

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITO DA OVARECTOMIA SOBRE PARÂMETROS DO METABOLISMO
ENERGÉTICO E COMPORTAMENTAIS EM RATAS ADULTAS**

VANIZE MACKEDANZ LÜDTKE

ORIENTADORA

Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITO DA OVARIECTOMIA SOBRE PARÂMETROS DO METABOLISMO
ENERGÉTICO E COMPORTAMENTAIS EM RATAS ADULTAS**

VANIZE MACKEDANZ LÜDTKE

ORIENTADORA

Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza 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, 2011

Ao meu marido Igor,
por tornar possível mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus “por tudo o que Tens feito, por tudo o que Vais fazer”.

À minha orientadora, profa. Dra. Angela Wyse, pelas oportunidades de crescimento, pela confiança em mim e no meu trabalho todos esses anos, pelos ensinamentos, pelo incentivo, apoio, carinho e amizade.

Aos amigos e colegas do laboratório Aline, Andréa, Bárbara, Cris Matté, Cris Mattos, Emi, Francieli, Felipe, Fernanda, Jana, Ju, Lenir, Maira, Siomara e Tiago. Todos de alguma forma me ajudaram muito com a realização deste trabalho e na minha formação. Obrigada pela amizade, ótima convivência, apoio e por toda ajuda. Vocês estarão para sempre em meu coração!

Ao prof. Dr. Clovis M. D. Wannmacher pelos sábios conselhos, pela amizade e por tornar nossos dias na Bioquímica mais alegres e musicais!

À Isabel André e Carlos Vinícius Gonçalves do SANEP agradeço pela compreensão, apoio e oportunidade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela formação de qualidade e gratuita.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao meu irmão Toni pelo apoio, carinho e ajuda.

Aos meus pais Ronaldo e Nelda, meus grandes mestres, agradeço pelo amor, apoio, confiança, dedicação, exemplo e incentivo.

Ao meu marido Igor pela amizade, compreensão, paciência e amor.
Obrigada por estar sempre ao meu lado me apoiando nos momentos mais importantes da minha vida.

*“Eu não sou quem eu gostaria de ser;
eu não sou quem eu poderia ser, ainda,
eu não sou quem eu deveria ser.*

*Mas graças a Deus
eu não sou mais quem eu era!”*

Martin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XIV
I. INTRODUÇÃO	1
1. A Menopausa e a Neuroproteção do Estrógeno	1
2. Metabolismo Energético Cerebral	3
2.1 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	5
2.2 Creatina Quinase	8
2.3 Piruvato Quinase	10
2.4 Cadeia Transportadora de Elétrons e Fosforilação Oxidativa.....	12
3. Ansiedade	14
II. OBJETIVOS.....	16
Objetivo geral.....	16
Objetivos específicos	16
III. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Animais e reagentes	18
3.2 Protocolo experimental	18
3.3 Controle do ciclo estral e medida do estradiol	18
3.4 Estudos bioquímicos	19
3.4.1 Preparação das amostras.....	19
3.4.2 Preparação das membranas plasmáticas sinápticas	21
3.4.3 Determinação da atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	21

3.4.4	Determinação da atividade da piruvato quinase	22
3.4.5	Determinação da atividade da succinato desidrogenase	22
3.4.6	Determinação da atividade do complexo II	23
3.4.7	Determinação da atividade da citocromo c oxidase.....	23
3.4.8	Determinação da atividade da creatina quinase	24
3.5	Determinação protéica	24
3.6	Tarefas comportamentais	24
3.6.1	Labirinto em cruz elevado	25
3.6.2	Caixa claro-escuro	26
3.7	Análise estatística	27
IV.	RESULTADOS	28
4.1	Efeito da ovariectomia sobre a atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	28
4.2	Efeito da ovariectomia sobre a atividade da piruvato quinase	28
4.3	Efeito da ovariectomia sobre as atividades da succinato desidrogenase, do complexo II e da citocromo c oxidase	29
4.4	Efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase citosólica.....	31
4.5	Efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase mitocondrial	32
4.6	Efeito da ovariectomia sobre o comportamento na tarefa do labirinto em cruz elevado	33
4.7	Efeito da ovariectomia sobre o comportamento no teste da caixa claro-escuro	34
V.	DISCUSSÃO	35
VI.	CONCLUSÕES.....	44
VII.	PERSPECTIVAS	45
VIII.	REFERÊNCIAS	46

RESUMO

A menopausa se caracteriza pela diminuição dos níveis plasmáticos de estrógeno em mulheres. Dados na literatura mostram o papel neuroprotetor desse hormônio e sugerem que a privação estrogênica está associada à patogenia de condições neurodegenerativas e ao aparecimento de distúrbios emocionais, como a ansiedade. Neste contexto, é descrito que mulheres pós-menopáusicas são mais vulneráveis a esses distúrbios do que as mulheres jovens. No presente trabalho, avaliamos os efeitos da ovariectomia, um modelo animal de depleção hormonal ovariana, sobre alguns parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratas adultas. Inicialmente, investigamos o efeito da ovariectomia sobre alguns parâmetros do metabolismo energético (Na^+ , K^+ -ATPase, piruvato quinase e enzimas da cadeia respiratória) em estriado de ratas adultas. Resultados mostraram que a ovariectomia aumenta as atividades das enzimas Na^+ , K^+ -ATPase, succinato desidrogenase e complexo II. Também verificamos o efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase nas frações citosólica e mitocondrial preparadas a partir de hipocampo de ratas. Nossos resultados mostraram que a ovariectomia aumentou significativamente a atividade da creatina quinase citosólica, mas não alterou a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de hipocampo de ratas adultas. Finalmente, investigamos o efeito da ovariectomia sobre o comportamento tipo-ansiedade em ratas adultas. Observamos que o comportamento dos animais na tarefa do labirinto em cruz elevado e no teste da caixa claro-escuro não foi alterado pela ovariectomia. Em conjunto esses resultados podem colaborar, pelo menos em parte, para o entendimento de alguns sintomas relacionados à menopausa. Entretanto, mais estudos serão necessários a fim de elucidar os mecanismos envolvidos na depleção estrogênica.

ABSTRACT

Menopause is characterized by decreased plasma levels of estrogen in women. Literature data show the neuroprotective role of this hormone and suggest that estrogen deprivation is associated with the pathogenesis of neurodegenerative conditions and with the emergence of emotional disorders such as anxiety. In this context, it is reported that postmenopausal women are more vulnerable to these disorders than younger women. In this study, we evaluated the effects of ovariectomy, an animal model of hormonal depletion on some biochemical and behavioral parameters in female adult rats. Initially, we investigated the effect of ovariectomy on some parameters of energy metabolism (Na^+ , K^+ -ATPase, pyruvate kinase and respiratory chain enzymes) in striatum of female adult rats. Results showed that ovariectomy increases the activity of the enzymes Na^+ , K^+ -ATPase, succinate dehydrogenase and complex II. We also tested the effect of ovariectomy on the creatine kinase activity in cytosolic and mitochondrial fractions prepared from hippocampus of female rats. Our results showed that ovariectomy significantly increased the activity of cytosolic creatine kinase, but did not alter the activity of creatine kinase in the mitochondrial fraction of hippocampus of female adult rats. Finally, we investigated the effect of ovariectomy on anxiety-like behavior in female adult rats. We observed that the animal behavior in the elevated plus maze task and in light-dark box test was not affected by ovariectomy. Taken together these results may contribute, at least in part, to the understanding of some symptoms related to menopause. However more studies are needed to elucidate the mechanisms involved in estrogen depletion.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
BB-CK	creatina quinase citosólica cerebral
CK	creatina quinase
DNA	ácido desoxirribonucleico
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
K ⁺	íon potássio
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
Mg ²⁺	íon magnésio
Mi-CK	creatina quinase mitocondrial
Mi _s -CK	creatina quinase mitocondrial sarcomérica
Mi _u -CK	creatina quinase mitocondrial ubíqua
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
Na ⁺	íon sódio
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
OVX	ovariectomizadas
PCr	fosfocreatina
PEP	fosfoenolpiruvato
Pi	fosfato inorgânico
PK	piruvato quinase
RE	receptores estrogênicos
RE α	receptor estrogênico alfa

RE β	receptor estrogênico beta
SDH	succinato desidrogenase
SNC	sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo catalítico da Na^+, K^+ -ATPase (Nelson e Cox, 2006).....	7
Figura 2. Reação de transfosforilação catalisada pela creatina quinase.....	9
Figura 3. Reação catalítica da piruvato quinase.....	10
Figura 4. Fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória (Nelson e Cox, 2006).....	13
Figura 5. Efeito da ovariectomia sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em estriado de ratas adultas.....	28
Figura 6. Efeito da ovariectomia sobre a atividade da piruvato quinase em estriado de ratas adultas.	29
Figura 7. Efeito da ovariectomia sobre as atividades da succinato desidrogenase (A), do complexo II (B) e da citocromo c oxidase (C) em estriado de ratas adultas..	30
Figura 8. Efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase citosólica em hipocampo de ratas adultas.	31
Figura 9. Efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase mitocondrial em hipocampo de ratas adultas.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da ovariectomia sobre o comportamento na tarefa do labirinto em cruz elevado	33
Tabela 2. Efeito da ovariectomia sobre o comportamento no teste da caixa claro-escuro	34

I. INTRODUÇÃO

1. A Menopausa e a Neuroproteção do Estrógeno

A menopausa é definida como uma espontânea e permanente interrupção do ciclo menstrual resultante da perda da atividade folicular ovariana (World Health Organization, 1996). Ocorre aproximadamente aos 51 anos de idade nas mulheres e apresenta como consequência a redução dos níveis plasmáticos de estrógeno. Com o aumento da expectativa de vida no último século, as mulheres passaram a viver um terço de suas vidas na pós-menopausa. Sabe-se que o estado pós-menopausal e a privação de estrógenos ovarianos causam impacto em múltiplos sistemas fisiológicos incluindo o ósseo, o cardiovascular, o imune e o sistema nervoso central (SNC) (Wise, 2001).

Em mulheres adultas com ciclo reprodutivo normal, os ovários secretam hormônios esteróides como os estrógenos e a progesterona, e hormônios peptídeos, como as ativinas, folistatinas e inibinas (Burger, 1996). Três estrógenos são encontrados naturalmente no plasma feminino: 17 β -estradiol, estrona e estriol (Singh et al., 2006). O mais abundante e potente estrógeno humano é o 17 β -estradiol, também conhecido como estradiol ou estrógeno. Estriol e estrona estão presentes em baixos níveis e apresentam menor atividade sobre os receptores estrogênicos (RE) (Gruber et al., 2002; Morissette et al., 2008). Após a menopausa, o córtex adrenal é a principal fonte primária de compostos estrogênicos (Ruggiero e Likis, 2002). No entanto, mais de 80% destes estrógenos endógenos circulantes são inativos na forma de conjugados de sulfato e glucoronídeo (Wood et al., 2007).

Os estrógenos regulam uma ampla variedade de funções não reprodutivas no SNC pela interação com vários processos celulares e moleculares. Em adição ao seu papel de hormônio sexual, o estrógeno exerce um efeito neuroprotetor (Behl, 2002), capaz de promover a plasticidade sináptica e a excitabilidade neural (McEwen, 2002), induzir sobrevivência neuronal (Yang et al., 2010) e modular marcadores sinápticos que parecem ser relacionados à cognição (Gibbs e Gabor, 2003). Em contrapartida, estudos têm demonstrado que a privação estrogênica está associada à perda de memória, ao declínio da função cognitiva, ao aparecimento de distúrbios emocionais, como a ansiedade, bem como à patogênese de doenças neurodegenerativas (Halbreich et al., 1995; Van Duijn, 1999; Birge, 2003; O'Bryant et al., 2003; Henderson, 2005; Craig e Murphy, 2007). Neste contexto, a incidência de doenças neurodegenerativas é maior em mulheres na pós-menopausa do que em mulheres jovens (González et al., 2008).

A ação estrogênica no encéfalo pode ser mediada por dois mecanismos: clássico ou genômico e não genômico. O modo clássico de ação envolve a ligação de estrógeno a receptores estrogênicos RE α e RE β , ambos da superfamília de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição. O complexo estrógeno-receptor se liga às sequências específicas do DNA conhecidas como elementos responsivos a hormônios, resultando na regulação da transcrição de genes que codificam uma ampla variedade de proteínas (Beato e Klug, 2000; Genazzani et al., 2007). Ambos os subtipos de RE são encontrados no encéfalo com diferentes localizações, sugerindo papéis distintos sobre a função neuronal e o comportamento (Choleris et al., 2006). Os RE α são principalmente expressos em regiões relacionadas à reprodução, como o hipotálamo e a amígdala, e os RE β no cerebelo, córtex cerebral, hipocampo,

lócus cerúleos, entre outros (Mitra et al., 2003). Ambos os receptores possuem seu mRNA expresso no estriado (Kuppers e Beyer, 1999). Estudos recentes revelaram que os RE também estão presentes na mitocôndria (Chen et al., 2004; Yang et al., 2004).

Além do modo clássico de ação, tem sido descrito que os estrógenos podem exercer respostas mais rápidas, que ocorrem em poucos minutos, o que caracteriza o mecanismo não genômico. No entanto, pouco se sabe sobre esse mecanismo. Sugere-se que o modo não genômico seja mediado por RE de membrana, os quais se apresentam co-localizados com a caveolina, que levam a ativação de cascatas de sinalização intracelulares, incluindo a modulação da concentração intracelular de cálcio e a fosforilação de uma variedade de proteínas como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Raz et al., 2008; McCarthy, 2009). Ou ainda, através da intercalação dos hormônios esteróides nas membranas celulares, modificando a interação entre lipídios e a fluidez de membrana (Whiting et al., 2000).

A ovariectomia em ratas adultas é o modelo animal mais amplamente utilizado a fim de mimetizar as mudanças na pós-menopausa em mulheres (Sato et al., 2003). A responsividade à depleção estrogênica é mais acentuada em ratas jovens (dois a seis meses). Uma semana após a ovariectomia, os níveis de hormônios ovarianos esteroidais já são indetectáveis no sangue (Chakraborty e Gore, 2004; Monteiro et al., 2005a).

2. Metabolismo Energético Cerebral

Grande parte da energia encefálica consumida é fornecida pelo metabolismo da glicose à CO_2 e H_2O , um processo que inicia com a glicólise e termina com a fosforilação oxidativa. Em condições normais, a glicose é o principal metabólito energético para o cérebro, visto que este tecido possui pouca reserva energética, comparada à sua elevada atividade metabólica, e, por isso, necessita de um suprimento de glicose contínuo a partir do sangue (Erecinska e Silver, 1994). Entretanto, durante o jejum prolongado, o cérebro gradualmente passa a utilizar os corpos cetônicos (Smith et al., 2007; Prins, 2008). Em estado de repouso, o cérebro é responsável por 60% da utilização de glicose e por 20% do total de oxigênio consumido pelo organismo (Ginsberg et al., 1992; Berg et al., 2004).

A oxidação da glicose através da glicólise forma duas moléculas de piruvato que são convertidas a CO_2 e H_2O no ciclo de Krebs e na cadeia transportadora de elétrons. O acoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa fornece mais de 95% do ATP sintetizado no SNC (Raichle e Mintun, 2006). Quando o fornecimento de oxigênio é normal, a fosforilação oxidativa depende da concentração de ATP, ADP e fosfato inorgânico (Pi) e da razão mitocondrial de NADH/NAD^+ , a qual é determinada pela atividade da cadeia transportadora de elétrons e pelo fornecimento de elétrons por enzimas mitocondriais. A cadeia transportadora de elétrons oxida o NADH e bombeia prótons para o espaço intermembrana da mitocôndria formando um gradiente de prótons que ativa a ATP sintase a qual produz o ATP na fosforilação oxidativa (Erecinska e Silver, 1994). A maior parte do ATP produzido no SNC é utilizado pela Na^+, K^+ -ATPase, uma enzima ligada à membrana plasmática que mantém o

potencial de membrana necessário à transmissão do impulso nervoso (Ames, 2000; Erecinska et al., 2004).

Um importante sistema auxiliar de manutenção dos níveis cerebrais de ATP é o da creatina quinase, que está presente tanto no citosol quanto ligada às membranas mitocondriais e catalisa a transfosforilação reversível entre a fosfocreatina e o ATP. Este sistema é associado a funções importantes, principalmente no cérebro, tais como o tamponamento energético (regenerando ATP) e a transferência de ATP dos sítios produtivos para os de consumo (Wyss et al., 1992; Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000).

2.1 Na⁺,K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase (EC 3.6.3.9), também conhecida como bomba de Na⁺, é uma proteína integral de membrana responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico celular, através do co-transporte de três íons Na⁺ para o meio extracelular e dois íons K⁺ para o meio intracelular, utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP como força motriz (Blanco e Mercer, 1998).

O gradiente eletroquímico gerado pelo fluxo dos íons Na⁺ e K⁺ através da membrana celular é utilizado para a manutenção da excitabilidade neuronal, regulação do volume celular, do pH intracelular e para o transporte de moléculas ligadas ao co-transporte de Na⁺, como glicose, aminoácidos e neurotransmissores (Blanco e Mercer, 1998; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Em adição ao transporte de íons Na⁺ e K⁺, a Na⁺,K⁺-ATPase também atua como receptor na transdução de sinal, respondendo a estímulos extracelulares específicos como hormônios e neurotransmissores (Xie e Askari, 2002).

Estruturalmente, a Na^+, K^+ -ATPase é formada por duas subunidades catalíticas α com dez segmentos transmembrana, que contém os sítios de ligação para Na^+ , K^+ , ATP e glicosídeos cardíacos, duas subunidades β regulatórias com um domínio transmembrana, e uma subunidade auxiliar formada por uma proteína da família FXYD (subunidade γ), que modula a afinidade ao substrato mas parece não ser necessária para a atividade enzimática (Mobasher et al., 2000; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004; Geering, 2006).

Durante seu ciclo catalítico, a Na^+, K^+ -ATPase apresenta-se sob duas formas conformacionais: uma desfosforilada, com alta afinidade por íons Na^+ e baixa afinidade por íons K^+ , conhecida como forma E1, e outra fosforilada, com alta afinidade por íons K^+ e baixa por íons Na^+ , forma E2 (Figura 1).

Primeiramente, três íons Na^+ ligam-se a Na^+, K^+ -ATPase na forma E1 no citoplasma. Quando a enzima é fosforilada pelo ATP, ocorre uma mudança conformacional e a perda da afinidade pelos íons Na^+ , que são liberados no meio extracelular. A enzima passa à forma E2, onde dois íons K^+ ligam-se em sítios de alta afinidade, e o fosfato inorgânico é liberado. A desfosforilação da enzima causa outra mudança conformacional, com isso a afinidade por íons K^+ é reduzida e os dois íons são liberados no meio intracelular. A enzima volta à forma E1, dando reinício ao ciclo (Kaplan, 2002; Devlin, 2003; Jorgensen et al., 2003). A ouabaína, glicosídeo cardiotônico e inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase, liga-se na enzima na etapa em que ela está fosforilada, impedindo a desfosforilação (Kaplan, 2002).

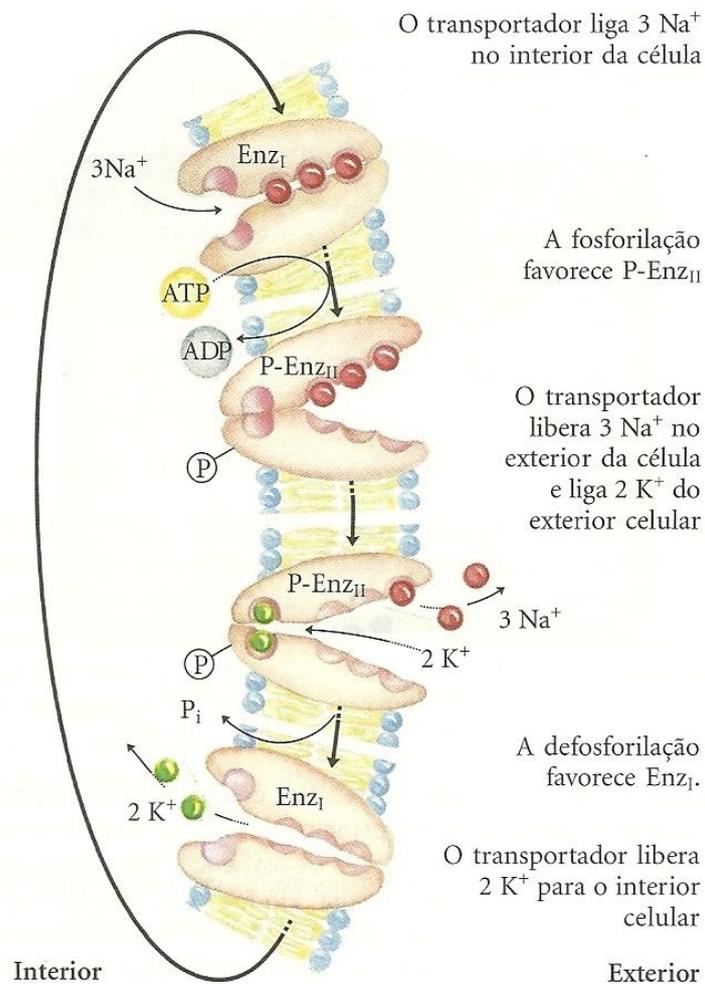


Figura 1. Ciclo catalítico da Na⁺,K⁺-ATPase (Nelson e Cox, 2006).

Devido ao papel fundamental da Na⁺,K⁺-ATPase para o funcionamento normal do SNC, alterações na sua atividade podem afetar diretamente a sinalização celular via neurotransmissores e a atividade neuronal (Moseley et al., 2007). Neste contexto, dados na literatura mostram que a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase está reduzida na isquemia cerebral (Wyse et al., 2000), na epilepsia (Grisar et al., 1992) e em processos neurodegenerativos como a doença de Alzheimer (Yu, 2003; Dickey et al., 2005). Em adição, estudos em animais demonstraram que alterações na atividade dessa enzima estão associadas a um

aumento no comportamento típico de ansiedade (Moseley et al., 2007; Crema et al., 2010).

A atividade enzimática da Na^+, K^+ -ATPase tem sido considerada um índice adequado de atividade neuronal em estudos de interações neuroendócrinas (Del Castilho et al., 1987). Estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que a ovariectomia aumenta a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo de ratas adultas (Monteiro et al., 2005b).

2.2 Creatina Quinase

A demanda e a oferta de energia celular são reguladas e bem equilibradas para a economia e a eficiência do uso da energia. Células com necessidades energéticas altas e variáveis, como os neurônios, podem aumentar a taxa de hidrólise do ATP em poucos segundos e por várias ordens de magnitude, mas os níveis intracelulares de ATP permanecem constantes. Essa homeostase energética pode ser explicada pela ação de sistemas auxiliares, como o da creatina quinase/fosfocreatina, que conectam sítios de consumo de energia com os de produção de energia através da transferência de grupos fosforil (Andres et al., 2008).

A creatina quinase (CK) (ATP: creatina *N*-fosforiltransferase, EC 2.7.3.2) é uma enzima que catalisa a transferência reversível do grupo *N*-fosforil da fosfocreatina (PCr) para o ADP, regenerando desta forma o ATP (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000) (Figura 2).



Figura 2. Reação de transfosforilação catalisada pela creatina quinase.

Há cinco principais isoenzimas da creatina quinase: três são encontradas no citoplasma e duas na mitocôndria (Mi-CK). As isoformas citosólicas formam dímeros e são expressas de uma maneira tecido-específica, isto é, cérebro-específica (BB-CK), músculo esquelético-específica (MM-CK) e um heterodímero músculo cardíaco-específico (MB-CK) (Wallimann et al., 1992). As formas mitocondriais são usualmente dispostas em octâmeros e são constituídas da isoforma ubíqua Mi_U -CK e da forma sarcomérica Mi_S -CK, as quais são expressas predominantemente no cérebro e no músculo estriado, respectivamente (Wallimann e Hemmer, 1994; Boero et al., 2003). A interação entre as isoformas citosólica e mitocondrial é de fundamental importância na homeostasia energética celular (Silva et al., 2003).

A creatina quinase parece estar envolvida em certas condições patológicas relacionadas com a deficiência de energia cerebral (Whittingham e Lipton, 1981). Considerando que a energia é crucial para manter o desenvolvimento e regular as funções cerebrais, tem sido postulado que o prejuízo na função da creatina quinase possa ter um papel crítico no processo neurodegenerativo que leva à perda neuronal (Tomimoto et al., 1993). De fato, a atividade da creatina quinase está reduzida em doenças neurodegenerativas e em modelos animais de esclerose lateral amiotrófica (David et al., 1998; Aksenov et al., 2000; Wendt et al., 2002; Bürklen et al., 2006).

2.3 Piruvato Quinase

A glicólise, que ocorre no citosol, tem papel fundamental no metabolismo energético por fornecer parte da energia utilizada pela maioria dos organismos. Essa rota metabólica é formada por uma sequência de dez reações enzimáticas, nas quais um mol de glicose é convertido a dois mols de piruvato com a geração de dois mols de ATP/mol de glicose. Subsequentemente, o piruvato pode seguir duas rotas metabólicas distintas. Em condições anaeróbicas, o piruvato é convertido a um produto final reduzido, o lactato. Entretanto, sob condições aeróbicas, o piruvato é transportado para dentro da mitocôndria, e é completamente oxidado, via ciclo de Krebs e cadeia respiratória, a CO_2 e H_2O , respectivamente (Voet et al., 2002; Smith et al., 2007).

A via glicolítica é regulada por três enzimas: a hexoquinase, a fosfofrutoquinase e a piruvato quinase (Allert et al., 1991). A piruvato quinase (PK) (ATP: piruvato 2-O-fosfotransferase, EC 2.7.1.40) catalisa a reação final da glicólise (Figura 3): a transfosforilação irreversível de fosfoenolpiruvato (PEP) e ADP a piruvato e ATP (Kayne, 1973; Valentini et al., 2000).



Figura 3. Reação catalítica da piruvato quinase.

A piruvato quinase é uma típica enzima alostérica que participa do controle do fluxo metabólico da frutose-1,6-bifosfato a piruvato, na segunda fase da glicólise. Além disso, o piruvato está envolvido em uma variedade de rotas metabólicas, indicando que a piruvato quinase pode ser considerada uma enzima

chave não somente para a via glicolítica, mas para todo o metabolismo celular (Mattevi et al., 1996; Muñoz e Ponce, 2003).

Nos mamíferos, a piruvato quinase existe na forma de quatro isoenzimas, M1, M2, L e R, codificadas por dois diferentes genes *PK-M* e *PKLR* (Fothergill-Gilmore e Michels, 1993). Essas isoenzimas diferem em suas propriedades químicas, físicas, cinéticas, eletroforéticas e imunológicas, bem como na distribuição tecidual (Hall e Cottam, 1978). A isoenzima tipo M1 é principalmente expressa em músculo esquelético, coração e cérebro adulto. O tipo L é predominante em tecidos gliconeogênicos, como o fígado (Hakim et al., 1976). O tipo R está presente nos eritrócitos e tecidos hematopoiéticos e o tipo M2 é predominante no feto, em neoplasias, em tecidos não diferenciados e em proliferação. A isoenzima tipo M2 é progressivamente substituída pelo tipo M1 em músculo esquelético, coração e cérebro durante o desenvolvimento (Dabrowska et al., 1998).

Hormônios esteróides ovarianos, particularmente o 17 β -estradiol, possuem um papel modulatório na utilização de glicose pelo encéfalo feminino (Verma et al., 2005; Brinton, 2008). Ratas ovariectomizadas apresentam redução no consumo de glicose pelo cérebro (Porrino et al., 1982; López-Grueso et al., 2010). Dados na literatura demonstram que declínios na concentração de estrógeno e a consequente alteração da homeostase de glicose cerebral podem estar associados com o déficit cognitivo, prejuízo na memória e outros sintomas da menopausa (Simpkins e Katovitch, 1989; Azari et al., 1992).

2.4 Cadeia Transportadora de Elétrons e Fosforilação Oxidativa

A fosforilação oxidativa é o estágio final do metabolismo produtor de energia nos aeróbios. Todas as etapas oxidativas na degradação de carboidratos, lipídeos e aminoácidos convergem para esse estágio final da respiração celular no qual a energia proveniente da oxidação, na forma de coenzimas nucleotídicas reduzidas NADH e FADH₂, é responsável pela síntese de ATP.

Nos eucariotos a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias, e é responsável pela maior parte da energia liberada pela célula. Este processo envolve a redução de O₂ a H₂O por elétrons doados pelo NADH e FADH₂, que fluem pela cadeia transportadora de elétrons, com centros redox que possuem afinidade crescente por elétrons (aumento do potencial de redução-padrão), ocorrendo concomitantemente a produção de ATP a partir de ADP e Pi (Nelson e Cox, 2006).

A cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória é composta de quatro complexos protéicos integrais da membrana mitocondrial interna e dois transportadores móveis de elétrons, que são a coenzima Q ou ubiquinona e o citocromo c (Figura 4) (Di Donato, 2000). O complexo I, também chamado de NADH: ubiquinona oxirredutase ou NADH desidrogenase, passa elétrons do NADH para a ubiquinona, formando ubiquinol. O complexo II, também denominado de succinato: ubiquinona oxirredutase é formado pela succinato desidrogenase solúvel (SDH) ou succinato: metanossulfato de fenazina oxirredutase (Fischer et al., 1985) juntamente com outras três subunidades, todas elas codificadas por genes nucleares (Voet e Voet, 2006). A SDH ocupa uma posição única como parte integrante do ciclo de Krebs e também da cadeia

respiratória (Oyedotun e Lemire, 1999). Esse complexo reduz a ubiquinona com elétrons do FADH_2 provenientes da oxidação do succinato a fumarato no ciclo de Krebs. O complexo III, citocromo bc_1 ou ubiquinona: citocromo c oxirredutase, catalisa a transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo c . O complexo IV, mais conhecido como citocromo c oxidase, a enzima terminal da cadeia respiratória, transporta dois elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, reduzindo-o a H_2O (Saraste, 1999; Voet e Voet, 2006).

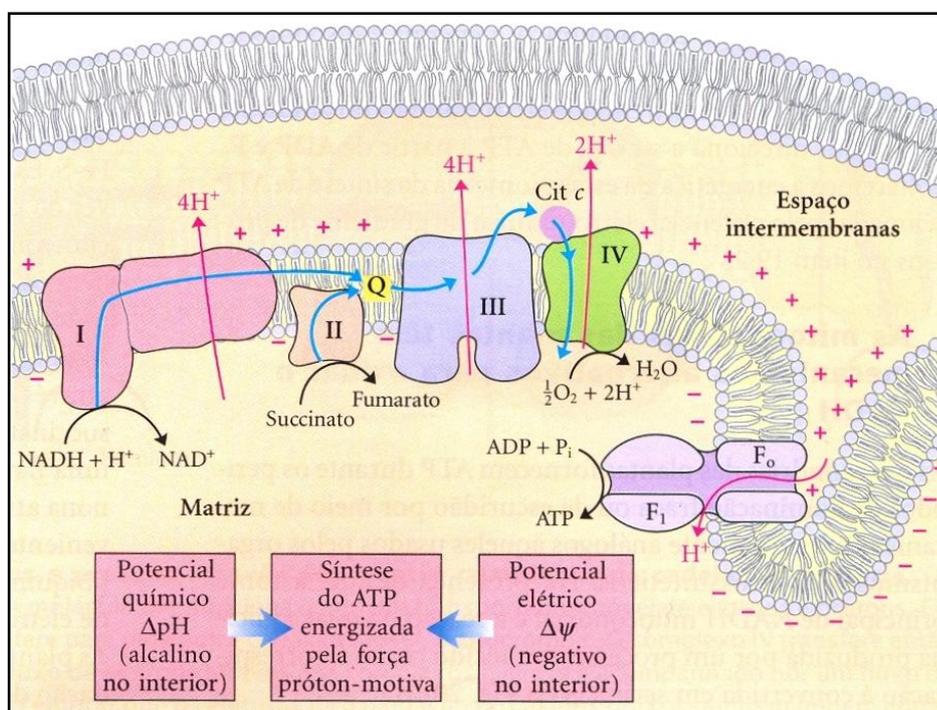


Figura 4. Fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória (Nelson e Cox, 2006).

A transferência de elétrons através dos complexos I, III e IV da cadeia respiratória resulta no bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o lado citosólico da membrana interna da mitocôndria também conhecido como espaço intermembranar (Figura 4). Com isso, segundo o modelo quimiosmótico,

cria-se um gradiente químico (ΔpH) e um gradiente elétrico ($\Delta \psi$) através da membrana que fornece a energia na forma de força próton-motriz para a síntese de ATP a partir de ADP e P_i pela ATP sintase (complexo F_0F_1), à medida que os prótons fluem passivamente de volta para a matriz (Nelson e Cox, 2006; Valsecchi et al., 2010).

Deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam à diminuição da síntese de ATP (Heales et al., 1999) e estão relacionadas ao envelhecimento e a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer, de Huntington e de Parkinson (Calabrese et al., 2001; Atamna e Frey, 2007; Navarro e Boveris, 2007; Ramsey e Giasson, 2007; Pandey et al., 2010). Além disso, a disfunção mitocondrial pode ter um papel fundamental na alteração de neurônios em mulheres pós-menopáusicas (Shi et al., 2008; Xu et al., 2008). Existem evidências apontando a cadeia respiratória como um novo e importante alvo para as ações do estrógeno através de RE presentes na mitocôndria (Simpkins et al., 2008; Chen et al., 2009). Neste contexto, Xu e colaboradores (2008) demonstraram significantes alterações na forma e estrutura mitocondrial e redução nos níveis de ATP em neurônios hipocámpais de ratas ovariectomizadas. Estas alterações causadas pela ovariectomia foram revertidas pelo tratamento com estrógeno, revelando o papel deste hormônio na preservação da estrutura e função mitocondrial no cérebro.

3. Ansiedade

A ansiedade é um estado emocional com componentes psicológicos e fisiológicos, que faz parte do espectro normal das experiências humanas, sendo

propulsora do desempenho. Ela passa a ser patológica quando é desproporcional à situação que a desencadeia, ou quando não existe um objeto específico ao qual se direcione (Andrade e Gorenstein, 1998).

Dados na literatura sugerem que mulheres são mais vulneráveis a transtornos de humor como a ansiedade e a depressão do que homens (Breslau et al., 1995; Seeman, 1997). Essa diferença entre gêneros pode ser relacionada à flutuação hormonal durante o ciclo reprodutivo, principalmente do estrógeno (Pigott, 1999). Neste contexto, mudanças na secreção de estrógeno durante a pré-menopausa e a menopausa podem ser relevantes para o aumento do risco de ansiedade nestes períodos (Hill et al., 2007).

A ovariectomia tem sido utilizada como modelo de privação estrogênica para avaliar os efeitos do estrógeno sobre o comportamento (Walf e Frye, 2006). Diversos estudos demonstraram que a ovariectomia aumenta o comportamento típico de ansiedade em ratas e a administração subcutânea de estradiol é capaz de reverter esse efeito em vários testes (Diaz-Veliz et al., 1997; Bowman et al., 2002; Frye e Walf, 2004; Walf e Frye, 2006). A participação de RE β parece ser muito importante para o efeito ansiolítico do estrógeno. Estudos em camundongos *knockout* para o gene do RE β sugerem que esse receptor é necessário para as ações do estrógeno sobre o comportamento afetivo (Krezel et al., 2001; Imwalle et al., 2005; Rocha et al., 2005).

Existem evidências sugerindo que a disfunção no metabolismo energético cerebral está relacionada com distúrbios neuropsiquiátricos como esquizofrenia, depressão, transtorno bipolar e ansiedade (Konradi et al., 2004; Prabakaran et al., 2004; Einat et al., 2005; Rezin et al., 2008; Scaglia, 2010).

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Considerando que: (1) mulheres pós-menopáusicas são mais suscetíveis a doenças neurodegenerativas, ao déficit cognitivo e a distúrbios emocionais; (2) alterações mitocondriais e do metabolismo energético parecem estar associados a essas condições; (3) a ovariectomia é usada como modelo animal de depleção hormonal ovariana; o objetivo geral do nosso estudo foi investigar alguns parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo energético celular, bem como avaliar possíveis alterações comportamentais em ratas adultas ovariectomizadas.

Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da ovariectomia sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica de estriado de ratas adultas.

2. Avaliar o efeito da ovariectomia sobre a atividade da piruvato quinase em estriado de ratas adultas.

3. Verificar o efeito da ovariectomia sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória (SDH, complexo II e citocromo c oxidase) em estriado de ratas adultas.

4. Determinar o efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase em frações mitocondrial e citosólica de hipocampo de ratas adultas.

5. Verificar o efeito da ovariectomia sobre o comportamento típico de ansiedade através das tarefas de labirinto em cruz elevado (plus maze) e caixa claro-escuro em ratas adultas.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e reagentes

Foram utilizadas ratas Wistar adultas obtidas do biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Os animais foram mantidos em temperatura constante (22 ± 1 °C), em intervalos de 12 h de ciclo claro/escuro, com livre acesso à água e à ração padrão. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovadas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Todos os reagentes químicos utilizados foram adquiridos da *Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)*.

3.2 Protocolo experimental

Aos oitenta dias de vida as ratas foram submetidas à cirurgia de acordo com os seguintes grupos: *sham*, sem a remoção dos ovários, e ovariectomizadas, com a remoção de ambos os ovários para a eliminação dos esteróides ovarianos endógenos (Waynforth e Flecknell, 1992), sendo administrados como anestésicos cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) intraperitonealmente.

3.3 Controle do ciclo estral e medida do estradiol

O ciclo reprodutivo de ratas é chamado de ciclo estral, e tem duração média de quatro ou cinco dias. O ciclo estral é caracterizado por quatro fases denominadas proestro, estro, metaestro e diestro (Long e Evans, 1922; Marcondes et al., 2002). A identificação de cada fase é baseada na proporção

entre três tipos celulares observados nos lavados vaginais a fresco em microscópio ótico: células epiteliais nucleadas, células cornificadas e leucócitos. A fase proestro, durante a qual ocorre o pico de concentração plasmática de estrógeno, é caracterizada pela predominância de células epiteliais nucleadas; estro, quando somente células cornificadas são observadas; a fase metaestro é caracterizada por semelhante proporção entre os três tipos celulares e diestro quando há a predominância de leucócitos no lavado vaginal (Marcondes et al., 2002).

A fase do ciclo estral foi determinada diariamente, durante dez dias que antecederam a ovariectomia, a fim de assegurar que todas as ratas possuíam um ciclo reprodutivo normal. Além disso, determinamos a fase do ciclo nas ratas *sham* para que todas fossem sacrificadas na tarde da fase diestro.

A medida do estradiol foi realizada com a utilização de Kit comercial, através da técnica de radioimunoensaio (Adaltis Estradiol Maia Kit, Italy). Os níveis de estrógeno nas fêmeas do grupo ovariectomizadas foram indetectáveis, confirmando a eficácia do procedimento cirúrgico da ovariectomia (Monteiro et al., 2005b).

3.4 Estudos bioquímicos

No trigésimo primeiro dia após a ovariectomia, os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O encéfalo foi rapidamente removido e as estruturas cerebrais, estriado e hipocampo, foram dissecadas.

3.4.1 Preparação das amostras

Para a preparação das membranas plasmáticas sinápticas de estriado, utilizadas para a determinação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, o estriado foi homogeneizado 1:10 (p/v) em tampão médium pH 7,4 contendo, sacarose 0,32 mM, HEPES 5 mM e EDTA 1 mM.

Para a determinação da atividade da piruvato quinase, o estriado foi homogeneizado 1:6 (p/v) em solução tampão (sacarose 0,32 M; EGTA 1 mM e Tris-HCl 10 mM, pH 7,4). Os homogeneizados foram centrifugados a 800 g 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 a determinação da atividade da enzima e da concentração protéica.

Para a determinação das atividades da SDH, complexo II e citocromo c oxidase, o estriado foi homogeneizado 1:20 (p/v) em tampão SETH pH 7,4 (sacarose 250 mM; EDTA 2 mM; Trizma base 10 mM e 50 $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ de heparina). Os homogeneizados foram centrifugados a 800 g por 10 minutos e os sobrenadantes foram mantidos a -70°C até serem utilizados para a determinação das atividades enzimáticas. Imediatamente antes dos ensaios enzimáticos da SDH e do complexo II, as amostras foram congeladas e descongeladas três vezes para romper as membranas mitocondriais.

Para a determinação da atividade da cretina quinase, o hipocampo foi homogeneizado 1:10 (p/v) em solução tampão SET (sacarose 0,32 M; EGTA 1 mM e Tris-HCl 10 mM, pH 7,4). Os homogeneizados foram centrifugados a 800 g 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 sobrenadante da segunda centrifugação contém citosol e outros componentes celulares como o retículo endoplasmático e

foi utilizado para a determinação da atividade da creatina quinase citosólica (BB-CK). O sedimento enriquecido em mitocôndria foi lavado duas vezes com o mesmo tampão isotônico SET e ressuspendido em Tampão Tris-HCl, pH 7,5, contendo MgSO_4 100 mM, para a determinação da atividade da creatina quinase mitocondrial (Mi-CK). As frações subcelulares foram armazenadas a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ por um período menor do que uma semana. A fração mitocondrial foi congelada e descongelada três vezes imediatamente antes do ensaio enzimático a fim de romper as membranas mitocondriais, facilitando a interação da creatina quinase com os substratos.

3.4.2 Preparação das membranas plasmáticas sinápticas

As membranas plasmáticas sinápticas de estriado foram preparadas de acordo com o método de Jones e Matus (1974), com algumas modificações (Wyse et al., 1995). Os homogeneizados de estriado foram centrifugados a 1.000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi removido e novamente centrifugado a 12.000 g por 20 minutos. O sedimento foi ressuspendido em tampão hipotônico (tampão Tris-HCl 5 mM, pH 8,1), a 0°C por 30 minutos e colocado em um gradiente descontínuo de sacarose que consiste de sucessivas camadas de 0,3; 0,8 e 1,0 M. Depois de centrifugada a 69.000 g durante 120 minutos, a fração da interface 0,8-1,0 M de sacarose foi utilizada para medir atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase.

3.4.3 Determinação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase

O meio de incubação continha MgCl_2 5 mM, NaCl 80 mM, KCl 20 mM e tampão Tris-HCl 40 mM pH 7,4, em um volume final de 200 μL . A reação foi

iniciada com adição de ATP com concentração final de 3 mM. Os controles foram incubados nas mesmas condições, diferenciando-se pela adição de ouabaína 1 mM, um inibidor específico da Na⁺,K⁺-ATPase. A atividade da Na⁺,K⁺-ATPase foi determinada pela diferença entre os ensaios com e sem adição de ouabaína, como descrito por Wyse e colaboradores (1998). A dosagem do fosfato inorgânico (Pi) liberado foi realizada de acordo com Chan e colaboradores (1986). A atividade específica da enzima foi expressa em nmol de Pi/min.mg de proteína. Todas as amostras foram incubadas em duplicata e lidas em espectrofotômetro a 630 nm.

3.4.4 Determinação da atividade da piruvato quinase

A atividade da piruvato quinase foi determinada de acordo com Leong e colaboradores (1981). O meio de incubação continha tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; NADH 0,16 mM; KCl 75 mM; ADP 5 mM; 7 unidades de L-lactato desidrogenase; Triton X-100 0,1% (v/v) e 10 µl de sobrenadante livre de mitocôndria, em um volume final de 0,5 mL. A reação começou após 30 minutos de pré-incubação através da adição de PEP 1 mM. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas a 25°C e lidos em espectrofotômetro a 340 nm. Os resultados foram expressos em µmol de piruvato formado/min.mg de proteína.

3.4.5 Determinação da atividade da succinato desidrogenase

A atividade da SDH foi determinada de acordo com o método de Fischer e colaboradores (1985) através do decréscimo na absorbância devido a redução do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) a 600 nm com 700 nm como comprimento de onda de referência ($\epsilon=19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na presença de metassulfato de fenazina (PMS). A

mistura reativa (tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4; succinato de sódio 16 mM e DCIP 8 μ M) foi pré-incubada com 40-80 μ g de proteína a 30°C por 20 minutos. Subseqüentemente foram adicionados azida sódica 4 mM, rotenona 7 μ M e DCIP 40 μ M. A reação foi iniciada pela adição PMS 1 mM e monitorada por 5 minutos. Os resultados foram expressos como nmol/min.mg de proteína.

3.4.6 Determinação da atividade do complexo II

Inicialmente, 40-80 μ g de proteína foram pré-incubada com a 30°C por 20 minutos. O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4; succinato de sódio 16 mM e DCIP 8 μ M. Após foram adicionados ao meio azida sódica 4 mM e rotenona 7 μ M e a reação foi iniciada pela adição DCIP 40 μ M. As absorvâncias foram registradas por 5 minutos a 600nm. A atividade do complexo II foi medida pelo decréscimo na absorvância devido a redução do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) a 600 nm com 700 nm como comprimento de onda de referência ($\epsilon=19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Fischer et al., 1985). Os resultados foram expressos como nmol/min.mg de proteína.

3.4.7 Determinação da atividade da citocromo c oxidase

A atividade da citocromo c oxidase foi determinada de acordo com Rustin e colaboradores (1994). A atividade enzimática foi medida pelo decréscimo na absorvância devido à oxidação do citocromo c previamente reduzido a 550 nm, tendo 580 nm como comprimento de onda de referência ($\epsilon=19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O meio da reação continha tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0; n-dodecil- β - Δ -maltosídeo 0,6 mM e 2-4 μ g de proteína. A reação foi iniciada com adição de 0,7 μ g de citocromo c reduzido. A atividade da citocromo c oxidase foi medida a

25 °C por 10 minutos. Os resultados foram expressos em nmol/min.mg de proteína.

3.4.8 Determinação da atividade da creatina quinase

O meio de incubação continha tampão Tris-HCl 300 mM pH 7,5, fosfocreatina 7mM, MgSO₄ 9 mM e aproximadamente 1 µg de proteína em um volume final de 0,13 ml. Após uma pré-incubação de 5 minutos a 37 °C, a reação enzimática foi iniciada com a adição de ADP 0,42 µmol. A reação foi parada após uma incubação de 10 minutos pela adição de ácido *p*- hidroximercuriobenzóico 1 µmol. A creatina formada pela reação enzimática foi estimada de acordo com o método colorimétrico de Hughes (1962). A adição de 0,1 mL de α -naftol 2% e 0,1 mL de diacetil 0,05% promoveu o aparecimento de cor que foi lida após 20 minutos a 540 nm. Os resultados foram expressos como µmol de creatina formada/min.mg de proteína.

3.5 Determinação protéica

A medida de proteínas na determinação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase foi realizada de acordo com Bradford (1976). Para os demais parâmetros do metabolismo energético, a determinação de proteínas foi realizada de acordo com Lowry e colaboradores (1951). Os ensaios foram realizados utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.6 Tarefas comportamentais

Um mês após a ovariectomia, os animais foram submetidos às tarefas comportamentais do labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro. As tarefas

comportamentais foram realizadas em uma sala com a temperatura constante (21 ± 2 °C) e com condições de iluminações especiais para cada teste. Antes das sessões, os animais foram colocados na sala experimental por pelo menos 15 minutos para adaptação. Todas as tarefas foram realizadas no período entre as 14:00 e as 17:00 horas.

3.6.1 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado é um teste comportamental amplamente utilizado para avaliar a ansiedade em roedores, principalmente por ser eficaz, simples, de baixo custo e de fácil interpretação (Cruz-Morales et al., 2002). Essa tarefa tem sido validada para avaliar os efeitos ansiolíticos de agentes farmacológicos e de hormônios esteróides, bem como definir regiões cerebrais e mecanismos subjacentes ao comportamento do tipo ansiedade (Walf e Frye, 2007).

Os animais foram submetidos à tarefa do labirinto em cruz elevado de acordo com Pellow e colaboradores (1985). O modelo é baseado na aversão natural dos roedores a espaços abertos e elevados. O teste foi realizado em um aparelho em forma de cruz, feito de madeira, mantido a 80 cm acima do piso, sendo constituído de dois braços abertos opostos (50 cm x 10 cm), dois braços fechados opostos com paredes laterais (50 cm x 10 cm x 30 cm) e uma área central (10 cm x 10 cm). A tarefa foi conduzida na sala de observação utilizando iluminação vermelha (25 W). Cada animal foi colocado no centro do labirinto em cruz, com a face voltada para um dos braços abertos, e o seu desempenho foi avaliado por 5 minutos. O labirinto foi limpo com álcool 20% após cada teste. Foram mensurados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços

abertos e fechados, e calculada a porcentagem de tempo nos braços abertos (tempo no braço aberto/tempo total x 100). A atividade nos braços abertos reflete o nível de ansiedade, enquanto que o número de entradas nos braços fechados é interpretado como um índice de atividade motora (Pelow et al., 1985; Walf e Frye, 2007). A entrada foi definida quando o animal colocava todas as quatro patas em um braço. Os animais que caíram do labirinto foram excluídos do estudo.

3.6.2 Caixa claro-escuro

A caixa claro-escuro também é uma ferramenta muito útil na investigação de comportamento tipo-ansiedade em animais. Trata-se de uma caixa experimental dividida em dois compartimentos: um claro e um escuro, sendo o escuro menor que o claro. Diante da aversão natural dos animais a ambientes iluminados, o compartimento claro representa um local arriscado para o animal, pois ele estaria em maior exposição. Já o compartimento escuro, com uma área menor e com pouca luz é um ambiente mais atraente para o animal por ser aparentemente mais seguro. Assim a permanência do animal em um ou outro destes compartimentos sugere possíveis alterações comportamentais relacionadas à ansiedade.

A caixa claro-escuro consiste de uma câmara de acrílico retangular com fechamento superior em vidro, dividida em dois compartimentos sendo uma metade clara (30 cm x 20 cm x 20 cm) pintada de branco e iluminada e a outra metade escura (15 cm x 20 cm x 20 cm) pintada de preto. Os dois compartimentos são separados por uma divisória com um pequeno orifício por onde os animais possuem livre acesso entre os lados. O compartimento claro foi iluminado por uma lâmpada de luz branca (60 W) e o compartimento escuro

recebeu somente parte da iluminação. O experimento foi conduzido em uma sala sem iluminação. Os animais foram colocados no compartimento claro com a face voltada para o orifício que dá acesso ao compartimento escuro e a atividade foi registrada por 10 minutos. Os parâmetros registrados foram tempo que o animal demorava em deixar o campo claro pela primeira vez, tempo total de permanência no compartimento claro e número de entradas para o compartimento claro. A caixa foi limpa com álcool 20% após cada teste. A entrada em um compartimento foi considerada quando o animal colocava todas as quatro patas no novo compartimento (Chotiwat e Harris, 2006).

3.7 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste t de Student, utilizando o software Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (SPSS). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1 Efeito da ovariectomia sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase

Como pode ser observado na figura 5, a ovariectomia aumentou significativamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase [$t(6) = -3,10$; $*p < 0,05$] em estriado de ratas adultas.

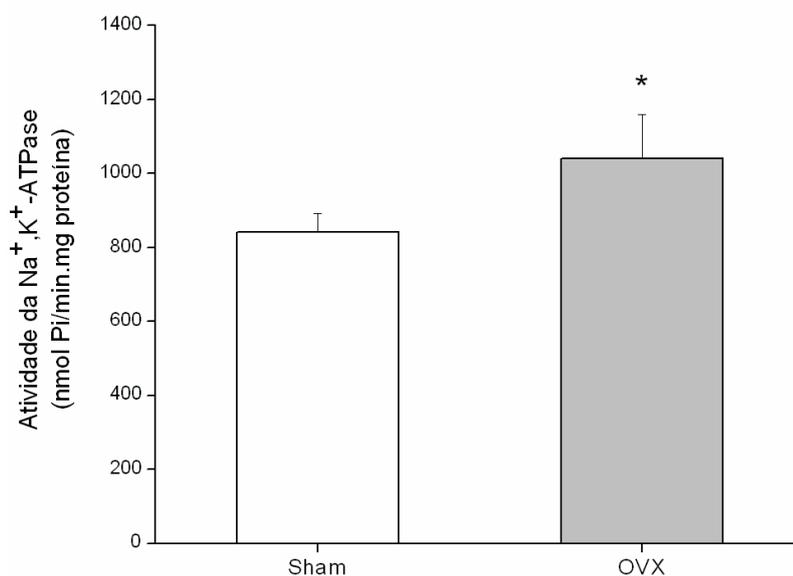


Figura 5. Efeito da ovariectomia sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em estriado de ratas adultas. Os dados estão expressos como média \pm D.P. para 4 animais em cada grupo. $*p < 0,05$ (teste t de Student). OVX: ovariectomizadas

4.2 Efeito da ovariectomia sobre a atividade da piruvato quinase

Como pode ser visto na figura 6, a ovariectomia não alterou significativamente a atividade da piruvato quinase em estriado de ratas adultas [$t(8) = 0,012$; $p > 0,05$].

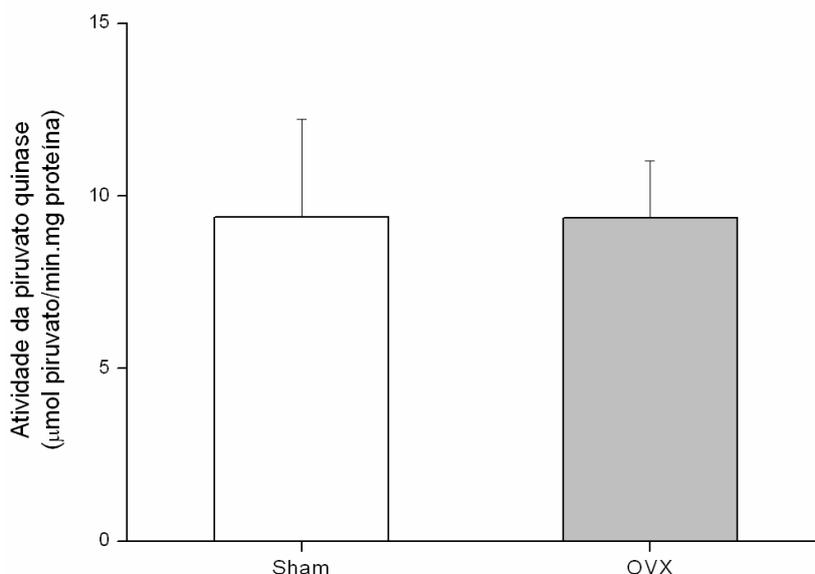


Figura 6. Efeito da ovariectomia sobre a atividade da piruvato quinase em estriado de ratas adultas. Os dados estão expressos como média \pm D.P. para 5 animais em cada grupo. $p > 0,05$ (teste t de Student). OVX: ovariectomizadas

4.3 Efeito da ovariectomia sobre as atividades da succinato desidrogenase, do complexo II e da citocromo c oxidase

A figura 7 mostra que a ovariectomia aumentou significativamente as atividades da SDH (A) [$t(7) = -5,40$; $**p < 0,01$] e do complexo II (B) [$t(7) = -4,56$; $**p < 0,01$], em estriado de ratas adultas. A atividade da citocromo c oxidase não foi alterada pela ovariectomia quando comparada com o grupo *sham* (C) [$t(7) = 1,60$; $p > 0,05$] na mesma estrutura cerebral.

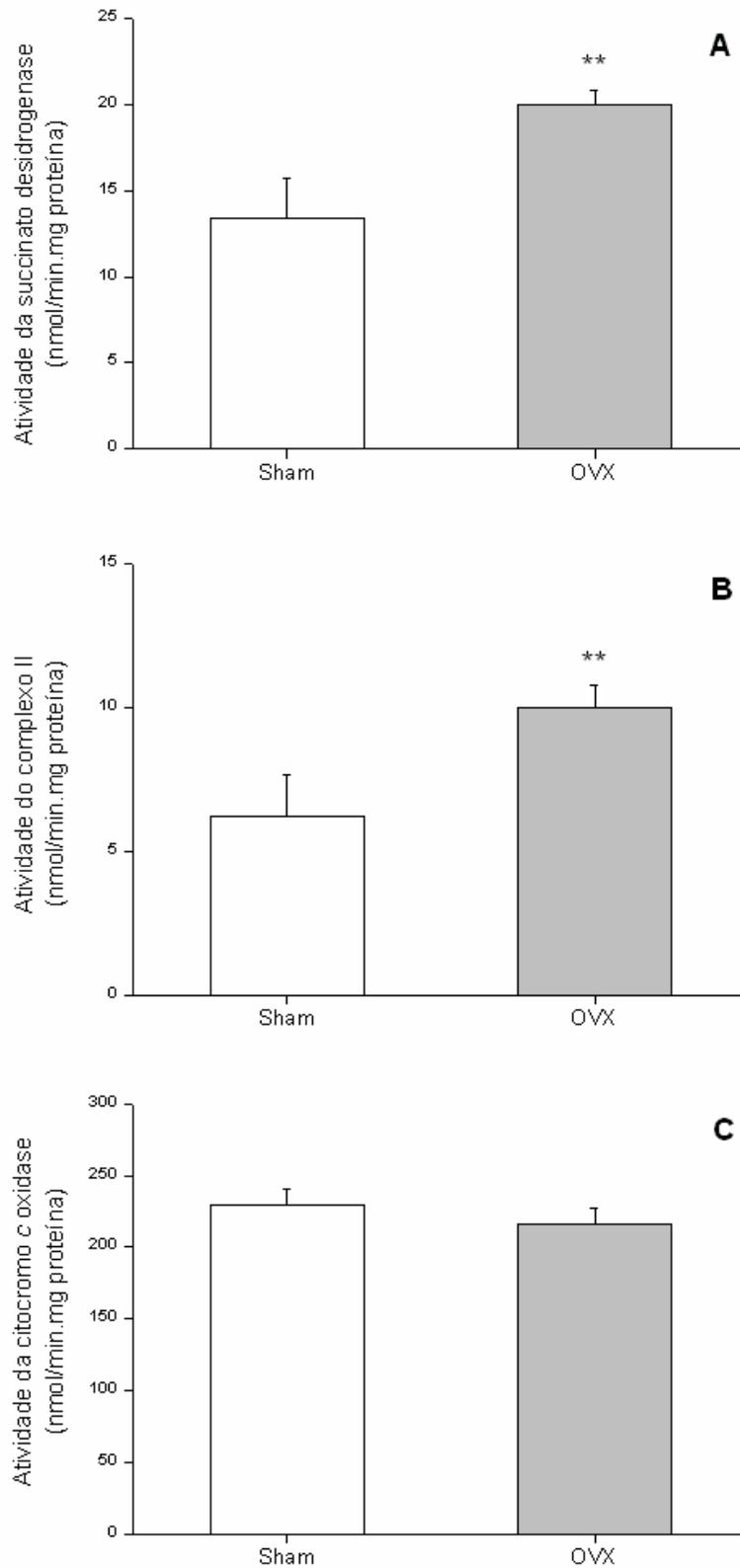


Figura 7. Efeito da ovariectomia sobre as atividades da succinato desidrogenase (A), do complexo II (B) e da citocromo c oxidase (C) em estriado de ratas adultas. Os dados estão expressos como média \pm D.P. para 4-5 animais em cada grupo. ** $p < 0,01$ (teste t de Student). OVX: ovariectomizadas

4.4 Efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase citosólica

Como pode ser observado na figura 8, a ovariectomia aumentou significativamente a atividade da creatina quinase citosólica [$t(8) = -5,25$; $*p < 0,05$] em hipocampo de ratas adultas.

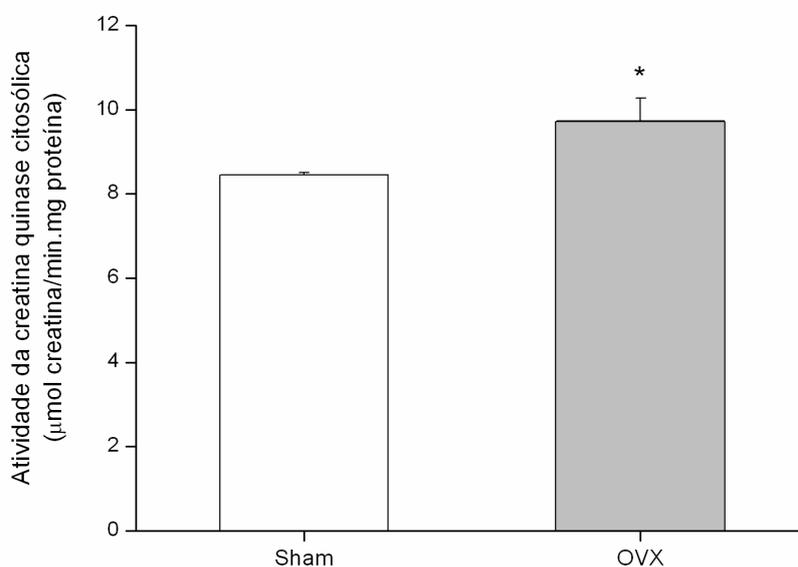


Figura 8. Efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase citosólica em hipocampo de ratas adultas. Os dados estão expressos como média \pm D.P. para 5 animais em cada grupo. $*p < 0,05$ (teste t de Student). OVX: ovariectomizadas

4.5 Efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase mitocondrial

A figura 9 mostra que a ovariectomia não alterou significativamente a atividade da creatina quinase mitocondrial em hipocampo de ratas adultas [$t(8)=0,357$; $p>0,05$].

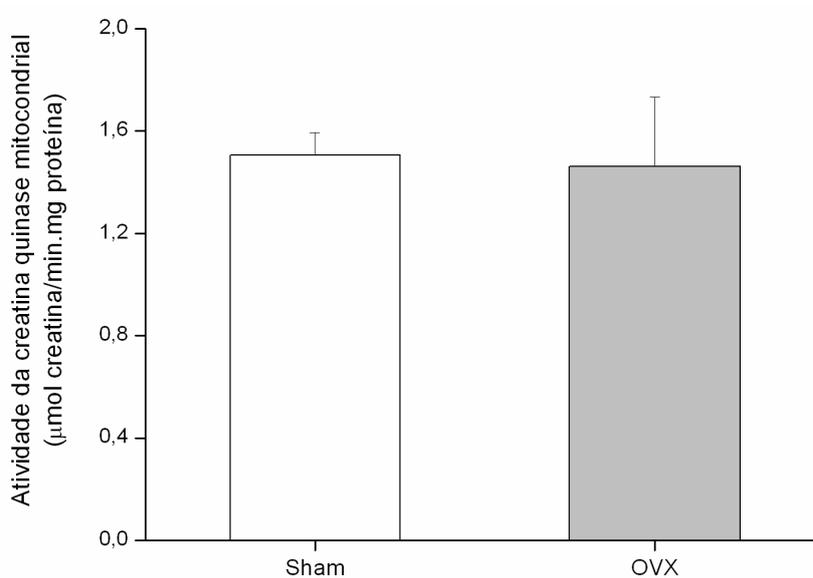


Figura 9. Efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase mitocondrial em hipocampo de ratas adultas. Os dados estão expressos como média \pm D.P. para 5 animais em cada grupo. $p>0,05$ (teste t de Student). OVX: ovariectomizadas

4.6 Efeito da ovariectomia sobre o comportamento na tarefa do labirinto em cruz elevado

Como pode ser visto na tabela 1, a ovariectomia não alterou o desempenho dos animais nesta tarefa, visto que não houve diferença significativa entre os grupos no tempo de permanência nos braços abertos [$t(22)= 1,33$; $p>0,05$], no número de entradas nos braços abertos [$t(22)= 0,90$; $p>0,05$], no número de entradas nos braços fechados [$t(22)= -1,08$; $p>0,05$] e na percentagem de tempo nos braços abertos [$t(22)= 1,33$; $p>0,05$].

Tabela 1. Efeito da ovariectomia sobre o comportamento na tarefa do labirinto em cruz elevado

	Sham	OVX
Tempo nos braços abertos (s)	112,6 ± 7,1	90,1 ± 15,3 ^a
Entradas nos braços abertos	7,7 ± 0,6	6,8 ± 0,8
Entradas nos braços fechados	8,1 ± 0,5	9,0 ± 0,5
Percentagem de tempo nos braços abertos	37,5 ± 2,3	30,0 ± 5,1

^a Os dados estão representados como média ± E.P.M. para 12 animais por grupo.

4.7 Efeito da ovariectomia sobre o comportamento no teste da caixa claro-escuro

A tabela 2 mostra que a ovariectomia não alterou o comportamento das ratas neste teste, pois não houve diferença significativa entre os grupos no número de entradas para o claro [t(23)= 0,59; p>0,05], no tempo de latência para entrar no compartimento escuro [t(23)= 0,38; p>0,05] e no tempo total no compartimento claro [t(23)= 0,76; p>0,05].

Tabela 2. Efeito da ovariectomia sobre o comportamento no teste da caixa claro-escuro

	Sham	OVX
Tempo de latência para entrar no compartimento escuro (s)	23,0 ± 3,2	21,6 ± 2,2 ^a
Tempo total no claro (s)	50,7 ± 10,1	40,8 ± 8,3
Número de entradas para o claro	1,5 ± 0,4	1,1 ± 0,4

^a Os dados estão representados como média ± E.P.M. para 12 animais por grupo.

V. DISCUSSÃO

Os hormônios esteróides, principalmente secretados pelos ovários, exercem diversas ações não reprodutivas em múltiplos sistemas fisiológicos, incluindo o SNC (Wise, 2001). Tem sido demonstrado que o estrógeno desempenha um importante papel nas funções cognitivas e na neuroproteção (Gibbs, 1994; Shepherd, 2001; Gandy, 2003; McCullough e Hurn, 2003). Dados na literatura sugerem que a diminuição dos níveis plasmáticos desse hormônio após a menopausa está relacionada ao aparecimento de doenças neurodegenerativas (Wise, 2002; Ragonese et al., 2006). Neste contexto, foi demonstrado que a terapia de reposição estrogênica na pós-menopausa reduz o risco e retarda o aparecimento destas doenças (Paganini-Hill e Henderson, 1996; Zandi et al., 2002). Entretanto, estudos mostraram que o uso prolongado de estrógeno e progesterona sintéticos não melhora a função cognitiva (Rapp et al., 2003) e aumenta o risco de demência em mulheres acima de 65 anos (Shumaker et al., 2003).

Tendo em vista que disfunções mitocondriais e do metabolismo energético podem estar envolvidos na fisiopatologia de muitas doenças neurodegenerativas (Beal, 2000; Sullivan e Brown, 2005; Atamna e Frey, 2007; Soane et al., 2007), iniciamos nossos estudos investigando o efeito da ovariectomia sobre algumas atividades enzimáticas essenciais ao metabolismo energético em estriado de ratas adultas. Utilizamos a ovariectomia a fim de promover a depleção hormonal ovariana, por ser considerado o modelo animal que melhor reproduz as mudanças pós-menopáusicas (Savonenko e Markowska, 2003).

O estriado constitui uma rede neural interligada, onde essa estrutura recebe informações de outras áreas cerebrais como córtex cerebral e hipocampo e as conecta com os outros constituintes dos núcleos da base (Mahon et al., 2004). O estriado foi utilizado nestes experimentos, pois expressa mRNA de RE α e RE β (Kuppers e Beyer, 1999) e tem sido mostrado estar associado com mecanismos de memória e aprendizado (Graybiel, 1995; Knowlton et al., 1996; Wise, 1996; Nakano, 2000). Além disso, a menopausa parece estar relacionada com o declínio da memória e o aparecimento de distúrbios cognitivos (Halbreich et al., 1995). Resultados semelhantes foram reportados em estudos prévios realizados com o modelo experimental utilizado nesse trabalho (Singh et al., 1994; Monteiro et al., 2005a; Monteiro et al., 2008).

Considerando que os íons Na⁺ e K⁺ desempenham papéis importantes no desenvolvimento de gradientes eletroquímicos e na sinalização neuronal, alterações na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase podem ter um impacto significativo sobre a função cerebral em mulheres pós-menopáusicas. Nossos resultados mostraram que a ovariectomia aumenta a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membrana plasmática sináptica de estriado de ratas adultas, corroborando com recente trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa o qual mostra um aumento na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratas ovariectomizadas (Monteiro et al., 2005b).

O mecanismo pelo qual a ovariectomia aumenta a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase não está esclarecido. Contudo, a atividade dessa enzima pode ser modulada por diversos mecanismos (Ewart e Klip, 1995; Lopina, 2000). A subunidade catalítica α da Na⁺,K⁺-ATPase pode ser fosforilada em resíduos de serina e treonina, *in vitro* e *in vivo*, pelas proteínas quinases C, A e G (Beguin et

al., 1994; Borghini et al., 1994; Fotis et al., 1999; Mahmoud e Cornelius, 2002). A ativação dessas proteínas quinases está geralmente associada à estimulação da Na⁺,K⁺-ATPase (Cornelius e Logvinenko, 1996; Kiroytcheva et al., 1999; Cornelius e Mahmoud, 2003). Tem sido demonstrado que a estimulação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase é associada com um decréscimo na fluidez da membrana (Levin et al., 1990). Neste contexto, alguns estudos mostram que o 17 β-estradiol pode modular a atividade dessa enzima e a fluidez de membrana (Halbreich e Kahn, 2003; Rao e Kölsch, 2003). Em adição, a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase pode ser estimulada pelo aumento na concentração intracelular de Na⁺, o qual afeta o potencial intracelular (Despa et al., 2002). Outra possibilidade poderia ser um aumento na síntese ou uma diminuição na degradação da enzima.

Por outro lado, trabalhos têm mostrado que o conteúdo de ATP cerebral está reduzido em ratas ovariectomizadas (Erecinska e Silver, 1989; Birge, 1997; Ma et al., 2003; Shi et al., 2008; Xu et al., 2008). É sabido que a Na⁺,K⁺-ATPase consome cerca de 40-50% do ATP produzido no cérebro (Erecinska e Silver, 1994; Magistretti, 2008) e que a atividade da mesma também encontra-se aumentada em hipocampo de ratas submetidas à ovariectomia (Monteiro et al., 2005b). Podemos sugerir que um dos mecanismos envolvidos na depleção de ATP no cérebro após a ovariectomia seja o aumento na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. A estimulação dessa enzima, que possivelmente ocorre durante a menopausa e a pós-menopausa, poderia levar a uma diminuição no conteúdo de ATP cerebral, que é descrito estar associado à fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (Shi et al., 2008). Considerando que a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase está relacionada ao metabolismo energético (Mata et al., 1980), o

próximo objetivo de nosso estudo foi avaliar o efeito da ovariectomia sobre as atividades de algumas enzimas chaves do metabolismo energético cerebral.

A piruvato quinase catalisa um importante passo regulatório na glicólise: a conversão de PEP à piruvato. Essa enzima tílica possui quatro formas diferentes de apresentação nas células: L, M1, M2 e R. A piruvato quinase M1 é a isoforma cerebral e tem sido isolada e estudada em ratos (Srivastava e Baquer, 1985). Relatos da literatura demonstraram que a administração de 17 β -estradiol induz alterações nos níveis da piruvato quinase (Kostanyan e Nazaryan, 1992; Blake et al., 2005). Tendo em vista que a piruvato quinase tem sido considerada uma enzima chave para o metabolismo da glicose no encéfalo (Feksa et al., 2005); que ratas ovariectomizadas exibem baixas taxas de utilização de glicose pelo cérebro (Porrino et al., 1982; López-Grueso et al., 2010) e, que o aumento na atividade da Na^+, K^+ -ATPase estimula a captação de glicose e a glicólise em encéfalo, rim e eritrócitos (Parker e Hoffman, 1967; Lipton e Robacker, 1983), nós examinamos o efeito da ovariectomia sobre a atividade da piruvato quinase em estriado de ratas. Nossos resultados mostraram que a ovariectomia não foi capaz de alterar a atividade da piruvato quinase. Entretanto, não podemos descartar a hipótese de um possível efeito em outras enzimas da via glicolítica, as quais não foram avaliadas nesse estudo.

A maior parte da energia necessária para a célula é obtida através da fosforilação oxidativa, um processo que requer a ação de vários complexos enzimáticos localizados na membrana interna da mitocôndria, a cadeia respiratória mitocondrial (Horn e Barrientos, 2008). Na maioria dos organismos, a cadeia respiratória é formada por quatro complexos onde o transporte de elétrons está acoplado com a translocação de prótons da matriz mitocondrial para o

espaço intermembranas. O gradiente eletroquímico gerado é utilizado pela ATP sintase para catalisar a formação de ATP através da fosforilação do ADP (Boekema e Braun, 2007). Tecidos com alta demanda energética, como o cérebro, contêm um grande número de mitocôndrias, sendo portanto, mais suscetíveis à alterações do metabolismo aeróbio. Neste trabalho também verificamos o efeito da ovariectomia sobre os complexos da cadeia respiratória: SDH, complexo II e citocromo *c* oxidase em estriado de ratas adultas. Nós observamos que a ovariectomia não alterou a atividade da citocromo *c* oxidase, mas aumentou significativamente as atividades da SDH e do complexo II.

O aumento na atividade dos complexos da cadeia respiratória tem sido descrito como um possível mecanismo em resposta a falhas na produção de energia na mitocôndria (Rossignol et al., 2003). Dessa forma, é possível que o aumento nas atividades da SDH e do complexo II seja um mecanismo compensatório, a fim de aumentar a síntese de ATP, que se encontra em baixos níveis em cérebro de ratas ovariectomizadas (Erecinska e Silver, 1989; Birge, 1997; Ma et al., 2003; Shi et al., 2008; Xu et al., 2008). Podemos ainda propor que a estimulação desses complexos da cadeia transportadora de elétrons, causada pela ovariectomia, poderia estar relacionado ao aumento na atividade da Na^+, K^+ -ATPase demonstrado em nosso estudo, desde que uma parte considerável do ATP cerebral é utilizado para sustentar a atividade dessa enzima (Erecinska e Silver, 1994; Voet et al., 2002).

Em nosso estudo, a atividade da citocromo *c* oxidase, também conhecida como complexo IV, não foi alterada pela ovariectomia, após 30 dias de depleção hormonal ovariana. Interessantemente, Shi e Xu (2008) observaram que a atividade desse mesmo complexo, em mitocôndrias hipocâmpais de ratas

ovariectomizadas, se alterava transitoriamente em um pequeno intervalo de tempo: aumentava no 9º dia após a ovariectomia, diminuía no 12º dia e retornava aos mesmos níveis do grupo controle (*sham*) no 15º dia. Em outro trabalho, Irwin e colaboradores (2008) demonstraram um aumento da expressão e da atividade do complexo IV em mitocôndrias cerebrais de ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno, evidenciando a participação desse hormônio na regulação da função mitocondrial.

Após os resultados obtidos com alguns parâmetros do metabolismo energético em estriado de ratas adultas, resolvemos estudar o efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase, uma enzima fundamental na manutenção da homeostasia energética cerebral, nas frações citosólica e mitocondrial preparadas a partir de hipocampo de ratas. Escolhemos essa estrutura cerebral porque ela tem importante papel nos mecanismos de memória, aprendizado e ansiedade (Daniel e Dohanich, 2001; Deacon e Rawlins, 2005), possui RE α e RE β expressos, e porque ratas ovariectomizadas apresentaram um aumento na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e diminuição no conteúdo de ATP em hipocampo (Monteiro et al., 2005b; Xu et al., 2008).

O sistema creatina quinase/creatina/fosfocreatina é bastante importante para a manutenção dos níveis de energia, uma vez que ele regenera o ATP consumido nos tecidos e transfere o ATP dos sítios de produção (glicólise e mitocôndria) para os sítios de consumo (ATPases celulares) (Wallimann et al., 1992, Wyss et al., 1992). No tecido nervoso, a creatina quinase encontra-se em duas isoformas, uma mitocondrial (Mi-CK) e outra citosólica (BB-CK), acoplada funcionalmente à Na⁺,K⁺-ATPase (Blum et al., 1991).

Nossos resultados mostraram que a ovariectomia aumentou significativamente a atividade da creatina quinase citosólica em hipocampo de ratas adultas. No entanto, a ovariectomia não alterou a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial. Sabe-se que a creatina quinase citosólica cerebral é considerada um marcador de indução mediada por RE e que o estrógeno pode atuar sobre a atividade desta enzima em vários órgãos que contém RE (Malnick et al., 1983; Sömjen et al., 1997; Katzburg et al., 2001). A estimulação na atividade da creatina quinase citosólica pode ter sido desencadeada pelo aumento na demanda energética em hipocampo de ratas ovariectomizadas, devido, possivelmente, a uma maior atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Monteiro et al., 2005b). A creatina quinase, através de reações de transfosforilação, transfere o ATP produzido por meio da glicólise para a bomba de Na^+ que consome cerca de 50% do ATP cerebral. Nossos achados, entretanto, não nos permitem debater a cerca dos mecanismos envolvidos na estimulação da creatina quinase citosólica sem que mais estudos sejam realizados como, por exemplo, investigar se a ovariectomia modifica as atividades de complexos da cadeia respiratória em hipocampo, visto que a isoforma mitocondrial da creatina quinase não se encontra alterada, e ainda, verificar se a via glicolítica é afetada pela depleção hormonal ovariana.

Posteriormente, utilizamos as tarefas comportamentais do labirinto em cruz elevado e da caixa claro-escuro para avaliar o efeito do modelo de ovariectomia utilizado sobre o comportamento tipo-ansiedade em ratas adultas. Tem sido descrito que a ansiedade é um dos mais citados sintomas psicológicos relacionados à ausência de hormônios ovarianos que são observados em mulheres na pós-menopausa (Pisani et al., 1998; Paoletti et al., 2001). Em

roedores, o efeito da privação de estrógeno induzida pela ovariectomia sobre comportamento tipo-ansiedade tem sido estudado, e alguns resultados se demonstraram incoerentes. Em adição, alterações mitocondriais e do metabolismo energético estão sendo relacionadas a distúrbios psicológicos, como a ansiedade (Gardner e Boles, 2010). Nós verificamos que o comportamento dos animais na tarefa do labirinto em cruz elevado não foi alterado pela ovariectomia, indicando que este modelo experimental não foi ansiogênico. Similarmente, a ovariectomia não alterou o desempenho das ratas no teste da caixa claro-escuro em nosso estudo.

Recentemente, um trabalho demonstrou que ratas ovariectomizadas por um longo período, ou seja, doze semanas após a cirurgia, apresentaram um aumento nos níveis de ansiedade em comparação com animais ovariectomizados três semanas antes do teste (Picazo et al., 2006), evidenciando que o tempo de depleção hormonal ovariana influencia o comportamento tipo-ansiedade. Além disso, o tipo de tarefa comportamental utilizada, e a idade e espécie do animal também podem afetar esse tipo de comportamento. Sabe-se que a ansiedade é uma desordem cognitiva associada ao hipocampo (Deacon e Rawlins, 2005) e, apesar de algumas enzimas chave do metabolismo energético encontrarem-se alteradas nessa estrutura cerebral de ratas ovariectomizadas (dados não mostrados), em nosso estudo, o comportamento tipo-ansiedade em ratas adultas com aproximadamente 4 meses (110 dias) de idade não foi alterado por quatro semanas de privação hormonal ovariana induzida pela ovariectomia.

Sumarizando, nosso trabalho mostrou que a ovariectomia aumenta as atividades da Na^+, K^+ -ATPase, SDH e complexo II em estriado de ratas adultas. Verificamos também que a ovariectomia aumenta a atividade da creatina quinase

citossólica em hipocampo de ratas adultas. Considerando a importância do metabolismo energético para o funcionamento normal do SNC, os nossos achados podem, pelo menos em parte, colaborar para o entendimento de sintomas e distúrbios neurológicos observados em algumas mulheres pós-menopáusicas. Entretanto, mais estudos serão necessários a fim de elucidar o mecanismo dessas alterações e outros processos envolvidos na depleção hormonal ovariana.

VI. CONCLUSÕES

A ovariectomia em ratas adultas:

- Aumentou as atividades da Na^+, K^+ -ATPase, da SDH e do complexo II em estriado
- Não alterou as atividades da piruvato quinase e da citocromo *c* oxidase em estriado
- Aumentou significativamente a atividade da creatina quinase na fração citosólica em hipocampo
- Não alterou a atividade da creatina quinase mitocondrial de hipocampo
- Não alterou o desempenho (número de entradas nos braços abertos e fechados, tempo de permanência nos braços abertos e percentagem de tempo nos braços abertos) na tarefa do labirinto em cruz elevado
- Não modificou os parâmetros comportamentais, número de entradas no compartimento claro, tempo de latência para entrar no compartimento escuro e tempo total no campo claro, no teste da caixa claro-escuro.

Os resultados do presente trabalho em conjunto, mostram os efeitos da ovariectomia sobre alguns parâmetros bioquímicos e comportamentais e poderão auxiliar no entendimento de alguns sintomas relacionados à menopausa. Entretanto, mais estudos serão necessários a fim de elucidar os mecanismos envolvidos na depleção estrogênica.

VII. PERSPECTIVAS

1. Estudar detalhadamente os mecanismos de alteração na atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase, SDH, complexo II e creatina quinase citosólica causada pela ovariectomia.
2. Verificar a captação de glicose e a liberação de lactato em hipocampo e estriado de ratas adultas ovariectomizadas.
3. Determinar o efeito da ovariectomia sobre a atividade da creatina quinase em frações mitocondrial e citosólica de estriado de ratas adultas.
4. Avaliar as atividades das enzimas piruvato quinase, succinato desidrogenase, complexo II e citocromo c oxidase em hipocampo de ratas adultas ovariectomizadas.

VIII. REFERÊNCIAS

- Aksenov M, Aksenova M, Butterfield DA, Markesbery WR (2000) Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 74:2520-2527.
- Allert S, Ernest I, Poliszczak A, Opperdoes FR, Michels PA (1991) Molecular cloning and analysis of two tandemly linked genes for pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 200:19-27.
- Ames A 3rd (2000) CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev* 34:42-68.
- Andrade LHSG, Gorenstein C (1998) Aspectos Gerais das Escalas de Avaliação de Ansiedade. *Rev Psiqu Clin* 25.
- Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR (2008) Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76:329-343.
- Atamna H, Frey WH 2nd (2007) Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease. *Mitochondrion* 7:297-310.
- Azari NP, Rapoport SI, Salerno JA, Grady CL, Gonzalez-Aviles A, Schapiro MB, Horwitz B (1992) Interregional correlations of resting cerebral glucose metabolism in old and young women. *Brain Res* 589:279-290.
- Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH (1979) *The laboratory rat. Biology and diseases*. New York: Academic Press.
- Beal MF (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 23:298-304.
- Beato M, Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6:225-236.
- Beguín P, Beggah AT, Chibalin AV, Burgener-Kairuz P, Jaisser F, Mathews PM, Rossier BC, Cotecchia S, Geering K (1994) Phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 269:24437-24445.
- Behl C (2002) Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nat Rev Neurosci* 6:433-442.

- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2004) Bioquímica. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Birge SJ (1997) The role of estrogen in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurology* 48:36-41.
- Birge SJ (2003) The use of estrogen in older women. *Clin Geriatr Med* 19:617-627.
- Blake CA, Brown LM, Duncan MW, Hunsucker SW, Helmke SM (2005) Estrogen regulation of the rat anterior pituitary gland proteome. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:800-807.
- Blanco G, Mercer R (1998) Isozymes of the Na⁺,K⁺-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 275:633-650.
- Blum H, Balschi JA, Johnson RG Jr (1991) Coupled in vivo activity of creatine phosphokinase and the membrane-bound (Na⁺,K⁺)-ATPase in the resting and stimulated electric organ of the electric fish *Narcine brasiliensis*. *J Biol Chem* 266:10254-10259.
- Boekema EJ, Braun HP (2007) Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 282:1-4.
- Boero J, Qin W, Cheng J, Woolsey TA, Strauss AW, 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.
- Borghini I, Geering K, Gjinovci A, Wollheim CB, Pralong WF (1994) In vivo phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit in sciatic nerves of control and diabetic rats: effects of protein kinase modulators. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6211-6215.
- Bowman RE, Ferguson D, Luine VN (2002) Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. *Neuroscience* 113:401-410.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-die-binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Breslau N, Schultz L, Peterson E (1995) Sex differences in depression: a role for preexisting anxiety. *Psychiatr Res* 58:1-12.

- Brinton RD (2008) Estrogen regulation of glucose metabolism and mitochondrial function: therapeutic implications for prevention of Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1504-1511.
- Bürklen TS, Schlattner U, Homayouni R, Gough K, Rak M, Szeghalmi A, Wallimann T (2006) The creatine kinase/creatine connection to Alzheimer's disease: CK-inactivation, APP-CK complexes and focal creatine deposits. *J Biomed Biotechnol* 2006:35936.
- Burger HG (1996) The endocrinology of the menopause. *Maturitas* 23:129-136.
- Calabrese V, Scapagnini G, Giuffrida Stella AM, Bates TE, Clark JB (2001) Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res* 26:739-764.
- Chakraborty TR, Gore AC (2004) Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:977-987.
- Chan KM, Delfer D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375-380.
- Chen JQ, Cammarata PR, Baines CP, Yager JD (2009) Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim Biophys Acta* 1793:1540-1570.
- Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD (2004) Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:1011-1022.
- Choleris E, Ogawa S, Kavaliers M, Gustafsson JA, Korach KS, Muglia LJ, Pfaff DW (2006) Involvement of estrogen receptor alpha, beta and oxytocin in social discrimination: a detailed behavioral analysis with knockout female mice. *Genes Brain Behav* 5:528-539.
- Chotiawat C, Harris RB (2006) Increased anxiety-like behavior during the post-stress period in mice exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav* 50:489-495.
- Cornelius F, Logvinenko N (1996) Functional regulation of reconstituted Na^+, K^+ -ATPase by protein kinase A phosphorylation. *FEBS Lett* 380:277-280.

- Cornelius F, Mahmmoud YA (2003) Direct activation of gastric H⁺,K⁺-ATPase by N-terminal protein kinase C phosphorylation. Comparison of the acute regulation mechanisms of H⁺,K⁺-ATPase and Na⁺,K⁺-ATPase. *Biophys J* 84:1690-1700.
- Craig MC, Murphy DG (2007) Estrogen: effects on normal brain function and neuropsychiatric disorders. *Climacteric* 10:97-104.
- Crema L, Schlabitz M, Tagliari B, Cunha A, Simão F, Krolow R, Pettenuzzo L, Salbego C, Vendite D, Wyse AT, Dalmaz C (2010) Na⁺,K⁺-ATPase activity is reduced in amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. *Neurochem Res* 35:1787-1795.
- Cruz-Morales SE, Santos NR, Brandão ML (2002) One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 72:973-978.
- Dabrowska A, Pietkiewicz J, Dabrowska K, Czapińska E, Danielewicz R (1998) Interaction of M1 and M2 isozymes pyruvate kinase from human tissues with phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1383:123-129.
- Daniel JM, Dohanich GP (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* 21:6949-6956.
- David SS, Shoemaker M, Haley BE (1998) Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabelling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Mol Brain Res* 54:276-287.
- Deacon RMJ, Rawlins JNP (2005) Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. *Behav Brain Res* 156:241-249.
- Del Castillo AR, Battaner E, Guerra M, Alonso T, Mas M (1987) Regional changes of brain Na⁺,K⁺-transporting adenosine triphosphatase related to ovarian function. *Brain Res* 416:113-118.
- Despa S, Islam MA, Pogwizd SM, Bers DM (2002) Intracellular [Na⁺] and Na⁺ pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 539:133-143.
- Devlin TM (2003) Manual de bioquímica com correlações clínicas. 5 ed. EUA: Edgard Blücher LTDA.

- Di Donato S (2000) Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 23:247-263.
- Diaz-Veliz G, Alarcon T, Espinoza C, Dussaubat N, Mora S (1997) Ketanserin and anxiety levels: influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 58:637-642.
- Dickey CA, Gordon MN, Wilcock DM, Herber DL, Freeman MJ, Morgan D (2005) Dysregulation of Na⁺/K⁺ ATPase by amyloid in APP+PS1 transgenic mice. *BMC Neurosci* 6:7.
- Einat H, Yuan P, Manji HK (2005) Increased anxiety-like behaviors and mitochondrial dysfunction in mice with targeted mutation of the Bcl-2 gene: further support for the involvement of mitochondrial function in anxiety disorders. *Behav Brain Res* 165:172-180.
- Erecinska M, Cherian S, Silver IA (2004) Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol* 73:397-445.
- Erecinska M, Silver IA (1989) ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:2-19.
- Erecinska M, Silver IA (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 43:37-71.
- Ewart HS, Klip A (1995) Hormonal regulation of the Na⁺,K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol* 269:295-311.
- Feksa LR, Cornelio A, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CM (2005) The effects of the interactions between amino acids on pyruvate kinase activity from the brain cortex of young rats. *Int J Dev Neurosci* 23:509-514.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23-36.
- Fothergill-Gilmore LA, Michels PA (1993) Evolution of glycolysis. *Biophys Mol Biol* 59:105-235.
- Fotis H, Tatjanenko LV, Vasilets LA (1999) Phosphorylation of the α -subunits of the Na⁺/K⁺-ATPase from mammalian kidneys and *Xenopus* oocytes by cGMP-dependent protein kinase results in stimulation of ATPase activity. *Eur J Biochem* 260:904-910.

- Frye CA, Walf AA (2004) Estrogen and/or progesterone systemically or to the amygdala can have anxiety, fear, and pain reducing effects in ovariectomized rats. *Behav Neurosci* 118:306-313.
- Gandy S (2003) Estrogen and neurodegeneration. *Neurochem Res* 28:1003-1008.
- Gardner A, Boles RG (2010) Beyond the serotonin hypothesis: Mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, in press.
- Geering, K (2006) FXYD proteins: new regulators of Na⁺,K⁺-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:241-250.
- Genazzani AR, Pluchino N, Luisi S, Luisi M (2007) Estrogen, cognition and female ageing. *Human Reproduction Update* 13:175-187.
- Gibbs RB (1994) Estrogen and nerve growth factor-related systems in brain: effects on basal forebrain cholinergic neurons and implications for learning and memory processes and aging. *Ann N Y Acad Sci* 743:165-196.
- Gibbs RB, Gabor R (2003) Estrogen and cognition: applying preclinical findings to clinical perspectives. *J Neurosci Res* 74:637-643.
- Ginsberg MD, Sternau LL, Globus MY, Dietrich WD, Busto R (1992) Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 4:189-225.
- González C, Díaz F, Alonso A (2008) Neuroprotective effects of estrogens: cross-talk between estrogen and intracellular insulin signalling. *Infect Disord Drug Targets* 8:65-67.
- Graybiel AM (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 5:733-741.
- Grisar T, Guillaume D, Delgado-Escueta AV (1992) Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res* 12:141-149.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC (2002) Mechanisms of disease: production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346:340-352.
- Hakim AM, Moss G, Gollomp SM (1976) The effect of hypoxia on the pentose phosphate pathway in brain. *J Neurochem* 26:683-688.
- Halbreich U, Kahn LS (2003) Hormonal aspects of schizophrenias: an overview. *Psychoneuroendocrinology* 28:1-16.

- Halbreich U, Lumley LA, Palter S, Manning C, Gengo F, Joe SH (1995) Possible acceleration of age effects on cognition following menopause. *J Psychiatr Res* 29:153-163.
- Hall ER, Cottam GL (1978) Isozymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties. *Int J Biochem* 9:785-793.
- Heales SJ, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB (1999) Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta* 1410:215-228.
- Henderson VW (2005) Menopause and disorders of the central nervous system. *Minerva Ginecol* 57:579-592.
- Hill MN, Karacabeyli ES, Gorzalka BB (2007) Estrogen recruits the endocannabinoid system to modulate emotionality. *Psychoneuroendocrinology* 32:350-357.
- Horisberger JD (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)* 19:377-387.
- Horn D, Barrientos A (2008) Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *IUBMB Life* 60:421-429.
- Hughes BP (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.
- Imwalle DB, Gustafsson JA, Rissman EF (2005) Lack of functional estrogen receptor β influences anxiety behavior and serotonin content in female mice. *Physiol Behav* 84:157-163.
- Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J (2008) Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology* 149:3167-3175.
- Jones DH, Matus AI (1974) Isolation of plasma synaptic membrane from brain by combination flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta* 356:276-287.
- Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ (2003) Structure and mechanism of Na^+, K^+ -ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol* 65:817-849.

- Kaplan JH (2002) Biochemistry of Na⁺,K⁺-ATPase. *Annu Rev of Biochem* 71:511-535.
- Katzburg S, Ornoy A, Hendel D, Lieberherr M, Kaye AM, Somjen D (2001) Age and gender specific stimulation of creatine kinase specific activity by gonadal steroids in human bone-derived cells in culture. *J Endocrinol Invest* 24:166-172.
- Kayne FJ (1973) Pyruvate kinase. In: *The Enzymes*. 3 ed. New York: Boyer PD.
- Kiroytcheva M, Cheval L, Carranza ML, Martin PY, Favre H, Doucet A, Feraille E (1999) Effect of cAMP on the activity and the phosphorylation of Na⁺,K⁺-ATPase in rat thick ascending limb of Henle. *Kidney Int* 55:1819-1831.
- Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR (1996) A neostriatal habit learning system in humans. *Science* 273:1399-1402.
- Konradi C, Eaton M, MacDonald ML, Walsh J, Benes FM, Heckers S (2004) Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 61:300-308.
- Kostanyan A, Nazaryan K (1992) Rat brain glycolysis regulation by estradiol-17 beta. *Biochim Biophys Acta* 1133:301-306.
- Krezel W, Dupont S, Krust A, Chambon P, Chapman PF (2001) Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor β -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 98:12278-12282.
- Kuppers E, Beyer C (1999) Expression of estrogen receptor α and β mRNA in the developing and adult mouse striatum. *Neurosci Lett* 276:95-98.
- Leong SF, Lai JCK, Lim L, Clark JB (1981) Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. *J Neurochem* 37:1548-1556.
- Levin G, Cogan U, Levy Y, Mokady S (1990) Riboflavin deficiency and the function and fluidity of rat erythrocyte membranes. *J Nutr* 120:857-861.
- Lipton P, Robacker K (1983) Glycolysis and brain function: [K⁺]₀ stimulation of proteins synthesis and K⁺ uptake require glycolysis. *FASEB J* 42:2875-2880.
- Long JA, Evans HM (1922) The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California* 6:1-148.
- López-Grueso R, Borrás C, Gambini J, Viña J (2010) Aging and ovariectomy cause a decrease in brain glucose consumption in vivo in Wistar rats. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 45:136-140.

- Lopina OD (2000) Na⁺,K⁺-ATPase: structure, mechanism, and regulation. *Membr Cell Biol* 13:721-744.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-267.
- Ma JY, Choo YK, Lee SH, Jeong HY, Keum KS, Choi BK, Jung KY (2003) Seungnoidan increases cerebrocortical ATP and acetylcholine contents in ovariectomized rats. *Phytother Res* 17:1025-1031.
- Magistretti P (2008) Brain energy metabolism. In: Squire L, Bloom FE, Spitzer NC (eds) *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press, p. 271-296.
- Mahmmoud YA, Cornelius F (2002) Protein kinase C phosphorylation of purified Na⁺,K⁺-ATPase: C-terminal phosphorylation sites at the α - and γ -subunits close to the inner face of the plasma membrane. *Biophys J* 82:1907-1919.
- Mahon S, Deniau JM, Charpier S (2004) Corticostriatal plasticity: life after the depression. *Trends Neurosci* 27:460-467.
- Malnick SD, Shaer A, Soreq H, Kaye AM (1983) Estrogen-induced creatine kinase in the reproductive system of the immature female rat. *Endocrinology* 113:1907-1909.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62:609-614.
- Mata M, Fink DJ, Gainer H, Smith CB, Davidsen L, Savakis H, Schwartz WJ, Sokoloff L (1980) Activity-dependent energy metabolism in rat posterior pituitary, primarily reflects sodium pump activity. *J Neurochem* 34:213-215.
- Mattevi A, Bolognesi M, Valentini G (1996) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *FEBS Lett* 389:15-19.
- McCarthy MM (2009) The two faces of estradiol: effects on the developing brain. *Neuroscientist* 15:599-610.
- McCullough LD, Hurn PD (2003) Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends Endocrinol Metab* 14:228-235.
- McEwen B (2002) Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57:357-384.
- Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144:2055-2067.

- Mobasher A, Avila J, Cózar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJO, Lamb JF, Martin-Vasallo P (2000) Na⁺,K⁺-ATPase isozyme diversity: comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep* 20:51-91.
- Monteiro SC, Matté C, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse AT (2005a) Vitamins E and C pretreatment prevents ovariectomy-induced memory deficits in water maze. *Neurobiol Learn Mem* 84:192-199.
- Monteiro SC, Matté C, Delwing D, Wyse AT (2005b) Ovariectomy increases Na⁺,K⁺-ATPase, acetylcholinesterase and catalase in rat hippocampus. *Mol Cell Endocrinol* 236:9-16.
- Monteiro SC, Mattos CB, Ben J, Netto CA, Wyse AT (2008) Ovariectomy impairs spatial memory: prevention and reversal by a soy isoflavone diet. *Metab Brain Dis* 23:243-253.
- Morissette M, Le Saux M, D'Astous M, Jourdain S, Al Sweidi S, Morin N, Estrada-Camarena E, Mendez P, Garcia-Segura LM, Di Paolo T (2008) Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108:327-338.
- Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, Vorhees CV, Lingrel JB (2007) Deficiency in Na⁺,K⁺-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 27:616-626.
- Muñoz ME, Ponce E (2003) Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 135:197-218.
- Nakano K (2000) Neural circuits and topographical organization of the basal ganglia and related regions. *Brain Dev* 22:5-16.
- Navarro A, Boveris A (2007) The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C670-686.
- Nelson DL, Cox MM (2006) *Lehninger Princípios de bioquímica*. 4 ed. São Paulo: Sarvier.
- O'Bryant SE, Palav A, McCaffrey RJ (2003) A review of symptoms commonly associated with menopause: implications for clinical neuropsychologists and other health care providers. *Neuropsychol Rev* 13:145-152.

- Oyedotun KS, Lemire BD (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase anchor subunit, Sdh4p: mutations at the C-terminal lys-132 perturb the hydrophobic domain. *Biochim Biophys Acta* 1411:170-179.
- Paganini-Hill A, Henderson VW (1996) Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med* 156:2213-2217.
- Pandey M, Mohanakumar KP, Usha R (2010) Mitochondrial functional alterations in relation to pathophysiology of Huntington's disease. *J Bioenerg Biomembr* 42:217-226.
- Paoletti AM, Floris S, Mannias M, Orrù M, Crippa D, Orlandi R, Del Zompo MM, Melis GB (2001) Evidence that cyproterone acetate improves psychological symptoms and enhances the activity of the dopaminergic system in postmenopause. *J Clin Endocrinol Metab* 86:608-612.
- Parker JC, Hoffman JF (1967) The role of membrane phosphoglycerate kinase in the control of glycolytic rate by active cation transport in human red blood cells. *J Gen Physiol* 50:893-916.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-167.
- Picazo O, Estrada-Camarena E, Hernandez-Aragon A (2006) Influence of the post-ovariectomy time frame on the experimental anxiety and the behavioural actions of some anxiolytic agents. *Eur J Pharmacol* 530:88-94.
- Pigott TA (1999) Gender differences in the epidemiology and treatment of anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 60 S18:4-15.
- Pisani G, Facioni L, Fiorani F, Pisani G (1998) Psychosexual problems in menopause. *Minerva Ginecol* 50:77-81.
- Porrino LJ, Nehlig A, Namba H, Sokoloff L (1982) Modulation of local cerebral glucose metabolism by estrogen and progesterone in the hypothalamus of ovariectomized female rats. *Soc Neurosci Abstr* 8.
- Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JT, Griffin JL, Wayland M, Freeman T, Dudbridge F, Lilley KS, Karp NA, Hester S, Tkachev D, Mimmack ML, Yolken RH, Webster MJ, Torrey EF, Bahn S (2004) Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry* 9:684-697, 643.

- Prins ML (2008) Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1-16.
- Ragonese P, D'Amelio M, Savettieri G (2006) Implications for estrogens in Parkinson's disease: an epidemiological approach. *Ann N Y Acad Sci* 1089:373-382.
- Raichle ME, Mintun MA (2006) Brain work and brain imaging. *Annu Rev Neurosci* 29:449-476.
- Ramsey CP, Giasson BI (2007) Role of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: Implications for treatment. *Drugs Aging* 24:95-105.
- Rao ML, Kölsch H (2003) Effects of estrogen on brain development and neuroprotection-implications for negative symptoms in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 28:83-96.
- Rapp SR, Espeland MA, Shumaker SA, Henderson VW, Brunner RL, Manson JE, Gass ML, Stefanick ML, Lane DS, Hays J, Johnson KC, Coker LH, Dailey M, Bowen D (2003) Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 289:2663-2672.
- Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW (2008) Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals* 16:140-153.
- Rezin GT, Cardoso MR, Gonçalves CL, Scaini G, Fraga DB, Riegel RE, Comim CM, Quevedo J, Streck EL (2008) Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Int* 53:395-400.
- Rocha BA, Fleischer R, Schaeffer JM, Rohrer SP, Hickey GJ (2005) 17Beta-estradiol-induced antidepressant-like effect in the Forced Swim Test is absent in estrogen receptor-beta knockout (BERKO) mice. *Psychopharmacology* 179: 637-643.
- Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat J, Letellier T (2003) Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* 370:751-762.
- Ruggiero RJ, Likis FE (2002) Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *J Midwifery Womens Health* 47:130-138.

- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain efficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35-51.
- Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283:1488-1493.
- 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* 142:207-216.
- Savonenko AV, Markowska AL (2003) The cognitive effects of ovariectomy and estrogen replacement are modulated by aging. *Neuroscience* 119:821-830.
- Scaglia F (2010) The role of mitochondrial dysfunction in psychiatric disease. *Dev Disabil Res Rev* 16:136-143.
- Seeman MV (1997) Psychopathology in women and men: focus on female hormones. *Am J Psychol* 154:1641-1647.
- Shepherd JE (2001) Effects of estrogen on cognition mood, and degenerative brain diseases. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 41:221-228.
- Shi C, Xu XW, Forster EL, Tang LF, Ge Z, Yew DT, Xu J (2008) Possible role of mitochondrial dysfunction in central neurodegeneration of ovariectomized rats. *Cell Biochem Funct* 26:172-178.
- Shi X, Xu J (2008) Increased vulnerability of brain to estrogen withdrawal-induced mitochondrial dysfunction with aging. *J Bioenerg Biomembr* 40:625-630.
- Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawsky-Wende J (2003) Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 289:2651-2662.
- Silva CG, Bueno AR, Schuck PF, Leipnitz G, Ribeiro CA, Wannmacher CD, Wyse AS, Wajner M (2003) D-2-Hydroxyglutaric acid inhibits creatine kinase activity from cardiac and skeletal muscle of young rats. *Eur J Clin Invest* 33:840-847.
- Simpkins JW, Katovitch MJ (1989) Relationship between blood glucose and hot flushes in women and an animal model. In: Lomax P, Schonnanm E (eds). *Thermoregulation: Research and clinical applications*, Basel: Karger, p. 1312-1317.

- Simpkins JW, Yang SH, Sarkar SN, Pearce V (2008) Estrogen actions on mitochondria - physiological and pathological implications. *Mol Cell Endocrinol* 290:51-59.
- Singh M, Dykens JA, Simpkins JW (2006) Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:514-521.
- Singh M, Meyer EM, Millard WJ, Simpkins JW (1994) Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female Sprague Dawley rats. *Brain Res* 644:305-312.
- Smith C, Marks AD, Lieberman M (2007) *Bioquímica médica básica de Marks. Uma abordagem clínica*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Soane L, Kahraman S, Kristian T, Fiskum G (2007) Mechanisms of impaired mitochondrial energy metabolism in acute and chronic neurodegenerative disorders. *Neurosci Res* 85:3407-3415.
- Sömjen D, Lundgren S, Kaye AM (1997) Sex and depot-specific stimulation of creatine kinase B in rat adipose tissues by gonadal steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62:89-96.
- Srivastava LK, Baquer NZ (1985) Purification and properties of rat brain pyruvate kinase. *Arch Biochem Biophys* 236:703-713.
- Sullivan PG, Brown MR (2005) Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:407-410.
- Tomimoto H, Yamamoto K, Homburger HA, Yanagihara T (1993) Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol* 86:447-455.
- Valentini G, Chiarelli L, Fortin R, Speranza ML, Galizzi A, Mattevi A (2000) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 275:18145-18152.
- Valsecchi F, Koopman WJ, Manjeri GR, Rodenburg RJ, Smeitink JA, Willems PH (2010) Complex I disorders: causes, mechanisms, and development of treatment strategies at the cellular level. *Dev Disabil Res Rev* 16:175-182.
- Van Duijn CM (1999) Hormone replacement therapy and Alzheimer's disease. *Maturitas* 31:201-205.
- Verma S, Srivastava RK, Sood S, Sharma S (2005) Effect of estrogen on hypoglycemia-induced neurological impairment in ovariectomized rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27:405-409.

- Voet D, Voet GV, Pratt CW (2002) Fundamentos de bioquímica. Porto Alegre: Artmed.
- Voet D, Voet JG (2006) Bioquímica. 3 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Walf AA, Frye CA (2006) A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology* 31:1097-1111.
- Walf AA, Frye CA (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2:322-328.
- Wallimann T, Hemmer W (1994) Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 133-134:193-220.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM (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* 281:21-40.
- Waynforth HB, Flecknell PA (1992) Experimental and surgical technique in the rat. London: Academic Press.
- Wendt S, Dedeoglu A, Speer O, Wallimann T, Beal MF, Andreassen AO (2002) Reduced creatine kinase activity in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Free Radic Biol Med* 32:920-926.
- Whiting KP, Restall CJ, Brain PF (2000) Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sci* 67:743-757.
- Whittingham TS, Lipton P (1981) Cerebral synaptic transmission during anoxia is protected by creatine. *J Neurochem* 37:1618-1621.
- Wise PM (2001) The "menopause" and the aging brain: causes and repercussions of hypoestrogenicity. *Biogerontology* 2:113-115.
- Wise PM (2002) Estrogens and neuroprotection. *Trends Endocrinol Metab* 13:229-230.
- Wise S (1996) The role of the basal ganglia in procedural memory. *Semin Neurol* 8:39-46.
- Wood CE, Register TC, Cline JM (2007) Soy isoflavonoid effects on endogenous estrogen metabolism in postmenopausal female monkeys. *Carcinogenesis* 28:801-808.

- World Health Organization (1996) Research on the menopause in the 1990: Reports of a WHO scientific group. Technical Report Series 886, Geneva, Switzerland.
- Wyse ATS, Bolognesi G, Brusque AM, Wajner M, Wannmacher CMD (1995) Na^+ , K^+ -ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the central cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Med Sci Res* 23:261-262.
- Wyse ATS, Brusque AM, Silva CG, Streck EL, Wajner M, Wannmacher CMD (1998) Inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport* 9:1719-1721.
- Wyse ATS, Streck EL, Worm P, Wajner A, Ritter F, Netto CA (2000) Preconditioning prevents the inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* 25:971-975.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107-1213.
- Wyss M, Smeitink J, Weyers RA, Wallimann T (1992) Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 25:119-166.
- Xie Z, Askari A (2002) Na^+ , K^+ -ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem* 269:2434-2439.
- Xu XW, Shi C, He ZQ, Ma CM, Chen WH, Shen YP, Guo Q, Shen CJ, Xu J (2008) Effects of phytoestrogen on mitochondrial structure and function of hippocampal CA1 region of ovariectomized rats. *Cell Mol Neurobiol* 28:875-886.
- Yang LC, Zhang QG, Zhou CF, Yang F, Zhang YD, Wang RM, Brann DW (2010) Extranuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus. *Plos one* 5.
- Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM Jr, Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P, Simpkins JW (2004) Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4130-4135.
- Yu SP (2003) Na^+ , K^+ -ATPase: The new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem Pharmacol* 66:1601-1609.

Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Mayer LS, Steffens DC, Breitner JC (2002) Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA* 288:2123-2129.