sham: 1,12  $\pm 0.06$  - Ovx: 1.63  $\pm 0.08^{*}$ / Ovx + Apo: 0.99  $\pm 0.07^{\#}$  - Ovx + Espiro: 1.08  $\pm 0.06^{\#}$  p<0.05), (Nox4-Sham: 0,64 ± 0,05 - Ovx: 1,22 ± 0,15\*/ Ovx + Apo: 0,64 ± 0,07# - Ovx + Espiro: 0,65 ± 0,10#, p<0,05). Os animais Ovx apresentaram maior produção de ânion superóxido quando comparados ao Sham e os tratamentos com Apo e Espiro preveniram tal aumento (Sham: 3,85 ± 0,40 - Ovx: 9,74 ± 1,03\*/ Ovx + Apo: 4,16 ± 0,48# - Ovx + Espiro: 2,99 ± 0,21#, p<0,01). A taxa de respiração mitocondrial máxima em resposta aos substratos (glutamato + malato: G + M, palmitoil L-carnitina: PC e piruvato: P + M) das subpopulações IFM no Estado 3 se mostraram reduzidas no grupo Ovx vs Sham, e os tratamentos com Apo e Espiro preveniram tal redução nas subpopulações SSM no Estado 3 somente em resposta ao substrato G + M a taxa de respiração máxima se mostrou reduzida nos animais Ovx vs Sham e os tratamentos preventivos com Apo/Espiro reverteram a redução da taxa de respiração máxima. No Estado 4 das subpopulações IFM e SSM a taxa de respiração máxima se mostrou aumentada nos grupos Ovx vs Sham na presença de todos os substratos e os tratamentos com Apo/ou Espiro preveniram este aumento. Houve redução na expressão dos complexos I, IV e III mitocondriais na subpopulação IFM dos grupos Ovx e os tratamentos com Apo/ou Espiro não foram capaz de reverter a redução (Complexo I: Sham:  $0.96 \pm 0.08$ -Ovx:  $0.53 \pm 0.08$ / Ovx + Apo: 0.75± 0,11\*-Ovx + Espiro: 0,59 ± 0,08\* µg - Complexo IV: Sham: 1,22 ± 0,17-Ovx: 0,80 ± 0,09\*/ Ovx + Apo: 0,95 ± 0,09\*-Ovx + Espiro: 0,70 ± 0,07\* µg – Complexo III: Sham: 1,19 ± 0,17-Ovx:  $0,79 \pm 0,09^*$ / Ovx + Apo:  $0,74 \pm 0,09^*$ -Ovx + Espiro:  $0,73 \pm 0,05^* \mu g$ , p<0,05). Na subpopulação SSM do grupo Ovx + Espiro houve redução na expressão dos Complexos I, IV e III (Complexo I: Sham: 1,30 ± 0,18- Ovx: 0,99 ± 0,18/ Ovx + Apo: 1,07  $\pm 0,06$ -Ovx + Espiro: 0,93  $\pm 0,09^*$  µg, p<0,05 - Complexo IV: Sham: 1,30  $\pm$  0,20-Ovx:  $0,99 \pm 0,13/Ovx + Apo: 0,86 \pm 0,09^*-Ovx + Espiro: 0,79 \pm 0,08^* \mu g, p<0,05 - Complexo III: Sham: 1,33 \pm 0,19-Ovx: 0,99 \pm 0,12/ Ovx + Apo: 1,08 \pm 0,08-Ovx + Espiro: 0,02 \pm 0,07^* \mu g, p<0,05). A expressão das proteínas antioxidantes Mn-SOD e Catalase estavam reduzidas nas ratas Ovx$ *vs* $Sham e os tratamentos com Apo ou Espiro preveniram sua redução. A expressão das proteínas mitocondriais Tfam e PGC1<math>\alpha$  estavam reduzidas nos grupos Ovx e os tratamentos com Apo ou Espiro preveniram tal redução. Nossos resultados demonstram que a ovariectomia aumenta o estresse oxidativo proveniente da NADPH oxidase e da mitocôndria. Os tratamentos com Apocinina e Espironolactona tiveram ação antioxidante e foram capazes de impedir o prejuízo na contratilidade miocárdica.

Palavras chave: ovariectomia, estrogênio, mitocôndrias, NADPH oxidase, SRAA, EROs.

#### ABSTRACT

This study aimed to identify if the production of reactive oxygen species by NADPH oxidase and mitochondria trigger the dysfunction in this model of female sex hormone deprivation for 60 days. Wistar rats with ≈7 weeks old and randomly divided into 4 groups: Sham, Ovx, Ovx + Apocynin (Ovx + Apo) and Ovx + Spironolactone (Ovx + Spiro). The results showed that Apo was able to prevent body weight gain in the animals. Spiro was unable to prevent body weight gain. Evaluating myocardial contractility, we observed that Apo treatment was able to prevent the reduction of myocardial contractility observed in Ovx animals (Sham: 605.4 ± 10.37 g - Ovx: 358.3 ± 21.23 \* g / Ovx + Apo (dF / dt +: Sham mg vs. Ovx \* mg / Ovx + Apo # mg / mg p <0.01) and (dF / dt-Sham mg vs. Ovx \* mg / Ovx + Apo # mg / mg, p <0.01); and the treatment with Spiro also presented preventive capacity (Sham: 712 ± 14.31 g - Ovx: 281.3 ± 7.99 \* g / Ovx + Spiro: 726.1 ± 4.39 # g / g, p <0.01). All groups showed positive inotropic strength in response to Ca <sup>2+</sup> and Isoproterenol, but the Ovx groups treated with Apo and / or Spiro presented similar responses to the Sham group and in the Ovx group such responses were reduced (Ca2+ -1.25-Sham: 484 ± 20.52 g vs Ovx: 247 ± 12.23 \* g vs. Ovx + Apo: 494 ± 32.40 g / g, p <0.01) - (Ca<sup>2+</sup>- 1.25-Sham: 450.81 ± 38, 08 g vs. Ovx: 285.29 ± 23.89 \* g vs Ovx + Spiro: 544.71  $\pm$  57.06 # g / g, p <0.01). Response to the  $\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol in the Ovx group treated with Apo was similar to the Sham group and the untreated Ovx animals showed reduction in the contractile response (Iso Log [M] 10<sup>-3-</sup>Sham: 592.73 ± 26.59 g-Ovx: 345.43 \* ± 31.12g / Ovx + Apo: 627.51 ± 21.44 # g / g, p < 0.05). In the Ovx animals the response to Iso was reduced compared to Sham and the treatment with Spiro prevented such reduction (Iso Log [M] 10<sup>-3</sup>-Sham: 607.19 ± 22.87 g - Ovx: 304.98 ± 28, 68 \* g / Ovx + Spiro: 666.12  $\pm$  71.24 g / g, p <0.05). Expression of Serca 2a protein was

reduced, and expression of phospholabam (PLB) and Nox4 were increased in Ovx animals compared to Sham and Apo and / or Spiro treatment reversed the reduction of Serca 2a expression (Sham: 1.39 ± 0.12 - Ovx: 0.86 ± 0.05 \* / Ovx + Apo: 1.26 ± 0.08 # -Ovx + Spiro: 1.28 ± 0.10 # p < 0.05) and reduced PLB and Nox4 (PLB-Sham: 1.12 ± 0.06 -Ovx: 1.63 ± 0.08 \* / Ovx + Apo: 0.99 ± 0.07 # - Ovx + Spiro: 1 , 0.64 ± 0.05 - Ovx: 1.22 ± 0.15 \* / Ovx + Apo: 0.64 ± 0.07, - Ovx + Spiro: 0.65 ± 0.10%, p < 0.05). Ovx animals had higher superoxide anion production when compared to Sham, and Apo and Spiro treatments reduced this increase (Sham: 3.85 ± 0.40 - Ovx: 9.74 ± 1.03 \* / Ovx + Apo: 4.16 ± 0.48 # - Ovx + Spiro: 2.99 ± 0.21 #, p <0.01). The maximum mitochondrial respiration rate in response to the substrates (glutamate + malate: G + M, palmitoyl Lcarnitine: PC and pyruvate: P + M) of the IFM subpopulations in State 3 were reduced in the Ovx vs Sham group, and the treatments with Apo and Spiro prevented such reduction (Ovx vs. Ovx Apo / or Spiro Ovx, p < 0.05) in the SSM subpopulations in State 3 only in response to the G + M substrate the maximum respiration rate was shown reduced in the Ovx vs Sham animals and preventive treatments with Apo / Spiro reversed the reduction of the maximum respiration rate. In State 4 of the IFM and SSM subpopulations the maximal respiration rate was increased in the Ovx vs Sham groups in the presence of all substrates and the Apo / or Spiro treatments reduced this increase. A reduction in the expression of the mitochondrial complexes I, IV and III in the Ovx subpopulation IFM was observed, and the non-reversible Apo / or Spiro treatments were able to reverse the reduction (Complex I: Sham: 0.96 ± 0.08- Ovx: 0.53 ± 0.08 / Ovx + Apo: 0.75 ± 0.11 \* -Ovx + Spiro: 0.59 ± 0.08 \* µg - Complex IV: Sham: 1.22 ± 0.17- Ovx: 0.80 ± 0.09 \* / Ovx + Apo: 0.95 ± 0.09 \* -Ovx + Spiro:  $0.70 \pm 0.07 * \mu g$  - Complex III: Sham:  $1.19 \pm 0.17$  -Ovx:  $0.79 \pm 0.09 * / Ovx + Apo$ :  $0.74 \pm 0.09$  \* -Ox + Spiro: 0.73  $\pm 0.05$  \* µg, p <0.05). In the SSM subpopulation of the Ovx + Spiro group there was a reduction in the expression of Complexes I, IV and III (Complex I: Sham:  $1.30 \pm 0.18$ - Ovx:  $0.99 \pm 0.18$  / Ovx + Apo:  $1.07 \pm 0.06$ -Ovx + Spiro:  $0.93 \pm 0.09 *$  µg, p <0.05 - Complex IV: Sham:  $1.30 \pm 0.20$ -Ovx:  $0.99 \pm 0.13$  / Ovx + Apo:  $0.86 \pm 0.09 *$  - Ovx + Spiro:  $0.79 \pm 0.08 *$  µg, p <0.05 - Complex III: Sham:  $1.33 \pm 0.19$ -Ovx:  $0.99 \pm 0.12$  / Ovx + Apo:  $1.08 \pm 0.08$ -Ovx + Spiro:  $0.02 \pm 0.07 *$  µg, p <0.05). Expression of the Mn-SOD and Catalase antioxidant proteins were reduced in the Ovx vs. Sham rats and Apo or Spiro treatments prevented the reduction of the expression of the proteins mitochondrial CTE Tfam and PGC1 $\alpha$  were reduced Ovx vs Sham and Apo or Spiro treatments prevented that estrogen hormone deprivation increases oxidative stress both by NADPH oxidase and mitochondria, and the preventive treatments with Apocynin and Spironolactone had antioxidant action and were able to prevent damage in myocardial contractility.

Keywords: ovariectomy, estrogen, mitochondria, NADPH oxidase, RAAS, ROS.

# 1. INTRODUÇÃO

# 1.1 Previsão epidemiológica das doenças cardiovasculares e a expectativa de vida feminina

De acordo com a *American Heart Association* a doença cardiovascular é a principal causa mundial de morte contando em torno de 18 milhões de mortes por ano e com expectativa de crescimento para mais de 25 milhões de mortes até 2030 [1]. As doenças cardiovasculares apresentam diferença de gênero, acometendo mais os homens na vida adulta do que as mulheres, porém essa diferença é extinta quando as mulheres entram na menopausa [2].

Tal diferença relacionada ao gênero se deve a produção do hormônio sexual feminino estrogênio que durante a vida reprodutiva das mulheres apresenta ações genômicas e não genômicas que previnem as doenças cardiovasculares [3, 4], porém ao entrarem no climatério o efeito protetivo do estrogênio diminui e a incidência de doenças cardiovascular entre mulheres a partir de 55 anos aumenta [5].

Dados epidemiológicos mostram que seguindo a tendência dos países desenvolvidos, no Brasil ocorre um aumento da longevidade feminina [6], ou seja, a expectativa de vida da mulher é maior que a do homem, o que acarreta um aumento no número da população idosa feminina [7]. Com o envelhecimento e mudanças de hábitos de vida a incidência de doenças cardiovasculares aumentam, e alterações no perfil metabólico modificam a distribuição do tecido adiposo, levando ao aumento de gordura abdominal em mulheres no pós-menopausa e contribuindo para a progressão de processos ateroscleróticos [8, 9].

O enrijecimento arterial é um fator de risco para o aparecimento da hipertensão, e está correlacionado ao envelhecimento em ambos os sexos, porém dados clínicos e experimentais mostram que tal processo é acelerado após a menopausa [10, 11], podendo levar essas mulheres a desenvolverem hipertrofia cardíaca e acidente vascular cerebral (AVC) [12, 13]. O AVC é a terceira causa de morte e a primeira doença incapacitante entre mulheres nos Estados Unidos da América (EUA) [14], sendo a segunda causa de morte e terceira doença incapacitante no mundo [15].

## 1.2 A terapia de reposição hormonal e suas controvérsias

Em 1929, nos EUA, Edward Adelbert Doisy no laboratório de bioquímica da Escola de Medicina da Universidade de Saint Louis, através de técnicas analíticas isolou o estrogênio ovariano e em 1945 ganhou o prêmio Nobel em Medicina, por seus achados que contribuíram de forma significativa para a ciência [16]. A primeira pílula de estrogênio foi produzida em 1942 e aprovada pela FDA dos EUA (Administração de Alimentos e Drogas) com o nome de premarin (estrogênio equino conjugado), e em 1965 no Reino Unido a terapia de reposição hormonal (TRH) foi disponibilizada para mulheres sem o devido estudo clínico dos efeitos adversos [17, 18].

Em 1966 o ginecologista Robert Wilson publicou o livro *Feminine Forever* (feminina para sempre), onde ele descreveu o estrogênio como a maior revolução biológica da história da civilização e nos primeiros 7 meses do lançamento do livro vendeu 100,000 copias; e

entre 1967 e 1975 a venda do premarin triplicou. O premarin se tornou muito popular nos EUA, sendo a quinta droga mais popular e pesquisadores fizeram estudos que associaram o uso de premarin com aumento do risco de câncer no endométrio [19, 20].

A terapia de reposição hormonal (TRH) para mulheres começou a ser descrita como uma fonte da juventude, o que despertou o interesse de pesquisadores que resolveram acompanhar as mulheres que faziam uso das TRH; Em 1993 um grande estudo clínico começou nos Estados Unidos da América chamado de *Women's Health Initiative* (WHI), tal estudo comparou os efeitos das TRH (estrogênio) e TRH combinada (estrogênio + progesterona) na saúde das mulheres na menopausa que receberam as terapias e das que receberam o placebo [21].

E em 1996 no Reino Unido, um estudo chamando milhões de mulheres coletou questionários e dados clínicos, que indicaram um aumento nos casos de câncer de mama entre as mulheres que usaram a combinação de estrogênio e progesterona, ascendendo o sinal de alerta para a prescrição de TRH, levando as autoridades em saúde do Reino Unido a repensarem se os riscos atrelados à prescrição valeriam os benefícios [22].

Após analise dos dados em 2002, o WHI sugeriu que o uso de TRH combinada fosse abolida devido ao pequeno risco de provocar câncer de mama, doenças cardíacas, acidente vascular cerebral (AVC) e coágulos sanguíneos [23], após a publicação dos estudos citados os médicos principalmente na Europa, desaconselharam o uso de TRH apenas com estrogênio ou combinada com progesterona [24]. Porém, entre 2004 a 2006 pesquisadores que analisaram melhor tais estudos encontraram os seguintes fatos:

- ✓ A TRH iniciada em grupo de mulheres com idade entre 50 e 59 anos ou em mulheres com menos de 10 anos menopausadas, não aumentou risco de AVC e doenças cardíacas;
- ✓ As doses que cada mulher tomava de TRH não foram consideradas;
- ✓ No estudo do Reino Unido foi encontrado que as mulheres que utilizaram estrogênio transdérmico ou em gel não apresentaram riscos de trombose;
- Mostraram também que os riscos para tais doenças só aumentaram em mulheres com idade a partir de 60 anos que faziam uso de TRH;
- Os estudos não levaram em conta a obesidade ou hábitos de vida como fatores de risco para as doenças acima citadas [25, 26].

Considerando a controvérsia nos resultados das TRH existe a necessidade de encontrar um meio de prevenção, para mulheres que estão na menopausa e já tiveram câncer de mama, de ovário, trombose e AVC e não podem se beneficiar das TRH, visto que as mulheres tem expectativa de vida maior e que a previsão da WHO é de aumento de casos de doenças cardiovasculares [27, 28].

#### 1.3 O estrogênio e o sistema cardiovascular

O estrogênio regula vários componentes do sistema cardiovascular, como a expressão e atividade da enzima conversora da angiotensina, tanto no plasma quanto no tecido. O hormônio estrogênio se liga aos receptores de estrogênio e, subsequentemente, ativam as vias de sinalização da proteína ativada por mitógeno (MAP) quinase e do fator nuclear

kappa B (NF kappa B), resultando em um *up-regulation* de enzimas antioxidantes [29, 30]. Os efeitos benéficos do estrogênio sobre o sistema cardiovascular ocorrem quando ele se liga aos receptores de estrogênio (RE), alterando a transcrição de genes no núcleo (efeito genômico) e ativa a sinalização de quinases no citosol (efeito não genômico, ou extranuclear) [31, 32].

Existem dois receptores nucleares, RE- $\alpha$  e RE- $\beta$ , e um terceiro receptor de membrana, receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) ou GPR30 [33-35]. Os RE- $\alpha$  e RE- $\beta$  são encontrados principalmente no citosol e no núcleo além de estarem localizados nas mitocôndrias [36, 37]. As ações genômicas mediadas pelo RE- $\alpha$  nuclear envolvem a ligação do ligante nos elementos de resposta estrogênica, ou seja, o estrogênio se liga ao receptor nuclear e sinaliza a produção de proteínas quinase mitogênicas (MAPK) e o fator nuclear kappa B resultanto em um *up-regulation* de enzimas antioxidantes [38].

Acredita-se que os efeitos não genômicos do estrogênio sejam mediados por REα e / ou REβ localizados na membrana plasmática [39, 40] e as ações rápidas, ou seja, não genômicas do estrogênio são mediadas por REs de membrana através de várias vias, incluindo tirosina quinase, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), adenilato ciclase (AMPc) e guanilil ciclase (GMPc) [41, 42].

Sendo um regulador funcional para o sistema cardiovascular, o estrogênio está envolvido no crescimento, diferenciação e apoptose de células musculares lisas vasculares, células endoteliais, fibroblastos e cardiomiócitos [43]. Estudos indicam que o estrogênio modula os canais iônicos para Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup> das células musculares lisas vasculares, reduzindo as disfunções eletrofisiológicas do tônus vascular e das células endoteliais de cardiomiócitos [44, 45]. Em cardiomiócitos e células vasculares lisas e vasculares, o estrogênio ativa a

expressão tanto da iNOS (óxido nítrico sintase indutível) quanto da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) [46].

A modulação da produção de óxido nítrico (NO) pelo estrogênio é um dos importantes mecanismos bioquímicos sobre os quais se baseiam as diferenças de gênero e os efeitos benéficos do estrogênio no sistema cardiovascular [47, 48]. Em evento simulado de préisquemia em camundongos ficou evidente que as fêmeas apresentaram injúria cardíaca reduzida com o pré-tratamento com isoproterenol, e aumento na expressão da eNOS associado a caveolina. A comparação foi realizada em cardiomiócitos das fêmeas, quando comparado com os cardiomiócitos dos machos [49].

O NO está envolvido na cardioproteção via ativação da proteína quinase G (PKG), que leva à ativação de vias mitocondriais incluindo a ativação de um canal mitocondrial regulado por ATP que permite o transporte de K<sup>+</sup> para as mitocôndrias (mito KATP) [50]. O NO é descrito como um dos principais fatores de aumento da biogênese mitocondrial e redutor de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial [51, 52]. Um aumento da enzima óxido nítrico sintase (NOS) nas fêmeas pode, portanto, alterar a expressão gênica e ativar as vias de sinalização do óxido NO. Dados os efeitos pleiotrópicos do NO, é provável que o aumento da NOS em cardiomiócitos femininos tenha um papel importante na cardioproteção [53].

## 1.3.1 O estrogênio e o Acoplamento Excitação Contração

Os hormônios sexuais exercem sua ação reguladora também na via de Acoplamento Excitação Contração (AEC) de cardiomiócitos isolados [54]. A descoberta de que os cardiomiócitos possuem receptores para hormônios esteroides sexuais, levou à ideia de que diferenças de gênero na função contrátil cardíaca podem estar ligadas aos efeitos

desses hormônios nos componentes da via do AEC [55]. Estudos identificaram diferenças na repolarização cardíaca regulada por hormônio andrógeno e que homens sofrem mais de falência cardíaca com fração de ejeção reduzida do que as mulheres [56, 57].

Estudos realizados com roedores ovariectomizados sugerem que o estrogênio suprime a liberação de Ca<sup>2+</sup> pelo retículo sarcoplasmático (RS) e contribui de forma importante para a redução do ganho do acoplamento excitação-contração presente nos cardiomiócitos das fêmeas. Nos cardiomiócitos, as concentrações de Ca<sup>2+</sup> são fortemente reguladas através do mecanismo de AEC [58].

Nos miócitos ventriculares, AEC é iniciado quando o potencial de ação se propaga ao longo da membrana celular, ativando os canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L sensíveis à voltagem e resultando em uma corrente interna de Ca<sup>2+</sup> [59]. Os canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L localizados dentro das invaginações na membrana estão intimamente associados aos canais de liberação de Ca<sup>2+</sup> localizados no retículo sarcoplasmático (SR), que são conhecidos como receptores de rianodina (RyRs) [60]. O influxo de Ca<sup>2+</sup> desencadeia a liberação de Ca<sup>2+</sup> pelo SR pela ligação aos RyRs, resultando em sua abertura e subsequente liberação de Ca<sup>2+</sup>, que dá origem ao transientes de Ca<sup>2+</sup> [61].

A quantidade de Ca<sup>2+</sup> liberada do RS é muito maior que o Ca<sup>2+</sup> desencadeador que entra na célula, um fenômeno conhecido como liberação de Ca<sup>2+</sup> induzida por Ca<sup>2+</sup>. O grau de amplificação do influxo de Ca<sup>2+</sup> para a quantidade resultante de Ca<sup>2+</sup> liberado do RS pode ser quantificado medindo-se um parâmetro conhecido como "ganho" do acoplamento EC. Experimentalmente, o ganho é calculado como a razão entre a quantidade de Ca<sup>2+</sup> liberado pelo RS (transiente de Ca<sup>2+</sup>) por unidade de corrente de Ca<sup>2+</sup> [62]. Fatores como aumento da carga de Ca<sup>2+</sup>, diminuição da temperatura ou estimulação ß-adrenérgica

aumentam o ganho do AEC [63, 64].

Portanto, a modulação do ganho AEC pode potencialmente aumentar ou inibir a liberação de Ca<sup>2+</sup>, independentemente de alterações no influxo de Ca<sup>2+</sup>. O aumento da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular, causado pelo transiente de Ca<sup>2+</sup>, permite que o Ca<sup>2+</sup> se ligue aos miofilamentos, especificamente à troponina C, resultando em contração do miócito [65].

Uma segunda proteína quinase implicada na regulação da função contrátil cardíaca é a quinase II dependente de Ca<sup>2+</sup> -calmodulina (CaMKII). A CaMKII também fosforila vários componentes da via de acoplamento EC para causar um aumento na lusitropia e inotropia, e embora em menor extensão do que a PKA, a medida que a PKA e CaMKII aumentam a contração através do aumento do transiente de Ca<sup>2+</sup>, a função contrátil em miócitos individuais permanece estável [55, 59, 66].

É essa sequência de eventos rigidamente regulada que medeia a contração sincronizada dos cardiomiócitos e, portanto, deve ser considerada ao avaliar a função contrátil cardíaca em homens e mulheres. O Ca<sup>2+</sup> do RS é liberado na forma de discretas unidades de liberação de Ca<sup>2+</sup> subcelular chamadas faíscas (*Sparks*) de Ca<sup>2+.</sup> Acredita-se que as faíscas de Ca<sup>2+</sup> resultem da ativação de um agrupamento de 6 a 20 canais RyR complexados com um canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L e muitas dessas unidades de liberação se fundam para formar transientes de Ca<sup>2+</sup> [56-68].

O relaxamento ocorre quando a maioria do Ca<sup>2+</sup> é sequestrado para o retículo sarcoplasmático por meio da ação da enzima Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Serca 2a), enquanto uma quantidade muito menor de Ca<sup>2+</sup> é removida da célula predominantemente pelo trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) [59, 66]. A recaptação de Ca<sup>2+</sup> no RS é regulada pela PLB, que inibe a

Serca 2a. A fosforilação de PLB abole a inibição da Serca 2a e aumenta a captação de Ca<sup>2+</sup> para o RS, resultando em um decaimento mais rápido do transiente de Ca<sup>2+</sup> [68]. A fosforilação da troponina I causa um relaxamento mais rápido, promovendo a dissociação do Ca<sup>2+</sup> dos miofilamentos [69].

Em animais submetidos a ovariectomia bilateral ocorre aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca<sup>2+</sup> [70, 71]. A sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> intracelular e a hipersensibilização dos miofilamentos ao cálcio, sob condição de deficiência de estrogênio, podem aumentar a suscetibilidade a diversas doenças cardiovasculares em estados estrogênicos baixos, como em mulheres mais velhas na pós-menopausa [72, 73].

Evidências mostram que o estrogênio pode modificar de forma aguda as propriedades eletrofisiológicas do coração, regulando o nível e a atividade dos canais iônicos e modulando a repolarização cardíaca. Tanto os hormônios sexuais endógenos quanto os exógenos podem afetar a duração do intervalo QT; e o estrogênio prolonga o intervalo QT em animais [73].

O estradiol pode regular negativamente a expressão das correntes do canal de potássio, tais como as correntes retardadas de ativação lenta (lks) e as correntes retardadas de ativação rápida (lkr), diminuindo os níveis de mRNA dos componentes do canal de potássio e prolongando a duração do potencial de ação [74]. A modulação estrogênica dos canais iônicos cardíacos pode ocorrer por mecanismos genômicos e não-genômicos, regulando diversas enzimas que influenciam o sistema cardiovascular [75, 76].

#### 1.3.2 O estrogênio e o sistema renina angiotensina aldosterona

O estrogênio está envolvido na regulação de várias vias do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), por exemplo, os níveis circulantes de ANG II e aldosterona estão elevados durante a fase lútea (fase de maior produção de estradiol) e baixos na fase folicular. Porém os efeitos dos componentes do SRAA sob o sistema cardiovascular se mostram atenuados, em mulheres na fase lútea submetidas a pressão ortostática negativa, pois apresentaram pressão arterial média reduzida [77, 78].

Os hormônios ovarianos flutuam durante o ciclo menstrual, os efeitos independentes do estrogênio endógeno e progesterona per se sobre o SRAA permanecem em grande parte incertos. O estrogênio aumenta a síntese de angiotensinogênio, enquanto diminui a síntese de renina e da enzima conversora de angiotensina (ECA) [79].

A angiotensina II tem um papel na regulação do sistema cardiovascular ativando cascatas de sinalização intracelular de múltiplos processos celulares, hipertrofia, síntese de colágeno, ativação da NADPH oxidase, uma enzima que tem a função primária de catalisar a transferência de elétrons de NADPH para oxigênio molecular a forma de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio [79].

No cardiomiócito a NADPH oxidase (Nox) é uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs), e as Nox são subunidades catalíticas que possuem sete membros conhecidos (Nox1, 2, 3, 4 e 5 além das Duox 1 e 2), geram espécies reativas de oxigênio como sua função primária, e nos miócitos cardíacos a Nox2 e Nox4 são as isoformas predominantes [80]. A Nox2 está localizada na membrana plasmática, que se torna ativa aos estímulos relevantes para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, tais como força mecânica ou angiotensina II, visto que um aumento de Angio II e expressão aumentada de Nox2 em cardiomiócitos de humanos acometidos por doenças

cardiovasculares (DCV), como o infarto a expressão de Nox2 [81], estudos que correlacionam outros componentes do SRA, como aldosterona, e sua influência na via da NADPH oxidase se fazem necessários.

As DCV são complexas, pois o sistema cardiovascular é influenciado por hormônios do sistema nervoso simpático (vias adrenérgicas), hormônios sexuais (estrogênio) e hormônios adrenais (aldosterona) [82-83]. Em 2011, Paigel e col., em experimentos realizados em nosso laboratório, concluiram que a ovariectomia reduziu a força de contração cardíaca, diminuiu a expressão de Serca 2a e aumentou a expressão de PLB [84], e em 2012, Ribeiro Júnior e col., provaram o envolvimento do SRA na disfunção na contratilidade miocárdica induzida pela Ovx, sendo revertida com o uso de Losartan, que é um bloqueador dos receptores AT1 [85].

O estrogênio diminui a expressão de receptores de AT1 no tecido alvo, mas tem o efeito oposto na expressão de receptores de AT2 [85]. Nos rins de ratas ovariectomizadas a expressão de receptores de AT2 diminuiu e a reposição com estrogênio aumentou a expressão de tais receptores [86]. Um dos responsáveis pela atividade exacerbada do SRA é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e Ribeiro Júnior e col., em 2013 mostraram, que em cardiomiócitos de ratas Ovx, ocorreu aumento da produção de ânion superóxido *in situ*, e aumento da expressão da subunidade da Nox2 p<sup>22phox</sup> [85, 87].

As EROs desempenham um papel importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares [88]. O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio regulam a proliferação e a migração celular sob condições fisiológicas. Uma produção excessiva de EROs desencadeia estresse oxidativo, disfunção celular e apoptose [89] e tal produção

excessiva de EROs pode ocorrer através da ativação da NADPH oxidase via receptor AT1 e provocar efeitos deletérios sobre a função mitocondrial. Além disso, as EROs são capazes de influenciar a homeostase do cálcio e as modificações da via de sinalização celular de proteínas envolvidas no transiente de cálcio, como a Serca 2a e o RyR [89, 90].

Quando a atividade do SRA é exarcebada, ocorre um aumento da síntese de aldosterona, e a aldosterona é um ativador direto da NADPH oxidase, aumentando a atividade da NADPH oxidase ocorre aumento de EROs, e consequentemente aumenta a atividade da Nox4 [91]. A Nox4 está localizada na membrana mitocondrial interna (MMI) das células cardíacas e um aumento da expressão e atividade da Nox4, são fatores que podem levar ao desacoplamento da cadeia transportadora de elétron (CTE), aumento do fluxo de Ca<sup>2+</sup> que leva a ruptura das membranas mitocondriais e apoptose [92].

### 1.3.3 Função mitocondrial e a NADPH oxidase

As mitocôndrias são organelas presentes em células eucariontes, em células de órgãos que apresentam alta demanda energética, tais como o fígado e coração, as mitocôndrias são as organelas que aparecem em maior número, pois suas principais funções são a respiração celular e produzir ATP como forma de energia, que serve como combustível para o metabolismo das células [93].

As mitocôndrias aparecem em uma bolsa limitada por duas membranas, uma externa-MME (membrana mitocondrial externa) e interna. A membrana externa separa o espaço intermembrana do citosol, é permeável a pequenas moléculas, tem o papel de interagir com o meio externo, a fim de garantir mobilidade, posicionar a organela onde a demanda energética for maior e importar proteínas para as mitocôndrias [94]. A membrana interna separa o espaço intermembranar da matriz mitocondrial, é impermeável a maioria das moléculas, forma uma série de dobras chamadas cristas mitocondriais, que tem a finalidade de aumentar a superfície enzimática sem aumentar o tamanho da organela, e entre as cristas existe uma solução coloidal chamada de matriz mitocondrial [95].

Várias enzimas responsáveis pelas reações químicas da respiração estão na membrana interna e na matriz mitocondrial, além de enzimas na matriz encontram-se DNA, RNA e ribossomos o que significa que as mitocôndrias possuem equipamento próprio para síntese de proteínas e de autoduplicação, sendo assim as mitocôndrias têm a capacidade de manterem sua quantidade nas células constante [96].

A integridade das MME e MMI é essencial para a função mitocondrial, pois moléculas são transportadas para dentro das mitocôndrias, através de canais presentes nas duas membranas; Um desses canais de extrema importância presente na membrana mitocondrial é o mPTP (poro de transição de permeabilidade mitocondrial) é um canal voltagem dependente de alta condutância presente na mitocôndria que permite a passagem de água, íons e moléculas de até 15 kDa [97]. Esse canal é altamente sensível ao cálcio, stress oxidativo, redox, voltagem, pH, adenosina trifosfato (ADP) [98, 99].

Palmer e colaboradores em 1977, provou a existência de duas subpopulações mitocondriais, uma subpopulação localizada abaixo do sarcolema- subsarcolemal (SSM), e a subpopulação interfibrilar (IFM) localizada entre as miofibrilas, com diferentes propriedades bioquímicas, visto que as atividades específicas das enzimas succinato deshidrogenase e citrato sintase estavam mais altas na IFM quando comparadas as da

SSM, além de a IFM oxidar os substratos 1.5 vezes mais rápido que a SSM [100].

O termo substrato na bioquímica significa um composto químico que serve como propulsor do mecanismo de ação de uma ou mais enzimas. Para que a respiração celular ocorra são necessários substratos energéticos como a glicose, gordura ou proteína, que entram no ciclo de Krebs para a produção de ATP [101].

Nas células eucariontes a respiração é aeróbica, ou seja, necessita de oxigênio, no entanto apresenta uma etapa anaeróbica, não dependente de oxigênio, que é a glicólise ocorre no citosol e, várias reações químicas que tem por finalidade a quebra da glicose em duas moléculas de ácido pirúvico, levando a liberação de quatro elétrons (e<sup>-</sup>) e quatro íons de hidreto (H<sup>+</sup>), dois H<sup>+</sup> e quatro e<sup>-</sup> são capturados por duas moléculas de NAD<sup>+</sup> (Nicotinamida Adenina Dinocleotídio), passando para o estado reduzido NADH [102].

Outra etapa é o ciclo de Krebs, ocorre na matriz mitocondrial, sendo formado por um conjunto de enzimas que oxidam os substratos piruvato, glutamato, malato e palmitoil para redução do NAD e succinato que reduz o FAD. O ciclo de Krebs e a cadeia respiratória são alimentados pela oxidação de ácidos graxos, por intermédio AcetilCoenzima A (Acetil-CoA) e redução de NAD<sup>+</sup>e FAD á NADH e FADH<sub>2</sub>. Resumidamente as moléculas de Acetil-CoA sofrem oxidação, formando uma coenzima A e duas moléculas de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) [103].

No ciclo de Krebs, o piruvato é o principal substrato, sendo translocado pela piruvatotranslocase, proteína ancorada na MMI e transporta especificamente o piruvato do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial em simporte com o H+ (diferentes íons são transportados através da membrana em uma mesma direção contra um gradiente de concentração independente de ATP) [104].
A última etapa é a fosforilação oxidativa, ou cadeia transportadora de elétrons (CTE), que ocorre nas cristas mitocondriais. A MMI possui gradiente eletroquímico de prótons entre a matriz e o espaço intermembranar, onde ocorre a fosforilação oxidativa. A CTE é formada por quatro complexos proteicos inseridos na MMI que são os complexos I, II, III, IV e V, além dois componentes independentes a ubiquinona e o citocromo c, que realizam o transporte de elétrons ao longo de toda a CTE [105].

A MMI é permeável somente a O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, portanto contém proteínas de transporte que controlam a passagem de metabólitos como o ATP, ADP, piruvato, Ca<sup>2+</sup>e fosfato. As moléculas orgânicas NAD<sup>+</sup> e FAD (Flavina Adenina Dinucleotídio) na sua forma reduzida, ou seja, NADH e FADH<sub>2</sub> são carreadores de elétrons essenciais, pois tem acesso á cadeia respiratória pelo complexo I, e chega até o complexo IV que através do citocromo c reduz O<sub>2</sub> para formar H<sub>2</sub>O [94, 106].

Já o complexo V (FOF1-ATP sintase) utiliza-se da força motriz do gradiente eletroquímico de prótons para fosforilar ADP + P*i* (fosfato inorgânico) em ATP, portanto a oxidação que ocorre nos complexos I e II, são cruciais para a manutenção do gradiente eletroquímico e formação de ATP [107].

A respiração mitocondrial é avaliada pelo consumo de O<sub>2</sub> e apresenta quatro fases ou estados:

- ✓ Estado 1: estado onde é adicionado tampão de O₂ á mitocôndria;
- ✓ Estado 2: ou velocidade inicial, este estado é caracterizado pela baixa velocidade de consumo de O₂ pelo fato de qua a concentração de ADP endógeno é bastante

baixa, já que não existe utilização de ATP *in vitro*; neste estado um substrato é adicionado a mitocôndria com tampão de O<sub>2</sub>;

- ✓ Estado 3: significa a velocidade de consumo de O₂ quando a mitocôndria é colocada em um meio com substrato oxidável com ADP, produzindo ATP.
- ✓ Estado 4: significa a velocidade do consumo de O₂ após a mitocôndria já ter consumido todo o ADP disponível [108].

Dessa forma a capacidade da mitocôndria desencadear seu processo energético, quando exposta a ADP, é avaliada [109]. Todo esse processo que se finaliza em liberação de energia, também produz EROs e as enzimas antioxidantes mitocondriais como, a manganês superóxido dismutase (Mn-SOD) e catalase (Cat) reduzem o estresse oxidativo, sendo assim o sistema antioxidante mitocondrial neutraliza a produção de EROs produzidos pela cadeia respiratória, para o citosol [110].

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares [111]. Foi recentemente relatado que a ativação do receptor AT1 da via da NADPH oxidase levaria à disfunção mitocondrial abrindo o canal de potássio sensível ao ATP mitocondrial (mitoKATP) [112].

A literatura mostra que o canal para potássio sensível a ATP mitocondrial pode ser ativado por EROs a partir da NADPH oxidase, uma vez que a inibição desta enzima evita completamente a disfunção mitocondrial induzida pela angiotensina II. Além disso, a abertura do mitoKATP desencadeia a produção de EROs, diminui o potencial de membrana das mitocôndrias e, portanto, diminui a produção de ATP, desencadeando a apoptose [113, 114].

O aumento de espécies reativas de oxigênio, modifica a homeostase do cálcio

mitocondrial e a probabilidade de abertura do poro mitocondrial (MPTP); fatores cruciais na manutenção da viabilidade celular. O MPTP é um canal dependente de voltagem de alta condutividade presente na mitocôndria que permite a passagem de água, íons e moléculas de até 1500 daltons. Este canal é altamente sensível ao cálcio e ao estresse oxidativo. Sua composição e regulamentação não são bem conhecidas [115, 116].

A abertura do MPTP é uma resposta a fatores estressores como EROs e sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> comuns na isquemia-reperfusão [117, 118]. Esses dois fatores estimulam a ciclofilina D (CyPD), que é uma proteína localizada na matriz mitocondrial, e sua função é promover a abertura do poro de transição de permeabilidade induzida por Ca<sup>2+</sup>, a abertura desta porção resulta em perda de produção de ATP, desacoplamento da cadeia respiratória e ruptura da membrana mitocondrial. A perda de ATP e a saída do citocromo C da membrana mitocondrial resulta em morte celular [119].

O cálcio mitocondrial uniporter (MCU), é uma proteína transmembranar, que facilita a passagem de Ca<sup>2+</sup> do citosol para a mitocôndria, apresenta baixa afinidade ao Ca<sup>2+</sup> e é um importante mantenedor do gradiente eletroquímico. O Ca<sup>2+</sup> é um segundo mensageiro intracelular com funções pleiotrópicas que variam desde controle de expressão gênica, a ativação de metabolismo e morte celular [120]. A absorção de Ca<sup>2+</sup> na matriz mitocondrial desempenha um papel vital na regulação de múltiplos processos fisiológicos e patológicos. As mitocôndrias podem absorver o Ca<sup>2+</sup> através de múltiplos canais e vias, no entanto, o complexo mtCU é a via mais proeminente e bem caracterizada [121].

O fator de transcrição mitocondrial (Tfam) está localizado na matriz mitocondrial, tem um papel importante na replicação, transcrição e organização do DNA mitocondrial (DNAmt), além de proteger o DNAmt dos efeitos nocivos das EROs [122]. No tecido miocárdico

danificado, existe um aumento do estresse oxidativo, levando a um remodelamento da matriz extracelular devido a ativação de metaloproteases, causam hipertrofia, pois ocorre a substituição da elastina pelo colágeno que se encontra em diversas cardiomiopatias. A redução de miocárdio de trabalho, que é substituído por tecido inativo reduz a síntese de Tfam e essa redução foi constatada em diversas formas de hipertrofia cardíaca [123].

A transcrição mitocondrial é controlada pela PGC-1α e por outros fatores de transcrição, e estão intrinsicamente ligados ao controle da biogênese mitocondrial e adaptação metabólica no tecido cardíaco [124]. A proteína co-ativadora de transcrição gênica alfa (PGC-1α) apresenta um papel regulatório importante na transcrição gênica mitocondrial, auxilia a biogênese e funcionamento mitocondrial nos cardiomiócitos, na insuficiência cardíaca a expressão de PGC-1α está reduzida [125].

#### 1.4 Deficiência de estrogênio e doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares tais como falência cardíaca e infarto do miocárdio apresentam características importantes como redução da expressão da Serca 2a, aumento da expressão de PLB e diminuição da responsividade ao cálcio [126, 127].

Em estudo publicado com modelo animal após 60 dias de ovariectomia ocorreu redução na expressão de Serca 2a, aumento na expressão da PLB, aumentou a produção de ROS gerada pela NADPH oxidase, que levou a redução na contratilidade do miocárdio, mostrando o envolvimento da deficiência de estrogênio ovariano na redução da contratilidade miocárdica [84].

O estrogênio está envolvido na regulação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), pois durante a fase lútea as concentrações de renina plasmática, angiotensina II e aldosterona estão elevadas e durante a fase folicular essas concentrações se mostram

diminuídas. Esta observação reflete a redução mediada pelo estrogênio na resposta tecidual ao SRAA circulante durante a fase lútea [77, 128] além de reduzir a resposta do tecido cardíaco ao cálcio e ao isoproterenol, aumentar a expressão de Nox2 e da enzima conversora de angiotensina plasmática [85, 87].

A redução da síntese de estrogênio está associada a doenças cardiovasculares (DCV), visto que a incidência de DCV aumenta na pós-menopausa, e em mulheres jovens submetidas a ovariectomia a prevalência de DCV aumenta em comparação a mulheres jovens com os ovários intactos [129, 130]. As DCV são complexas, pois envolvem o coração e as artérias os quais são responsáveis por fornecer oxigênio e nutrientes às células e ajudar a eliminar resíduos metabólicos [131].

As mulheres apresentam diferentes mudanças hormonais ao longo da vida, que se inicia na puberdade, passa pela menarca, gestação e menopausa, todas essas mudanças hormonais alteram as concentrações de lipoproteína [132, 133]. Estudos mostram que mulheres na pós-menopausa apresentam mudanças no perfil lipídico, tais como, aumento na lipoproteína de baixa densidade (LDL) e redução na lipoproteína de alta densidade (HDL), caracterizando uma dislipidemia associada ao aumento na incidência de DCV em mulheres na pós-menopausa. Diversos estudos mostram a associação do aparecimento de doença arterial coronariana em mulheres na pós-menopausa e aumento de LDL [134, 135].

Outra DCV que se destaca em mulheres na pós-menopausa é a hipertensão. No estudo publicado por Fortepiani e colaboradores em 2003, onde o grupo utilizou ratas espontaneamente hipertensas e na pós-menopausa (SHRPM), as ratas SHRPM apresentaram pressão alta média [136] e Yanes e colaboradores em 2010, mostrou que o

tratamento com losartan, um antagonista dos receptores de angiotensina I, reduziu a pressão arterial no modelo animal SHRPM, o que mostra a influência do estrogênio na regulação do sistema renina angiotensina aldosterona [137].

O papel regulador dos hormônios sexuais femininos na função da NADPH oxidase e mitocôndria não seja bem definido, o estrogênio apresenta ação protetora na isquemia/reperfusão, pois as mitocôndrias nas fêmeas produzem menos espécies reativas de oxigênio em relação aos machos [138], e em ratas ovariectomizadas a cascata de apoptose mitocondrial se ativa, aumentando marcadores pró-apoptóticos, tais como, TNF-alfa, caspase 3 e 8 [139].

Embora a literatura descreva a influência do estrogênio sobre o SRAA, ainda não está claro se a aldosterona aumenta o estresse oxidativo mitocondrial, via NADPH oxidase causando a disfunção da contratilidade miocárdica observada em ratas ovariectomizadas [85, 140]. Considerando esse fato, nossa hipótese é de que a redução da contratilidade miocárdica observada nas ratas Ovx é causada pelo aumento do estresse oxidativo mitocondrial dependente da aldosterona via NADPH oxidase.

## 2. OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

O estudo teve como objetivo identificar se a produção das espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria e NADPH oxidase, ativada pela aldosterona, participam da disfunção miocárdica nas ratas Ovx.

## 2.2 Objetivos específicos

- 1. Avaliar da contratilidade do músculo papilar;
- 2. Quantificar a produção de ânion superóxido no músculo papilar;
- Estudar os parâmetros bioquímicos do tecido cardíaco, através da expressão da Serca 2a, PLB e NOX4;
- 4. Analisar a resposta das subpopulações mitocondriais IFM e SSM aos respectivos substratos:
  - ✓ Glutamato + Malato;
  - ✓ Palmitoil L-carnitina;
  - ✓ Piruvato + Malato.
  - 5. Avaliar da produção de espécies reativas do oxigênio pela mitocôndria;
  - 6. Estudar os complexos da cadeia respiratória da mitocôndria.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1 Animais Experimentais

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Ratus Novergicus Albinus*) fornecidas pelo biotério do Programa de Pós-Graduação, pesando 230 ± 10 g, idade de ± 7 semanas, armazenadas em gaiolas com no máximo quatro animais, 25 ± 1° C, em ciclo claro/escuro de 12:12 horas, onde tiveram livre acesso à ingestão de água e ração. Todos os protocolos desenvolvidos foram aprovados pela Comissão de Ética-UFES para pesquisa com animais (CEUA-UFES 028/2014).

#### 3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram separados, aleatoriamente nos seguintes grupos:

#### Grupo submetido a Cirurgia Fictícia (Sham)

As ratas deste grupo foram anestesiadas com Ketamina (50 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg) por via i.p. Após a anestesia as ratas foram tricotomizadas sendo realizada antissepsia com álcool a 70% e foi feita uma incisão de 1,0 a 1,5 cm na pele e no tecido subcutâneo entre a última costela e a coxa a 1,0 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal, porém os ovários não foram retirados, a cavidade peritoneal foi fechada com fio absorvível e fio de nylon, no pós-operatório imediato os animais foram mantidos em observação e por 7 dias receberam 0,1 mL de

antibiótico enrofloxacina intramuscular [84, 85].

#### Grupo submetido a Ovariectomia (Ovx)

As ratas deste grupo foram anestesiadas por Ketamina (50 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg) (i.p.). Após a anestesia as ratas foram tricotomizadas e a área sofreu antissepsia com álcool a 70% e foi realizada uma incisão de 1,0 a 1,5 cm na pele e no tecido subcutâneo entre a última costela e a coxa a 1,0 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal, e os ovários foram retirados, a cavidade peritoneal foi fechada com fio absorvível e fio de nylon, no pós-operatório imediato (aproximadamente por 12 horas) os animais foram mantidos em observação, e por 7 dias receberam 0,1 mL de antibiótico enrofloxacina intramuscular [84, 85].

#### Grupo submetido a Ovariectomia e tratados com Apocinina 30 mg/kg (Ovx + Apo)

No mesmo dia após recuperação da anestesia, as ratas Ovx foram tratadas com Apocinina (Inibidor da NADPH oxidase) (diluição em água) [141] por 60 dias.

# Grupo submetido a Ovariectomia e tratados com Espironolactona 80 mg/kg (Ovx+ Espiro)

No mesmo dia após recuperação da anestesia, as ratas Ovx foram tratadas por gavagem com Espironolactona (Antagonista dos receptores de mineralocorticóides) (diluída em carboximetilcelulose) [142] por 60 dias.

O ciclo estral das ratas foi acompanhado por 15 dias, e somente as que estavam no proestro (fase de ciclo de maior produção de estradiol) foram submetidas á cirurgia.

3.3 Acompanhamento do peso corporal:

O peso corporal das ratas foi acompanhado de 15 em 15 dias até o dia do sacrifício, onde foi utilizada uma balança que foi tarada conforme o recipiente plástico utilizado para colocar os animais, atentando para que não houvesse nenhum resíduo que interferisse na mensuração.

3.4 Mensuração do peso do ventrículo:

Após 60 dias, as ratas foram anestesiadas e foi realizada uma incisão do abdômen até o tórax onde o coração foi retirado, e o ventrículo esquerdo (VE) foi separado do ventrículo direito (VD). Ambos foram pesados em uma balança analítica, o músculo papilar foi retirado e o VE e o VD foram devidamente colocados em tubos para amostra e aclimatados em -80° C. Após a realização dos protocolos os músculos papilares também foram pesados.

3.5 Avaliação da eficácia da castração:

O útero, foi retirado após os 60 dias de ovariectomia, o excesso de líquido absorvido com auxílio de papel de filtro, e pesado ainda úmido, em balança analítica. O útero foi desidratado (24 horas a 96° C) para avaliação do peso seco pelo comprimento da tíbia.

3.6 Medida do comprimento da tíbia:

Após o sacrifício a tíbia esquerda foi dissecada com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e um bisturi separando a parte óssea dos músculos e tendões, o comprimento foi avaliado com o auxílio de um paquímetro.

3.7 Análise da contratilidade miocárdica in vitro

Protocolos experimentais para músculos papilares isolados

O isolamento do músculo papilar ocorreu conforme protocolo estabelecido em nosso laboratório e para tanto as ratas foram anestesiadas com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), via intraperitoneal. Após checar a efetividade da anestesia os animais foram sacrificados, os corações foram rapidamente removidos no coto aórtico colocados em solução nutridora de Krebs-Henseleit contendo (em mM): 135 NaCl; 4,6 KCl; 1,25 CaCl<sub>2</sub>; 1,15 MgSO<sub>4</sub>; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 18 NaHCO<sub>3</sub>; 5,5 glicose, pH= 7,4. A parede do ventrículo direito foi separada para expor o septo interventricular, que foi dividido ao meio para que os músculos papilares do ventrículo ficassem claramente expostos. O músculo papilar posterior do ventrículo esquerdo foi cuidadosamente dissecado numa plataforma de parafina e suas extremidades presas a anéis de aço inoxidável, sendo em seguida imerso em uma cuba contendo 20 mL de solução de Krebs-Henseleit, aerada com solução gasosa (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e mantidas a 29°C para evitar hipóxia [84, 85].

As preparações foram ligadas a um transdutor de força isométrico (TSD125 - Biopac Systems, Inc. CA). A estimulação por campo elétrico foi induzida por pulsos isolados (10 a 15 V, duração de 5 ms) que foram aplicados através de um par de eletrodos de prata posicionados ao longo de toda a extensão do músculo papilar. A frequência padrão de estimulação foi de 0,5 Hz. Em seguida, o músculo papilar foi estirado sucessivamente, até atingir a força de contração máxima, chamada de *Lmáx.* O músculo foi mantido nesta condição, realizando contrações estáveis durante 60 minutos, este tempo foi necessário para que o músculo papilar se estabilizasse diante das novas condições experimentais. Assim seguiram os seguintes experimentos de:

- Força de contração: Após 60 minutos de estabilização a força de contração foi mensurada. A força de contração foi expressa em gramas de força desenvolvida por grama de peso de músculo papilar (g/g).
- 2. dF/dt: Variação da força de contração em função do tempo, que foi dada pelo cálculo da primeira derivada temporal dos valores de força, sendo avaliadas as máximas derivadas positiva (dF/dt+) e negativa (dF/dt-) como parâmetro de performance da contração (sístole) e do relaxamento (diástole), respectivamente.
- 3. Resposta contrátil ao cálcio extracelular: Com a finalidade de avaliar a resposta inotrópica ao cálcio, a solução nutridora onde foram mantidos os músculos papilares foi trocada para uma solução contendo concentrações crescentes de cálcio (0,62, 1,25, 2,5 e 3,75 mM) no banho dos músculos papilares. A variação de força foi corrigida pelo peso dos músculos e expressa em g/g.



**Figura 1**. Registro demonstrando a variação de força de contração isométrica (g/g) frente a concentrações crescentes de cálcio extracelular (CaCl<sub>2</sub>: 0,62; 1,25; 2,5; e 3,75 mM) obtida em preparação de músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratas dos grupos Sham, Ovx, Ovx + Apo e Ovx + Espiro.

4. Resposta ao Isoproterenol (Iso-agonista β-adrenérgico): Para avaliar o efeito dos tratamentos com Apocinina ou Espironolactona na resposta β-adrenérgica dos músculos papilares, foi utilizado o Isoproterenol (10<sup>-4</sup> M). Para a realização desta intervenção foi utilizada uma solução de Krebs-Henseleit contendo CaCl<sub>2</sub> 0,62 mM), pois se sabe que as preparações de músculo isolados de ratos apresentam melhor resposta inotrópica positiva quando estão em baixa concentração de cálcio (Vassallo et al., 1994) [143]. A resposta inotrópica foi calculada como a razão entre a amplitude máxima de força na presença do Isoproterenol e a amplitude de força estabilizada anterior ao Isoproterenol.



**Figura 2**. Registro demonstrando a variação de força de contração isométrica (g/g) na presença de Iso 10<sup>-4</sup> M obtida em preparação de músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratas dos grupos Sham, Ovx, Ovx + Apo e Ovx + Espiro.

3.8 Avaliação "in situ" de O<sub>2</sub>- no músculo papilar pela técnica de fluorescência ao dihidroetídeo (DHE)

Após a realização da avaliação da contratilidade com os músculos isolados, os papilares foram mantidos por 1 h em solução de Krebs-Hepes (em mM: 130 NaCl; 5,6 KCl; 2 CaCl<sub>2</sub>; 0,24 MgCl<sub>2</sub>; 8,3 HEPES; e, pH 7,4) contendo sacarose a 30%. A seguir, os músculos papilares foram armazenados em Tissue-Tek (O.C.T.) e congelados em -80°C até o dia do experimento.

No dia do experimento as amostras foram cortadas em criostato em secções de 10 µm de espessura e colocadas em lâmina de vidro gelatinizada, e secas em estufa à 37 °C. Após a secagem, as secções foram incubadas em condições idênticas durante 30 minutos à 37 °C em tampão Krebs-Hepes. Em seguida, o Krebs-Hepes foi escorrido e o excesso foi seco. Posteriormente, foi feita a incubação com DHE 2 µM por 30 minutos na estufa, em câmara protegida da luz, à 37°C, conforme descrito por Rodrigues et al., (2012) [144].

As imagens de luminescência foram coletadas em um microscópio de fluorescência invertido, Leica DM 2500, com uma câmera fotográfica Leica DFC 310 FX e com filtro de 568 nm. As mesmas configurações de imagem foram usadas para ambos os grupos experimentais. A quantificação das imagens foi realizada pelo software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

#### 3.9 Estudo da extração de proteínas e imunoblotting

Preparação dos tecidos e quantificação das proteínas

Os corações foram removidos e manualmente dissecados como descrito previamente por Morra et al. (2018) [145]. Os tecidos foram homogeinizados com tampão de Lise (250 mmol/L de sacarose, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L imidazol, pH 7,2), seguido de inibidores de protease: 1 mmol/L 4-(2-aminotil) - fluoreto de sulfonibenzeno, 1 mmol/L benzamida, 10 mg/L leupeptina, 1 mg/L pepstatina A, 1 mg/L aprotinina, e 1 mg/L quimostatina). A homogeinização foi realizada usando um homogeinizador Potter 0° C. O homogenato foi centrifugado a 1000×g por 10 minutos. O sobrenadante foi salvo e o sedimento foi suspenso em três volumes do tampão de lise, e a centrifugação foi repetida. Ambos os sobrenadantes foram misturados e centrifugados a 10.000×g por 20 minutos. O sobrenadante foi guardado e o sedimento foi descartado. A concentração de proteínas foi determinada usando o ensaio de Lowry [146].

#### Eletroforese e transferência das amostras

Para a realização da eletroforese foram feitos géis de SDS-Bis acrilamida à 7,5%, 10 e 12% e em seguida os géis foram carregados com as amostras previamente acondicionadas em um tampão Laemmli 4X e centrifugadas à 6000 RPM por 1 minuto. Após o carregamento os géis foram imersos em tampão para eletroforese (Tris-HCL 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, pH 8,3) e submetidos a uma amperagem de 80 mA por 3 horas. Ao término da eletroforese foi feita a transferência elétrica das proteínas dos géis para uma membrana de nitrocelulose (GE Amersham, UK) em um tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% e SDS 0,1%, pH 8,3) em

temperatura de 20°C em um aparelho Semi-dry (Bio-Rad) usando 25 V *overnight*. Finalizada a transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por 2 horas em solução bloqueadora que continha leite desnatado diluído em tampão de TBST (Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 0,1%, pH 7,5).

Western blot das proteínas dos músculos papilares

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-Serca 2a (1:1000. 80 μg. Santa Cruz 8094), mouse anti-fosfolamban (1:2000.80μg. Santa Cruz 393990), mouse anti-Mfn-1 (1:100. 80 μg. Santa Cruz 166644), rabbit PGC-1α (1:500. 80 μg. Santa Cruz 13067), mouse anti-Tfam (1:1000. 80 μg. Santa Cruz 376672), rabbit anti-NRF-1 (1:500. 80 μg. Santa Cruz 33771), anti-MCU (1:1000. 20 μg. Sigma-aldrich HPA037480), Catalase (1:12000. 30 μg. Sigma-aldrich C0979), Nox-4 (1:2000. 80 μg. Sigma-aldrich SAB1304615), anti-OXPHOS (1:2500. 10 μg. Abcam 110413) and CypD (1:1000. 20 μg. Mitoscience 110324) anti-PLB (1:2000. 25 μg. Santa Cruz 393990), anti-AMPKα (1:100080 μg. Cell Signaling #2532), anti-Mn-Sod (1:5000. 10 μg. Millipore 06-984), mouse anti-GAPDH (1:3000. 80μg. Santa Cruz 32233) diluídos em solução de TBST e incubados *overnight* à 20°C.

No dia posterior ao da incubação com os anticorpos primários os mesmos foram recolhidos, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução TBST para remoção dos anticorpos primários e os seguintes anticorpos secundários respectivos aos primários foram incubados: Anti-mouse (1:5000 Stressgen, Victória, Canadá), permanecendo incubados por 1 hora em uma solução de leite desnatado diluído à 5% em tampão TBST.

Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução TBST e as bandas foram detectadas utilizando um composto fluorescente (ECL) e as membranas foram expostas a radiação ultravioleta usando software ChemiDoc system (Bio-rad Image Lab 5.2.1), onde as bandas imunorreativas foram detectadas e fotografadas digitalmente. As proteínas foram corrigidas pela quantidade da GAPDH. As imagens foram quantificadas usando o software Image J (Image V1.56; National Institutes of Health, EUA).

#### 3.10 Função mitocondrial cardíaca

Os corações foram removidos e colocados em recipiente contendo solução tampão *Chappel-Perry - CP* (100 mM KCI; 50 mM MOPS; 5 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM EGTA, 1 mM ATP e 2 mg/mL albumina bovina - BSA) a 4º C. Apenas o VE foi utilizado para avaliar a atividade mitocondrial. Em conformidade com o protocolo de isolamento de mitocôndrias (Palmer et al.,1977) [100] e as adaptações realizadas por Ribeiro et al. (2014) [147] as subpopulações mitocondriais (e Intermiofibrilar - IFM e Subsarcolemal - SSM) foram isoladas a partir de aproximadamente 0,6 g de tecido de VE [100].

O VE foi lavado, fragmentado com o auxílio de uma tesoura, homogeneizado em 22,5 ml do tampão *Chappel-Perry* (pH 7.4, 4 °C) e centrifugado (Centrifuge 5804 R – Eppendorf, Germany) a 580 x g por 10 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante (S1) resultante da primeira centrifugação foi imediatamente filtrado com auxílio de uma gaze e um recipiente que foi reservado. O *pellet* oriundo desta primeira centrifugação foi ressuspendido em 7,5 mL do mesmo tampão e novamente centrifugado a 580 x g por 10 min. O sobrenadante (S2) desta segunda centrifugação foi filtrado e adicionado ao S1. Em seguida, o sobrenadante (S1 + S2) foi novamente centrifugado à 580 x g por 7 min. O sobrenadante resultante desta centrifugação foi novamente centrifugado. O *pellet* remanescente da centrifugação correspondeu à subpopulação SSM.

O *pellet* remanescente da segunda centrifugação foi ressuspendido em 9 mL de tampão *Chappel-Perry* com adição de 5 mg de tripsina por grama de tecido. Em seguida, uma segunda homogeneização foi realizada e as amostras foram agitadas (agitador magnético, ika® c-mag hs10, EUA) em banho de gelo por 10 min, para digerir os miofilamentos.

Após agitação, foram adicionados 10 mL de tampão *Chappel-Perry* contendo BSA (fraction V, fatty acid free) a 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 ressuspendido 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 e novamente centrifugado a 3.000 x g por 7 min.

O *pellet* final corresponde a subpopulação IFM. 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 ressuspendidos em 200 µL de tampão KME e a concentração protéica foi determinada pelo método de Lowry. Abaixo a figura 13 mostra desenho esquemático do isolamento mitocondrial.



**Figura 3**: Subpopulações mitocondriais subsarcolemal (SSM) e intermiofibrilar (IFM) (adaptado de DO VAL LIMA, 2017).

3.11 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, Kingston, ON, Canada). As frações isoladas mitocondriais (0,25 mg/mL) foram incubadas em um tampão para respiração mitocondrial (100 mM KCl, 50 mM MOPS, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA and 1 mg/mL BSA/Fraction V, pH 7.4) como descrito por Palmer et al. (1977) [100] e modificado por Ribeiro et al. (2014) [147].

O estado 3, resultante da velocidade de consumo de oxigênio quando a mitocôndria é colocada em um meio com substrato oxidável com ADP, produzindo assim o ATP e, o estado 4, resultante da velocidade do consumo de  $O_2$  após a mitocôndria já ter consumido todo o ADP disponível, foram medidos com a adição dos substratos glutamato + malato (10 e 5 mM, respectivamente), piruvato + malato (10 e 5 mM, respectivamente), piruvato + inibidor Rotenona (20 µM e 7,5 mM, respectivamente).

Após a adição dos substratos, foi adicionado ADP para atingir uma concentração final de 200 μM, sendo observado um aumento do consumo de oxigênio em função do tempo. Após completa depleção do ADP, observado pelo surgimento do estado IV, adicionou-se oligomicina, um inibidor da ATP sintase (fração F0) da cadeia respiratória. Os estados 3, 4 e 4 + oligomicina, a razão de controle respiratório (RCR - razão do estado III/estado IV) e razão ADP:O foram calculados posteriormente.

Os estados 3 e 4 são expressos como nanomol de consumo de O<sub>2</sub> normalizado por proteína mitocondrial por minuto (nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>). A razão RCR indica o acoplamento da cadeia respiratória e a razão ADP:O (razão fosfato inorgânico/oxigênio), indica o quanto de O<sub>2</sub> é reduzido em H<sub>2</sub>O na fosforilação oxidativa, indicando sua eficiência. A Figura 4 mostra o esquema representativo da oxidação fosforilativa.



**Figura 4**: Esquema ilustrativo da mensuração da respiração mitocondrial (estado 1 a 4 e a razão estado 3/estado 4) pelo consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>).

#### 4.12 Drogas e reagentes químicos

Sais e reagentes utilizados, quando não indicado de outro modo, foram adquiridos da Sigma ou Merck (Darmstadt, Alemanha).

### 4.13 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias foram usadas para identificar possíveis alterações induzidas pelos tratamentos Apocinina e/ou Espironolactona e ovariectomia, seja isoladamente ou por interação. O teste *post-hoc* de *Fisher, Tukey ou Bonferroni* foram usados para múltiplas comparações quando diferenças significantes foram detectadas pela ANOVA. O valor de alfa considerado como significativo foi de 5% (*p* < 0,05).

O número de animais (n) utilizado em cada protocolo experimental está descrito na sessão de Resultados.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que a Apocinina foi capaz de prevenir o ganho de peso apresentado pelas ratas Ovx quando comparado aos animais Sham. Já os animais Ovx tratados com Espironolactona não apresentaram redução no ganho de peso corporal quando comparados ao grupo Sham. Nos animais tratados com Apo ocorreu prevenção do aumento de peso do ventrículo esquerdo quando comparado ao grupo Ovx, porém no grupo tratado com Espiro não ocorreu prevenção do ganho de peso do ventrículo esquerdo quando comparado ao grupo do ventrículo esquerdo do ganho de peso do ventrículo esquerdo comparado ao Ovx.

Grupos	Sham (n=18)	Ovx (n=18)	Ovx + Apo (n=11)	Ovx + Espiro (n=7)
PCI (g)	216,1 ± 3,5	211,4 ± 3,2	218,3 ± 1,2	218,9 ± 1,3
PCF (g)	280,1 ± 4,0	351,8 ± 12,6*	305,2 ± 9,5 <b>#</b>	339,6±3,8*
VE (g)	$0,5 \pm 0,0$	$0,6 \pm 0,0^{*}$	$0,4 \pm 0,0^{#}$	$0,6 \pm 0,0^{*}$
CT (mm)	$35,2 \pm 0,5$	$34,6 \pm 0,7$	36,1 ± 0,5	$34,5 \pm 0,6$
Útero/Tíbia (mg/cm)	183 ± 5,6	22,1 ± 2,1*	24,8 ± 1,5*	21,1 ± 3,2*
VE/Tíbia (mg/mm)	14,6 ± 0,3	21,4 ± 0,1* <b>#</b>	13,14 ± 0,3 <b>#</b>	17,9 ± 1,5 <b>#</b>
Músculo Papilar (mg)	$5,2 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,2$	$5,42 \pm 0,1$	5,52 ± 0,1

**Tabela 1.** Apresentação dos dados ponderais de ratas Sham, Ovx, Ovx tratados por 60 dias com Apocinina (Apo) ou Espironolactona (Espiro).

PCI (g), peso corporal inicial e PCF, peso corporal final (g). CT: comprimento da tíbia (mm). VE-ventrículo esquerdo (g). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM e comparados entre os grupos por ANOVA uma via seguidos pelo teste post-hoc de Tukey. \*p < 0,05 em relação ao grupo **Sham** e #p < 0,05 em relação aos grupos **Ovx**.

Os tratamentos com Apocinina e/ou Espironalctona por 60 dias representado na Figura 5 preveniram a redução de contratilidade miocárdica nos animais ovariectomizados (Sham:  $605,4 \pm 10,37 \text{ g}$  - Ovx:  $358,3 \pm 21,23^* \text{ g}$ / Ovx + Apo:  $622,7 \pm 18,69^* \text{ g/g}$ , p<0,01 e Ovx + Espiro:  $726,1 \pm 4,39\#$ & g/g, p<0,01) a dF/dt+ (dF/dt+: Sham: 2449 ± 113 mg - Ovx: 1155 ± 91\* mg/ Ovx + Apo:  $4243 \pm 99\#$ & mg p<0,01 e Ovx + Espiro:  $3510 \pm 267,9\#$  mg/mg, p<0,01) e (dF/dt- Sham:  $-3884 \pm 82$  mg - Ovx:  $-2217 \pm 116^*$  mg/ Ovx + Apo:  $-4131 \pm 109\#$ & mg/mg, p<0,01 e / Ovx + Espiro:  $-3225,1 \pm 210\#$  mg/mg, p<0,01).



**Fig 5.** (**A**) Representação da Força Desenvolvida nos respectivos grupos **Sham**, **Ovx**, **Ovx** + **Apo e Ovx** + **Espiro**. (**B**) variação da força de contração em função do tempo- derivada positiva máxima (dF/dt+) e (**C**) derivada negativa (dF/dt-). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM e comparados entre os grupos por ANOVA uma via seguidos pelo teste post-hoc Bonferroni, \*p<0,01 em relação ao grupo Sham #p<0,01 em relação ao Ovx e & p<0,01 entre Ovx + Apo e Ovx + Espiro. n= 8-11

Como esperado, todos os grupos apresentaram resposta inotrópica positiva ao aumento do cálcio extracelular (Figura 6 A) e ao agonista  $\beta$ -adrenérgico, Isoproterenol (Figura 6 B). Entretanto, observa-se que as ratas ovariectomizadas e tratadas com Apocinina e/ou Espironolactona apresentaram a força de contração em resposta ao cálcio semelhante as Sham, e nas Ovx apresentaram tal força se mostrou reduzida em todas as concentrações de cálcio (Ca<sup>2+</sup>1,25- Sham: 484 ± 20,52 g vs Ovx: 247 ± 12,23\* g vs Ovx + Apo: 494 ± 32,40# g/g, p<0,01 e Ovx + Espiro: 544,71 ± 57,06# g/g, p<0,01).

A força de contração do músculo papilar em resposta ao agonista β-adrenérgico isoproterenol no grupo Ovx tratado com Apocinina e/ou Espironolactona foram semelhantes ao grupo Sham e os animais Ovx não tratados apresentaram redução na resposta contrátil. (Iso Log [M]  $10^{-3}$ - Sham: 592,73 ± 26,59 g - Ovx: 345,43\* ± 31,12g/ Ovx + Apo: 627,51 ± 21,44# g/g, p<0,05 e Ovx + Espiro: 666,12 ± 71,24# g/g, p<0,05).



**Figura 6**: (**A**) Efeito do aumento do cálcio extracelular concentrações de 0,62 a 3,75 mM nos grupos Sham, Ovx, Ovx + Apo e Ovx + Espiro (**B**) Curva concentração-resposta ao Isoproterenol  $(10^{-7} - 10^{-1} \text{ M})$  nos grupos citados. Os resultados estão expressos como média ± EPM e comparados entre os grupos por ANOVA duas vias seguida de post-hoc Tukey, \*p < 0,05 em relação ao grupo Sham e #p < 0,05 em relação aos grupos Ovx. n= 12-38.

Visto que a contratilidade miocárdica se mostrou reduzida nas Ovx e os tratamentos com Apo e/ou Espiro, preveniram tal redução, avaliamos as expressões das proteínas Serca 2a e PLB, envolvidas na homeostase do Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos, e observou-se que nas ratas Ovx a expressão de Serca 2a é menor quando comparada ao grupo Sham e o tratamento com Apo ou Espiro preveniu a redução da expressão da Serca 2a (Figura 7 A). (Sham: 1,39 ± 0,12 - Ovx: 0,86 ± 0,05\*/ Ovx + Apo:1,26 ± 0,08# - Ovx + Espiro: 1,28 ± 0,10# p<0,05).

Na figura 7 B observa-se um aumento da expressão de PLB nas ratas Ovx quando comparadas às Sham e o tratamento com Apo ou Espiro preveniu esse aumento (Sham:  $1,12 \pm 0,06$  - Ovx:  $1,63 \pm 0,08^*$ / Ovx + Apo:  $0,99 \pm 0,07\#$  - Ovx + Espiro:  $1,08 \pm 0,06\#$  p<0,05).

A Figura 7 D demonstra os resultados da expressão da proteina Nox4, que participa na produção de EROs, vimos que nas ratas Ovx ocorreu aumento na expressão da Nox4, quando comparada ao grupo Sham. O tratamento com Apo ou Espiro preveniu o aumento da expressão igualando tais grupos ao Sham. (Sham:  $0,64 \pm 0,05 - Ovx: 1,22 \pm 0,15^*/Ovx + Apo: 0,64 \pm 0,07\# - Ovx + Espiro: 0,65 \pm 0,10\#, p<0,05)$ .



**Figura 7**: Expressão das proteínas Serca 2a, PLB e Nox4 normalizadas pela GAPDH (**A**, **B** e **D**). Serca 2a normalizada pela PLB nos grupos (**C**): Sham (n=9), Ovx (n=9), Ovx + Apo (n=9) e Ovx + Espiro (n=9). Os resultados estão representados como média  $\pm$  EPM e comparados entre os grupos por ANOVA 1 via seguida de teste post-hoc Fisher, \*p<0,05 em relação ao grupo Sham e #p< 0,01 em relação aos grupos Ovx. n= 4-9

Nas ratas Ovx ocorreu aumento da expressão proteica de Nox4, e para confirmar se ocorreu um aumento da produção de EROs, foi avaliada a produção de  $O_2 \cdot nos$  cardiomióciros, e na figura 9 os animais Ovx tratados com Apo ou Espiro, apresentaram uma redução na intensidade da fluorescência, que está aumentada nos animais Ovx, confirmando então que nesses animais ocorreu um aumento na produção de ânion superóxido, e que ao submetermos os animais aos tratamentos com Apo ou Espiro por 60 dias esse aumento foi prevenido. (Sham:  $3,85 \pm 0,40 - Ovx$ :  $9,74 \pm 1,03^*/Ovx + Apo: 4,16 \pm 0,48\# - Ovx + Espiro: 2,99 \pm 0,21\#$ , p<0,01).



**Figura 8**: Detecção *in situ* de ânion superóxido. Micrografia de tecidos do músculo papilar corados com DHE (fluorescência vermelha) nos grupos: Sham, Ovx, Ovx + Apo e Ovx + Espiro. A intensidade da fluorescência está representada pelos gráficos de barra como unidade arbitral (AU), e os grupos foram comparados por ANOVA 1 via seguida de teste post-hoc Fisher, \*p<0,01 em relação ao grupo Sham e #p<0,01 em relação aos grupos Ovx. n= 6-16.

#### Avaliação da respiração mitocondrial

As subpopulações IFM e SSM foram avaliadas por substratos específicos aos complexos I e II da cadeia transportadora de eletróns (glutamato + malato, palmitoil L-Carnitina, piruvato + malato e succinato na presença do inibidor rotenona).

Para compreender as possíveis alterações induzidas pela Ovx sobre a cadeia transportadora de elétrons, avaliamos o "shuttle" do aspartato a partir da utilização dos substratos glutamato + malato para a geração de NADH (fonte do elétron para o Complexo I).

No estado 3 a respiração máxima nas subpopulações de IFM e SSM se mostraram reduzidas no grupo Ovx quando comparado ao grupo Sham, após o tratamento por 60 dias com Apo ou Espiro a redução foi prevenida. No entanto, a respiração máxima no estado 4, nas subpopulações IFM e SSM foi maior no grupo Ovx quando comparado com as ratas Sham. Os tratamentos com Apo e Espiro impediram este aumento (figura 10). Tais dados mostraram que a ovariectomia afetou a oxidação dos substratos e/ou desacoplamento da CTE mitocondrial em ambas populações avaliadas.



Glutamato + Malato

SSM



**Figura 9**: Avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial das subpopulações IFM estado 3 (A), estado 4 (B) e SSM estado 3 (C) e estado 4 (D) em resposta ao substrato Glutamato + Malato nos grupos Sham, Ovx, Ovx + Apo e Ovx + Espiro. Valores expressos em nanomol de oxigênio/min/mg de proteína mitocondrial. Os resultados estão expressos como média ± EPM, \*p<0.05 em relação ao grupo Sham e #p<0,05 em relação aos grupos Ovx. ANOVA 1 via seguida de post-hoc Fisher. n= 7-16.

Após a respiração máxima ao substrato glutamato + malato nas Ovx se mostrar reduzida, o que pode indicar redução da atividade dos complexos I e II, o que corrobora com o aumento de EROs, a β-oxidação foi avaliada na presença do substrato palmitoil L-carnitina. (Figura 10).

A L-carnitina medeia o transporte de ácidos graxos do citosol para a MMI chegando a matriz mitocondrial para sua β-oxidação, isso leva à produção de acetil-coA, que entra no ciclo do ácido tricarboxílico, melhorando a atividade da cadeia respiratória mitocondrial e reduz a formação de EROs [148].

No estado 3 ocorreu redução da respiração máxima na subpopulação IFM do grupo Ovx quando comparado ao Sham, essa redução foi prevenida com os tratamentos com Apo ou Espiro. Não houve diferença da respiração máxima entre os grupos no estado 3 da subpopulação SSM.

No estado 4, nas Figura 10 B e 10 D, observou-se um aumento na respiração máxima das subpopulações IFM e SSM no grupo Ovx, e o tratamento por 60 dias com Apo ou Espiro preveniu tal aumento, igualando-os ao grupo Sham. Sendo assim, podemos inferir que ocorreu um prejuízo na fosforilação oxidativa mitocondrial nos animais Ovx, e os tratamentos com Apo ou Espiro preveniram tal prejuízo.



Palmitoil L-Carnitina







Na figura 11 A, vimos que a respiração máxima do grupo Ovx na subpopulação IFM no etado 3, apresentou redução que foi prevenida com o tratamento com Apo e Espiro. No estado 4, ocorreu um aumento que foi reduzido com o tratamento com Apo e Espiro. Não houve diferença entre os grupos na subpopulação SSM no estado 3 para o substrato piruvato + malato, porém, no estado 4 ocorreu aumento na respiração máxima do grupo Ovx e tal aumento foi prevenido com o tratamento com Apo ou Espiro.



Piruvato + Malato

SSM



**Figura 11**: Avaliação do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial das subpopulações IFM estado 3 (A), estado 4 (B) e SSM estado 3 (C) e estado 4 (D) SSM em resposta ao substrato piruvato + malato nos grupos Sham, Ovx, Ovx + Apo e Ovx + Espiro. Valores expressos em nanomol de oxigênio/min/mg de proteína mitocondrial. Os resultados estão expressos como média ± EPM, \*p<0.05 em relação ao grupo Sham e #p<0,05 em relação aos grupos Ovx. ANOVA 1 via seguida de post-hoc Fisher. n= 9-17.

A principal função da CTE é fazer com que os elétrons cheguem ao destino final, que é o complexo IV, onde o O<sub>2</sub> é reduzida a H<sub>2</sub>O, e o prejuízo na função dos complexos da CTE, pode indicar uma redução na expressão desses complexos, portanto a expressão dos Complexos I, II, III, IV e V nas subpopulações IFM e SSM foram analisadas.

Na Figura 12 A que representa a subpopulação IFM, observa-se que ocorreu uma redução nos Complexos I e IV da subpopulação IFM nos grupos Ovx + Apo e Ovx + Espiro comparados com o grupo Sham (Complexo I: Sham:  $0.96 \pm 0.08$ -Ovx:  $0.53 \pm 0.08$ / Ovx + Apo:  $0.75 \pm 0.11^*$ -Ovx + Espiro:  $0.59 \pm 0.08^*$  nmol O<sub>2</sub>.mg-1.min-1 - Complexo IV: Sham:  $1.19 \pm 0.17$ -Ovx:  $0.79 \pm 0.09$ / Ovx + Apo:  $0.74 \pm 0.09^*$ -Ovx + Espiro:  $0.73 \pm 0.05^*$  nmol O2.mg-1.min-1). No Complexo III os tratamentos com apocinina e/ou espironolactona não foram capazes de prevenir a redução deste complexo (Complexo III: Sham:  $1.19 \pm 0.17$ -Ovx:  $0.79 \pm 0.09^*$ / Ovx + Apo:  $0.72 \pm 0.09^*$ -Ovx + Espiro:  $0.73 \pm 0.05^*$  nmol O<sub>2</sub>.mg-1.min-1) e nos Complexo II e V não ocorreu diferença entre os grupos (Complexo II: Sham:  $0.88 \pm 0.09$ -Ovx:  $0.80 \pm 0.06^*$ / Ovx + Apo:  $0.84 \pm 0.07^*$ -Ovx + Espiro:  $0.65 \pm 0.04^*$  nmol O<sub>2</sub>.mg-1.min-1 - Complexo V: Sham:  $0.81 \pm 0.12$ -Ovx:  $0.77 \pm 0.06$ / Ovx + Apo:  $0.79 \pm 0.07 \pm 0.06$  nmol O<sub>2</sub>.mg-1.min-1).



**Figura 12**: (A) Expressão proteíca dos complexos da cadeia transportadora de elétrons (OXPHOS) das subpopulações mitocondriais IFM dos grupos Sham, Ovx, Ovx + Apo e Ovx + Espiro. Os resultados estão expressos como média ± EPM e os grupos foram comparados por ANOVA 1 via seguida de teste post-hoc Fisher. \*p<0,05. n= 7-10.

Na Figura 12 B, observa-se que não houve diferença significante na expressão dos complexos II da subpopulação SSM, nos respectivos grupos (Complexo V: Sham: 1,32  $\pm$  0,19-Ovx: 1,04  $\pm$  0,12/ Ovx + Apo: 1,11  $\pm$  0,07-Ovx + Espiro: 1,02  $\pm$  0,07 nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> – Complexo IV: Sham: 1,33  $\pm$  0,19-Ovx: 0,99  $\pm$  0,12/ Ovx + Apo: 1,08  $\pm$  0,07-Ovx +
Espiro:  $0,98 \pm 0,07$  nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> – Complexo III: Sham:  $1,30 \pm 0,20$ -Ovx:  $0,99 \pm 0,12$ / Ovx + Apo:  $0,86 \pm 0,09$ -Ovx + Espiro:  $0,79 \pm 0,08$  nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> – Complexo II: Sham:  $1,07 \pm 0,16$ -Ovx:  $0,98 \pm 0,14$ / Ovx + Apo:  $0,95 \pm 0,06$ -Ovx + Espiro:  $0,80 \pm 0,08$  nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> – Complexo I: Sham:  $1,30 \pm 0,18$ -Ovx:  $0,99 \pm 0,13^*$ / Ovx + Apo:  $1,07 \pm 0,06$ -Ovx + Espiro:  $0,93 \pm 0,09^*$ # nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).



**Figura 12**: (B) Expressão proteíca dos complexos da cadeia transportadora de elétrons (OXPHOS) das subpopulações mitocondriais SSM dos grupos Sham, Ovx, Ovx + Apo e Ovx + Espiro. Os resultados estão expressos como média ± EPM e os grupos foram comparados por ANOVA 1 via seguida de teste post-hoc Fisher. \*p<0,05. n= 10-16.

Analisando a enzima antioxidante Mn-SOD (Fig. 13 A e 13 B), observou-se uma redução tanto na subpopulação IFM como na SSM do grupo Ovx ao compararmos com o grupo Sham e tal redução foi prevenida na subpopulação IFM pelos tratamentos com apocinina e espironolactona, porém o tratamento com Espiro não foi capaz de reverter a redução da enzima Mn-SOD na subpopulação SSM (IFM Mn-SOD: Sham: 1,44 ± 0,16 - Ovx: 0,87 ± 0,07\*/ Ovx + Apo: 1,49 ± 0,10# - Ovx + Espiro: 1,49 ± 0,07# nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> SSM Mn-SOD: Sham: 1,01 ± 0,14 - Ovx: 0,62 ± 0,09\*/ Ovx + Apo: 1,02 ± 0,07# - Ovx + Espiro: 0,86 ± 0,11 nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).

Podemos observar na Figura 13 C e 13 D que ocorreu também uma redução na catalase nas subpopulações IFM e SSM do grupo Ovx quando comparamos ao Sham, todavia a redução foi abolida nas subpopulações IFM e SSM dos grupos tratados com Apo e o tratamento com Espiro apresentou uma tendência, porém não foi capaz de prevenir a redução da catalase (IFM Cat: Sham:  $1,50 \pm 0,23$  - Ovx:  $0,81 \pm 0,11^*$ / Ovx + Apo:  $1,46 \pm$ 0,12# - Ovx + Espiro:  $1,30 \pm 0,08\#$  nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> - SSM Cat: Sham:  $0,94 \pm 0,10$  -Ovx:  $0,46 \pm 0,04^*$ / Ovx + Apo:  $0,98 \pm 0,16\#$  - Ovx + Espiro:  $0,79 \pm 0,12\&$  nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, p=0,08).



**Figura 13**: Expressão proteica da enzima superóxido dismutase mangânes (Mn-SOD) e catalase nas subpopulações mitocondriais isoladas de ventrículo esquerdo IFM e SSM dos grupos Sham, Ovx, Ovx + Apo e Ovx + Espiro. Dados expressos como média ± EPM. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise ANOVA 1 via seguidos pelo teste post-hoc de Fisher. \*p<0.05 em relação ao grupo Sham e #p<0,05 em relação aos grupos Ovx, quando &p=0,08. n= 4-10.

Com a finalidade de estudar os mecanismos envolvidos na capacidade de retenção de  $Ca^{2+}$ , realizamos a expressão protéica do MCU Figura 14 A e 14 B e CypD Figura 14 C e 14 D, nas mitocôndrias de todos os grupos. Não houve diferença significante na expressão proteica de MCU nas subpopulações IFM e SSM quando comparamos com o grupo Sham (IFM: Sham: 0,66 ± 0,08 - Ovx: 0,69 ± 0,08/ Ovx + Apo: 0,72 ± 0,08 - Ovx + Espiro: 0,76 ± 0,07 nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> – SSM: Sham: 0,57 ± 0,11 - Ovx: 0,54 ± 0,13/ Ovx + Apo: 0,87 ± 0,14-Ovx + Espiro: 0,73 ± 0,15 nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> ).

A expressão da CypD na subpopulação IFM está aumentada no grupo Ovx quando comparado ao grupo Sham, porém, após os tratamentos por 60 dias com Apo ou Espiro esse aumento foi reduzido se igualando ao grupo Sham (IFM: Sham:  $0,73 \pm 0,05 -$ Ovx:  $1,09 \pm 0,10^*$ / Ovx + Apo:  $0,71 \pm 0,08\#$  - Ovx + Espiro:  $0,60 \pm 0,10\#$  nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>). A expressão da CypD na subpopulação SSM não apresentou diferença significante nos respectivos grupos (SSM: Sham:  $1,29 \pm 0,28$  - Ovx:  $1,24 \pm 0,18$ / Ovx + Apo:  $1,10 \pm 0,08$ - Ovx + Espiro:  $1,02 \pm 0,09$  nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).



**Figura 14**: Expressão proteica do cálcio uniporter mitocondrial (MCU) e ciclofilina D (CypD) das subpopulações mitocondriais isoladas (IFM e SSM) do ventrículo esquerdo de ratas dos grupos Sham, Ovx, Ovx + Apo e Ovx + Espiro. Dados expressos como média ± EPM. Os dados foram comparados entre os grupos ANOVA 1 via seguido pelo teste post-hoc de Fisher, \*p<0.05 em relação ao grupo Sham e #p<0,05 em relação aos grupos Ovx, quando &p=0,08. n= 6-10.

Ao analisarmos o fator de transcrição mitocondrial A (Tfam), observamos que em ambas as subpopulações (IFM e SSM) representadas na Figura 15 A e 15 B, a expressão se encontrava reduzida no grupo Ovx, porém, os tratamentos com Apo e Espiro previniram a redução da expressão de Tfam (IFM: Sham: 1,11  $\pm$  0,12 - Ovx: 0,43  $\pm$  0,07\*/ Ovx + Apo: 0,82  $\pm$  0,06# - Ovx + Espiro: 0,94  $\pm$  0,15# nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> - SSM: Sham: 1,13  $\pm$ 0,12 - Ovx: 0,45  $\pm$  0,11\*/ Ovx + Apo: 1,33  $\pm$  0,23# - Ovx + Espiro: 1,26  $\pm$  0,14# nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> ).

No grupo Ovx a expressão de PGC-1 $\alpha$  representado na Figura 15 C e 15 D se mostrou reduzida em IFM e SSM, no entanto, o tratamento com Apo ou Espiro foi capaz de reverter a redução quando comparado ao grupo Sham (IFM: Sham: 1,41 ± 0,25 - Ovx: 0,60 ± 0,11\*/ Ovx + Apo: 1,23 ± 0,18# - Ovx + Espiro: 1,09 ± 0,07# nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> - SSM: Sham: 1,41 ± 0,19 - Ovx: 0,73 ± 0,09\*/ Ovx + Apo: 1,37 ± 0,11# - Ovx + Espiro: 1,32 ± 0,09# nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).





**Figura 15:** Expressão proteica por meio da técnica de *Western Blotting* do Tfam e PGC1- $\alpha$  das subpopulações IFM e SSM. Dados expressos como média ± EPM. Os dados foram comparados entre os grupos por ANOVA 1 via seguidos pelo teste post-hoc de Fisher, \*p<0.05 em relação ao grupo Sham e #p<0,05 em relação aos grupos Ovx, quando &p=0,08. n= 7-11.

Podemos observar que ocorreu um aumento na carbonilação das proteínas do grupo Ovx em ambas as subpopulações (Figura 16 A e B) e o tratamento com Apo ou Espiro preveniu esse aumento (IFM: Sham:  $0,65 \pm 0,06$  - Ovx:  $0,86 \pm 0,05^*$ / Ovx + Apo:  $0,70 \pm 0,04\#$  - Ovx + Espiro:  $0,55 \pm 0,03\#$  nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> - SSM: Sham:  $0,96 \pm 0,09$  - Ovx:  $1,50 \pm 0,19^*$ / Ovx + Apo:  $1,07 \pm 0,10\#$  - Ovx + Espiro:  $1,07 \pm 0,11\#$  nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).



**Figura 16**: Expressão das protéinas carboniladas nas subpopulações (A) IFM e (B) SSM, respectivamente. Dados expressos como média ± EPM. Os dados foram comparados entre os grupos por ANOVA 1 via seguidos pelo teste posthoc de Fisher, \*p<0, 05 em relação ao grupo Sham e #p<0,05 em relação aos grupos Ovx. n= 9-15.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que os tratamentos por 60 dias com Apocinina e/ou Espironolactona preveniram o aumento do estresse oxidativo, preveniram a redução de Serca2a, proteína envolvida na captação de Ca<sup>2+</sup>, preveniram a redução das proteínas mitocondriais envolvidas na sinalização do Ca<sup>2+</sup> e na biogênese mitocondrial. Estes dados sugerem que o aumento da produção de EROs mitocondrial depende da aldosterona, que ativa a NADPH oxidase e promove prejuízos na captação e sinalização de Ca<sup>2+</sup>, reduzindo expressão de proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial causando redução da contratilidade miocárdica em ratas Ovx.

Nosso estudo demonstrou que mais um componente do SRAA se mostra ativo no processo de redução da contratilidade miocárdica em ratas Ovx. A aldosterona participa no aumento de estresse oxidativo mitocondrial através da ativação da NADPH oxidase. A literatura descreve que em ratas Ovx a NADPH oxidase é ativada, quando a angio II, se liga ao receptor AT<sub>1</sub> que é um dos componentes do SRAA, aumentando a produção de EROs, reduzindo a contratilidade miocárdica [85, 149].

Observamos que a redução da contratilidade miocárdica nas ratas com deficiência de estradiol (Ovx) ocorreu devido ao aumento na produção de EROs, redução de Serca 2a, proteína envolvida na captação de Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos, e das proteínas mitocondriais envolvidas na sinalização de Ca<sup>2+</sup> que são as CyPD e MCU, e os tratamentos por 60 dias com apocinina e/ou espironolactona preveniram a redução da contratilidade nas ratas Ovx.

Nas ratas ovariectomizadas e tratadas por 60 dias com apocinina o peso corporal se mostrou reduzido quando comparado as ratas ovariectomizadas, o que está em conformidade com os estudos de Sutham et al, 2018 e Jiang et al 2011, que mostraram que a obesidade está relacionada com um *upregulation* da NADPH oxidase [150, 151] e Meng et al, 2011 demonstraram que o tratamento com apocinina em camundongos submetidos a uma dieta rica em gordura apresentou um efeito antioxidante e reduziu o ganho de peso desses animais na quinta semana de tratamento [152]. O tratamento com espironolactona não foi capaz de reduzir o peso das ratas Ovx tratadas por 60 dias.

O aumento na atividade da NADPH oxidase está relacionado com a idade. Ratos wistar com 21 meses de idade submetidos a isquemia apresentaram redução na função miocárdica, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, além de apresentarem um aumento na expressão da angiotensina I endotelial [153]; No presente estudo foi demonstrado que a ovariectomia causa efeitos deletérios no acoplamento excitação contração cardíaco [84, 85, 154] e o tratamento por 60 dias com Apocinina ou Espironolactona aumentou a força basal do músculo cardíaco que se mostrou reduzida após ovariectomia.

Valdés e colaboradores em 2018 relataram que em ratos com idade avançada (20-24 meses), a contratilidade miocárdica, que se mostrou reduzida em resposta ao agonista β adrenérgico isproterenol, foi restaurada quando usaram os inibidores da Nox, apocinina e VAS 2870. Os autores relataram aumento na amplitude do [Ca<sup>2+</sup>]*i* e redução na sensibilidade dos miofilamentos dos cardiomiócitos ao Ca<sup>2+</sup> quando comparados aos ratos jovens (≈ 5 meses) [155]. Em nosso estudo mostramos que a apocinina aumentou a força contrátil do músculo cardíaco em reposta ao cálcio e ao isoproterenol e tal força contrátil estava reduzida pela ovariectomia.

O SRAA funciona como uma cascata endócrina que regula a homeostase dos eletrólitos e da pressão arterial [156]. O mineralocorticóide aldosterona, é conhecido por promover fibrose cardíaca, hipertrofia, morte celular e é um importante sinalizador de estresse oxidativo [157, 158, 159]. Nosso estudo mostrou que o antagonista dos receptores de mineralocorticóide (MR), espironolactona, aumentou a contratilidade miocárdica que foi reduzida pela ovariectomia. Em corações humanos a aldosterona induz uma resposta inotrópica negativa [160], o que pode levar a redução da contratilidade miocárdica.

Bupha e Wattanapermpool em 2006 foram os primeiros a demonstrar que a ovariectomia reduz a expressão da Serca-2a em cardiomiócitos de ratas [161] e foram seguidos por Paigel et al em 2011 [84] e Ribeiro Júnior em 2012 [85]. Nosso estudo está em conformidade com os estudos citados, pois a expressão da Serca-2a estava reduzida e os tratamentos com apocinina e espironolactona foram capazes de tornar tal expressão semelhante a das ratas Sham. Em 2010 Liu et al [162] mostraram que o tratamento com apocinina reverteu a redução na expressão da Serca-2a em cardiomiócitos de coelhos que sofreram falência cardíaca, além de reduzir a produção de EROs, melhorando a disfunção cardíaca.

O tratamento com espironolactona também foi capaz de aumentar a expressão da Serca -2a, que estava reduzida nos animais Ovx. Nosso resultado foi controverso ao de Cittatini e colaboradores, que em 2003, demonstraram que em ratos com infarto moderado e que receberam o metabólito ativo da espironolactona, não houve diferença na redução da expressão da Serca-2a [163], tal diferença pode ser atribuída a fatores como a dosagem do fármaco que foi diferente, a forma preventiva que utilizamos o tratamento onde os animais Ovx após se recuperarem da cirurgia foram tratados com espironolactona. Em 2008 Hayashi e colaboradores estudaram se a aldosterona ativaria de forma não genômica a produção de EROs pela NADPH oxidase, e se causaria apoptose nos cardiomiócitos de ratos, eles relataram que a aldosterona não precisa afetar proteínas nucleares para apresentar seus efeitos deletérios, sua ação apoptótica é mais rápida do que se imaginava e estava associada a ativação da ASK1 (Quinase 1 Sinalizadora de Apoptose), e quando o grupo utilizou um antagonista de receptores de mineralocorticoide, tal fármaco apresentou um efeito antioxidante funcionando como um varredor de radicais livres, inibindo a atividade da ASK1 e consequentemente inibindo a apoptose [164].

Nas células H9c2 (cardiomiócitos embrionárias de ratos) estimuladas com o agonista βadrenérgico isoproterenol ocorreu um aumento do estresse oxidativo, apoptose e aumentou a expressão de Nox 4, quando tais células foram submetidas a um prétratamento com apocinina, o aumento do estresse oxidativo foi extinto [165]. Em nosso estudo observamos uma redução na expressão da Nox4 no tecido cardíaco nas ratas ovariectomizadas tratadas com apocinina, visto que, nos animais ovariectomizados não tratados tal expressão estava aumentada, o que confirma um aumento na produção de estresse oxidativo em animais ovariectomizados, nossos resultados estão em conformidade com o estudo de Miller e colaboradores, que em 2007, revelou um aumento na expressão de Nox4 e aumento no estresse oxidativo em artérias cerebrais de ratas ovariectomizadas [166].

O mesmo resultado foi encontrado quando as ratas Ovx foram tratadas com espironolactona, ocorreu uma redução na expressão de Nox4 e em 2009 Tada et al [167], descreveu um aumento na expressão de Nox4 em animais Ovx e o tratamento com eplerenona que também é um antagonista de receptores de mineralocorticóides por 3 meses aboliu o aumento na expressão de Nox4.

Em animais Ovx que foram sacrificados 10 semanas após cirurgia, Dunay e autores em 2015 concluíram que a ovariectomia prejudicou a recaptação miocárdica de Ca<sup>2+</sup> através do aumento na expressão da PLB que suprimiu a atividade da Serca 2a [168]. Em nossos achados, a expressão de PLB estava aumentada nas fêmeas Ovx e o tratamento com apocinina por 60 dias suprimiu o aumento na expressão da PLB. No coração, a PLB tem um papel importante no acoplamento excitação contração, pois ela tem como função inibir a Serca-2a, e sua fosforilação aumenta a recaptação de Ca<sup>2+</sup> pela Serca-2<sup>a</sup>, contribuindo para o relaxamento [60, 169], o que pode justificar a redução da contratilidade em resposta ao cálcio das ratas Ovx em nosso experimento.

Como esperado, o presente estudo demonstrou um aumento na produção de ânion superóxido no tecido cardíaco das ratas Ovx, o que é confirmado com a redução das enzimas antioxidantes [170, 171] tais como a SOD e catalase observada em nossos experimentos, produzindo então um desequilíbrio no sistema antioxidante, podendo causar dano celular, porém, os tratamentos com apocinina e/ou espironolactona foram capazes de reduzir a produção de ânion superóxido, confirmando seu(s) efeito(s) antioxidante(s).

O estudo publicado por Morra e colaboradores em 2019 [145], mostrou que a privação de hormônio sexual feminino levou a mudanças na estrutura das mitocôndrias, afetou a bioenergética celular, comprometendo a função dos cardiomiócitos. As mitocôndrias são organelas que tem como principal função produzir ATP que é fonte de energia para funcionalidade dos órgãos, tal função é regulada por meio de vias de sinalização que envolvem o Ca<sup>2+</sup> e EROs [172].

Em nossos resultados, observamos que existe um prejuízo na respiração das subpopulações mitocondriais das ratas Ovx, e tal prejuízo foi constatado quando utilizamos os substratos específicos aos complexos I e II da CTE (glutamato + malato, piruvato + malato e palmitoil-L-carnitina) participantes da função respiratória no cardiomiócito, tal fato já havia sido relatado em outros estudos com o mesmo modelo animal [145, 173]. O tratamento preventivo com Apocinina e/ou espironolactona restaurou a função respiratória mitocondrial, pelo fato de que as mitocôndrias têm função mecanosensitivas ao estiramento do músculo cardíaco e de uma forma não clara ativa a NADPH oxidase e a apocinina reduz a produção de EROs provocada pelo estiramento [174]; E em cardiomiócitos a espironolactona reduziu a produção de EROs mitocondrial induzida pela aldosterona [175] corroborando com os nossos resultados onde o tratamento com espironolactona apresentou ação antioxidante no tecido cardíaco das ratas Ovx.

Parte da produção de EROs mitocondrial ocorrem nos complexos I e III, que em condições de normalidade é rapidamente transformado em peróxido de hidrogênio, porém a redução de co-ativadores de transcrição mitocondrial tais como o PGC1α, levam a diminuição dos processos de fusão mitocondrial, que é a união e troca de material genético de duas ou mais mitocôndrias tendo a finalidade de promover reparo dispersando as mutações genéticas e fissão mitocondrial que é a divisão de uma mitocôndria em duas ou mais [176].

Observa-se em nossos resultados que a expressão de PGC1α está reduzida nas Ovx o que sinaliza um comprometimento de material genético mitocondrial, tal resultado foi observado em pacientes com isquemia e/ou falência cardíacas [177], e os tratamentos com apocinina e espironolactona foram capazes de aumentar a expressão de PGC1α

melhorando a biogênese mitocondrial, corroborando com nossos achados, Espinoza et al., em 2017, publicou um estudo em que células musculares com aumento de EROs estimulado por cortisol, ao serem exposta a apocinina ocorreu uma redução na produção de EROs [178], o que ocorreu também nos animais Ovx tratados com espironolactona; Um fato semelhante ocorreu em um estudo realizado por Ibarrola e colaboradores em 2018, onde os mesmos utilizaram biópsia de miocárdio de pacientes com estenose aórtica e estimularam com aldosterona 42 horas e 72 horas após o preparo das células, quando antagonizaram o efeito da aldosterona com espironolactona nos dois tempos a expressão de PGC1α que estava reduzida aumentou, provando que a espironolactona interferiu positivamente na disfunção mitocondrial causada pelo aumento de estresse oxidatvio [179].

As calpainas são proteases citosólicas ativadas pelo aumento das concentrações de Ca<sup>2+</sup> no citosol, sendo responsáveis pela degradação das proteínas contráteis e citosólicas, portanto a não degradação dos cardiomiócitos dependem da regulação do transiente de Ca<sup>2+</sup> que é feito pela Serca-2a, sendo uma proteína transportadora de Ca<sup>2+</sup> para o RS dependente de ATP [180] é plausível afirmar então que uma redução na expressão do Tfam provoca uma redução na expressão de Serca 2a, reduz a captação de Ca<sup>2+</sup> para o RS aumento o Ca<sup>2+</sup> citosólico e ativa proteases, em nossos resultados observou-se tanto uma redução na expressão da Serca-2a, quanto uma redução na expressão do Tfam, o que nos leva a entender que a redução na contratilidade miocárdica encontrada nas ratas Ovx, é em parte resultado da expressão de Serca-2a e Tfam reduzidas. Em 2011 Watanabe et al., descreveu que a expressão de ambas proteínas está reduzida nas cardiomiopatias [181].

O tratamento com apocinina aumentou a expressão de Tfam e de Serca 2a, melhorando o prejuízo na biogênese mitocondrial, contribuindo para a prevenção da redução da contratilidade miocárdica encontrada nas ratas Ovx ; o mesmo resultado encontramos quando tratamos os animais Ovx com espironolactona confirmando que o antagonismo da aldosterona de forma preventiva pode melhorar a contratilidade miocárdica, nossos resultados são corroborados por Zhao et al 2010, que demonstrou que em cães com modelo de fibrilação atrial e que sofreram estimulação o tratamento preventivo com espironolactona preveniu apoptose e fibrose atrial [182].

A ovariectomia aumentou a carbonilação das proteínas mitocondriais tanto em IFM como em SSM, sinalizando para um aumento de estresse oxidativo, que foi suprimido com os tratamentos com apocinina e/ou espironolactona [183].

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostraram que a privação de hormônio sexual feminino causou danos ao metabolismo energético mitocondrial, levando a redução da contratilidade miocárdica, essa redução foi evidente nos animais Ovx que apresentaram maior produção de EROs; A produção de EROs ocorreu em grande parte pela ativação do SRAA e NADPH oxidase e os tratamentos preventivos com Apocinina e Espironolactona foram capazes de inibir o estresse oxidativo funcionando como antioxidante.

## 7. REFERÊNCIAS

[1] American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics 2018 At-a-Glance

[2] Czubryt MP, Espira L, Lamoureux L et al. The role of sex in cardiac function and disease. Can J Physiol Pharmacol 2006;84(1):93-109.

[3] Stampfer et al., Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Tenyear follow-up from the nurses' health study. N Engl J Med. 1991;325(11):756-62.

[4] Barp J, Araujo AS, Fernandes TR, et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. Braz J Med Biol 2002;35(9):1075-81.

[5] Borras C, Gambini J, Vina J. Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. Front Biosci 2007;12:1008-1013.

[6] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Em 2017, expectativa de vida era de 76 anos. https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-no

[7] World Health Organization (WHO)– Global Health Observatory (GHO). Life Expectancy https://www.who.int/gho/mortality\_burden\_disease/life\_tables/situation\_trends\_text/en/.

[8] Polotsky HN, Polotsky AJ. Metabolic implications of menopause. Seminars in reproductive medicine 2010;28(5):426-34.

[9] Matthews KA, El Khoudary SR, Brooks MM, Derby CA et al. Lipid Changes around the Final Menstrual Period Predict Carotid Subclinical Disease in Postmenopausal Women. Stroke 2017;48(1):70-76.

[10] Maiello M, Zito A, Ciccone MM, Palmiero P. How aortic stiffness in postmenopausal women is related to common cardiovascular risk factors. Cardiol Res Pract 2014;2014:2160.

[11] Stice JP, Eiserich JP, Knowlton AA. Role of aging versus the loss of estrogens in the reduction in vascular function in female rats. Endocrinology 2009;150(1):212-9.

[12] Lebrun CE, van der Schouw YT, Bak AA, de Jong FH et al. Arterial stiffness in postmenopausal women: determinants of pulse wave velocity. J Hypertens 2002;(11):2165-72.

[13] Berger JS, McGinn AP, Howard BV, Kuller L et al. Lipid and lipoprotein biomarkers and the risk of ischemic stroke in postmenopausal women. Stroke 2012;43(4):958-66.

[14] Demel SL, Kittner S, Ley SH, McDermott M, Rexrode KM. Stroke Risk Factors Unique to Women. Stroke 2018;49(3):518-523.

[15] Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization; 2012. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global\_\_burden\_disease/en/

[16] Simoni RD, Hill RL, Vaughan M. The Discovery of Estrone, Estriol, and Estradiol and the Biochemical Study of Reproduction. The Work of Edward Adelbert Doisy. J Biol Chem 2002;277:28.

[17] Alexander IM. The history of hormone therapy use and recent controversy related to heart disease and breast cancer arising from prevention trial outcomes. J Midwifery Womens Health 2012;57(6):547-557.

[18] Burkman, R. T., Collins, J. A., and Greene, R. A. Current perspectives on benefits and risks of hormone replacement therapy. Am J Obstet Gynecol 2001;185 Suppl 2:S13-S23.

[19] Mack TM, Pike MC, Henderson BE, Pfeffer RI. Estrogens and endometrial cancer in a retirement community. N Engl J Med 1976;294(23):1262-7.

[20] Smith DC, Prentice R, Thompson DJ, Herrmann WL. Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. N Engl J Med 1975;293(23):1164-7.

[21] Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. JAMA 2002. pp. 321–333.

[22] Beral V; Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. Lancet 2003;362(9382):419-27.

[23] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA 2002;288(3):321-333.

[24] Faber A, Bouvy ML, Loskamp L, van de Berg PB et al. Dramatic change in prescribing of hormone replacement therapy in The Netherlands after publication of the Million Women Study: a follow-up study. Br J Clin Pharmacol 2005;60(6):641-7.

[25] John A Goldman. The Women's Health Initiative 2004 - Review and Critique. MedGenMed 2004;6(3): 65.

[26] James H. Clark. A critique of Women's Health Initiative Studies (2002-2006). Nucl Recept Signal 2006;4: e023.

[27] World Health Organization | Female life expectancy: https://www.who.int/gho/women\_and\_health/mortality/situation\_trends\_life\_expectancy/en/

[28] WHO | Cardiovascular diseases (CVDs) - World Health Organization: https://www.who.int/cardiovascular\_diseases/en/

[29] Knowlton AA, Korzick DH. Estrogen and the Female Heart. Mol Cell Endocrinol 2014 389(1-2): 31–39.

[30] Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(8):4686-91.

[31] Mendelsohn ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. Am J Cardiol 2002;90(1A):3F-6F.

[32] Kulpa J, Chinnappareddy N, Pyle WG. Rapid changes in cardiac myofilament function following the acute activation of estrogen receptor-alpha. PLoS One 2012;7(7):e41076.

[33] Hutson DD, Gurrala R, Ogola BO, et al. Estrogen receptor profiles across tissues from male and female Rattus norvegicus. Biol Sex Differ 2019;10:4.

[34] Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. J Clin Invest 2006;116(3):561-70.

[35] Segars JH, Driggers PH. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. Trends Endocrinol Metab 2002;13(10):422–427.

[36] Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, et al. Mitochondrial localization of estrogen receptor  $\beta$ . PNAS 2004;101(12):4130-4135.

[37] Pedram A, Razandi M, Lubahn D, Liu J, et al. Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin. Endocrinology 2008; 149(7):3361-9.

[38] Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, Sastre J. 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. Aging Cell 2005;4(3):113-8.

[39] Alexaki VI, Charalampopoulos I, Kampa M, Hatzoglou A, et al. Activation of membrane estrogen receptors induce pro-survival kinases. J. Steroid Biochem. Mol Biol 2006;98(2-3):97-100.

[40] Arnal JF, Lenfant F, Metivier R, Flouriot G, et al. Membrane and nuclear estrogen receptor alpha actions: from tissue specificity to medical implications. J. Physiol Rev 2017; 97:1045-1087.

[41] Deschamps AM, Murphy E. Activation of novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009;297: H1806-13.

[42] Feng Y, Madungwe NB, da Cruz Junho CV, Bopassa JC. Activation of G proteincoupled oestrogen receptor 1 at the onset of reperfusion protects the myocardium against ischemia/reperfusion injury by reducing mitochondrial dysfunction and mitophagy. Br J Pharmacol 2017;174(23): 4329-4344.

[43] Moens SJB, Schnitzler GR, Nickerson M, Guo H, et al. Rapid estrogen receptor signaling is essential for the protective effects of estrogen against vascular injury. Circulation 2012;126(16):1993-2004.

[44] Gebeily GE, Khoury NE, Mathieu S, Brouillette J, Fiset C. Estrogen regulation of the transient outward K+ current involves estrogen receptor  $\alpha$  in mouse heart. J Mol Cell Cardiol 2015;86:85-94.

[45] Fares E, Parks RJ, MacDonald JK, Egar JMS, Howlett SE. Ovariectomy enhances SR Ca2+ release and increases Ca2+ spark amplitudes in isolated ventricular myocytes. J Moll Cell Cardiol 2012;52(1):32-42.

[46] Nuedling S, Karas RH, Mendelsohn ME, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Activation of estrogen receptor beta is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. FEBS Lett 2001;502(3):103-8.

[47] Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Sukovich D et al. Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. J Clin Invest 1997; 99(10):2429-37.

[48] Wong PG, Armstrong DW, Tse MY, Brander EP, Panq SC. Sex-specific differences in natriuretic peptide and nitric oxide synthase expression in ANP gene-disrupted mice. Mol Cell Biochem 2013; 374(1-2):125-35.

[49] Sun J, Picht E, Ginsburg KS, Bers DM et al. Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca2+ channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. Circ Res 2006;98(3):403-11.

[50] Xu Z, Ji X, Boysen PG. Exogenous nitric oxide generates ROS and induces cardioprotection: involvement of PKG, mitochondrial KATP channels, and ERK. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004;286(4):H1433-40.

[51] Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. Science 2003;299(5608):896-9.

[52] Piantadosi CA, Suliman HB. Redox regulation of mitochondrial biogenesis. Free Radic Biol Med 2012; 53(11):2043-53.

[53] Castardo-de-Paula JC, de Campos BH, Amorim EDT, da Silva RV. Cardiovascular risk and the effect of nitric oxide synthase inhibition in female rats: The role of estrogen. Exp Gerontol 2017;97:38-48.

[54] Farrell SR, Ross JL, Howlett SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitationcontraction coupling in rat ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010;299(1):H36-45.

[55] Soltis AR, Saucerman JJ. Synergy between CaMKII substrates and  $\beta$ -adrenergic signaling in regulation of cardiac myocyte Ca(2+) handling. Biophys J 2010;99(7):2038-47.

[56] Chase A, Colyer J, Orchard CH. Localised Ca channel phosphorylation modulates the distribution of L-type Ca current in cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol 2010;49(1):121-31.

[57] Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C. Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. Cardiovasc Res 2005;65(1):148-57. [58] Keller KM, Howlett SE. Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart. Can J Cardiol 2016;32(9):1065-73.

[59] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature 2002;415(6868):198-205.

[60] Petrovic MM, Vales K, Putnikovic B, Djulejic V, Mitrovic DM. Ryanodine receptors, voltage-gated calcium channels and their relationship with protein kinase A in the myocardium. Physiol Res 2008;57(2):141-9.

[61] Lanner JT, Dimitra K, Joshi AD, Hamilton SL. Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2(11):a003996.

[62] Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. Annu Rev Physiol 2008; 70:23-49.

[63] Ginsburg KS, Bers DM. Modulation of excitation–contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca<sup>2+</sup> load and Ca<sup>2+</sup> current trigger. J Physiol 2004; 556(Pt 2):463–480.

[64] Shutt RH, Howlett SE. Hypothermia increases the gain of excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes. Am. J. Physiol 2008;295:C692-700.

[65] Sun YB, Lou F, Irving M. Calcium- and myosin-dependent changes in troponin structure during activation of heart muscle. J Physiol 2009;587(1):155-63.

[66] Reuter H, Pott C, Goldhaber JI, Henderson SA, Philipson KD et al. Na (+) --Ca2+ exchange in the regulation of cardiac excitation-contraction coupling. Cardiovasc Res 2005;67(2):198-207.

[67] Guatimosim S, Dilly K, Santana LF, Saleet Jafri M, Sobie EA et al. Local Ca(2+) signaling and EC coupling in heart: Ca(2+) sparks and the regulation of the [Ca(2+)](i) transient. J Mol Cell Cardiol 2002; 34(8):941-50.

[68] Zalk R, Lehnart SE, Mark AR. Modulation of the Ryanodine Receptor and Intracellular Calcium. Annu Rev Biochem 2007;76:367-85.

[69] Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergicinduced acceleration of cardiac relaxation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;278(3):H769-79.

[70] Wattanapermpool J, Riabroy T, Preawnim S. Estrogen supplement prevents the calcium hypersensitivity of cardiac myofilaments in ovariectomized rats. Life Sci 2000; 66(6):533-43.

[71] Bupha-Intr T, Wattanapermpool J, Peña JR, Wolska BM, Solaro RJ. Myofilament response to Ca2+ and Na+/H+ exchanger activity in sex hormone-related protection of cardiac myocytes from deactivation in hypercapnic acidosis. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007;292(2):R837-43.

[72] Parks RJ, Howlett SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitationcontraction coupling. Pflugers Arch 2013;465(5):747-63.

[73] Nakagawa M, Ooie T, Takahashi N, Taniguchi Y, Anan F et al. Influence of menstrual cycle on QT interval dynamics. Pacing Clin Electrophysiol 2006;29(6):607-13.

[74] Saito T, Ciobotaru A, Bopassa JC, Toro L. Estrogen contributes to gender differences in mouse ventricular repolarization. Circ Res 2009;105(4):343-52.

[75] Buitrago C, Massheimer V, de Boland AR. Acute modulation of Ca2+ influxo n rat heart by 17beta-estradiol. Cell Signal 2000;12(1):47-52.

[76] Ropero AB, Eghbali M, Minosyan TY, Tang G et al. Heart estrogen receptor alpha: distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen. J Mol Cell Cardiol 2006;41(3):496-510.

[77] Chidambaram M, Duncan JA, Lai VS, Cattran DC, Floras JS et al. Variation in the renin angiotensin system throughout the normal menstrual cycle. J Am Soc Nephrol 2002;13(2):446-52.

[78] Zimmerman MA, Sullivan JC. Hypertension: what's sex got to do with it? Physiology (Bethesda) 2013;28(4):234-44.

[79] Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. Gender and the renin-angiotensinaldosterone system. Fundam Clin Pharmacol 2010;24(6):687-9.

[80] Nabeebaccus A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases and cardiac remodelling. Heart Fail Rev 2011;16(1):5-12.

[81] Krijnen PA, Meischl C, Hack CE, Meijer CJ et al. Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction. J Clin Pathol 2003;56(3):194-9.

[82] MacLellan WR, Wang Y, Lusis AJ. Systems-based approaches to cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol 2012;9(3):172-84.

[83] Hart EC, Charkoudian N, Miller VM. Sex, Hormones and Neuroeffector Mechanisms. Acta Physiol (Oxf) 2011;203(1):155-65.

[84] Paigel AS, Ribeiro RF Jr, Fernandes AA, Tarqueta GP et al. Myocardial contractility is preserved early but reduced late after ovariectomy in young female rats. Reprod Biol Endocrinol 2011;9:54.

[85] Ribeiro RF Jr, Pavan BMM, Potratz FF, Fiorim J et al. Myocardial Contractile Dysfunction Induced by Ovariectomy Requires AT1 Receptor Activation in Female Rats. Cell Physiol Biochem 2012;30(1):1-12.

[86] Macova M, Armando I, Zhou J, Baiardi G et al. Estrogen reduces aldosterone, upregulates adrenal angiotensin II AT2 receptors and normalizes adrenomedullary Fra-2 in ovariectomized rats. Neuroendocrinology 2008;88(4):276-86.

[87] Ribeiro RF Jr, Potratz FF, Pavan BMM, Forechi L et al. Carvedilol Prevents Ovariectomy-Induced Myocardial Contractile Dysfunction in Female Rat. PLoS One 2013;8(1):e53226.

[88] Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. Cardiovasc Res 2006;71(2):310-21.

[89] Kaneko M, Elimban V, Dhalla NS. Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca2+ pump by oxygen free radicals. Am J Physiol 1989;257(3 Pt 2):H804-11.

[90] Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, O'Connell KA et al. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. Am J Physiol Heart Circ Physiol .2012;302(1):H167-79.

[91] Dikalova AE, Góngora MC, Harrison DG, Lambeth JD et al. Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010;299(3):H673-9.

[92] Hirschhäuser C, Bornbaum J, Reis A, Böhme S, Kaludercic N, Menabò R. NOX4 in Mitochondria: Yeast Two-Hybrid-Based Interaction with Complex I Without Relevance for Basal Reactive Oxygen Species? Antioxid Redox Signal 2015; 23(14): 1106–1112.
[93] Copper GM. Mitochondria-The Cell: A Molecular Approach. Sunderland (MA): Sinauer Associates 2000 Bookshelf.

[94] Friedman JR and Nunnari J. Mitochondrial form and function. Nature 2014;505(7483): 335–343.

[95] Murphy E, Ardehali H, Balaban RS, DiLisa F, Dorn GW 2nd et al. Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. Circ Res 2016;118(12):1960-91.

[96] Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 2014;(10):634-46.

[97] Javadov S. The calcium-ROS-pH triangle and mitochondrial permeability transition: challenges to mimic cardiac ischemia-reperfusion. Front Physiol 2015;6:83.

[98] Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? J Mol Cell Cardiol. 2009;46(6):821-31.

[99] Lindsay DP, Camara AK, Stowe DF, Lubbe R, Aldakkak M. Differential effects of buffer pH on Ca(2+)-induced ROS emission with inhibited mitochondrial complexes I and III. Front Physiol 2015;6:58.

[100] Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. J Biol Chem 1977; 252:8731-9.

[101] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. The Citric Acid Cycle-Biochemistry. New York: W H Freeman 2002 Bookshelf.

[102] Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. Nature 1967;213:137-9.

[103] Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. FEBS Lett 2003;546:355-8.

[104] Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. Cell Mol Life Sci 2014;71(14):2577-604.

[105] Hue L, Taegtmeyer H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;297(3): E578–E591.

[106] Brijs J, Sandblom E, Sundh H, Gräns A, Hinchcliffe J, Ekström A, Sundell K. Increased mitochondrial coupling and anaerobic capacity minimizes aerobic costs of trout in the sea. Sci Rep 2017;7:45778. [107] Sharma N, Okere IC, Brunengraber DZ, McElfresh TA, King KL, Sterk JP. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity and citric acid cycle intermediates during high cardiac power generation. J Physiol 2005;562(Pt 2):593-603.

[108] Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. Physiol Rev 2005;85:1093-129.

[109] Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. Nature 1967;213:137-9.

[110] Yang SH, Liu R. For the pursuit of oxygen and carbon dioxide channels in mitochondria. Med Gas Res 2016;6(4):237-238.

[111] Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966. Biochimica et biophysica acta 2011;1807(12):1507-38.

[112] Parker L. Metabolic and structural states of mitochondria. I. Regulation by adenosine diphosphate. J Biol Chem 1960;235:242-9.

[113] 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.

[114] Miriyala S, Spasojevic I, Tovmasyan A, Salvemini D, Vujaskovic Z, St. Clair et al. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. Biochim Biophys Acta 2012;1822(5): 794–8.

[115] Stanley WC, Dabkowski ER, Ribeiro RF Jr, O'Connell KA. Dietary fat and heart failure: moving from lipotoxicity to lipoprotection. Circ Res 2012;110(5):764-76.

[116] Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. Free Radic Biol Med 2011;51(7):1289-301.

[117] Xu Z, Ji X, Boysen PG. Exogenous nitric oxide generates ROS and induces cardioprotection: involvement of PKG, mitochondrial KATP channels, and ERK. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004;286(4):H1433-40.

[118] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. Cardiovasc Res 2004;61(3):372-85.

[119] Carreira RS, Lee Y, Ghochani M, Gustafsson AB, Gottlieb RA. Cyclophilin D is required for mitochondrial removal by autophagy in cardiac cells. Autophagy 2010;6(4):462-72.

[120] Mishra J, Jhun BS, Hurst S, O-Uchi J, Csordás G, Sheu SS. The Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter: Structure, Function and Pharmacology. Handb Exp Pharmacol 2017;240: 129–156.

[121] Yu Z, Chen R, Li M, Yu Y, Liang Y, Han F et al. Mitochondrial calcium uniporter inhibition provides cardioprotection in pressure overload-induced heart failure through autophagy enhancement. Int J Cardiol 2018;271:161-168.

[122] Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. Nature genetics 1998; 18(3):231–236.

[123] Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes & development 2000; 14(17):2123–2133.

[124] Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. J Clin Invest 2000;106: 847–856.

[125] Glenn C, Aihua Jiang, Zolt Arany. PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. Circ Res 2010; 107(7): 825–838.

[126] Bupha-Intr T, Wattanapermpool J. Regulatory role of ovarian sex hormones in calcium uptake activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006;291(3):H1101-8.

[127] Shanks J, Herring N, Johnson E, Liu K et al. Overexpression of Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2a Promotes Cardiac Sympathetic Neurotransmission via Abnormal Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Ca2+ Regulation. Hypertension 2017; 69(4):625-632.

[128] O'Hagan TS, Wharton W, Kehoe PG. Interactions between oestrogen and the renin angiotensin system - potential mechanisms for gender differences in Alzheimer's disease. Am J Neurodegener Dis 2012; 1(3): 266–279.

[129] Rosano G, Vitale C, Marazzi G, Volterrani M. Menopause and cardiovascular disease: the evidence. Climacteric 2007;10:19–24.

[130] Parker WH, Jacoby V, Shoupe D, Rocca W. Effect of bilateral oophorectomy on women's long-term health. Womens Health Lond Engl 2009;5:565–76.

[131] Xue B, Beltz TG, Guo F, Johnson AK. Sex differences in maternal gestational hypertension-induced sensitization of angiotensin II hypertension in rat offspring: the protective effect of estrogen. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2018;314(2):R274-R281.

[132] 15. Bittner V. Lipoprotein abnormalities related to women's health. Am J Cardiol 2002;90(8A):77i–84i.

[133] Knopp RH. Cardiovascular effects of endogenous and exogenous sex hormones over a woman's lifetime. Am J Obstet Gynecol 1988;158(6 Pt 2):1630–1643.
[134] Saha KR, Rahman MM, Paul AR, Das S. Changes in lipid profile of postmenopausal women. Mymensingh Med J 2013;22(4):706-11.

[135] Cífková R, Krajčoviechová A. Dyslipidemia and cardiovascular disease in women. Curr Cardiol Rep 2015;17(7):609. [136] Fortepiani LA, Zhang H, Racusen L, Roberts LJ 2nd, et al. Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. Hypertension 2003;41(3 Pt 2):640-5.

[137] Yanes LL, Romero DG, Iliescu R, Zhang H, Davis D, Reckelhoff JF. Postmenopausal hypertension: role of the Renin-Angiotensin system. Hypertension 2010;56(3):359-63.

[138] Lee SD, Kuo WW, Ho YJ, Lin AC et al. Cardiac Fas-dependent and mitochondriadependent apoptosis in ovariectomized rats. Maturitas 2008;61(3):268-77

[139] Fernández-Vega F, Abellán J, Vegazo O, De Vinuesa SG et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade to control blood pressure in postmenopausal women: influence of hormone replacement therapy. Kidney Int Suppl 2002;(82):S36-41.

[140] Giuberti K, Pereira RB, Bianchi PR, Paigel AS et al. Influence of ovariectomy in the right ventricular contractility in heart failure rats. Arch Med Res 2007;38(2):170-5.

[141] Rizzeti DA, Torres JGD, Escobar AG, Peçanha FM, Santos FW et al. Apocynin prevents vascular effects caused by chronic exposure to low concentration od Mercury. PLoS one 2013;8:e55806.

[142] Baldo MP, Zaniquelli D, Forechi L, Machado RC, Rodrigues SL, Mill JG. Effects of spironolactone in spontaneously hypertensive adult rats subjected to high salt intake CLINICS 2011;66(3):477-482.

[143] Vassallo DV, Lima EQ, Campagnaro P et al. Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. Pharmacol Res 1994;29(3):251-60.

[144] Rodrigues SM, Ximenes CF, de Batista PR, Simões FV. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. Toxicol Lett 2014;225(3):378-85.

[145] Morra EA, Rodrigues PL, Jesus CG, Do Val Lima PR et al. Endurance training restores spatially distincty cardiac mitochondrial function and myocardical contractility in ovariectomized rats. Free Radic Biol Med 2018; 130:174-180.

[146] Lowry OH, Rosebrough NJ, Faar AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.

[147] Ribeiro RF, Jr., Dabkowski ER, O'Connell KA, Xu W, Galvao TF, Hecker PA et al. Effect of a high-protein diet on development of heart failure in response to pressure overload. Appl Physiol Nutr Metab 2014;39:238-47.

[148] Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. Life Sci 2006;78(8):803-11.

[149] Hingtgen SD, Tian X, Yang J, Dunlay SM, Peek AS, Wu Y. Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. Physiol Genomics 2006;26(3):180-91.

[150] Sutham W, Sripetchwandee J, Minta W, Mantor D et al. Ovariectomy and obesity have a equal impact in causing mitochondrial dysfunction and impaired skeletal muscle contraction in rats. Menopause: The Journal of The North American Menopause Society. 2018 Vol. 25, No. 12, pp. 1448-145.

[151] Jiang F, Lim HK, Morris MJ, Prior L et al. Systemic upregulation of NADPH oxidase in dietinduced obesity in rats. Redox Rep. 2011;16(6):223-9.

[152] Meng R, Zhu DL, Bi Y, Yang DH, Wang YP. Antioxidative effect of apocynin on insulin resistance in high-fat diet mice. Ann Clin Lab Sci 2011;41(3):236-43.

[153] Oudot A, Martin C, Busseuil D, Vergely C et al. NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. Free Radic. Biol. Med 2006;40:2214–2222.

[154] Parks RJ, Bogachev O, Mackasey M, Ray G et al. The impact of ovariectomy on cardiac excitation-contraction coupling is mediated through cAMP/PKA-dependent mechanisms. J Mol Cell Cardiol 2017;111:51-60.

[155] Valdés Á, Treuer AV, Barrios G, Ponce N et al. NOX Inhibition Improves  $\beta$ -Adrenergic Stimulated Contractility and Intracellular Calcium Handling in the Aged Rat Heart. Int J Mol Sci 2018;19(8). [156] Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin - Angiotensin system revisited. J Intern Med 2008;264(3):224-36.

[157] Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R et al. Transgenic model of aldosteronedriven cardiac hypertrophy and heart failure. Circ Res 2003;93(1):69-76.

[158] Tsybouleva N, Zhang L, Chen S, Patel R et al. Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 2004;109(10):1284-91.

[159] Hayashi H, Kobara M, Abe M, Tanaka N et al. Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidasedependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. Hypertens Res 2008;31(2):363-75.

[160] Chai W, Garrelds IM, de Vries R, Batenburg WW et al. Nongenomic effects of aldosterone in the human heart: interaction with angiotensin II. Hypertension 2005;46(4):701-6.

[161] Bupha-Intr T, Wattanapermpool J. Regulatory role of ovarian sex hormones in calcium uptake activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006;291(3):H1101-8

[162] Liu Y, Huang H, Xia W, Tang Y et al. NADPH oxidase inhibition ameliorates cardiac dysfunction in rabbits with heart failure. Mol Cell Biochem 2010; 343:143–53.

[163] Cittadini A, Monti MG, Isgaard J, Casaburi C et al. Aldosterone receptor blockade improves left ventricular remodeling and increases ventricular fibrillation threshold in experimental heart failure. Cardiovasc Res 2003;58(3):555-64.

[164] Hayashi H, Kobara M, Abe M, Tanaka N et al. Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. Hypertens Res 2008;31(2):363-75.

[165] Theccanat T, Philip JL, Razzaque AM, Ludmer N, Li J, Xu X et al. Regulation of cellular oxidative stress and apoptosis by G protein-coupled receptor kinase-2; The role of NADPH oxidase 4. Cell Signal. 2016 Mar;28(3):190-203

[166] Miller AA, Drummond GR, Mast AE, Schmidt HH, Sobey CG. Effect of Gender on NADPH-Oxidase Activity, Expression, and Function in the Cerebral Circulation: Role of Estrogen. Stroke. 2007 Jul;38(7):2142-9.

[167] Tada Y, Kitazato KT, Tamura T, Yagi K et al. Role of mineralocorticoid receptor on experimental cerebral aneurysms in rats. Hypertension. 2009 Sep;54(3):552-7.

[168] Dunay GA, Paragi P, Sára L, Ács N et al. Depressed calcium cycling contributes to lower ischemia tolerance in hearts of estrogen-deficient rats. Menopause 2015;22(7):773-82.

[169] Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. Circ Res 2017;121(2):181-195.

[170] Almeida SA, Claudio ER, Mengal V, Oliveira SG et al. Exercise training reduces cardiac dysfunction and remodeling in ovariectomized rats submitted to myocardial infarction. PLoS One 2014;9(12):e115970.

[171] Claudio ERG, Endlich PW, Santos RL, Moysés MR, Bissoli NS, Gouvêa AS. Effects of Chronic Swimming Training and Oestrogen Therapy on Coronary Vascular Reactivity and Expression of Antioxidant Enzymes in Ovariectomized Rats. PLoS One 2013; 8(6): e64806.

[172] Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. Redox Biol 2015;6:260-271.

[173] Ribeiro Junior RF, Rodrigues PL, Morra EA, Ronconi KS et al. Estrogen regulates spatially distinct cardiac mitochondrial subpopulations. Mitochondrion 2017;35:87-96.

[174] Iribe G, Kaihara K, Yamaguchi Y, Nakaya M. Mechano-sensitivity of mitochondrial function in mouse cardiac myocytes. Prog Biophys Mol Biol 2017;130(Pt B):315-322.

[175] Nolly MB, Caldiz CI, Yeves AM, Villa-Abrille MC <sup>et al.</sup> The signaling pathway for aldosterone-induced mitochondrial production of superoxide anion in the myocardium. J Mol Cell Cardiol 2014;67:60-8.

[176] Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J 1973;134(3):707-16.

[177] Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C et al. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. J Am Coll Cardiol 2007;50(14):1362-9.

[178] Espinoza MB, Aedo JE, Zuloaga R, Valenzuela C et al. Cortisol Induces Reactive Oxygen Species Through a Membrane Glucocorticoid Receptor in Rainbow Trout Myotubes. J Cell Biochem 2017;118(4):718-725.

[179] Ibarrola J, Sadaba R, Martinez-Martinez E, Garcia-Peña A. Aldosterone Impairs Mitochondrial Function in Human Cardiac Fibroblasts via A-Kinase Anchor Protein 12. Sci Rep 2018;8(1):6801.

[180] French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL et al. Ischemia-reperfusioninduced calpain activation and Serca 2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006;290(1):H128-36.

[181] Watanabe A, Arai M, Koitabashi N, Niwano K et al. Mitochondrial transcription factors TFAM and TFB2M regulate Serca 2a gene transcription. Cardiovasc Res 2011;90(1):57-67.

[182] Zhao J, Li J, Li W, Li Y. Effects of spironolactone on atrial structural remodelling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. Br J Pharmacol 2010;159(8):1584-94.

[183] Di Zhang A, Nguyen Dinh Cat A, Soukaseum C, Escoubet B. Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling. Hypertension 2008;52(6):1060-7