



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Avaliação do metabolismo energético em hipocampo de ratas adultas submetidas à ovariectomia e/ou exercício físico

Cassiana Siebert

Orientadora: Profa. Dra. Angela T. S. Wyse

Porto Alegre

2014

I

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Avaliação do metabolismo energético em hipocampo de ratas adultas submetidas à ovariectomia e/ou exercício físico

Cassiana Siebert

Orientadora: Profa. Dra. Angela T. S. Wyse

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2014

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa Angela T. S. Wyse, pela oportunidade de fazer parte do seu maravilhoso grupo, pela orientação, pelos ensinamentos, amizade e confiança no meu trabalho.

À Deus por guiar os meus passos para sempre seguir em frente, apesar das adversidades.

Aos colegas e amigos do laboratório Fernanda Machado, Jana, Emi, Maira, Déia, Aline Cunha, Fê Vuaden, Samanta, Felipe, Edu Baggio, Helena, Eduardo Marques, Aline Longoni, Tiago Marcon, Tiago Herpich, Eduardo Liberato e Matheus, obrigada pela amizade, pelos conselhos e por todo auxílio na execução deste trabalho.

Aos meus amigos, especialmente às amigas que a faculdade me deu Amanda e Mariana, obrigada pela amizade, pelos conselhos, companheirismo e pelo incentivo constante. Obrigada por estarem comigo e tornarem Porto Alegre tão mais alegre.

Aos meus pais Celso e Dianeze, agradeço a dedicação que sempre tiveram comigo, o amor, o incentivo, o apoio, obrigada por acreditarem e investirem em mim.

Aos meus irmãos Rochele e Tiago, agradeço todo o amor, carinho, companheirismo.

Ao Prof. Clóvis e ao Rodrigo do laboratório 34, pela colaboração neste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de realizar este trabalho.

À CAPES e ao CNPq pela bolsa de estudos e por custear a pesquisa.

À todos vocês Muito Obrigada!

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”.

(Los Hermanos)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Menopausa.....	1
1.2	Metabolismo Energético	5
1.3	Creatina Cinase	6
1.4	Piruvato Cinase	8
1.5	Cadeia Respiratória e Fosforilação Oxidativa.....	9
1.6	Exercício Físico	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1	Animais e Reagentes.....	17
3.2	Tamanho da Amostra	17
3.3	Controle do Ciclo Estral.....	18
3.4	Modelo Experimental	18
3.5	Protocolo de Treinamento Físico.....	19
3.6	Protocolo Experimental.....	21
3.7	Estudos Bioquímicos	22
3.7.1	<i>Preparação das amostras.....</i>	<i>22</i>
3.7.2	<i>Determinação da atividade da piruvato cinase</i>	<i>23</i>
3.7.3	<i>Determinação da atividade da creatina cinase (frações citosólica e mitocondrial)</i>	<i>23</i>
3.7.4	<i>Determinação da atividade do complexo II.....</i>	<i>24</i>
3.7.5	<i>Determinação da atividade da succinato desidrogenase.....</i>	<i>24</i>
3.7.6	<i>Determinação da atividade da citocromo c oxidase.....</i>	<i>24</i>
3.7.7	<i>Determinação dos níveis de ATP</i>	<i>25</i>
3.7.8	<i>Determinação Protéica</i>	<i>25</i>
3.8	Análise Estatística	25
3.9	Aspectos éticos	25
4	RESULTADOS	27
4.1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
5	DISCUSSÃO.....	40

6	CONCLUSÕES.....	49
7	PERSPECTIVAS	50
8	REFERÊNCIAS	51

RESUMO

A redução na secreção de hormônios ovarianos, principalmente os estrógenos, é uma consequência da menopausa. Os estrógenos atuam principalmente como hormônios sexuais femininos, mas exercem também efeitos sobre diferentes sistemas fisiológicos, incluindo o sistema nervoso central. O tratamento normalmente utilizado para reduzir os sintomas da menopausa é a terapia hormonal, a qual parece ser eficaz no tratamento de sintomas, porém não está livre de efeitos adversos. Com base nisso, há uma crescente procura de terapias alternativas que minimizem os sinais e sintomas da menopausa. No presente estudo, investigamos o efeito da ovariectomia e/ou do exercício físico sobre as atividades das seguintes enzimas relacionadas ao metabolismo energético cerebral: creatina cinase (frações citosólica e mitocondrial), piruvato cinase, succinato desidrogenase, complexo II, citocromo c oxidase, bem como sobre os níveis de ATP em hipocampo de ratas. Ratas Wistar fêmeas adultas com noventa dias foram submetidas à ovariectomia (um modelo animal amplamente utilizado para mimetizar as alterações pós-menopausa). Trinta dias após o procedimento cirúrgico, as ratas foram submetidas ao protocolo de exercício, realizado em esteira adaptada para roedores, três vezes por semana, durante trinta dias. Doze horas após a última sessão de treinamento, os animais foram decapitados para posteriores análises bioquímicas. Os resultados mostraram que a ovariectomia não afetou as atividades da piruvato cinase, succinato desidrogenase e do complexo II, mas diminuiu as atividades da creatina cinase (frações citosólica e mitocondrial) e da citocromo c oxidase em hipocampo. Os níveis de ATP também foram reduzidos. O exercício físico foi capaz de reverter parcialmente apenas o declínio na atividade da creatina cinase fração citosólica. A falta de efeito do exercício sobre os outros parâmetros analisados não é clara, o tempo do treinamento pode não ter sido suficiente para promover uma adaptação do sistema de energia. Os resultados deste estudo sugerem que a deficiência estrogênica, que ocorre como resultado da ovariectomia, afeta os sistemas de geração e homeostase energética em hipocampo de ratas Wistar fêmeas adultas, contribuindo para a disfunção neuronal que pode ser observada na menopausa.

Palavras-chave: modelo experimental de menopausa, ovariectomia, homeostase energética, níveis de ATP, exercício físico

ABSTRACT

The reduction in the secretion of ovarian hormones, principally estrogen, is a consequence of menopause. Estrogens act primarily as female sex hormones, but also exert effects on different physiological systems including the central nervous system. The treatment normally used to reduce the symptoms of menopause is the hormone therapy, which seems to be effective in treating symptoms, although it may be responsible for adverse effects. Based on this, there is an increasing demand for alternative therapies that minimize signs and symptoms of menopause. In the present study, we investigated the effect of ovariectomy and/or physical exercise on the following activities related to brain energy metabolism enzymes: creatine kinase (cytosolic and mitochondrial fractions), pyruvate kinase, succinate dehydrogenase, complex II, cytochrome c oxidase, as well as on ATP levels in the hippocampus of adult rats. Adult female Wistar rats with 90 days of age were subjected to ovariectomy (an animal model widely used to mimic the postmenopausal changes). Thirty days after the procedure, the rats were submitted to the exercise protocol, which was performed in treadmill adapted for rodents three times a week for thirty days. Twelve hours after the last training session, the rats were decapitated for subsequent biochemical analyzes. Results showed that ovariectomy did not affect the activities of pyruvate kinase, succinate dehydrogenase and complex II, but decreased the activities of creatine kinase (cytosolic and mitochondrial fractions) and cytochrome c oxidase in hippocampus of adult female rats. ATP levels were also reduced. Exercise was only able to partially reverse the activity of creatine kinase cytosolic fraction. The lack of effect of exercise on the other parameters analyzed is not clear, the training time may not have been sufficient to promote adaptation of the energy system. The results of this study suggest that estrogen deficiency that occurs as a result of ovariectomy affects production systems and energy homeostasis in the hippocampus of adult female Wistar rats, contributing to neuronal dysfunction which can be observed in menopause.

Keywords: experimental model of menopause, ovariectomy, energy homeostasis, ATP levels, physical exercise

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
CK	creatina cinase
CK-BB	creatina cinase citosólica cerebral
CK-MB	creatina cinase citosólica cardíaca
CK-Mi	creatina cinase mitocondrial
CK-Mi_s	creatina cinase mitocondrial sarcomérica
CK-Mi_u	creatina cinase mitocondrial ubíqua
CK-MM	creatina cinase citosólica muscular
DNA	ácido desoxirribonucleico
ERE	elemento de resposta estrogênica
FADH₂	flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FSH	hormônio folículo estimulante
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
LH	hormônio luteinizante
mRNA	RNA mensageiro
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
OVX	ovariectomia
PCr	fosfocreatina
PEP	fosfoenolpiruvato
Pi	fosfato inorgânico
PK	piruvato cinase

RE	receptor estrogênico
REα	receptor estrogênico alfa
REβ	receptor estrogênico beta
SDH	succinato desidrogenase
SNC	sistema nervoso central
TRH	terapia de reposição anormal

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e mecanismos de retrocontrole.....	2
Figura 2. Reação catalisada pela creatina cinase	8
Figura 3. Reação catalisada pela PK.....	9
Figura 4. Fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa.....	12

Materiais e Métodos

Figura 5. Cronologia dos procedimentos experimentais.....	21
--	----

Resultados

Figure 1. Timeline of experimental procedures.....	32
Figure. 2 Effect of ovariectomy and physical exercise on activities of CK cytosolic fraction (A) and CK mitochondrial fraction (B) in hippocampus of female adult rats.	33
Figure. 3 Effect of ovariectomy and physical exercise on PK activity in the hippocampus of female adult rats.	34
Figure. 4 Effect of ovariectomy and physical exercise on activities of SDH (A), Complex II (B) and COX in hippocampus of female adult rats.....	34
Figure. 5 Effect of ovariectomy and physical exercise on ATP levels in hippocampus of female adult rats.	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 Menopausa

Com o passar da idade, o sistema reprodutivo feminino sofre mudanças, que levam à interrupção permanente do ciclo menstrual. A redução da secreção hormonal que ocorre nesse período, incluindo dos estrógenos, resulta na interrupção das habilidades reprodutivas feminina, dando início à menopausa (Bellantoni e Blackman, 1996; Wise, 2001), que pode ocorrer em mulheres de forma natural em torno dos 50 anos de idade (World Health Organization, 2009), ou de forma induzida por cirurgia, quimioterapia ou radioterapia (Edwards e Li, 2013; O'Bryant et al., 2003; World Health Organization, 1996). Dentre as mudanças mais notáveis deste período estão a falência ovariana definitiva, a redução significativa dos níveis hormonais ovarianos e a amenorreia (Bellantoni e Blackman, 1996).

A menopausa é uma condição do envelhecimento normal da mulher, e pode ou não ser acompanhada de sintomas (Edwards e Li, 2013). A maior parte das mulheres que se aproximam da menopausa apresentará sintomas físicos e psicológicos nos próximos anos, levando a uma perda de qualidade de vida (O'Bryant et al., 2003; Soules et al., 2001). Além disso, estudos indicam que a menopausa pode estar associada com o aumento do risco para doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, por exemplo (Davey, 2013; Vest e Pike, 2013).

Os ovários de mulheres adultas que possuem um ciclo reprodutivo normal secretam hormônios esteroides (estrógenos e progesterona) e hormônios não

esteroides (ativinas, inibinas e folistatinas) (Burger et al., 2007; Messinis, 2006). Essa liberação é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, através da secreção de gonadotrofinas hipofisárias: o hormônio luteinizante (LH), e o hormônio folículo estimulante (FSH), os quais estão sob o controle da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que é produzido e liberado pelo hipotálamo (Messinis, 2006). Um mecanismo de regulação importante do GnRH é realizado pelas substâncias ovarianas e pelas gonadotrofinas da corrente sanguínea através do mecanismo de retroalimentação negativa e positiva (Messinis, 2006) (Figura 1). A transição para a menopausa engloba mudanças como a elevação do FSH, e nos ovários ocorre o esgotamento dos folículos ovarianos, baixando a concentração de estrógenos na circulação (Burger et al., 2007; Soules et al., 2001), dessa forma, neste período, devido às baixas concentrações de estrógenos, progesterona e substâncias não esteroidais características da menopausa, o mecanismo de regulação por retroalimentação é extinto (Messinis, 2006).

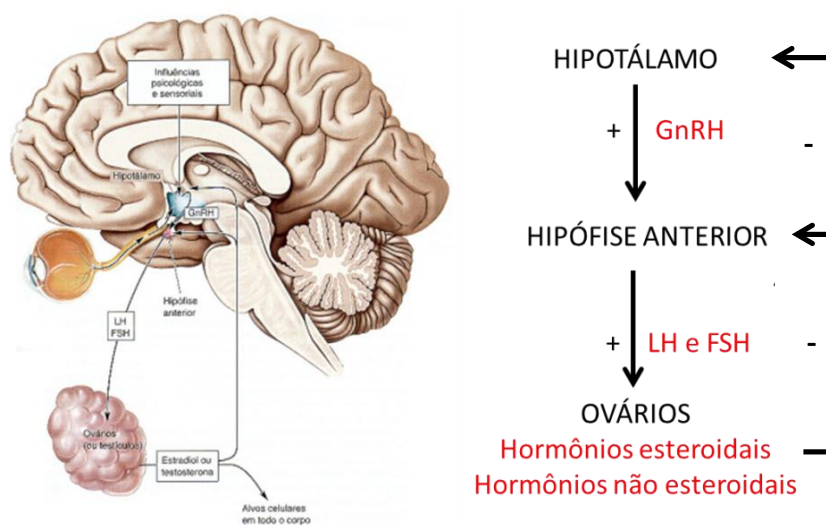


Figura 1. Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e mecanismos de retrocontrole (Bear et al., 2002).

Os estrógenos pertencem ao grupo de compostos esteroides, que atuam principalmente como hormônios sexuais femininos, mas também circulam por todo o organismo exercendo efeitos em vários órgãos e sistemas fisiológicos, tais como o sistema nervoso central (SNC), cardiovascular, imune e ósseo, por exemplo (Arnal et al., 2010; Fiocchetti et al., 2012; Wise, 2001; Wise, 2002). Além dessas funções, os estrógenos parecem exercer papel neuroprotetor (Petrovska et al., 2012; Scott et al., 2012; Wise, 2002), pois são capazes de promover plasticidade sináptica e excitabilidade neural (Brinton, 2009; McEwen, 2002), além de induzir sobrevivência neuronal (Yang et al., 2010) e modular marcadores sinápticos associados à cognição (Gibbs e Gabor, 2003). Adicionalmente, os estrógenos parecem desempenhar um papel sinalizador sistêmico, regulando e coordenando várias funções dos genes, células e órgãos, atuando como uma molécula de sinalização no cérebro (Brinton, 2008; Rettberg et al., 2013).

O organismo feminino secreta três tipos principais de estrógenos: Estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E3), sendo o 17 β -estradiol (E2, estradiol ou estrógeno), o principal estrógeno circulante durante a idade reprodutiva da mulher (Rettberg et al., 2013; Singh et al., 2006). O Estriol e a estrona são encontrados em baixos níveis e possuem uma menor atividade sobre os receptores de estrogênio (RE) (Gruber et al., 2002; Morissette et al., 2008).

Os estrógenos atuam através de seus receptores (REs), que possuem duas classes gerais: os REs nucleares e os REs associados à membrana, ambos encontrados no cérebro (Rettberg et al., 2013). Os REs nucleares possuem ainda duas isoformas clássicas: RE α e RE β , que são funcionalmente

distintos e diferencialmente distribuídos através do cérebro. Em cérebro de ratos e camundongos, os RE α mostram um padrão de distribuição semelhante ao cérebro humano (Brinton, 2009; Milner et al., 2001; Mitra et al., 2003; Shughrue et al., 1997), estando distribuído por todo o hipotálamo, prosencéfalo, hipocampo, e amígdala (Mitra et al., 2003; Osterlund et al., 2000; Ostlund et al., 2003). RE β são encontrados em maior concentração principalmente no hipocampo e no córtex cerebral (Mitterling et al., 2010; Osterlund et al., 2000; Ostlund et al., 2003; Shughrue et al., 1997). Particularmente, no hipocampo, os RE α e RE β estão localizados nas espinhas dendríticas, que são conhecidos sítios de formação de sinapses apresentando um alto grau de plasticidade (Milner et al., 2001; Milner et al., 2005). Além disso, esses receptores parecem desempenhar funções relacionadas a tarefas de aprendizagem dependente do hipocampo (Spencer et al., 2008). Os REs nucleares existem inicialmente como monômeros e dimerizam-se antes da translocação para o núcleo onde atuam regulando a transcrição.

Os REs associados à membrana são monômeros de RE α e RE β (Rettberg et al., 2013). A sinalização estrogênica clássica ocorre como resultado da translocação do RE ligado ao estrogênio para o núcleo, onde se liga ao elemento de resposta estrogênica (ERE) regulando a expressão gênica. Já os REs associados à membrana são capazes de rapidamente iniciar vias de sinalização intracelulares após a exposição a estrógenos (Rettberg et al., 2013). Alguns estudos estabelecem ainda a presença de REs mitocondriais (Irwin et al., 2012; Milner et al., 2005; Mitterling et al., 2010; Stirone et al., 2005; Yang et al., 2004) o que evidencia um possível papel dos estrógenos na bioenergética celular.

1.2 Metabolismo Energético

A principal fonte energética para o cérebro dos mamíferos é a glicose, sendo que os neurônios são as células cerebrais que mais requerem energia (Howarth et al., 2012; Mergenthaler et al., 2013). Como o tecido cerebral possui pouca reserva energética quando comparado com sua alta atividade metabólica, faz-se necessário um fornecimento contínuo de glicose para atender às suas demandas (Shulman et al., 2003). Logo, em situações onde o metabolismo energético apresenta-se reduzido pode haver um comprometimento do funcionamento normal desse tecido (Bolanos et al., 2009).

Em humanos, o cérebro corresponde a 2% de todo o peso corporal e consome cerca de 20% da energia proveniente da glicose, sendo considerado o principal consumidor de glicose (Erbsloh et al., 1958; Mergenthaler et al., 2013). Assim, em situações de jejum prolongado, onde os níveis de glicose encontram-se reduzidos o cérebro pode gradualmente passar a utilizar corpos cetônicos para suprir suas necessidades (Prins, 2008).

Uma redução no metabolismo energético do cérebro pode levar a uma diminuição na síntese de ATP e contribuir para a fisiopatologia de certas doenças, como hipóxia/isquemia e doenças neurodegenerativas (Atamna e Frey, 2007; Blass, 2001; Kristian, 2004; Mergenthaler et al., 2013; Soane et al., 2007).

O metabolismo da glicose a gás carbônico (CO_2) e água (H_2O), é responsável por fornecer grande parte do ATP consumido pelo cérebro, através de um processo que inicia com a glicólise e encerra com a fosforilação oxidativa (Erecinska e Silver, 1994). A via glicolítica ocorre no citoplasma da célula e tem como produto final o piruvato, sendo produzidos neste processo dois mols de

piruvato por mol de glicose (Erecinska e Silver, 1994). Na presença de oxigênio, esse piruvato é então convertido em CO_2 e H_2O na mitocôndria, através da ação combinada do ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido tricarboxílico) com a cadeia respiratória (Erecinska e Silver, 1994). A produção de ATP na mitocôndria ocorre através do acoplamento da fosforilação oxidativa com a cadeia transportadora de elétrons (Irwin et al., 2008). Em condições adequadas de fornecimento de oxigênio, a fosforilação oxidativa depende das concentrações de ATP, ADP e fosfato inorgânico (Pi) e da razão NADH/NAD^+ mitocondrial (Erecinska e Silver, 1994) para o seu funcionamento. É importante ressaltar que a fosforilação oxidativa no cérebro é responsável por fornecer mais de 95% do ATP sintetizado (Erecinska e Silver, 1989; Erecinska e Silver, 1994).

Estudos mostraram que hormônios esteroides ovarianos, particularmente o 17β -estradiol, possuem papel modulador na utilização da glicose pelo cérebro feminino (Brinton, 2008; Verma et al., 2005) e que ratas ovariectomizadas possuem uma redução no consumo de glicose (Lopez-Grueso et al., 2010), o que conseqüentemente pode prejudicar o metabolismo energético cerebral.

1.3 Creatina Cinase

A energia é necessária para a realização de praticamente todos os processos celulares. Dessa forma, é fundamental que haja adequada produção, transporte, conversão e utilização de energia por processos que envolvem inúmeras reações catalisadas por enzimas devidamente reguladas (Wallimann et al., 1992).

A creatina cinase (CK), EC 2.7.3.2, é uma enzima chave da energética celular, representada por um sistema de enzimas com inúmeras isoenzimas compartmentalizadas em locais onde a energia é produzida ou utilizada (Wallimann et al., 1992; Wallimann et al., 1998). A CK parece encontrar-se, por exemplo, próximo aos locais onde ocorre a geração de força por proteínas motoras, transporte de íons através de bombas de íons, e também outros processos que requerem ATP (Wallimann et al., 1992).

Existem cinco isoenzimas da CK conhecidas em vertebrados: três encontradas no citoplasma e duas na mitocôndria. As três isoformas citosólicas existem como dímeros compostos por duas subunidades: a subunidade M (de *muscle*) e a subunidade B (de *brain*), dessa forma são conhecidas como: CK-MM, CK-BB e CK-MB. A CK-MM é encontrada no músculo esquelético, a CK-BB no cérebro e tecidos neurais e a CK-MB no coração e músculo estriado durante o desenvolvimento (Wallimann et al., 1992; Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). Já as isoenzimas mitocondriais da CK são chamadas CK-Mi ubíqua (CK-Mi_u) e CK-Mi sarcomérica (CK-Mi_s), sendo a isoforma ubíqua encontrada no músculo liso, no cérebro e em outros tecidos e a isoforma sarcomérica nos ventrículos e no músculo esquelético (Boero et al., 2003; Wallimann e Hemmer, 1994; Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000).

A CK é uma enzima importante para a manutenção da homeostase do sistema de energia nas células que requerem alta demanda e flutuações energéticas. Esta enzima catalisa a transferência reversível do grupo N-fosforil da fosfocreatina (PCr) para o ADP, assim, regenerando ATP (Wallimann et al., 1992; Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000) (Figura 2).



Figura 2. Reação catalisada pela creatina cinase: a transferência reversível do grupo N-fosforil da PCr para o ADP regenerando ATP. PCr: fosfocreatina

O sistema CK//PCr parece exercer um papel complexo na homeostase de energia celular (Wallimann et al., 1992), e sua atividade pode estar relacionada com algumas condições patológicas resultantes da deficiência de energia cerebral (Whittingham e Lipton, 1981). Diminuição na sua função parece desenvolver papel importante no processo de neurodegeneração associado com a perda neuronal (Tomimoto et al., 1993).

1.4 Piruvato Cinase

A piruvato cinase (PK), EC 2.7.1.40, é uma enzima com papel importante na via glicolítica, uma importante via de fornecimento de energia para o bom funcionamento cerebral (Valentini et al., 2000).

A glicólise que ocorre no citosol consiste em uma sequência de dez reações enzimáticas, no qual a glicose é convertida no produto final piruvato. Nessa sequência de reações, um mol de glicose é convertido em dois mols de piruvato, juntamente com a formação de dois mols de ATP por mol de glicose (Mergenthaler et al., 2013). O piruvato formado pode seguir duas vias distintas: em condições anaeróbicas, pode ser convertido a lactato pela glicólise anaeróbica, ou, em condições aeróbicas ele é transportado para dentro da

mitocôndria e então oxidado através do ciclo de Krebs e cadeia respiratória formando CO₂ e H₂O (Erecinska e Silver, 1994).

A PK catalisa a reação final da glicólise, onde ocorre a transfosforilação irreversível do fosfoenolpiruvato (PEP) e ADP, formando piruvato, juntamente com a síntese de uma molécula de ATP (Erecinska e Silver, 1994; Valentini et al., 2000) (Figura 3).



Figura 3. Reação catalisada pela PK: a transfosforilação irreversível PEP e ADP formando piruvato e ATP. PEP: fosfoenolpiruvato

Dados na literatura mostram que o 17β-estradiol altera a atividade e expressão de enzimas glicolíticas no cérebro de ratas (Blake et al., 2005; Kostanyan e Nazaryan, 1992), dessa forma, declínios na sua concentração podem afetar a homeostase de glicose cerebral.

1.5 Cadeia Respiratória e Fosforilação Oxidativa

A energia na forma de ATP (trifosfato de adenosina) é essencial para a realização de diversas funções da célula, assim como para a realização de eventos biológicos e moleculares. Redução nos níveis energéticos pode representar uma ameaça para a integridade e homeostase celular, já que prejuízos no metabolismo energético podem causar sinalização pró-apoptótica,

dano oxidativo, excitotoxicidade e impedir o reparo do DNA mitocondrial (Owen e Sunram-Lea, 2011).

A mitocôndria consiste em uma rede funcional integrada que regula o equilíbrio energético celular, sendo a fonte primária de energia na célula, já que nela ocorre a respiração celular que converte nutrientes em energia (Irwin et al., 2008).

A cadeia respiratória, ou cadeia transportadora de elétrons, ocorre na membrana mitocondrial interna e é formada por quatro complexos protéicos integrais de membrana: o complexo I (NADH: ubiquinona oxirredutase ou NADH desidrogenase), complexo II (succinato: ubiquinona oxirredutase), complexo III (citocromo bc_1 ou ubiquinona: citocromo c oxirredutase) e complexo IV (citocromo c oxidase), e dois transportadores móveis de elétrons: a coenzima Q ou ubiquinona e o citocromo c (Acin-Perez e Enriquez, 2013; Vartak et al., 2013).

Na cadeia respiratória ocorre a oxidação dos equivalentes redutores NADH e $FADH_2$ provenientes de diferentes rotas metabólicas como a glicólise, oxidação de ácidos graxos e ciclo de Krebs, por exemplo (Acin-Perez e Enriquez, 2013). O Complexo I é o principal ponto de entrada de elétrons para a cadeia respiratória. Ele transfere os elétrons do NADH para ubiquinona dentro da membrana. Já o complexo II consiste em um ponto alternativo de entrada de elétrons provenientes do $FADH_2$ para a cadeia respiratória, onde os elétrons são então transferidos do succinato para a ubiquinona (Acin-Perez e Enriquez, 2013; Dudkina et al., 2008). A succinato desidrogenase (SDH) é uma enzima que encontra-se ligada à membrana mitocondrial e está envolvida tanto no ciclo de Krebs (responsável pela oxidação do succinato a fumarato na matriz

mitocondrial, com a consequente libertação de FADH_2), quanto na cadeia respiratória (transfere os elétrons da ubiquinona, sem o bombeamento de prótons na membrana mitocondrial interna) (Huang e Millar, 2013). Os elétrons passam então da ubiquinona para o complexo III, que transfere esses elétrons para o citocromo c. O Complexo IV ou citocromo c oxidase é o complexo final da cadeia respiratória que catalisa a transferência dos elétrons do citocromo c para o O_2 , reduzindo este à H_2O (Acin-Perez e Enriquez, 2013; Dudkina et al., 2008). Essa transferência de elétrons através da cadeia respiratória resulta no bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas nos complexos I, III e IV. Como consequência, um gradiente de prótons é criado, gerando força próton-motriz que impulsiona a síntese de ATP pela ATP sintase (fosforilação oxidativa) a partir de $\text{ADP} + \text{Pi}$ (Acin-Perez e Enriquez, 2013; Dudkina et al., 2008; Pierron et al., 2012) (Figura 4).

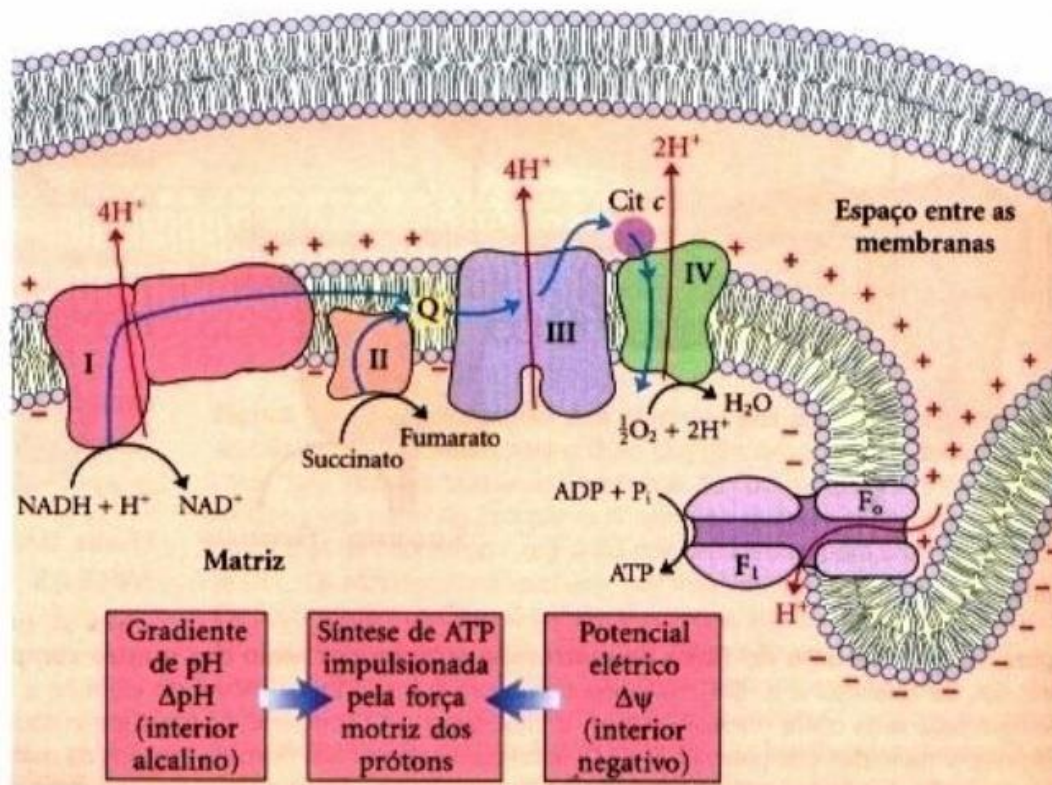


Figura 4. Fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa. Os elétrons do NADH e outros substratos oxidáveis são carregados através da cadeia transportadora de elétrons na membrana interna da mitocôndria. O fluxo de elétrons é acompanhado por uma transferência de prótons nos complexos I, III e IV através da membrana, gerando um gradiente químico (ΔpH) e um gradiente elétrico ($\Delta\psi$). A membrana interna da mitocôndria é impermeável aos prótons, dessa forma, eles retornam a matriz mitocondrial através de canais específicos. Essa força próton motriz gerada que direciona os prótons para a matriz propicia a síntese de ATP pela ATP-sintase (Nelson e COX, 2012).

Evidências indicam que alterações no metabolismo energético mitocondrial podem contribuir para a fisiopatologia de lesões cerebrais e doenças neurodegenerativas como, por exemplo, a doença de Alzheimer e Parkinson (Moran et al., 2012; Soane et al., 2007). Além disso, sabe-se que a redução nos níveis de estrógenos circulantes em decorrência da menopausa coincide com

um declínio na bioenergética cerebral, podendo resultar em comprometimento metabólico (Rettberg et al., 2013).

1.6 Exercício Físico

Mulheres após a menopausa têm utilizado a terapia de reposição hormonal (TRH) para a substituição dos estrógenos endógenos. Os benefícios da TRH sobre a memória e funções cognitivas têm sido relatados (Sherwin, 2003; Shoupe, 2011). Por outro lado, há indícios de que essa terapia também é capaz de aumentar o risco de desenvolvimento de tumores e doenças cardiovasculares (Lobo, 2007; Miquel et al., 2006), a partir disto, há uma procura crescente de terapias alternativas para o tratamento e a minimização dos sinais e sintomas da menopausa.

A realização de exercícios físicos regular parece reduzir o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral isquêmico, hipertensão, diabetes tipo 2, obesidade, osteoporose, câncer e também de patologias psiquiátricas como a ansiedade e depressão, além de prevenir ou retardar a prejuízo cognitivo e a insônia (Booth et al., 2000; Femminella et al., 2013; Kramer et al., 2005; Paolillo et al., 2013), embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam totalmente elucidados. Evidências sugerem que o exercício pode agir como neuroprotetor em casos de lesão hipocampal, aumentando a expressão de fatores neurotróficos envolvidos na sobrevivência neuronal, diferenciação e alteração da plasticidade sináptica/memória (Berchtold et al., 2001; Cotman e Berchtold, 2002; Griesbach et al., 2007; Sim et al., 2004).

A molécula que mais se relaciona com o aumento da neurogênese induzida pelo exercício físico é o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Ernst et al., 2006; Vaynman et al., 2006). Existem evidências de que a exercício físico aumenta os níveis de BDNF, estimulando a neurogênese e aumentando a resistência do cérebro aos insultos cerebrais (Cotman e Berchtold, 2002). O aumento na liberação de neurotrofinas está associado a níveis mais altos de exercício, tanto em estudos em animais como em humanos (Kirk-Sanchez e McGough, 2014; Rasmussen et al., 2009; Seifert et al., 2010), tendo impacto positivo na função do cérebro em envelhecimento (Kirk-Sanchez e McGough, 2014; Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005). Neste contexto o exercício parece melhorar o aprendizado e o desempenho cognitivo (Cotman e Berchtold, 2002; van Praag et al., 2005).

Estudos clínicos mostram que a atividade física regular pode retardar o aparecimento de doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, tais como doença de Alzheimer, demência, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Adlard et al., 2005; Garraux, 2008; Kramer et al., 1999; Laurin et al., 2001; McCrate e Kaspar, 2008). Além disso, pesquisas indicam que o exercício físico pode manter a saúde e a função cerebral, sugerindo que o exercício pode ser uma boa estratégia terapêutica para a prevenção ou regeneração de doenças neurodegenerativas (Kramer et al., 1999; Mattson, 2000).

Dessa forma, partindo do princípio de que mulheres pós-menopáusicas, devido à falta de estrogênio, são mais suscetíveis a déficit cognitivo, distúrbios emocionais e doenças neurodegenerativas e que alterações no metabolismo energético podem estar associadas a essas condições neste trabalho

investigamos a influência da ovariectomia sobre o metabolismo energético em hipocampo de ratas adultas, além do papel que o exercício físico pode sobre as possíveis alterações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a influência da OVX sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em hipocampo de ratas Wistar adultas. Avaliamos também o papel neuroprotetor do exercício físico sobre as possíveis alterações encontradas.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da ovariectomia e/ou do exercício físico sobre a atividade da enzima piruvato cinase;
2. Avaliar o efeito da ovariectomia e/ou do exercício físico sobre a atividade da creatina cinase, frações citosólica e mitocondrial;
3. Investigar o efeito da ovariectomia e/ou do exercício físico sobre as atividades das seguintes enzimas da cadeia transportadora de elétrons: succinato desidrogenase, complexo II e citocromo c oxidase;
4. Avaliar o efeito da ovariectomia e/ou do exercício físico sobre os níveis de ATP em hipocampo de ratas adultas;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Reagentes

Para este estudo experimental, foram utilizadas ratas Wistar fêmeas adultas com 80 dias, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, que foram mantidas em ciclos claro/escuro de 12/12 h em temperatura constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), com livre acesso à água e alimento comercial proteico (20%). Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais, conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental. O projeto foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (#24085).

Os animais utilizados foram acondicionados em caixas (65cm x 25cm x 15 cm) com grades e com o chão coberto de serragem. Foram colocados de 4 a 5 animais em cada caixa. A eutanásia desses animais foi realizada por decapitação, sem uso de anestésicos, para posterior retirada do hipocampo.

3.2 Tamanho da Amostra

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com (Callegari-Jaques, 2003), e segundo estudos já realizados em nosso grupo (Ben et al., 2009; Mackedanz et al., 2011; Monteiro et al., 2007), onde para estudos bioquímicos foram necessários de 4 a 8 animais por grupo.

3.3 Controle do Ciclo Estral

O ciclo reprodutivo das ratas é denominado ciclo estral tem duração média de quatro a cinco dias. O ciclo estral possui quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro. A identificação das fases baseia-se na proporção entre os três tipos celulares observados nos lavados vaginais a fresco em microscópio ótico: células epiteliais nucleadas, células cornificadas e leucócitos. Na fase proestro, no qual ocorre o pico de concentração plasmática de estrógeno, observa-se predominância de células epiteliais nucleadas; na estro, observa-se apenas células cornificadas; na fase metaestro há semelhante proporção entre os três tipos celulares e na fase diestro, onde há baixa concentração de estrógeno, observa-se uma predominância de leucócitos no lavado vaginal (Marcondes et al., 2002).

A fase do ciclo estral através de esfregaço vaginal foi determinada diariamente, durante o período de dez dias que antecedem a OVX, para assegurar que todas as ratas possuíam um ciclo reprodutivo normal e garantir assim, sua inclusão no estudo. O ciclo estral também foi controlado antes da decapitação, para que as ratas sham fossem decapitadas na fase de diestro (baixa concentração de estrógeno).

3.4 Modelo Experimental

O modelo animal de supressão hormonal ovariana mais amplamente utilizado para mimetizar as alterações no período pós-menopausa é a ovariectomia (OVX) (Savonenko e Markowska, 2003).

O modelo experimental foi realizado conforme Ben et al., (2009), onde aos 90 dias de vida as ratas foram submetidas à OVX, um procedimento cirúrgico para a remoção de ambos os ovários, com consequente depleção estrogênica (Waynforth e Flecknell, 1992). Os anestésicos intraperitonealmente administrados foram ketamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg).

A medida de estrógeno nas ratas do grupo OVX deve ser indetectável, o que confirma a eficácia do procedimento cirúrgico de remoção dos ovários (Monteiro et al., 2005a). Estudos prévios já estabelecidos em nosso laboratório demonstraram que a OVX diminui significativamente os níveis de estradiol em ratas submetidas a este procedimento, confirmando sua eficácia para a depleção estrogênica (Monteiro et al., 2007).

O procedimento cirúrgico foi realizado na sala de cirurgia do Biotério do Departamento de Bioquímica. Após o efeito da anestesia os animais foram mantidos na sala de pós-operatório, para recuperação.

3.5 Protocolo de Treinamento Físico

Após 30 dias da remoção bilateral dos ovários as ratas foram submetidas ao treinamento físico em esteira adaptada para roedores (Inbramed TK 01, Porto Alegre, Brasil), de acordo com Cechetti et al., (2007). Os ratos foram inicialmente habituados com o aparelho de esteira para minimizar o estresse e a novidade. O protocolo de exercício físico iniciou no 110º dia de vida do animal e terminou no dia 140º de vida. As ratas foram mantidas correndo por 20 min, em uma frequência de três vezes por semana (Ben et al., 2010; Ben et al., 2009) por 30 dias. Os animais controles foram mantidos por 20 min na esteira desligada (da

Cunha et al., 2012; Scopel et al., 2006). Foi utilizado um protocolo de exercício de intensidade moderada (Ben et al., 2009; Cechetti et al., 2007; da Cunha et al., 2012; Scopel et al., 2006), a 60% do consumo máximo de oxigênio do animal (Brooks e White, 1978). A medição do pico de consumo de oxigênio (VO_2) foi realizada indiretamente em todos os animais antes do protocolo de treinamento físico. Cada rato correu individualmente na esteira, inicialmente em baixa velocidade, seguido por aumento da velocidade de 5m/min a cada 3 minutos, até ao ponto de exaustão. O tempo de fadiga (min) e carga de trabalho (m/min) foram considerados indicadores de capacidade para o exercício, que foi tomado como VO_{2max} (Arida et al., 1999; Brooks e White, 1978).

O protocolo de exercício consistiu em aumento gradual da velocidade de execução e tempo: na 1ª semana 18 m/min nos primeiros 3 min, 24 m/min para os próximos 2 min, 36 ou 48 m/min para os próximos 10 min, 24 m/min durante 2 minutos e, em seguida, 18 m/min durante os últimos 3 min, na 2ª semana 18 m/min durante os primeiros 3 min, 24 m/min para o próximo 1 min, e 36 ou 48 m/min para os 12 min seguintes, 24 m/min durante 1 minuto seguinte e 18 m/min durante os últimos 3 min, nas 3ª e 4ª semanas a 18 m/min durante os primeiros 3 minutos, 36 ou 48 m/min para os próximos 14 min e 18 m/min durante os últimos 3 min (Ben et al., 2009; Cechetti et al., 2007; da Cunha et al., 2012). Os animais que inicialmente se recusaram a executar foram estimulados tocando suas costas, choque elétrico ou estímulo físico não foram utilizados neste estudo.

3.6 Protocolo Experimental

Ratas com 80 dias de vida tiveram seu ciclo estral controlado e após sua inclusão no estudo foram divididas em dois grupo: (1) sham e (2) OVX, onde as ratas do grupo sham foram submetidas a cirurgia, porém sem a remoção de ambos os ovários, apenas para mimetizar os estresse e as ratas do grupo OVX tiveram ambos os ovários retirados. Trinta dias após a cirurgia, as ratas foram divididas em 4 grupos: (1) *sham*, (2) *sham* + exercício, (3) OVX e (4) OVX + exercício para a aplicação do treinamento físico (30 dias após a OVX, por um período de 30 dias). Doze horas após a última sessão de treino as ratas foram decapitadas para posteriores análises bioquímicas, a fim de verificar se o exercício físico foi capaz de reverter as possíveis alterações encontradas. O desenho experimental pode ser observado na Figura 5 a seguir.

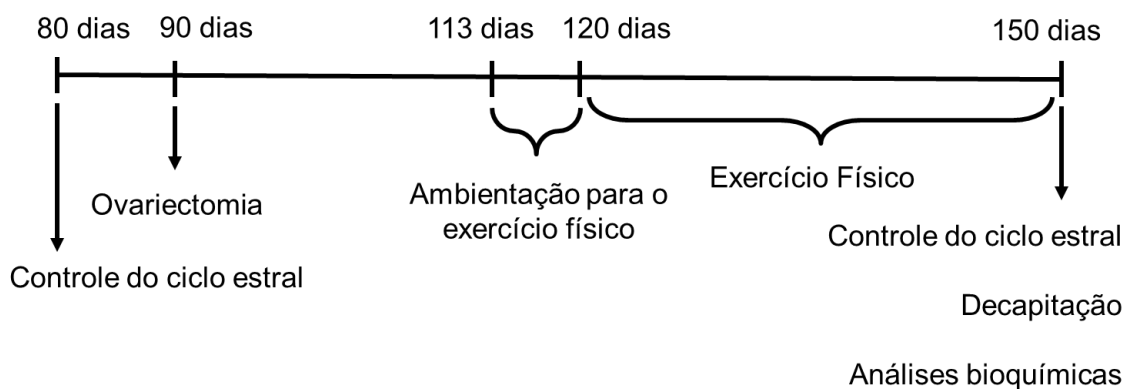


Figura 5. Cronologia dos procedimentos experimentais

3.7 Estudos Bioquímicos

3.7.1 Preparação das amostras

Para a determinação da atividade da PK o hipocampo foi homogeneizado 1:6 (p/v) em solução tampão (sacarose 0,32 M; EDTA 1mM e Tris-HCl 10 mM, pH 7,4). Os homogeneizados foram centrifugados a 800g por 10 minutos a 4°C e o precipitado descartado. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante livre de mitocôndria foi utilizado para determinar a atividade da enzima e da concentração proteica.

Para a determinação da atividade da CK (frações citosólica e mitocondrial), o hipocampo foi homogeneizada 1:10 (p/v) em tampão de SETH (sacarose 0,32 M, EGTA 1 mM e Tris-HCl 10 mM, pH 7,4). Os homogeneizados foram centrifugados a 800 g durante 10 min a 4°C e o precipitado foi descartado. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante da segunda centrifugação foi utilizado para determinar a atividade da CK fração citosólica. O sedimento enriquecido em mitocôndria foi lavado duas vezes com o mesmo tampão e novamente suspenso em tampão Tris-HCl, pH 7,5, contendo MgSO₄ 100 mM para a determinação da atividade da fração mitocondrial da CK. A fracção mitocondrial foi congelada e descongelada três vezes antes do ensaio de enzimático, a fim de romper as membranas mitocondriais.

Para a determinação das atividades da SDH, complexo II e citocromo c oxidase, o hipocampo foi homegeneizado 1:20 (p/v) em tampão SETH pH 7,4

(sacarose 250 mM; EDTA 2mM. Trizma base 10 mM e 50 UI.mL⁻¹ de heparina). Os homogeneizados foram centrifugados a 800 g por 10 minutos e os sobrenadantes foram mantidos a -70 °C até a utilização para a determinação das atividades enzimáticas.

Para determinação dos níveis de ATP o hipocampo foi imediatamente após dissecado, congelado em nitrogênio líquido. A homogeneização foi realizada em solução de NaOH 0,1 M, onde para cada hemisfério do hipocampo foi adicionado 1 mL de NaOH 0,1 M. Não é necessário centrifugar.

3.7.2 Determinação da atividade da piruvato cinase

A atividade da enzima PK foi determinada de acordo com Leong et al., (1981). A reação começa após 30 minutos de pré-incubação através da adição de PEP 1mM. Os resultados foram expressos em μmol de piruvato formado por min por mg de proteína.

3.7.3 Determinação da atividade da creatina cinase (frações citosólica e mitocondrial)

A atividade de CK foi realizada de acordo com o método colorimétrico descrito por Hughes, (1962). O meio de incubação contendo Tris-HCl 65 mM pH 7,5, de fosfato de creatina 7 mM, MgSO_4 9 mM e cerca de 1 μg de proteína em um volume final de 0,13 mL. Foi realizada uma pré-incubação de 30-90 min a 37°C, e em seguida, a reação enzimática foi iniciada pela adição de ADP 0,3 μmol . A reação foi interrompida após 10 minutos de incubação pela adição de *p*-hidroximercuriobenzóico 1 μmol . A adição de 0,1 mL de α - naftol 2% e 0,1 mL

de diacetil 0,05% promoveu aparecimento de cor após 20 min, detectado a 540 nm. Os resultados foram expressos como μmol de creatina formada por min por mg de proteína.

3.7.4 Determinação da atividade do complexo II

A atividade do complexo II é medida pelo decréscimo na absorbância devido a redução de 2,6-dicloroindofenol (DCIP) a 600 nm (Fischer et al., 1985). Os resultados foram expressos como nmol/min.mg de proteína.

3.7.5 Determinação da atividade da succinato desidrogenase

A atividade da SDH foi determinada de acordo com o método de Fischer et al., (1985) através do decréscimo na absorbância do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) a 600 nm na presença de metassulfato de fenazina (PMS). Os resultados foram expressos como nmol/min.mg de proteína.

3.7.6 Determinação da atividade da citocromo c oxidase

A atividade da citocromo c oxidase foi determinada de acordo com Rustin et al., (1994). A atividade enzimática foi medida pelo decréscimo na absorbância devido à oxidação do citocromo c previamente reduzido a 550 nm. Os resultados foram expressos em nmol/min.mg de proteína.

3.7.7 Determinação dos níveis de ATP

As amostras foram analisadas utilizando o kit ATPlite™ (PerkinElmer), um sistema de análise de detecção de ATP, de acordo com Witt et al., (2003). A concentração de ATP foi calculada a partir de uma curva padrão expressa em $\mu\text{mol/g}$.

3.7.8 Determinação Protéica

A determinação das proteínas totais foi realizada através do método colorimétrico de Lowry et al., (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

3.8 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados foi realizado ANOVA de 2 vias seguido do teste de Tukey quando F foi significativo.

As análises foram realizadas utilizando o software Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (SPSS), sendo considerado diferenças significativamente estatística quando $p < 0,05$.

3.9 Aspectos éticos

O trabalho tratou-se de um procedimento experimental em animais, não havendo, então, aplicação de termo de consentimento. Os animais foram mantidos em condições adequadas, manipulados e tratados com seriedade e respeito, além de anestesiados antes do procedimento de retirada dos ovários.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e apenas após a aprovação iniciado.

4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados no artigo científico intitulado:

**Effect of physical exercise on changes in activities of creatine kinase,
cytochrome c oxidase and ATP levels caused by ovariectomy**

Cassiana Siebert, Janaína Kolling, Emilene B.S. Scherer, Felipe Schmitz, Maira
J. da Cunha, Rodrigo B. de Andrade, Clovis M. D. Wanmacher, Angela T.S.

Wyse

4.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of physical exercise on changes in activities of creatine kinase, cytochrome c oxidase and ATP levels caused by ovariectomy

Cassiana Siebert, Janaína Kolling, Emilene B.S. Scherer, Felipe Schmitz, Maira J. da Cunha, Rodrigo B. de Andrade, Clovis M. D. Wanmacher, Angela T.S.

Wyse

Periódico: Metabolic Brain Disease

Status: In press

5 DISCUSSÃO

Devido ao aumento na expectativa média de vida das mulheres e o constante período em que elas entram na menopausa, estima-se que as mulheres passarão mais de três décadas de suas vidas no período pós-menopausa (Wise, 2001). Assim, a saúde e o bem-estar geral dessas mulheres tornaram-se um problema de saúde pública mundial (Poomalar e Arounassalame, 2013).

No período de transição para a menopausa ocorrem alterações hormonais, incluindo a diminuição acentuada nos níveis de estrógenos na circulação, o que terá consequências em diversos sistemas, incluindo o SNC (Wise, 2001) além de parecer alterar o processo neural associado com a cognição e processos patológicos relacionados com doenças que afetam o SNC, tais como as doenças neurodegenerativas e outras (Henderson, 2013; Vest e Pike, 2013). Dessa forma, a diminuição dos estrógenos e progesterona decorrentes da menopausa tornam o cérebro mais vulnerável a sofrer insultos agudos, bem como desenvolver doenças neurodegenerativas (Simpkins et al., 2005; Wise, 2002).

As ações dos estrógenos no cérebro estão relacionadas com a regulação do transporte de glicose, com a glicólise aeróbica, função mitocondrial e geração de ATP, e no corpo, os estrógenos protegem contra a obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Rettberg et al., 2013). Além disso, os estrógenos parecem prevenir doenças neurodegenerativas, por mecanismos ainda não completamente elucidados. Adicionalmente a isto, estudos mostram que esses hormônios podem ativar sistemas de defesa antioxidante eliminando espécies

reativas, limitando o dano a proteínas e ao DNA mitocondrial, e melhorando a atividade da cadeia transportadora de elétrons (Nilsen, 2008).

Sabendo-se que muitas estratégias alternativas para o tratamento dos sintomas da menopausa estão sendo estudadas (Ben et al., 2009; Mackedanz et al., 2011; Monteiro et al., 2007), a hipótese de tratamento escolhido para esse estudo foi o exercício físico, já que este tem sido utilizado para reduzir ou reverter os processos fisiológicos observados no envelhecimento (Buford et al., 2013; Kirk-Sanchez e McGough, 2014).

A partir destas evidências, levando em consideração que alterações no metabolismo energético estão relacionadas com a patogênese de várias doenças que afetam o SNC (Moran et al., 2012) e que os estrógenos exercem papel na regulação de algumas enzimas-chave do metabolismo energético (Rettberg et al., 2013), no presente estudo, nós avaliamos a influência da OVX e do exercício físico sobre o metabolismo energético em hipocampo de ratas Wistar adultas.

O hipocampo é uma estrutura cerebral que localiza-se bilateralmente no lobo temporal e desempenha papel central na formação de memórias declarativas (Izquierdo et al., 1998). Diferentes áreas cerebrais interagem com o hipocampo regulando a aquisição e o armazenamento de novas informações (Izquierdo et al., 1997). Dessa forma, o hipocampo foi a estrutura utilizada neste estudo, pois apresenta ERs (α e β) (Shughrue et al., 1997; Shughrue et al., 2000) e esta relacionado com processos de memória e aprendizagem (Daniel e Dohanich, 2001). Além disso, estudos prévios em ratas ovariectomizadas já demonstraram haver déficit de memória nestes animais (Ben et al., 2010; Monteiro et al., 2008).

A OVX foi o modelo experimental escolhido, pois consiste no modelo animal mais amplamente utilizado de deprivação estrogênica, mimetizando as alterações decorrentes da menopausa (Sato et al., 2003; Savonenko e Markowska, 2003). Sabe-se que em uma semana após a OVX os níveis de estrógenos circulantes tornam-se indetectáveis (Chakraborty e Gore, 2004; Monteiro et al., 2005b).

Dessa forma, inicialmente avaliamos o efeito da OVX e/ou exercício físico sobre o sistema responsável pela homeostase de energia da célula, através da atividade da CK. O sistema CK/PCr desempenha um importante papel na homeostase energética, já que regenera o ATP consumido nos tecidos, além de transferir o ATP dos sítios de produção (glicólise e mitocôndria) para os sítios de consumo (ATPases celulares) (Wallimann et al., 1992; Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). Essa enzima está presente nos tecidos que requerem alta demanda de energia para o desempenho das suas funções, tais como o tecido muscular cardíaco, músculo esquelético e cérebro, por exemplo (Wallimann e Hemmer, 1994). As isoenzimas da CK citosólica são co-expressas em tecidos juntamente com a isoforma mitocondrial (Wallimann et al., 1992) sendo extremamente importante a interação entre as duas isoformas para a manutenção da homeostase de energia celular (da Silva et al., 2003).

Nossos resultados mostraram haver uma redução na atividade da CK no grupo de ratas ovariectomizadas (quando comparado ao grupo sham e exercício), tanto na fração citosólica quanto na mitocondrial. O exercício físico reverteu parcialmente a inibição da atividade na fração citosólica, mas não exerceu efeito sobre a fração mitocondrial da enzima .

Já foi demonstrado que a CK é um marcador de dano celular em doenças que afetam o SNC, tais como isquemia e doença de Alzheimer (Aksenov et al., 2000; Tomimoto et al., 1993) e evidências indicam que uma inibição na atividade da CK pode estar envolvida na patogênese de diversas doenças, principalmente envolvendo o cérebro, já que algumas doenças neurodegenerativas exibem um sistema CK comprometido (Aksenov et al., 2000; Wendt et al., 2002).

Ambas as isoformas da CK (mitocondrial e citosólica) podem ser irreversivelmente afetadas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Aksenov et al., 2000; Konorev et al., 1998; Koufen e Stark, 2000; Schlattner et al., 2006; Stachowiak et al., 1998), sendo que a CK mitocondrial parece para ser o principal alvo do estresse oxidativo (Koufen e Stark, 2000; Stachowiak et al., 1998). Foi demonstrado que a CK-BB se faz presente tanto em útero como no cérebro de ratos, e a sua síntese no útero (proteína e mRNA) é regulada por estrógenos mas no cérebro os estrógenos parecem não exercer efeito sobre a CK (Bergen et al., 1993; Pentecost et al., 1990). Adicionalmente, dados mostram que a CK pode ser inibida por modificações oxidativas (Aksenov et al., 2000), o que poderia explicar nossos resultados em cérebro, já que prévios estudos mostram que a OVX induz estresse oxidativo em cérebro de ratas (Behr et al., 2012; Kume-Kick et al., 1996; Martins et al., 2012; Monteiro et al., 2005a).

Após verificar o déficit no sistema de manutenção da homeostase energética, através da avaliação da atividade da CK (frações citosólica e mitocondrial), foi avaliada a atividade da PK, enzima chave da glicólise. A PK não apresentou alteração neste estudo, mostrando não ser afetada pela OVX ou pelo exercício, porém não podemos descartar que outras enzimas da glicólise

não estejam alteradas, necessitando de maior investigação. Além disso, estudo realizado por Mackedanz et al., (2011) em estriado de ratas submetidas a OVX também mostrou não haver alteração nessa enzima.

Com o objetivo de verificar como se comporta o funcionamento da cadeia respiratória em hipocampo de ratas submetidas à OVX e/ou exercício, avaliamos as atividades das seguintes enzimas: SDH, complexo II e citocromo c oxidase. Os resultados mostraram que a OVX, bem como o exercício físico não alterou a atividade das enzimas SDH e do complexo II, mas observou-se uma diminuição na atividade da citocromo c oxidase, nos grupos OVX e OVX mais exercício quando comparado com o grupo sham. Dessa forma, observamos que o protocolo de exercício utilizado não foi capaz de reverter as alterações causadas pela OVX sobre a atividade da citocromo c oxidase em hipocampo. Estudo anterior realizado por Mackedanz et al., (2011), em estriado de ratas adultas submetidas à OVX, mostrou não haver alteração na atividade da citocromo c oxidase, porém foi observado aumento na atividade da SDH e do CII, mostrando a presença de um padrão diferente de alteração em cada estrutura estudada.

É sabido que a citocromo c oxidase atua como uma enzima chave na regulação da atividade da cadeia respiratória em células de mamíferos (Huttemann et al., 2012; Pacelli et al., 2011). Estudos mostram diminuição da sua atividade em hipocampo de ratas ovariectomizadas (Shi e Xu, 2008; Shi et al., 2011), concordando com os achados do presente estudo. Em adição, foi observado uma disfunção no complexo IV durante o envelhecimento e em doenças neurológicas (Navarro e Boveris, 2007).

Sabe-se que durante a fosforilação oxidativa normal, as mitocôndrias produzem espécies reativas de oxigênio (Cecarini et al., 2007; Turrens, 2003), devido à redução incompleta do oxigênio, (Cecarini et al., 2007; Sugioka et al., 1988). Sendo assim, a mitocôndria é considerada a principal fonte de espécies reativas de oxigênio, porém, ela também sofre os efeitos do excesso dessa produção, já que muitos componentes da bioenergética mitocondrial são vulneráveis ao estresse oxidativo, tais como peroxidação lipídica das membranas mitocondriais, danos a proteínas da cadeia respiratória e aumento do risco de comprometimento mitocondrial, o que pode levar à insuficiência energética celular e/ou apoptose (Blass, 2001; Cadenas e Davies, 2000; Lin e Beal, 2006; Rettberg et al., 2013). Portanto, a cadeia transportadora de elétrons é vulnerável a danos causados por radicais livres (Navarro e Boveris, 2007) e a inibição da atividade da citocromo c oxidase por estresse oxidativo já foi demonstrada (Musatov e Robinson, 2012; Sharpe e Cooper, 1998).

Dessa forma, a citocromo c oxidase, bem como a CK, também sofre ação de radicais livres, a qual foi mostrado estar aumentado em ratas ovariectomizadas (Behr et al., 2012; Kume-Kick et al., 1996; Martins et al., 2012; Monteiro et al., 2005a). Assim, um ciclo vicioso pode ter sido instalado, onde a mitocôndria danificada aumenta a produção de espécies reativas, e ao mesmo tempo sofre danos pelo excesso dessa produção (Romano et al., 2010).

Após verificar tais alterações na atividade de enzimas responsáveis pela geração e homeostase de energia celular, foi avaliada a influência da OVX e/ou do exercício físico sobre os níveis de ATP em hipocampo. Como esperado, devido à diminuição na atividade da CK (frações citosólica e mitocondrial) e da

citocromo c oxidase, bem como concordando com outros estudos (Shi e Xu, 2008; Shi et al., 2011; Xu et al., 2008), observamos uma diminuição nos níveis de ATP em hipocampo nos grupos de ratas ovariectomizadas e OVX mais exercício quando comparado ao grupo sham e grupo exercício. Neste caso, o exercício físico também não foi capaz de reverter os efeitos da OVX sobre esse parâmetro energético. Já foi descrito que os ratas ovariectomizadas apresentam aumento na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase em hipocampo (Monteiro et al., 2005a). Esta enzima tem papel fundamental no funcionamento do SNC e alterações na sua atividade podem afetar diretamente a sinalização de neurotransmissores, a atividade neuronal, bem como o comportamento (Moseley et al., 2007). Para desempenhar as suas funções, a Na^+ , K^+ -ATPase consome a maior parte do ATP cerebral (Erecinska e Silver, 1994), dessa forma a ativação dessa enzima pode estar contribuindo para o déficit de energia observado em hipocampo de ratas OVX. O ATP é a forma de energia essencial necessária para a célula realizar suas diversas funções, assim, condições que resultam na redução do nível energético parecem ameaçar a homeostase e a integridade celular (Klein e Ferrante, 2007). Portanto, estratégias terapêuticas que mantenham os níveis de ATP e, conseqüentemente, melhoram a função mitocondrial podem ser de grande importância para reduzir a perda e disfunção neuronal (Owen e Sunram-Lea, 2011).

O mecanismo pelo qual pode ocorrer a neurodegeneração em mulheres na pós-menopausa, bem como o mecanismo de proteção da TRH ainda não estão completamente esclarecidos. Pesquisas mostram que alterações mitocondriais podem estar associadas com a retirada ou privação de estrógenos, e alterações especificamente no metabolismo energético mitocondrial podem ser uma

maneira de neurodegeneração causada por mecanismos subjacentes após a menopausa (Xu et al., 2008).

Alguns estudos demonstram que a realização de atividade física regular pode reduzir alguns dos sintomas da menopausa, melhorando o bem-estar e a qualidade de vida em mulheres na pós-menopausa (de Azevedo Guimaraes e Baptista, 2011; McAndrew et al., 2009; Shangold, 1990). Ensaio clínicos randomizados com mulheres de meia-idade ou na idade da menopausa têm mostrado uma melhora significativa em alguns sintomas desta condição, tanto nos sintomas físicos quanto psicossociais (de Azevedo Guimaraes e Baptista, 2011; McAndrew et al., 2009).

Nesse estudo, verificou-se que o protocolo de exercício utilizado foi eficaz apenas para a reversão parcial da atividade da CK na fração citosólica, não exercendo efeitos sobre os outros parâmetros. A falta de efeito do exercício físico sobre os parâmetros analisados neste estudo não é clara. No entanto, embora tenha sido demonstrado anteriormente que o exercício físico reverte déficits de memória (Ben et al., 2010) e alterações nas atividades da Na^+, K^+ -ATPase e da acetilcolinesterase (Ben et al., 2009), é possível sugerir que o tempo em que os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento talvez não tenha sido suficiente para promover uma adaptação do sistema de energia, uma vez que a atividade de CK citosólica foi parcialmente revertida.

Os resultados do presente estudo sugerem que a deficiência estrogênica que ocorre como consequência da OVX afeta os sistemas de geração e homeostase energética em hipocampo de ratas Wistar fêmeas adulta. Além disso, a redução nos níveis de ATP pode contribuir para a disfunção neuronal

que pode ser observada na menopausa. Nossos resultados não nos permitem discutir sobre todos os mecanismos envolvidos nas alterações sem que mais estudos sejam realizados.

6 CONCLUSÕES

- A OVX em hipocampo de ratas Wistar adultas:
 - ✓ Não altera a atividade da PK
 - ✓ Inibe a atividade da CK, nas frações citosólica e mitocondrial
 - ✓ Não altera a atividade da SDH e complexo II
 - ✓ Inibe a atividade da citocromo c oxidase
 - ✓ Diminui os níveis de ATP

- O exercício físico em hipocampo de ratas Wistar adultas:
 - ✓ Reverteu parcialmente a inibição da creatina cinase fração citosólica.
 - ✓ Não teve efeito sobre os outros parâmetros

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Verificar o imunoconteúdo do BDNF e NGF;
- ✓ Avaliar a expressão gênica e protéica da citocromo c oxidase;
- ✓ Analisar parâmetros comportamentais;
- ✓ Avaliar a função mitocondrial em estruturas cerebrais;
- ✓ Verificar o perfil de neuroinflamação;
- ✓ Realizar um protocolo de exercício físico por um período maior, bem como comparar com ratas submetidas ao exercício voluntário;
- ✓ Investigar mecanismos que possam estar envolvidos nas alterações apresentadas.

8 REFERÊNCIAS

- Acin-Perez R., Enriquez J.A. (2013) The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochim Biophys Acta*. DOI.
- Adlard P.A., Perreau V.M., Pop V., Cotman C.W. (2005) Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:4217-21. DOI.
- Aksenov M., Aksenova M., Butterfield D.A., Markesbery W.R. (2000) Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 74:2520-7. DOI.
- Arida R.M., Scorza F.A., dos Santos N.F., Peres C.A., Cavalheiro E.A. (1999) Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res* 37:45-52. DOI.
- Arnal J.F., Fontaine C., Billon-Gales A., Favre J., Laurell H., Lenfant F., Gourdy P. (2010) Estrogen receptors and endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1506-12. DOI.
- Atamna H., Frey W.H., 2nd. (2007) Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease. *Mitochondrion* 7:297-310. DOI.
- Bear M.F., Connors B.W., Paradiso M.A. (2002) *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. 2.ed. ed., Porto Alegre.
- Behr G.A., Schnorr C.E., Simoes-Pires A., da Motta L.L., Frey B.N., Moreira J.C. (2012) Increased cerebral oxidative damage and decreased antioxidant defenses in ovariectomized and sham-operated rats supplemented with vitamin A. *Cell Biol Toxicol* 28:317-30. DOI.
- Bellantoni M.F., Blackman M.R. (1996) *Menopause and its consequences*. 4th ed ed., New York.
- Ben J., Soares F.M., Scherer E.B., Cechetti F., Netto C.A., Wyse A.T. (2010) Running exercise effects on spatial and avoidance tasks in ovariectomized rats. *Neurobiol Learn Mem* 94:312-7. DOI.
- Ben J., Soares F.M., Cechetti F., Vuaden F.C., Bonan C.D., Netto C.A., Wyse A.T. (2009) Exercise effects on activities of Na(+),K(+)-ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats. *Brain Res* 1302:248-55. DOI.
- Berchtold N.C., Kessler J.P., Pike C.J., Adlard P.A., Cotman C.W. (2001) Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 14:1992-2002. DOI.
- Bergen H.T., Pentecost B.T., Dickerman H.W., Pfaff D.W. (1993) In situ hybridization for creatine kinase-B messenger RNA in rat uterus and brain. *Mol Cell Endocrinol* 92:111-9. DOI.

- Blake C.A., Brown L.M., Duncan M.W., Hunsucker S.W., Helmke S.M. (2005) Estrogen regulation of the rat anterior pituitary gland proteome. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:800-7. DOI.
- Blass J.P. (2001) Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J Neurosci Res* 66:851-6. DOI.
- Boero J., Qin W., Cheng J., Woolsey T.A., Strauss A.W., Khuchua Z. (2003) Restricted neuronal expression of ubiquitous mitochondrial creatine kinase: changing patterns in development and with increased activity. *Mol Cell Biochem* 244:69-76. DOI.
- Bolanos J.P., Moro M.A., Lizasoain I., Almeida A. (2009) Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev* 61:1299-315. DOI.
- Booth F.W., Gordon S.E., Carlson C.J., Hamilton M.T. (2000) Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *J Appl Physiol (1985)* 88:774-87. DOI.
- Brinton R.D. (2008) The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. *Trends Neurosci* 31:529-37. DOI.
- Brinton R.D. (2009) Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function. *Trends Pharmacol Sci* 30:212-22. DOI.
- Brooks G.A., White T.P. (1978) Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 45:1009-15. DOI.
- Buford T.W., Anton S.D., Clark D.J., Higgins T.J., Cooke M.B. (2013) Optimizing the Benefits of Exercise on Physical Function in Older Adults. *PM R*. DOI.
- Burger H.G., Hale G.E., Robertson D.M., Dennerstein L. (2007) A review of hormonal changes during the menopausal transition: focus on findings from the Melbourne Women's Midlife Health Project. *Hum Reprod Update* 13:559-65. DOI.
- Cadenas E., Davies K.J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222-30. DOI.
- Callegari-Jaques S.I. (2003) *Bioestatística – Princípios e Aplicações*. 1ed. ed., Porto Alegre.
- Cecarini V., Gee J., Fioretti E., Amici M., Angeletti M., Eleuteri A.M., Keller J.N. (2007) Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1773:93-104. DOI.
- Cechetti F., Rhod A., Simao F., Santin K., Salbego C., Netto C.A., Siqueira I.R. (2007) Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res* 1157:121-5. DOI.
- Chakraborty T.R., Gore A.C. (2004) Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:977-87. DOI.

- Cotman C.W., Berchtold N.C. (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25:295-301. DOI.
- da Cunha M.J., da Cunha A.A., Ferreira A.G., Machado F.R., Schmitz F., Lima D.D., Delwing D., Mussulini B.H., Wofchuk S., Netto C.A., Wyse A.T. (2012) Physical exercise reverses glutamate uptake and oxidative stress effects of chronic homocysteine administration in the rat. *Int J Dev Neurosci* 30:69-74. DOI.
- da Silva C.G., Bueno A.R., Schuck P.F., Leipnitz G., Ribeiro C.A., Wannmacher C.M., Wyse A.T., Wajner M. (2003) D-2-hydroxyglutaric acid inhibits creatine kinase activity from cardiac and skeletal muscle of young rats. *Eur J Clin Invest* 33:840-7. DOI.
- Daniel J.M., Dohanich G.P. (2001) Acetylcholine mediates the estrogen-induced increase in NMDA receptor binding in CA1 of the hippocampus and the associated improvement in working memory. *J Neurosci* 21:6949-56. DOI.
- Davey D.A. (2013) Alzheimer's disease, dementia, mild cognitive impairment and the menopause: a 'window of opportunity'? *Womens Health (Lond Engl)* 9:279-90. DOI.
- de Azevedo Guimaraes A.C., Baptista F. (2011) Influence of habitual physical activity on the symptoms of climacterium/menopause and the quality of life of middle-aged women. *Int J Womens Health* 3:319-28. DOI.
- Devlin T.M. (2005) *Textbook of biochemistry: with clinical correlations*. 6th ed. Wiley, John & Sons, Incorporated.
- Ding F., Yao J., Zhao L., Mao Z., Chen S., Brinton R.D. (2013) Ovariectomy induces a shift in fuel availability and metabolism in the hippocampus of the female transgenic model of familial Alzheimer's. *PLoS One* 8:e59825. DOI.
- Dudkina N.V., Sunderhaus S., Boekema E.J., Braun H.P. (2008) The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J Bioenerg Biomembr* 40:419-24. DOI.
- Edwards B.J., Li J. (2013) Endocrinology of menopause. *Periodontol* 2000 61:177-94. DOI.
- Erbsloh F., Bernsmeier A., Hillesheim H. (1958) [The glucose consumption of the brain & its dependence on the liver]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr* 196:611-26. DOI.
- Erecinska M., Silver I.A. (1989) ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:2-19. DOI.
- Erecinska M., Silver I.A. (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 43:37-71. DOI.
- Ernst C., Olson A.K., Pinel J.P., Lam R.W., Christie B.R. (2006) Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis? *J Psychiatry Neurosci* 31:84-92. DOI.
- Femminella G.D., de Lucia C., Iacotucci P., Formisano R., Petraglia L., Allocca E., Ratto E., D'Amico L., Rengo C., Pagano G., Bonaduce D., Rengo G.,

- Ferrara N. (2013) Neuro-hormonal effects of physical activity in the elderly. *Front Physiol* 4:378. DOI.
- Ferreira A.G., da Cunha A.A., Scherer E.B., Machado F.R., da Cunha M.J., Braga A., Mussulini B.H., Moreira J.D., Wofchuk S., Souza D.O., Wyse A.T. (2012) Evidence that hyperprolinemia alters glutamatergic homeostasis in rat brain: neuroprotector effect of guanosine. *Neurochem Res* 37:205-13. DOI.
- Fiocchetti M., Ascenzi P., Marino M. (2012) Neuroprotective effects of 17beta-estradiol rely on estrogen receptor membrane initiated signals. *Front Physiol* 3:73. DOI.
- Fischer J.C., Ruitenbeek W., Berden J.A., Trijbels J.M., Veerkamp J.H., Stadhouders A.M., Sengers R.C., Janssen A.J. (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23-36. DOI.
- Freitas T.P., Scaini G., Correa C., Santos P.M., Ferreira G.K., Rezin G.T., Moretti M., Valvassori S.S., Quevedo J., Streck E.L. (2010) Evaluation of brain creatine kinase activity in an animal model of mania induced by ouabain. *J Neural Transm* 117:149-53. DOI.
- Garraux G. (2008) [Preserve brain function...through physical exercise?]. *Rev Med Liege* 63:293-8. DOI.
- Gibbs R.B., Gabor R. (2003) Estrogen and cognition: applying preclinical findings to clinical perspectives. *J Neurosci Res* 74:637-43. DOI.
- Griesbach G.S., Gomez-Pinilla F., Hovda D.A. (2007) Time window for voluntary exercise-induced increases in hippocampal neuroplasticity molecules after traumatic brain injury is severity dependent. *J Neurotrauma* 24:1161-71. DOI.
- Gruber C.J., Tschugguel W., Schneeberger C., Huber J.C. (2002) Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346:340-52. DOI.
- Henderson V.W. (2013) Alzheimer's disease: Review of hormone therapy trials and implications for treatment and prevention after menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol*. DOI.
- Howarth C., Gleeson P., Attwell D. (2012) Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1222-32. DOI.
- Huang S., Millar A.H. (2013) Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Curr Opin Plant Biol* 16:344-9. DOI.
- Huang S., Taylor N.L., Narsai R., Eubel H., Whelan J., Millar A.H. (2010) Functional and composition differences between mitochondrial complex II in Arabidopsis and rice are correlated with the complex genetic history of the enzyme. *Plant Mol Biol* 72:331-42. DOI.
- Hughes B.P. (1962) A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 7:597-603. DOI.

- Huttemann M., Helling S., Sanderson T.H., Sinkler C., Samavati L., Mahapatra G., Varughese A., Lu G., Liu J., Ramzan R., Vogt S., Grossman L.I., Doan J.W., Marcus K., Lee I. (2012) Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1817:598-609. DOI.
- Irwin R.W., Yao J., Hamilton R.T., Cadenas E., Brinton R.D., Nilsen J. (2008) Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology* 149:3167-75. DOI.
- Irwin R.W., Yao J., To J., Hamilton R.T., Cadenas E., Brinton R.D. (2012) Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. *J Neuroendocrinol* 24:236-48. DOI.
- Izquierdo I., Barros D.M., Mello e Souza T., de Souza M.M., Izquierdo L.A., Medina J.H. (1998) Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393:635-6. DOI.
- Izquierdo I., Quillfeldt J.A., Zanatta M.S., Quevedo J., Schaeffer E., Schmitz P.K., Medina J.H. (1997) Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci* 9:786-93. DOI.
- Kirk-Sanchez N.J., McGough E.L. (2014) Physical exercise and cognitive performance in the elderly: current perspectives. *Clin Interv Aging* 9:51-62. DOI.
- Klein A.M., Ferrante R.J. (2007) The neuroprotective role of creatine. *Subcell Biochem* 46:205-43. DOI.
- Konorev E.A., Hogg N., Kalyanaraman B. (1998) Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett* 427:171-4. DOI.
- Kostanyan A., Nazaryan K. (1992) Rat brain glycolysis regulation by estradiol-17 beta. *Biochim Biophys Acta* 1133:301-6. DOI.
- Koufen P., Stark G. (2000) Free radical induced inactivation of creatine kinase: sites of interaction, protection, and recovery. *Biochim Biophys Acta* 1501:44-50. DOI.
- Kramer A.F., Colcombe S.J., McAuley E., Scalf P.E., Erickson K.I. (2005) Fitness, aging and neurocognitive function. *Neurobiol Aging* 26 Suppl 1:124-7. DOI.
- Kramer A.F., Hahn S., Cohen N.J., Banich M.T., McAuley E., Harrison C.R., Chason J., Vakil E., Bardell L., Boileau R.A., Colcombe A. (1999) Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 400:418-9. DOI.
- Kristian T. (2004) Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell Calcium* 36:221-33. DOI.
- Kuiper G.G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.A. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-70. DOI.

- Kume-Kick J., Ferris D.C., Russo-Menna I., Rice M.E. (1996) Enhanced oxidative stress in female rat brain after gonadectomy. *Brain Res* 738:8-14. DOI.
- Laurin D., Verreault R., Lindsay J., MacPherson K., Rockwood K. (2001) Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol* 58:498-504. DOI.
- Leong S.F., Lai J.C., Lim L., Clark J.B. (1981) Energy-metabolizing enzymes in brain regions of adult and aging rats. *J Neurochem* 37:1548-56. DOI.
- Lin M.T., Beal M.F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-95. DOI.
- Lobo R.A. (2007) Menopause and stroke and the effects of hormonal therapy. *Climacteric* 10 Suppl 2:27-31. DOI.
- Lopez-Grueso R., Borrás C., Gambini J., Vina J. (2010) [Aging and ovariectomy cause a decrease in brain glucose consumption in vivo in Wistar rats]. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 45:136-40. DOI.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75. DOI.
- Mackedanz V., Mattos C.B., Feksa L.R., Wannmacher C.M., Wyse A.T. (2011) Ovariectomy alters energy metabolism in rat striatum: effect of supplementation with soy diet rich in isoflavones. *Metab Brain Dis* 26:97-105. DOI.
- Marcondes F.K., Bianchi F.J., Tanno A.P. (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62:609-14. DOI.
- Martins D.B., Mazzanti C.M., Franca R.T., Pagnoncelli M., Costa M.M., de Souza E.M., Goncalves J., Spanevello R., Schmatz R., da Costa P., Mazzanti A., Beckmann D.V., Cecim Mda S., Schetinger M.R., Lopes S.T. (2012) 17-beta estradiol in the acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and blood of ovariectomized adult and middle-aged rats. *Life Sci* 90:351-9. DOI.
- Mattevi A., Bolognesi M., Valentini G. (1996) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *FEBS Lett* 389:15-9. DOI.
- Mattson M.P. (2000) Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res* 886:47-53. DOI.
- McAndrew L.M., Napolitano M.A., Albrecht A., Farrell N.C., Marcus B.H., Whiteley J.A. (2009) When, why and for whom there is a relationship between physical activity and menopause symptoms. *Maturitas* 64:119-25. DOI.
- McCrate M.E., Kaspar B.K. (2008) Physical activity and neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromolecular Med* 10:108-17. DOI.
- McEwen B. (2002) Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57:357-84. DOI.

- Mergenthaler P., Lindauer U., Dienel G.A., Meisel A. (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 36:587-97. DOI.
- Messinis I.E. (2006) Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Hum Reprod Update* 12:557-71. DOI.
- Milner T.A., McEwen B.S., Hayashi S., Li C.J., Reagan L.P., Alves S.E. (2001) Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol* 429:355-71. DOI.
- Milner T.A., Ayoola K., Drake C.T., Herrick S.P., Tabori N.E., McEwen B.S., Warriar S., Alves S.E. (2005) Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 491:81-95. DOI.
- Miquel J., Ramirez-Bosca A., Ramirez-Bosca J.V., Alperi J.D. (2006) Menopause: a review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr* 42:289-306. DOI.
- Mitra S.W., Hoskin E., Yudkovitz J., Pear L., Wilkinson H.A., Hayashi S., Pfaff D.W., Ogawa S., Rohrer S.P., Schaeffer J.M., McEwen B.S., Alves S.E. (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144:2055-67. DOI.
- Mitterling K.L., Spencer J.L., Dziedzic N., Shenoy S., McCarthy K., Waters E.M., McEwen B.S., Milner T.A. (2010) Cellular and subcellular localization of estrogen and progesterin receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 518:2729-43. DOI.
- Monteiro S.C., Matte C., Delwing D., Wyse A.T. (2005a) Ovariectomy increases Na⁺, K⁺-ATPase, acetylcholinesterase and catalase in rat hippocampus. *Mol Cell Endocrinol* 236:9-16. DOI.
- Monteiro S.C., Mattos C.B., Scherer E.B., Wyse A.T. (2007) Supplementation with vitamins E plus C or soy isoflavones in ovariectomized rats: effect on the activities of Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPase and cholinesterases. *Metab Brain Dis* 22:156-71. DOI.
- Monteiro S.C., de Mattos C.B., Ben J., Netto C.A., Wyse A.T. (2008) Ovariectomy impairs spatial memory: prevention and reversal by a soy isoflavone diet. *Metab Brain Dis* 23:243-53. DOI.
- Monteiro S.C., Stefanello F.M., Vianna L.P., Matte C., Barp J., Bello-Klein A., Trindade V.M., Wyse A.T. (2005b) Ovariectomy enhances acetylcholinesterase activity but does not alter ganglioside content in cerebral cortex of female adult rats. *Metab Brain Dis* 20:35-44. DOI.
- Moran M., Moreno-Lastres D., Marin-Buera L., Arenas J., Martin M.A., Ugalde C. (2012) Mitochondrial respiratory chain dysfunction: implications in neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* 53:595-609. DOI.
- Morissette M., Le Saux M., D'Astous M., Jourdain S., Al Sweidi S., Morin N., Estrada-Camarena E., Mendez P., Garcia-Segura L.M., Di Paolo T. (2008)

- Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108:327-38. DOI.
- Moseley A.E., Williams M.T., Schaefer T.L., Bohanan C.S., Neumann J.C., Behbehani M.M., Vorhees C.V., Lingrel J.B. (2007) Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 27:616-26. DOI.
- Musatov A., Robinson N.C. (2012) Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radic Res* 46:1313-26. DOI.
- Navarro A., Boveris A. (2007) The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C670-86. DOI.
- Nelson D.L., Cox M.M. (2012) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th ed. ed. W. H. Freeman, New York.
- Nilsen J. (2008) Estradiol and neurodegenerative oxidative stress. *Front Neuroendocrinol* 29:463-75. DOI.
- O'Bryant S.E., Palav A., McCaffrey R.J. (2003) A review of symptoms commonly associated with menopause: implications for clinical neuropsychologists and other health care providers. *Neuropsychol Rev* 13:145-52. DOI.
- Osterlund M.K., Gustafsson J.A., Keller E., Hurd Y.L. (2000) Estrogen receptor beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression within the human forebrain: distinct distribution pattern to ERalpha mRNA. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3840-6. DOI.
- Ostlund H., Keller E., Hurd Y.L. (2003) Estrogen receptor gene expression in relation to neuropsychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1007:54-63. DOI.
- Owen L., Sunram-Lea S.I. (2011) Metabolic agents that enhance ATP can improve cognitive functioning: a review of the evidence for glucose, oxygen, pyruvate, creatine, and L-carnitine. *Nutrients* 3:735-55. DOI.
- Pacelli C., Latorre D., Cocco T., Capuano F., Kukat C., Seibel P., Villani G. (2011) Tight control of mitochondrial membrane potential by cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* 11:334-41. DOI.
- Paolillo S., Rengo G., Pagano G., Pellegrino T., Savarese G., Femminella G.D., Tuccillo M., Boemio A., Attena E., Formisano R., Petraglia L., Scopacasa F., Galasso G., Leosco D., Trimarco B., Cuocolo A., Perrone-Filardi P. (2013) Impact of diabetes on cardiac sympathetic innervation in patients with heart failure: a 123I meta-iodobenzylguanidine (123I MIBG) scintigraphic study. *Diabetes Care* 36:2395-401. DOI.
- Pentecost B.T., Mattheiss L., Dickerman H.W., Kumar S.A. (1990) Estrogen regulation of creatine kinase-B in the rat uterus. *Mol Endocrinol* 4:1000-10. DOI.
- Petrovska S., Dejanova B., Jurisic V. (2012) Estrogens: mechanisms of neuroprotective effects. *J Physiol Biochem* 68:455-60. DOI.

- Pierron D., Wildman D.E., Huttemann M., Markondapatnaikuni G.C., Aras S., Grossman L.I. (2012) Cytochrome c oxidase: evolution of control via nuclear subunit addition. *Biochim Biophys Acta* 1817:590-7. DOI.
- Poomalar G., K. , Arounassalame B. (2013) The quality of life during and after menopause among rural women. *J Clin Diagn Res* 7:135-9. DOI.
- Prins M.L. (2008) Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1-16. DOI.
- Rasmussen P., Brassard P., Adser H., Pedersen M.V., Leick L., Hart E., Secher N.H., Pedersen B.K., Pilegaard H. (2009) Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol* 94:1062-9. DOI.
- Rettberg J.R., Yao J., Brinton R.D. (2013) Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Front Neuroendocrinol*. DOI.
- Romano A.D., Serviddio G., de Matthaëis A., Bellanti F., Vendemiale G. (2010) Oxidative stress and aging. *J Nephrol* 23 Suppl 15:S29-36. DOI.
- Rossouw J.E., Anderson G.L., Prentice R.L., LaCroix A.Z., Kooperberg C., Stefanick M.L., Jackson R.D., Beresford S.A., Howard B.V., Johnson K.C., Kotchen J.M., Ockene J. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321-33. DOI.
- Rustin P., Chretien D., Bourgeron T., Gerard B., Rotig A., Saudubray J.M., Munnich A. (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35-51. DOI.
- Sato T., Teramoto T., Tanaka K., Ohnishi Y., Irifune M., Nishikawa T. (2003) Effects of ovariectomy and calcium deficiency on learning and memory of eight-arm radial maze in middle-aged female rats. *Behav Brain Res* 142:207-16. DOI.
- Savonenko A.V., Markowska A.L. (2003) The cognitive effects of ovariectomy and estrogen replacement are modulated by aging. *Neuroscience* 119:821-30. DOI.
- Schlattner U., Tokarska-Schlattner M., Wallimann T. (2006) Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1762:164-80. DOI.
- Scopel D., Fochesatto C., Cimarosti H., Rabbo M., Bello-Klein A., Salbego C., Netto C.A., Siqueira I.R. (2006) Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* 71:155-9. DOI.
- Scott E., Zhang Q.G., Wang R., Vadlamudi R., Brann D. (2012) Estrogen neuroprotection and the critical period hypothesis. *Front Neuroendocrinol* 33:85-104. DOI.
- Seifert T., Brassard P., Wissenberg M., Rasmussen P., Nordby P., Stallknecht B., Adser H., Jakobsen A.H., Pilegaard H., Nielsen H.B., Secher N.H.

- (2010) Endurance training enhances BDNF release from the human brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:R372-7. DOI.
- Shangold M.M. (1990) Exercise in the menopausal woman. *Obstet Gynecol* 75:53S-58S; discussion 81S-83S. DOI.
- Sharpe M.A., Cooper C.E. (1998) Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *J Biol Chem* 273:30961-72. DOI.
- Sherwin B.B. (2003) Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr Rev* 24:133-51. DOI.
- Shi C., Xu J. (2008) Increased vulnerability of brain to estrogen withdrawal-induced mitochondrial dysfunction with aging. *J Bioenerg Biomembr* 40:625-30. DOI.
- Shi C., Zou J., Li G., Ge Z., Yao Z., Xu J. (2011) Bilobalide protects mitochondrial function in ovariectomized rats by up-regulation of mRNA and protein expression of cytochrome c oxidase subunit I. *J Mol Neurosci* 45:69-75. DOI.
- Shoupe D. (2011) Individualizing hormone therapy to minimize risk: accurate assessment of risks and benefits. *Womens Health (Lond Engl)* 7:475-85. DOI.
- Shughrue P.J., Lane M.V., Merchenthaler I. (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507-25. DOI.
- Shughrue P.J., Scrimo P.J., Merchenthaler I. (2000) Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ERalpha and ERbeta) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Neuroscience* 96:41-9. DOI.
- Shulman G.I., Barret E.J., R.S. S. (2003) *Integrated fuel metabolism*. 6 th ed., New York.
- Sim Y.J., Kim S.S., Kim J.Y., Shin M.S., Kim C.J. (2004) Treadmill exercise improves short-term memory by suppressing ischemia-induced apoptosis of neuronal cells in gerbils. *Neurosci Lett* 372:256-61. DOI.
- Simpkins J.W., Yang S.H., Wen Y., Singh M. (2005) Estrogens, progestins, menopause and neurodegeneration: basic and clinical studies. *Cell Mol Life Sci* 62:271-80. DOI.
- Singh M., Dykens J.A., Simpkins J.W. (2006) Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:514-21. DOI.
- Soane L., Kahraman S., Kristian T., Fiskum G. (2007) Mechanisms of impaired mitochondrial energy metabolism in acute and chronic neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res* 85:3407-15. DOI.
- Soules M.R., Sherman S., Parrott E., Rebar R., Santoro N., Utian W., Woods N. (2001) Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertil Steril* 76:874-8. DOI.

- Spencer J.L., Waters E.M., Romeo R.D., Wood G.E., Milner T.A., McEwen B.S. (2008) Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol* 29:219-37. DOI.
- Stachowiak O., Dolder M., Wallimann T., Richter C. (1998) Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J Biol Chem* 273:16694-9. DOI.
- Stirone C., Duckles S.P., Krause D.N., Procaccio V. (2005) Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol Pharmacol* 68:959-65. DOI.
- Sugioka K., Nakano M., Totsune-Nakano H., Minakami H., Tero-Kubota S., Ikegami Y. (1988) Mechanism of O₂- generation in reduction and oxidation cycle of ubiquinones in a model of mitochondrial electron transport systems. *Biochim Biophys Acta* 936:377-85. DOI.
- Tomimoto H., Yamamoto K., Homburger H.A., Yanagihara T. (1993) Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol* 86:447-55. DOI.
- Turrens J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335-44. DOI.
- Valentini G., Chiarelli L., Fortin R., Speranza M.L., Galizzi A., Mattevi A. (2000) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 275:18145-52. DOI.
- van Praag H., Shubert T., Zhao C., Gage F.H. (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680-5. DOI.
- Vartak R., Porras C.A., Bai Y. (2013) Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell* 4:582-90. DOI.
- Vaynman S., Gomez-Pinilla F. (2005) License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. *Neurorehabil Neural Repair* 19:283-95. DOI.
- Vaynman S.S., Ying Z., Yin D., Gomez-Pinilla F. (2006) Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res* 1070:124-30. DOI.
- Verma S., Srivastava R.K., Sood S., Sharma S. (2005) Effect of estrogen on hypoglycemia-induced neurological impairment in ovariectomized rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27:405-9. DOI.
- Vest R.S., Pike C.J. (2013) Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease. *Horm Behav* 63:301-7. DOI.
- Wallimann T., Hemmer W. (1994) Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 133-134:193-220. DOI.
- Wallimann T., Wyss M., Brdiczka D., Nicolay K., Eppenberger H.M. (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the

- 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281 (Pt 1):21-40. DOI.
- Wallimann T., Dolder M., Schlattner U., Eder M., Hornemann T., Kraft T., Stolz M. (1998) Creatine kinase: an enzyme with a central role in cellular energy metabolism. *MAGMA* 6:116-9. DOI.
- Waynforth H.B., Flecknell P.A. (1992) *Experimental and surgical technique in the rat* 2nd ed ed.
- Wendt S., Dedeoglu A., Speer O., Wallimann T., Beal M.F., Andreassen O.A. (2002) Reduced creatine kinase activity in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Free Radic Biol Med* 32:920-6. DOI.
- Whelan T.J., Goss P.E., Ingle J.N., Pater J.L., Tu D., Pritchard K., Liu S., Shepherd L.E., Palmer M., Robert N.J., Martino S., Muss H.B. (2005) Assessment of quality of life in MA.17: a randomized, placebo-controlled trial of letrozole after 5 years of tamoxifen in postmenopausal women. *J Clin Oncol* 23:6931-40. DOI.
- Whittingham T.S., Lipton P. (1981) Cerebral synaptic transmission during anoxia is protected by creatine. *J Neurochem* 37:1618-21. DOI.
- Wise P.M. (2001) The 'menopause' and the aging brain: causes and repercussions of hypoestrogenicity. *Biogerontology* 2:113-5. DOI.
- Wise P.M. (2002) Estrogens and neuroprotection. *Trends Endocrinol Metab* 13:229-30. DOI.
- Witt K.A., Mark K.S., Hom S., Davis T.P. (2003) Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2820-31. DOI.
- World Health Organization. (1996) *Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group.* World Health Organ Tech Rep Ser 866:1-107. DOI.
- World Health Organization. (2009) *Mental health aspects of women's reproductive health. A global review of the literature.*, Geneva.
- Wyss M., Kaddurah-Daouk R. (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107-213. DOI.
- Xu X.W., Shi C., He Z.Q., Ma C.M., Chen W.H., Shen Y.P., Guo Q., Shen C.J., Xu J. (2008) Effects of phytoestrogen on mitochondrial structure and function of hippocampal CA1 region of ovariectomized rats. *Cell Mol Neurobiol* 28:875-86. DOI.
- Yang L.C., Zhang Q.G., Zhou C.F., Yang F., Zhang Y.D., Wang R.M., Brann D.W. (2010) Extranuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus. *PLoS One* 5:e9851. DOI.
- Yang S.H., Liu R., Perez E.J., Wen Y., Stevens S.M., Jr., Valencia T., Brun-Zinkernagel A.M., Prokai L., Will Y., Dykens J., Koulen P., Simpkins J.W. (2004) Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4130-5. DOI.