UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Adaptações morfofuncionais do músculo esquelético em camundongos com diferentes faixas etárias: efeito do treinamento físico na regeneração muscular

Nathalie Alves da Paixão

São Paulo

2016

NATHALIE ALVES DA PAIXÃO

Adaptações morfofuncionais do músculo esquelético em camundongos com diferentes faixas etárias: efeito do treinamento físico na regeneração muscular

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano

Orientador: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

São Paulo

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação da Publicação
Serviço de Biblioteca
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Paixão, Nathalie Alves da
Adaptações morfofuncionais do músculo esquelético em camundongos com diferentes faixas etárias: efeito do treinamento físico na regeneração muscular / Nathalie Alves da Paixão. – São Paulo :[s.n.], 2016.
98p.

Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Chakur Brum.

1. Músculo esquelético 2. Treinamento físico 3. Envelhecimento 4. Regeneração muscular I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PAIXÃO, Nathalie Alves da

Título: Adaptações morfofuncionais do músculo esquelético em camundongos com diferentes faixas etárias: efeito do treinamento físico na regeneração muscular

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

À Laura e ao Júlio (meus filhos): amor maior não há

À Bianca e à Grace (minhas irmãs): é impossível ser feliz sozinha

À Raimunda e Adaldiso (meus pais): com eles aprendi a batalhar e nunca desistir

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Patricia Chakur Brum, pela paciência, confiança e todos os ensinamentos que foram de grande importância para o meu amadurecimento profissional e pessoal.

Às amigas, Aline Bacurau, Telma Cunha, Janaína Vieira, Marcele Coelho, Katt Mattos e Luciano Lopes, por todo o apoio, incentivo, ajuda, auxílio, disposição, empenho e força que recebi desde o início de minha entrada no mestrado.

Aos professores, Edilamar Menezes de Oliveira e Paulo Rizzo Ramires, pelo suporte, simpatia e ânimo para comigo e meu projeto.

A todos os amigos do laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício Físico que colaboraram com ideias, ajustes, discussões, aprendizado, diversão, risadas, festas de aniversário e meu engajamento com a pesquisa desde a iniciação científica: Natale, Rodrigão, Diogo, Alessandra, Andréia, Carmão, Júlio, Marcelão, Vanessa, Max, Pamela, Guga, Bechara, Bozi, Paulo, Bianco, Juliane, Kátia, Chris, Gabriel, Bruno, Larissa, Rafael, Rodrigo, Lucas, Alexandre e Thaynara. Além dos amigos do laboratório de Bioquímica da Atividade Motora, Tiago, Fernanda, Úrsula Soci, Stéphano, Flávio, Fátima, Clara, João, André.

A todos os funcionários da EEFE pelo acolhimento. Agradeço especialmente aos técnicos do laboratório, Úrsula Urias, Glória, Ney, Alex, Katt, Marcele e Luciano, e aos secretários das pós-graduação da EEFE, Márcio, Ilza, Paulo, Mariana e Cláudia, pela dedicação, seriedade, pontualidade e competência.

A todos os meus amigos e familiares que mesmo sem entender direito o que eu estava fazendo, me apoiaram e incentivaram.

À CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro conferidos à mim e ao laboratório.

A Deus, por tudo.

RESUMO

PAIXÃO, N. A. da. **Adaptações morfofuncionais do músculo esquelético em camundongos com diferentes faixas etárias: efeito do treinamento físico na regeneração muscular.** Ano. 2016. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.

O envelhecimento é caracterizado por diversas alterações no organismo, as quais acarretam em fragilidade, maior susceptibilidade a quedas, perda de autonomia e piora da qualidade de vida. O músculo esquelético também é afetado pelo envelhecimento, levando a alterações na locomoção, adaptação metabólica e em sua plasticidade. Alterações na plasticidade - prejudicam a capacidade regenerativa do músculo esquelético, desencadeando modificações em todos os estágios desse processo. Uma estratégia que tem sido bastante utilizada para minimizar/reverter o impacto do envelhecimento na função e plasticidade muscular é o treinamento físico aeróbico (TFA), o qual promove diversos benefícios à musculatura esquelética. Dessa forma, na presente dissertação investigamos a contribuição do TFA de 4 semanas em esteira rolante na capacidade regenerativa do músculo tibial anterior de camundongos jovens e idosos após lesão mecânica. A capacidade regenerativa foi avaliada por métodos histológicos e de imunofluorescência em tecido aos 2, 4 e 15 dias após a indução da lesão mecânica. Os níveis de RNAm de fatores relacionados à resposta regenerativa muscular foram avaliados por PCR em tempo real. Para confirmar a eficácia do TFA e função muscular, avaliamos a capacidade aeróbica, a deambulação e a produção de força *ex vivo*. Observou-se que o TFA melhorou a função muscular e a capacidade aeróbica dos animais jovens e idosos. No que diz respeito ao processo de regeneração muscular, os resultados obtidos sugerem, aumento da área necrótica, da inflamação, da deposição de colágeno e redução da área de secção transversa das fibras nos animais idosos sedentários ao longo do curso temporal estudado. Adicionalmente, observou-se redução na expressão de genes envolvidos na ativação de células satélites e atraso no processo de diferenciação dessas células nesses animais. OTFA contribuiu para a redução da área necrótica, da inflamação, levando a menor deposição de colágeno e aumento da distribuição das fibras centro nucleadas nos animais idosos. No entanto, não se observou modificações na expressão dos genes com o TFA nesses animais.

Portanto, os dados sugerem que o TFA contribui para melhora do processo de regeneração muscular em camundongos idosos.

Palavras-chave: regeneração muscular; treinamento físico aeróbico; músculo esquelético; envelhecimento.

ABSTRACT

PAIXÃO, N. A. da. **Morphological and functional adaptations in skeletal muscle of young and old mice: effect of exercise training on muscle regeneration**. 2016. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.

Aging is a biological process characterized by a progressive impairment in physiological systems, which leads to general frailty and reduced exercise tolerance and performance in daily living activities. Skeletal muscle is directly affected by aging, displaying changes in locomotion, metabolic adaptation, and muscle plasticity. Altered muscle plasticity affects muscle regeneration capacity in elderly. Aerobic exercise training (AET) has been used as a strategy to minimize/reverse the impact of aging on muscle function and regenerative function. Thus, we have investigated the contribution of 4-week AET (running on the treadmill) for tibialis anterior muscle regenerative response from mechanical injury in young and old muscle, which were randomly assigned into untrained and trained groups. The regenerative capacity was evaluated by histology and immunofluorescence at 2, 4 and 15 days after the mechanical injury induction. Muscle mRNA levels of regulatory genes involved in muscle regeneration were evaluated by real time PCR. To verify the effectiveness of AET and muscle function, we assessed the aerobic capacity, step length in ambulation test and *ex vivo* muscle force production. We observed that AE improved muscle function and aerobic capacity of young and old mice. Regarding the muscle regeneration process, our data suggest an increase in necrotic area, inflammation and collagen deposition paralleled by a reduced fiber cross sectional area in sedentary old mice. These responses were associated with changes in gene expression suggesting reduced satellite cells activation and delayed differentiation. AET contributed to reduction in both necrotic area and inflammation, leading to reduced collagen deposition and increased centronucleated fibers, suggesting improved regeneration process. However no changes were observed in mRNA levels of genes studied after AET. Altogether, our data provide evidence for AET improved regeneration process in muscle of old mice.

Keywords: muscle regeneration; aerobic exercise training; skeletal muscle; aging;

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... XII

LISTA DE TABELAS..... XV

LISTA DE QUADROS..... XVI

LISTA DE FIGURAS..... XVII

LISTA DE ANEXOS..... XIX

1. INTRODUÇÃO 20

2. REVISÃO DE LITERATURA..... 22

2.1 ENVELHECIMENTO 22

2.2 PROCESSO REGENERATIVO PÓS-LESÃO MUSCULAR..... 24

2.2.1 Lesão muscular..... 25

2.2.2 inflamação muscular pós-lesão..... 27

2.2.3 Regeneração e Reparo muscular 29

2.3 CÉLULAS SATÉLITES 30

2.4 CONTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS MIOGÊNICAS NA REGENERAÇÃO MUSCULAR 36

2.5 TREINAMENTO FÍSICO E REGENERAÇÃO MUSCULAR DO JOVEM AO IDOSO..... 38

3. OBJETIVOS..... 42

3.1 GERAL 42

3.2 ESPECÍFICOS..... 42

4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 44

4.1 AMOSTRA..... 44

4.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FISICA 45

4.3 TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO 46

4.4 PROTOCOLO DA FUNÇÃO CONTRÁTIL *EX VIVO* DO

MÚSCULO ESQUELÉTICO 46
4.4.1 PREPARAÇÃO DO MÚSCULO E FIXAÇÃO NO BANHO DE ÓRGÃOS..... 46
4.4.2 SISTEMA DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E REGISTRO DE FORÇA MUSCULAR ISOMÉTRICA..... 46
4.4.3 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CURVA FORÇAxFREQUÊNCIA.. 48
4.4.4 PROTOCOLO DE INDUÇÃO À FADIGA..... 49
4.5 PROTOCOLO DE LESÃO POR PERFURAÇÕES NO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR..... 49
4.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS 50
4.6.1 COLORAÇAO COM HEMATOXILINA-EOSINA..... 50
4.6.2 COLORAÇÃO COM PICROSSÍRIUS RED 51
4.6.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA 52
4.6.4 CAPTURA E ANÁLISE DAS IMAGENS..... 53
4.7 EXPRESSÃO GÊNICA..... 53
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA 55
5. RESULTADOS/DISCUSSÃO..... 56
5.1 EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO SOBRE A TOLERÂNCIA AOS ESFORÇOS E FUNÇÃO MUSCULAR..... 56
5.2 EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO NA REGENERAÇÃO MUSCULAR 64
6. CONCLUSÃO 78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 77
ANEXOS 84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AST	área de secção transversa
ATP	adenosina trifosfato
AVDs	atividades de vida diária
c-Met	receptor de tirosina quinase
CS	células satélites
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDL	extensor digitorium longus
eMyHC	miosina de cadeia pesada embrionária
EROs	espécies reativas de oxigênio
FGF	fator de crescimento fibroblástico
GFP	*green fluorescent protein*
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HE	hematoxilina-eosina
HGF	fator de crescimento tipo hepatócito
IGF-I	fator de crescimento muscular similar à insulina
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
M	macrófago
M-caderina	molécula de adesão celular
MDSC	*muscle-derived stem cells*
MHC	miosina de cadeia pesada
MPO	mieloperoxidase
MRF4	*miogenic regulator factor 4*
Myf5	*myogenic factor 5*
MyoD	*myogenic differentiation factor*

MyoG	*myogenic factor 4* ou miogenina
NCAM	molécula de adesão neural
nMyHC	miosina de cadeia pesada neonatal
Notch	*notch receptor*
PAX7	*paired box 7*
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
SD	*side population*
SDF-1	stromal derived factor 1
SRF	*serum response factor*
TA	músculo tibial anterior
TFA	treinamento físico aeróbico
TGF-β	fatores de crescimento transformadores beta
TNFα	fator de necrose tumoral alfa
VCAM	molécula de adesão vascular
Wnt	*wingless-type MMTV integration site family*
β-gal	beta galactosidade

Símbolos

µm	micrometro
cm	centímetro
Hz	hertz
m	metro
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar

ms	milisegundos
nM	nanomolar
V	volts

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros morfológicos de animais jovens e idosos após lesão muscular. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado..... 66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Anticorpos que foram utilizados na imunofluorêscencia..... 51

Quadro 2 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (primers) que foram utilizados na expressão gênica por PCR..... 53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das quatro fases interligadas da regeneração muscular. Adaptado de Carosio e colaboradores (2011)..... 21

Figura 2 - Esquema da progressão do programa miogênico de células satélites (CS). CS quiescentes expressam PAX7 e Myf5. Após a ativação, elas aumentam a expressão de MyoD e se dividem para produzir um conjunto de células precursoras musculares. Progênies de CS seguem dois destinos eles podem regular negativamente MyoD e se auto-renovar, originando uma nova CS, ou se diferenciar por meio da expressão de PAX7, Myf5 e MyoD, e aumento da expressão de MRF4 e miogenina 30

Figura 3 - Desenho experimental 43

Figura 4 - Teste de deambulação 44

Figura 5 - Localização do músculo tibial anterior em roedores (A). Localização das 10 perfurações com agulha no músculo tibial anterior (B). Profundidade utilizada como padrão para as perfurações com a agulha 22G (C).... 48

Figura 6 - Coloração por hematoxilina-eosina. As setas longas indicam infiltrados inflamatórios e os asteriscos fibras basofílicas após 24h da indução da lesão (A). As setas curtas indicam fibras com o núcleo centralizado 15 dias após a lesão mecânica (B). Imagens adquiridas em 40x de magnificação 49

Figura 7 - Coloração por picrossírius em músculo tibial anterior após 15 dias da lesão por perfurações. Imagens adquiridas nas magnificações de 4x (A), 20x (B) e 40x (C)..... 50

Figura 8 - Marcação de fibras necróticas por imunoglobulinas reativas com a espécie estudada (camundongos). As fibras positivas para necrose estão marcadas em verde e são indicadas pelas setas curtas, em magnificação de 40x (A) e em magnificação de 20x (B), após 2 dias da indicação da lesão. Em azul a marcação para núcleos por Hoechst..... 51

Figura 9 - Distância máxima percorrida em teste de esforço realizado em animais jovens e idosos pré e pós o período de treinamento (A) e (B) delta da distância percorrida. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado..... 57

Figura 10 - Avaliação da função muscular por deambulação. (A) comprimento da passada absoluto (cm) e (B) normalizados pelo comprimento. Teste

realizado em animais jovens e idosos, sedentários e treinados após o período experimental. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado..... 59

Figura 11 - Marcação por imunofluorescência Laminina (vermelho) (A) e quantificação da área de secção transversa de fibras nos músculos EDL e Tibial Anterior (B e C) de animais jovens e idosos, sedentários e treinados. JS, Jovem Sedentário; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado; AST, Área de Secção Transversa; EDL, *extensor digitorum longus*..... *60*

Figura 12 - Função contrátil ex vivo do músculo EDL. Força de contração isométrica máxima atingida em protocolo de forçaXfrequência muscular (A) e protocolo de indução a fadiga (B). JS, Jovem Sedentário; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado..... 63

Figura 13 - Marcação de fibras necróticas por imunoglobulinas em verde (A) e (B) quantificação da área necrótica no músculo tibial anterior 2 dias após lesão mecânica. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado..... 68

Figura 14 - Coloração por hematoxilina-eosina para análise de área inflamada no músculo tibial anterior 2 (A e B) e 4 (C e D) dias após lesão mecânica em animais jovens e idosos, sedentários e treinados. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado..... 70

Figura 15 - Coloração por picrossirius red (A) e análise de fração de colágeno (B) no músculo tibial anterior 15 dias após lesão mecânica. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado..... 72

Figura 16 - Coloração por hematoxilina-eosina para análise de área de secção transversa das fibras com núcleo centralizado no músculo tibial anterior 15 dias após lesão mecânica em animais jovens e idosos, sedentários e treinados (A). Área de secção transversa de fibras com apenas um núcleo centralizado (B). Área de secção transversa de fibras com dois ou mais núcleos centralizados (C). Histograma da área de secção transversa das fibras com núcleos centralizados. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado..... 74

Figura 17 - Expressão gênica de reguladores da regeneração muscular 2 (A), 4 (B) e 15 (C) dias após a lesão mecânica. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado..... 76

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Padronização da quantidade de lesão muscular..... 90

Anexo 2 - Padronização do curso temporal da lesão muscular..... 91

Anexo 3 - Expressão gênica de marcadores de regulação miogênica após uma única sessão máxima de exercício físico 91

Anexo 4 - Dados brutos..... 92

Anexo 5 - Publicações durante o período do mestrado..... 97

1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é responsável pela locomoção, respiração, adaptação metabólica e pelo armazenamento da maior quantidade de proteínas corporais, além de apresentar grande plasticidade e adaptabilidade às condições ambientais. Uma importante característica adaptativa da musculatura esquelética é a capacidade de regenerar-se após uma lesão muscular. A extensão das lesões musculares pode variar - de brandas e/ou microlesões (observadas após um exercício físico) a graves e/ou extensas (como em entorses, lacerações, entre outras). Assim, o processo de lesão implica desde um simples desarranjo de sarcômeros e proteínas contráteis até a perda da integridade na transmissão de força e prejuízos no acoplamento excitação-contração (JÄRVINEN et al., 2005).

Em decorrência do envelhecimento, o músculo esquelético vai perdendo área e número de fibras, o que induz ao declínio da sua capacidade em produzir força e resistir à fadiga, aumentando a susceptibilidade para danos/lesões no próprio tecido muscular. Essas alterações contribuem para quadros de fragilidade física, que culminam em menor mobilidade e aumento no número de quedas, sendo este um dos principais fatores para a dependência na velhice (HADEY et al., 1993; HOLLOSZY et al., 1995). A partir disso, o processo de regeneração muscular tornou-se um tema científico relevante na expectativa de que intervenções terapêuticas pudessem melhorar a qualidade de vida de indivíduos idosos (CHARGE & RUDNICKI, 2004).

O processo de regeneração muscular após uma lesão consiste nas seguintes etapas: primeiramente, há um período inflamatório (com a migração de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos para conter o tamanho da lesão); em seguida, há um

período regenerativo (onde entram em ação células satélites e outras precursoras miogênicas para a recuperação das fibras lesionadas); e, por fim, ocorre o período de reparo/remodelamento muscular (com a angiogênese, a neurogênese e a recuperação funcional - força, flexibilidade e resistência muscular). Esse processo regenerativo pode levar dias ou meses, de acordo com a extensão da lesão e com a idade do indivíduo lesionado (CAROSIO et al., 2011).

Apesar de muitos trabalhos na literatura terem utilizado uma única sessão de exercício físico submáximo ou máximo, como forma de indução de lesão branda, seja por meio de contrações excêntricas máximas (protocolo comumente usado em humanos) (HORTOBAGYI et al., 1998; NOSAKA et al., 2002; PHILIPS et al., 2003) ou por corrida em declive (realizada tanto em animais, como em humanos) (AKIMOTO et al., 2002; SACHECK et al., 2003), pouco se sabe sobre o possível efeito terapêutico do treinamento físico aeróbico sobre o processo de regeneração muscular. Portanto, o objetivo dessa dissertação foi o de avaliar o efeito do treinamento físico aeróbico prévio à uma lesão muscular e comparar as respostas regenerativas entre camundongos jovens e idosos.

2. Revisão de Literatura

2.1 O processo de envelhecimento

Os avanços da medicina e da indústria farmacêutica aliados à melhora nas condições econômicas e sociais de vida têm resultado no aumento da população com idade superior a 60 anos no Brasil e no mundo. Segundo dados do IBGE (2013), atualmente no Brasil há 10 milhões de pessoas com idade superior a 60 anos e projeções apontam que, no ano de 2030, o Brasil terá a 6ª maior população mundial de idosos em números absolutos. Com o aumento da expectativa de vida, iniciativas que aumentem as chances de um envelhecimento saudável e autônomo tornam-se cada vez mais importantes (MARANHÃO NETO et al., 2008).

O envelhecimento pode ser caracterizado como um processo contínuo durante o qual ocorre declínio progressivo de todos os processos fisiológicos (NÓBREGA et al., 1999). Com o envelhecimento, observamos a perda da elasticidade da pele, quantidade de colágeno e tecido adiposo subcutâneo, o que altera a capacidade de absorção de choques e controle da perda de calor corporal (HAYCLIFF, 1996).

De fato, em muitos idosos, há aumento nos quadros de demência e uma redução na concentração e memorização, que - são mais prevalentes para a memória episódica (lembrança de eventos) do que para a memória semântica (conhecimento conceitual, cognição social) (CRAICK et al., 1990). O tecido adiposo aumenta de 18 a 36% nas pessoas do sexo masculino e de 33% a 48% nas do sexo feminino, principalmente na região abdominal, o que corrobora o aumento da susceptibilidade de doenças do aparelho circulatório (MATSUDO et al., 2000;

HUAYLLAS et al., 2001; BRITO et al., 2001). Outra mudança que ocorre com o envelhecimento é a diminuição na porcentagem de água, de 60% para 52%, que acarreta em maior rigidez nos tendões, ligamentos e cartilagens articulares (MARTEL et al., 2006; BASSET et al., 2004).

Com a mudança no metabolismo basal, há notadamente uma menor produção de hormônios: nos homens há menor testosterona circulante e ACTH, em torno dos 60 anos, ao passo que nas mulheres, devido à menopausa, por volta dos 45 anos, há diminuição de estrógeno (KANNAAN et al., 2005). Podemos observar também a perda de massa óssea, densidade óssea e mudança na geometria óssea, num total de 1 a 3% a cada ano, levando à menor estatura, aumento na fragilidade e quadros de osteoporose (SCHULTHEIS, 1991). No que diz respeito ao sistema imune, ocorre a imunosenescência, ou seja, acontece uma redução tanto nas respostas do sistema imune inato, como no do sistema imune adquirido, resultantes da involução do timo e da modulação das populações leucocitárias, que tem por consequência, resposta alterada contra patógenos, o que piora o combate à infecções e inflamações (ESQUENAZI et al., 2008). Na musculatura esquelética, há uma acentuada perda na massa, força e potência musculares com o envelhecimento (DOHERTY, 2003).

Dentre os diversos processos fisiológicos que se alteram com o avanço da idade, destaca-se a diminuição na capacidade de execução das atividades de vida diárias (AVDs), aumentando o grau de dependência dos idosos (INOUYE et al., 2007). Uma das consequências é o aumento no número de quedas, que comumente resulta em fraturas, que são consideradas causa frequente de dependência e morbidade na terceira idade (MORELAND et al., 2004). Cabrera e colaboradores (2007), em um estudo de coorte prospectivo com tempo médio de seguimento de 9

anos, observaram que de 840 idosos estudados, 36% vieram a óbito, sendo 8,6% devido, exclusivamente, a quedas.

Vários são os fatores que aumentam a susceptibilidade à queda no idoso, sendo que a sarcopenia, atrofia muscular no envelhecimento, está entre os principais. O processo de sarcopenia está relacionado a uma rede complexa de fatores metabólicos, imunológicos e neuro-humorais potencializados pela inatividade física e distúrbios nutricionais. Em geral, nessa condição, a síntese de proteínas é suprimida e suplantada pela elevação da degradação de proteínas, levando a um quadro atrófico que é agravado pela perda progressiva de mionúcleos por apoptose muscular (CHABI et al., 2008). De fato, em um acompanhamento de indivíduos idosos por um período de 12 anos, foi possível identificar que a perda de força muscular pode variar de 20 a 30%, sendo que a área de secção transversa (AST) dos músculos foi responsável por cerca de 90% dessa perda (FRONTERA et al., 1998). A diminuição do número de fibras musculares e da AST das fibras restantes tem sido associada à degeneração progressiva dos neurônios motores, principalmente os que inervam as fibras musculares do tipo II (FAULKNER et al., 2007).

Com o envelhecimento, além da redução da massa muscular, há diversas alterações que comprometem a função muscular. Uma delas refere-se à perda de capacidade regenerativa, que parece estar envolvida com a menor ativação/redução de componentes desse processo na ocorrência de lesões, contribuindo para a sarcopenia (COLLINS et al., 2007; WANG et al., 2013). Nos itens a seguir, serão descritos os aspectos relacionados ao processo regenerativo da musculatura esquelética, em condições normais e no idoso.

2.2 Processo regenerativo pós-lesão muscular

Em condições normais, o músculo esquelético adulto é um dos tecidos que se regenera de maneira eficaz em resposta à uma lesão. O processo regenerativo é caracterizado por quatro fases distintas: lesão/degeneração, inflamação, regeneração e remodelamento/reparo (CRISCO et al., 1994; CAROSIO et al.,2011) (Figura 1).

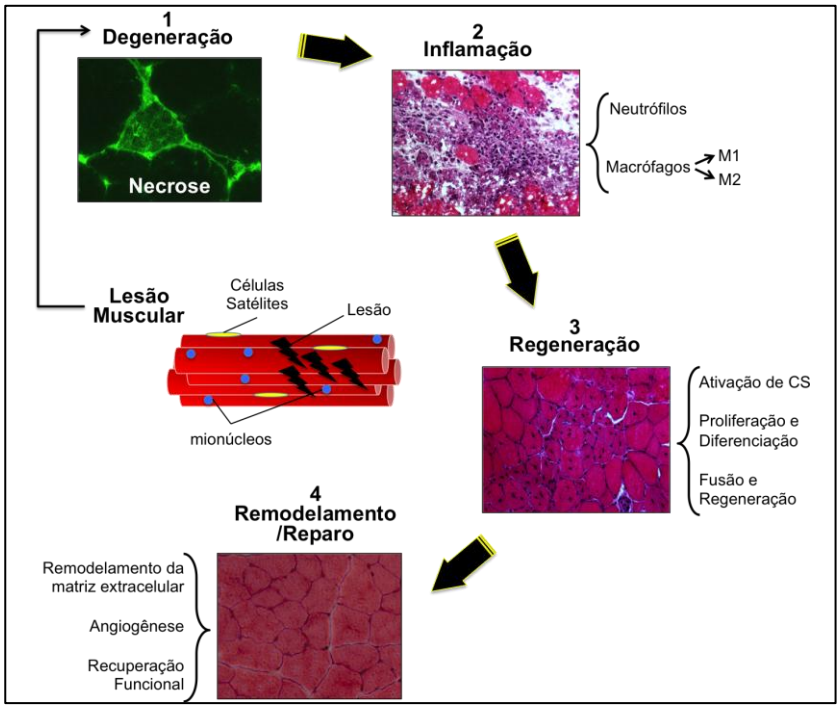

Figura 1 - Representação esquemática das quatro fases interligadas da regeneração muscular. Adaptado de Carosio e colaboradores (2011).

2.2.1 Lesão muscular

Após a lesão de fibras musculares, o processo de degeneração é resultado de rápida necrose derivada do aumento no influxo de Ca^{2+} extracelular, seguido pela ruptura do sarcolema. O aumento no influxo de Ca^{2+} leva à ativação das calpaínas, proteases neutras, associadas aos processos iniciais de degeneração ocorridos nos

sarcômeros musculares (ZIMOWSKA et al., 2001), promovendo o desarranjo de proteínas miofibrilares e proteínas do citoesqueleto (SULTAN et al., 2000). Fibras necróticas ativam uma acelerada resposta inflamatória, caracterizada pela invasão sequencial de populações de células inflamatórias específicas no tecido muscular (TIDBALL & WEHLING-HENRICKS, 2007). Parte dessa amplificação inflamatória se dá pela liberação de proteínas de choque térmico do tecido necrosado, além de microrganismos que aumentam a síntese de citocinas por meio da ativação de células do sistema imune inato, via *toll like receptors*. Portanto, os *tool like receptors* integram a resposta imunológica ao reparo tecidual.

Com o envelhecimento, observamos uma série de mudanças na homeostasia muscular que aumentam a susceptibilidade a lesões intramusculares e, também, a lesões de maior extensão induzidas pelo mesmo estímulo quando indivíduos idosos são comparados a indivíduos jovens. Essa perda de homeostasia muscular está relacionada ao aumento do sistema renina-angiotensina, com consequente aumento dos níveis de angiotensina II, e subsequente indução de genes das E3 ligases, como a atrogin, que integra e ativa o sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma, responsável pela proteólise muscular, que associado à menor produção de hormônios anabólicos (insulina, IGF-1 e tireoidianos) promove um desbalanço protéico, favorecendo a degradação de proteínas. (SHUKANOV et al., 2011; JARVINEN et al., 2005). Paralelamente, as mitocôndrias decaem em número e capacidade funcional, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sem a devida compensação das defesas antioxidantes, promovendo acúmulo de proteínas danificadas/alteradas e lesão no DNA mitocondrial e nuclear (RIPKISS E LANZA, 2010). Além disso, há ainda o acúmulo de proteínas indutoras de estresse no retículo sarcoplasmático, aumentando a autofagia e morte celular

programada (SANTORO et al., 2014). De fato, estudos recentes apontam uma diminuição substancial nos receptores do tipo *toll like receptors* em monócitos de idosos, o que aumenta a susceptibilidade a infecções e menor resposta à imunização por vacinas, e, consequentemente, menor resposta integrada no reparo tecidual (ESQUENAZI et al., 2012).

2.2.2 Inflamação muscular pós lesão

A participação do processo inflamatório na regeneração muscular é um fenômeno complexo e nem sempre benéfico para o tecido. Mescher e Neff (2005) propuseram que a evolução do sistema imunológico de mamíferos possibilita maior defesa contra microrganismos e facilita o reparo tecidual pela remoção de *debris* celulares, no entanto, com maior prejuízo na capacidade regenerativa. Nesse sentido, os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o local da lesão, devido à rápida diminuição do seu número, são indetectáveis 3-4 dias após a lesão (TIDBALL & VILLALTA, 2010). A mieloperoxidase (MPO), principalmente armazenada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, tem sido frequentemente utilizada como marcador indireto da presença deste tipo celular (SUZUKI et al., 1996; BRICKSON et al., 2001; KYRIAKIDES et al., 2001). Fatores liberados pelos neutrófilos, como elevadas concentrações de EROs e proteases, promovem a secreção de citocinas pró-inflamatórias que produzem sinais quimiotáticos responsáveis pela migração de monócitos circulantes para o local da lesão (FIELDING et al., 1993; BELCASTRO et al., 1996; WARREN et al., 2004). Os macrófagos (M) são o tipo celular mais predominante dentro da área lesionada após 48h. Vários estudos sugerem que os M desempenham um papel direto não somente na remoção de *debris* celulares, mas também na ativação de células precursoras

miogênicas, importantes na mediação da regeneração muscular (ST PIERRE & TIDBALL, 1994).

Foi demonstrada a existência de duas diferentes classes de M, M_1 e M_2, ativação clássica e alternativa, respectivamente. Essas duas classes desempenham papéis distintos e até opostos na regeneração muscular, por meio da polarização dessas células em direção a uma atividade pró-inflamatória ou anti-inflamatória (MANTOVANI et al., 2004). Os M_1 são os primeiros a invadirem o músculo lesionado, auxiliando na fagocitose dos *debris* celulares do tecido necrosado, no entanto, induzem grande liberação de citocinas pró-inflamatórias e EROs. Estas últimas estão relacionadas com o aumento no dano de sarcolema e com o aumento da extensão da lesão (KRIPPENDORF & RILEY, 1993). Além de produzirem níveis elevados de EROs, os M_1 também expressam a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), fundamental para elevar os níveis de NO que auxilia na eliminação de agentes patogênicos intracelulares (YACINE KHARRAZ, 2013). Inversamente, os M_2 se opõem às respostas inflamatórias dos M_1, promovendo a angiogênese, o remodelamento e reparo tecidual. Essa classe de M é dividida em três diferentes subclasses: $M_{2a,}$ M_{2b} e $M_{2c.}$ Os M_{2a} estão associados a estágios avançados do reparo tecidual, decorrentes da liberação de citocinas anti-inflamatórias como, interleucina (IL)-4, IL-13 e IL-10. E os M_{2b} e M_{2c} também produzem IL-10, no entanto, semelhante aos M_1, a subclasse M_{2b} apresenta também função pró-inflamatória, pela liberação do fator de necrose tumoral (TNF)-α e da IL-1β. (KRIPPENDORF & RILEY, 1993; ST PIERRE & TIDBALL, 1994; TIDBALL & WEHLING-HENRICKS, 2007). Essas evidências sugerem que a resposta inflamatória é um processo coordenado por mecanismos de fina regulação que tem como finalidade promover uma regeneração muscular eficiente.

Já os neutrófilos senescentes são incapazes de permanecer vivos no local da lesão por tempo suficiente para desempenhar a atividade fagocitária de maneira eficiente porque possuem uma menor resposta a citocinas que normalmente prolongariam sua meia-vida, promovendo apoptose prematura dessas células (FULOP et al., 1997). Além disso, outras funções estão reduzidas nos neutrófilos, dentre elas a quimiotaxia, produção de ânion superóxido e resposta reduzida ao fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), importante em sua gênese medular. (CRIGHTON et al., 2006).

No idoso, observamos uma aumento da inflamação sistêmica com elevação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL1, IL6, IL-1β e TNFα circulante (PEREIRA, 2012), além disso, há uma demora na polarização de M e diminuição na rede capilar no local da lesão (AGARWAL et al., 2010). Assim, parte da disfunção regenerativa nos idosos envolve mudanças na distribuição espacial de células inflamatórias bem como na identidade dos infiltrados inflamatórios (tipo celular e magnitude de fluxo sanguíneo local). Essas alterações estão associadas a uma fase inflamatória persistente e, por conseguinte, a um comprometimento na sequência temporal do processo regenerativo, retardando-o, o que reforça a importância entre o equilíbrio de ações inflamatórias excessivas e insuficientes (DOUGLAS et al., 2002).

2.2.3 Regeneração e Reparo muscular

A capacidade de regeneração muscular é garantida por um mecanismo intrínseco que restaura o aparelho contrátil lesionado. Assim, uma reserva de células indiferenciadas são ativadas, iniciando o ciclo celular e se fundem para formar

miotúbulos multinucleados (HAWKE & GARRY, 2001). Esse processo é seguido por uma fase de regeneração das fibras musculares, formação do tecido cicatricial e revascularização. Durante a fase seguinte, a fase do remodelamento/reparo, ocorre contração e reorganização do tecido cicatricial, além da recuperação da capacidade funcional do músculo. (PENG & HUARD, 2004).

No envelhecimento ocorrem alterações nos processos envolvidos na regeneração muscular, tais como, menor ativação e número de células satélite (CS), redução dos fatores de crescimento e maior deposição de tecido cicatricial, com aumento da deposição de tecidos não contratéis (tecido conjuntivo e adiposo), prejudicando o restabelecimento da função muscular (ALWAY et al., 2014; THOMSON & GORDON, 2006; DEGENS, 2007).

2.3 Células satélites

As CS foram descobertas por Mauro (1961) em músculos de rã, sendo assim designadas devido à sua localização *satélite*, entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares esqueléticas. Essas células são muito importantes nesse processo de regeneração, pois, uma vez que as fibras musculares adultas são células pós-mitóticas incapazes de se dividir, essa habilidade de auto reparo compete às CS ou células-tronco musculares, que se encontram em estado quiescente e indiferenciadas. (RENAULT et al., 2000; HAWKE AND GARRY, 2001; GOETSCH et al., 2003). Elas apresentam grande atividade mitótica que contribuem para a manutenção do músculo esquelético adulto (SCHULTZ, 1989).

O número de CS próximas aos mionúcleos sublaminares de fibras musculares diferem em função da espécie, da idade e do tipo de fibra muscular (HAWKE &

GARRY, 2001; JEJURIKAR & KUZON, 2003; DEDKOV, 2003). Em roedores neonatais, as CS constituem cerca de 30% de núcleos sublaminares, enquanto que em roedores adultos o percentual dessas células decresce bruscamente, constituindo apenas 5% da totalidade de núcleos (SEALE & RUDNICKI, 2000; SEALE et al., 2000; CHARGE & RUDNICKI, 2004). No músculo sóleo adulto, constituído principalmente por fibras do tipo I, há cerca de duas a três vezes mais CS quando comparado aos músculos tibial anterior (TA) ou extensor *digitorium longus* (EDL), constituídos essencialmente por fibras do tipo II (CHARGE & RUDNICKI, 2004). Por sua vez, a maior densidade de CS tem sido demonstrada em associação com a proximidade de capilares e das junções neuromusculares (PHILLIPS & KNIGHTON, 1990; UMNOVA & SEENE, 1991; VIERCK et al., 2000), estruturas abundantes principalmente em fibras oxidativas (HAWKE & GARRY, 2001).

No músculo adulto, as CS encontram-se normalmente quiescentes, ou seja, na fase G0 do ciclo celular (KUSCHEL et al., 1999). O número dessas células no estado quiescente se mantém relativamente constante após vários ciclos de degeneração/regeneração (JEJURIKAR & KUZON, 2003), sugerindo um mecanismo de auto renovação pelas próprias CS (SABOURIN & RUDNICKi, 2000; SEALE & RUDNICKI, 2000; ASAKURA et al., 2002), também chamado de divisão assimétrica. No entanto, quando sujeitas a estímulos apropriados, as CS proliferam, diferenciam-se e fundem-se, adicionando novos mionúcleos às fibras musculares diferenciadas, sendo este um papel determinante no crescimento pós-natal e na regeneração muscular (KUSCHEl et al., 1999; SEALE et al., 2000; ASAKURA et al., 2002).

Fatores de crescimento liberados após dano muscular, como, fator de crescimento similar à insulina-I (IGF-I), fator de crescimento tipo hepatócitos (HGF),

fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AA e PDGF-BB) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF), são importantes na estimulação das CS, sendo parte desses fatores responsáveis por induzir a proliferação e inibir a diferenciação celular, potencializando o recrutamento de células precursoras miogênicas (CARLSON et al., 2001; SHEFER et al., 2008). Em contrapartida, os fatores de crescimento transformadores (TGF-β), são conhecidos em suprimir a diferenciação miogênica (ALLEN & BOXHORN, 1989). Dentre esses fatores, a miostatina antagoniza a regeneração muscular, limitando a proliferação e diferenciação de CS. Músculos de animais com inativação gênica para miostatina, após lesão muscular, apresentam maior capacidade regenerativa e menor conteúdo de fibrose (WAGNER, 2005; JESPERSEN et al., 2006).

A descoberta de marcadores moleculares seletivos, expressos por CS, mas não por fibras musculares, tem contribuído para a sua caracterização (CAROSIO et al., 2011). A assinatura molecular dessas células compreende diferentes marcadores existentes ou expressos em determinadas etapas do ciclo celular. Os marcadores da superfície celular, como o receptor de tirosina quinase e HGF (c-Met), as moléculas de adesão celular M-caderina, as moléculas de adesão vascular-1 (VCAM-1) e as moléculas de adesão neural (NCAM), e os fatores de transcrição Pax7 e Pax3 (*paired box transcription factors*) são expressos simultaneamente em CS quiescentes e em proliferação (HAWKE & GARRY, 2001). O c-Met é o receptor para HGF, sendo este fator um potente agente mitótico para as CS e importante para a sua migração (CORNELISON & WOLD, 1997; SEALE & RUDNICKI, 2000). A M-caderina, a VCAM-1 e a NCAM são moléculas de adesão celular que coletivamente parecem ter um papel importante, tanto na adesão das CS à lâmina basal da fibra muscular, quanto na migração destas células em resposta a diferentes

estímulos. Já Pax7, é um fator de transcrição importante para a especificação da população de CS, pois sua inativação no genoma de camundongos, levou à ausência de CS, associada a uma deficiência muscular grave e letalidade (SEALE et al., 2000).

A proliferação e diferenciação das CS são reguladas, respectivamente, pelas sinalizações Notch e Wnt (Beta-catenina) (BRACK et al., 2008). As CS possuem receptor Notch-1, que quando ativado por seu ligante (Delta-like 1 e/ou Jagged-1) é clivado e migra para o núcleo onde ativa a transcrição do gene Hes-1, um fator de transcrição envolvido na ativação do ciclo celular, e inibição da expressão de genes responsáveis pela miogênese (LUO et al., 2005). A ativação Notch promove a proliferação de progênies de CS e uma rápida expansão na população de células precursoras miogênicas (mioblastos). A inibição da sinalização Notch, durante esta fase, impede a expansão da população de células precursoras miogênicas, e assim, inibe a capacidade regenerativa. Em um segundo momento, a expressão da proteína Numb, em células-filhas advindas da divisão assimétrica de CS, inibe a sinalização Notch e permite a transcrição dos genes reguladores da miogênese (MyoD ou Myf-3, Myf5, Miogenina ou Myf-1 e MRF4 ou Myf-6) (LUO et al., 2005).

Outras proteínas importantes na iniciação da diferenciação muscular pertencem à classe Wnt (BRACK et al., 2008). Foi demonstrado que a transição na sinalização Notch para Wnt também induz a diferenciação em células progenitoras miogênicas. Essa regulação está associada ao aumento da expressão de Wnt no tecido, e a um aumento da capacidade responsiva dessas células para essa sinalização. O *Crosstalk* entre essas duas vias ocorre por meio da GSK3β (glicogênio sintase quinase), que é mantida em uma forma ativa por Notch, mas é inibida pela sinalização canônica da Wnt (Beta-catenina). Estes resultados

demonstram que o equilíbrio temporal entre as vias Notch e Wnt, orquestra a progressão precisa das células precursoras ao longo da linhagem miogênica, pelos estágios de expansão proliferativa e diferenciação celular (BRACK et al., 2008).

As CS ativas expressam os fatores de transcrição Myf5 e MyoD e, uma vez diferenciadas, expressam Miogenina e MRF4. CS que mantêm a expressão de Pax7 e diminuem expressão de MyoD, reconstituem o compartimento de CS, promovendo sua auto-renovação (ZAMMIT et al., 2006). A expressão destes fatores de regulação miogênica durante a ativação, proliferação e diferenciação das CS é análoga à que ocorre durante a embriogênese (SEALE & RUDNICKI, 2000). As fibras regeneradas também repetem a sequência de transições de isoformas que ocorrem no músculo embrionário. Miotúbulos jovens expressam formas embrionárias de miosina de cadeia pesada (eMyHC), seguido pela expressão de MHC neonatal (nMyHC) e, finalmente, isoformas de MHC adultas (CARLSON et al., 2001). Além disso, as fibras recém-formadas são basofílicas, apresentam calibre pequeno e núcleo centralizado. Em secções longitudinais e em fibras isoladas, os núcleos centralizados são observados em porções discretas ou ao longo de toda a fibra na área de regeneração sugerindo que durante a regeneração a fusão celular não é difusa, mas focal ao local da lesão. Após a completa fusão das células precursoras miogênicas, as fibras aumentam de tamanho e os mionúcleos se movem para a periferia da fibra (CHARGE & RUDNICKI, 2004) (Figura 2).

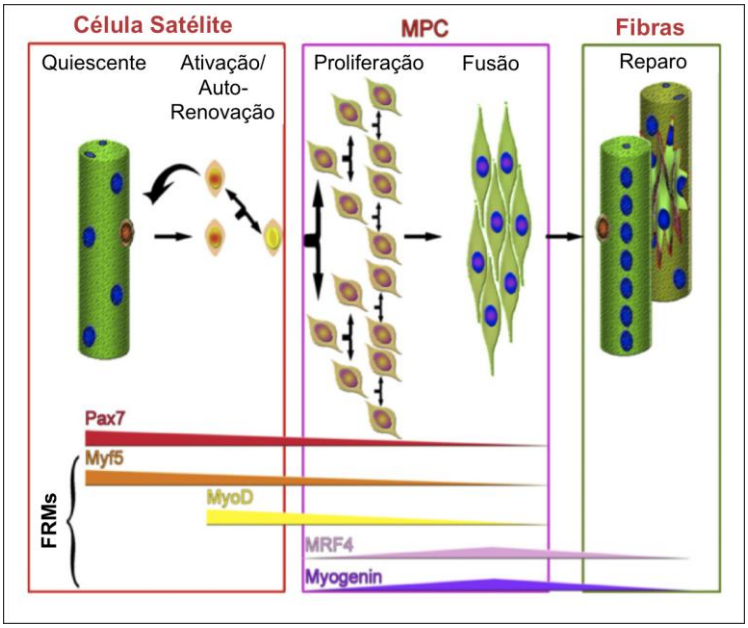

Figura 2 - Esquema da progressão do programa miogênico de células satélites (CS). CS quiescentes expressam Pax7 e Myf5. Após a ativação, elas aumentam a expressão de MyoD e se dividem para produzir um conjunto de células precursoras musculares. Progênie de CS seguem dois destinos. Eles podem regular negativamente MyoD e se auto-renovar, originando uma nova CS, ou se diferenciar por meio da diminuição da expressão de Pax7, Myf5 e MyoD, e aumento da expressão de MRF4 e miogenina.

As CS, apesar de serem mais diferenciadas que as células-tronco ainda apresentam uma importante plasticidade. Experimentos *in vitro* mostraram a capacidade de linhagens mioblásticas expressarem em diferentes condições de cultivo, marcadores característicos da diferenciação de tecido ósseo e adiposo (Runx2 e PPARy, respectivamente), com diminuição da expressão de MyoD. Isto não só mostra o seu caráter plástico, mas a importância do microambiente para a remodelagem do tecido muscular lesionado (CHEN & GOLDHAMER, 2003).

Diferente do que se acreditava previamente, não apenas o pool de CS se mostra reduzido no envelhecimento, mas também seu potencial de ativação, proliferação e diferenciação (SHAVLAKADZE, 2010; CONBOY, 2003; BARANI, 2003). De fato, experimentos com parabiose demonstraram que, quando restabelecido o *mileu*, as CS têm seu potencial miogênico restaurado (SAKUMA et

al., 2008; SINHA et al., 2014). Já Souza-Victor e colaboradores (2014) observaram que os dois mecanismos (redução do pool e da ativação das CS) estão envolvidos com o menor potencial miogênico. No entanto, essas respostas - ocorrem em momentos distintos do envelhecimento. Há inicialmente uma perda na capacidade de ativação de CS. Contudo, numa fase mais avançada, denominada geriátrica, há uma “geroconversão” das CS de seu estado quiescente em senescente, o que levaria essas células a uma menor renovação de seu pool, com consequente diminuição do número e calibre das miofibras.

Embora o processo de regeneração muscular durante o envelhecimento seja bem conhecido em relação a alterações na morfologia muscular, os mecanismos moleculares responsáveis pelo declínio na regeneração ainda não estão totalmente esclarecidos. Até o momento, podemos afirmar que há diferentes mecanismos sendo desencadeados em paralelo, ou seja, observamos reduzida produção de IGF-1 e menor ativação da sinalização de Notch, com consequente menor ativação e proliferação de CS (BUFORD et al., 2010; RYALL et al., 2008). O *serum response factor* (SRF) que diminui a sua ativação com a idade e o desuso, tem por alvo diferentes componentes do crescimento celular, migração, organização de citoesqueleto e miogênese, sua inativação aboliu a expressão de MyoD e miogenina em CS diferenciadas e, diminuiu, consideravelmente, a presença de alfa actina e MHCIIa em fibras musculares (SAKUMA et al., 2003 e 2008 e 2011). Por outro lado, estudos indicam que as CS senescentes tendem a adotar um padrão de diferenciação alternativa, mostrando potencial fibrogênico e adipogênico que pode contribuir para o aumento de tecido não contrátil (fibrose), o que está diretamente relacionado ao aumento da expressão de Wnt (BRACK et al., 2007; SCHIAFFINO et al., 2013). Há também a menor expressão de $p27^{kp1}$, MyoD, FOXO-1, miogenina e

MHC que são fundamentais para a diferenciação dos mioblastos e fusão dos miotúbulos (DEGENS et al., 2007; LEES et al., 2006). Essas mudanças favorecem a perda do potencial regenerativo muscular nos idosos.

Muito embora as CS sejam as principais responsáveis pelo processo regenerativo em resposta ao dano muscular, estudos demonstraram que populações celulares originalmente não residentes no músculo podem participar da regeneração desse tecido. Essas células são denominadas de células progenitoras miogênicas, as quais serão abordadas a seguir.

2.4 Contribuição de células precursoras miogênicas na regeneração muscular

A contribuição de células-tronco não musculares na regeneração do músculo esquelético foi descrita primeiramente por Ferrari e colaboradores (1998). Esses autores demonstraram que células-tronco da medula óssea obtidas de camundongos transgênicos que expressam β-galactosidase (β-gal), quando transplantadas em animais que sofreram mieloablação, após reconstituída a medula óssea, migravam para o músculo esquelético lesionado por cardiotoxina. Após 3 semanas, haviam células do doador (β-gal^{+}) no tecido muscular que havia sofrido dano. A expressão de *stromal derived factor 1* (SDF-1) pelo músculo esquelético lesionado e a expressão do receptor CXCR4 na membrana das células-tronco da medula óssea promovem a migração destas últimas com destino ao músculo (MORIMOTO et al., 2007). Apesar das células derivadas da medula óssea contribuírem bem menos que as CS no processo regenerativo, esses resultados geraram grande interesse quanto a novas estratégias terapêuticas.

O papel fisiológico dessa migração também foi demonstrado em resposta ao exercício excêntrico. LaBarge e Blau (2002) demonstraram que células-tronco da medula óssea de animais GFP (*Green fluorescent protein*) transplantadas em animais imunodeficientes, após exercício físico excêntrico, constituíam cerca de 3,5% dos mionúcleos (GFP^+) e, apresentavam características morfológicas e moleculares de CS. Nesse estudo ficou confirmado a contribuição das células-tronco da medula óssea na renovação da população de CS.

Após esses estudos, diferentes populações celulares originalmente não residentes no músculo vêm sendo caracterizadas. Essas populações residem no músculo esquelético ou podem ser recrutadas de compartimentos não musculares em resposta à injúria e regeneração. As SP (*side population*), caracterizadas pela expressão de Sca^{-1high} e $CD45^{low}$, constituem uma população de células progenitoras residentes nos tecidos adultos (medula óssea; músculo esquelético). Estas células aumentam em número após a lesão e participam na regeneração muscular (MEESON et al., 2004). MDSC (*muscle-derived stem cells*) são outra população de células tronco com potencial miogênico isoladas do músculo esquelético adulto expressando os marcadores Sca^{-1} e CD34. Progenitores associados a vasos derivados da aorta dorsal também apresentam potencial miogênico e participam da regeneração muscular. As MDSCs residentes no músculo estão intimamente associadas a maculatura, especificamente aos capilares ao redor da fibra, apesar de também serem encontradas sob a lâmina basal das fibras musculares, um sítio preferencial das CS. Tanto as células endoteliais como 60% das MDSCs são $CD34^+Sca1^+$ sugerindo serem subpopulações de células endoteliais. Essas células se diferenciariam tanto em células do endotélio vascular quanto em fibras do

músculo esquelético após implantadas no músculo esquelético (PENG & HUARD, 2004).

Até o momento, não se sabe ao certo o que ocorre com o pool e a migração dessas células no que tange a regeneração no envelhecimento. Contudo, como este é um processo degenerativo, podemos supor que haja diminuição no conteúdo dessas células e de sua contribuição para a regeneração muscular no envelhecimento.

2.5 Treinamento físico e regeneração muscular do jovem ao idoso

A prática regular de exercícios físicos traz muitos benefícios para a saúde, promovendo muitas adaptações sistêmicas e localizadas no organismo. O treinamento de predominância aeróbica, caracterizado por atividades de longa duração de baixa a média intensidade, proporciona melhorias na função cardiovascular, no metabolismo e trofismo muscular, aumentando a tolerância à realização de esforços físicos (HOOD & SALEEM, 2007; HOOD, 2009; CUNHA et al., 2012). A melhora da aptidão aeróbica é resultado de maior oferta de oxigênio aos tecidos e de sua utilização mais eficaz pelos músculos exercitados que apresentam maior número de capilares por fibra muscular, bem como maior densidade e atividade mitocondrial, sendo de grande valia não só para atletas, bem como para a melhora na saúde e qualidade de vida da população em geral (ADHIHETTY et al., 2003).

O aumento da capacidade física após período de treinamento está relacionado a várias adaptações estruturais e funcionais da musculatura esquelética,

tais como, aumento da densidade mitocondrial, da atividade de enzimas oxidativas, da modulação da distribuição dos tipos de fibras, aumento da capilarização muscular, diminuição da oxidação de proteínas, aumento na produção de IGF-1 que estimula a síntese proteica e diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias que são grandes fontes de produção de EROs (BASSEL-DUBY & OLSON, 2006; SHEFER & BENAYAHU, 2012). Portanto, o treinamento físico aeróbico (TFA) gera uma grande cascata de adaptações que modulam o fenótipo das fibras musculares.

Algumas adaptações inerentes ao exercício físico são observadas independentemente da idade dos indivíduos. Em estudo de Zampieri e colaboradores (2014), onde analisaram músculos de idosos esportistas (±70 anos), observou-se que estes indivíduos apresentaram uma maior força isométrica, uma melhor preservação da morfologia da fibra muscular e na ultraestrutura de organelas intracelulares responsáveis pela produção de ATP e acoplamento de Ca^{2+}, além de baixa expressão de genes relacionados à autofagia e produção de EROs quando comparados a idosos sedentários.

Além disso, o TFA traz outros benefícios para idosos, tais como, a diminuição da inflamação, a redução no risco de desenvolver doenças, e melhora cognitiva. De fato, o TFA apresenta-se como, uma abordagem não medicamentosa eficiente para melhorar e manter as funções cognitivas em idosos saudáveis e pacientes com transtorno cognitivo leve (BHERER, 2013). Os mecanismos responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios do TFA no idoso não estão totalmente esclarecidos, mas podem estar ligados a mudanças no fenótipo de monócitos, melhora na produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL4, IL10 e IL13), e com a diminuição de citocinas pró-inflamatórias (IL6 e TNFα) (MOTA, 2009; BOMBARDA, 2009; HUANG, 2013). Sendo assim, a prática regular de exercício físico torna-se uma boa estratégia

para atenuar a piora na função e estrutura de diferentes órgãos e sistemas advindos com o envelhecimento.

Já no que diz respeito, às adaptações regenerativas na musculatura esquelética frente ao TFA, os primeiros trabalhos datam do início deste século. Inicialmente foi demonstrado que: seis meses de exercício voluntário regular foram capazes de promover a incorporação de células progenitoras hematopoiéticas ao nicho de CS (LA BARGE & BLAU, 2002). O exercício forçado de corrida em declive (com maior componente excêntrico que promove microlesão) durante uma ou quatro semanas também promoveu uma incorporação ainda maior de tais células (PALERMO et al. 2005). Mais recentemente, pela primeira vez, células progenitoras não hematopoiéticas ($Sca1^{+}CD45^{-}$) foram identificadas na musculatura esquelética logo após uma sessão (exercício agudo) de corrida em declive na musculatura de camundongos (VALERO et al. 2012). Além disso, esses autores demonstraram que essa migração é dependente da integrina α7B1. Ainda com relação a essa integrina, foi demonstrado que ela aumenta a hipertrofia da fibra muscular tanto nas horas que se seguem a uma sessão de exercício excêntrico quanto após quatro semanas de treinamento de corrida em declive (LUEBER et al 2011).

No envelhecimento, o TFA teria um papel importante no restabelecimento dos fatores de crescimento que contribuem para a ativação das CS. Além disso, auxiliaria na reorganização dos componentes envolvidos nesse processo de regeneração. Dessa forma, nossa hipótese é a de que o TFA moderado controlado e regular acarretará numa melhora da resposta regenerativa em camundongos jovens e idosos.

3. Objetivos

3.1 Geral

Estudar a contribuição do TFA na capacidade regenerativa do músculo TA de camundongos jovens e durante o envelhecimento após lesão mecânica.

3.2 Específicos

3.2.1 - Avaliar em camundongos jovens e idosos, sedentários e treinados:

- a eficácia do TFA, por meio de teste máximo escalonado em esteira rolante;
- o comprimento da passada em teste de deambulação;
- o acompanhamento ponderal da massa corporal;
- função contrátil *ex vivo* do músculo EDL;
- AST das fibras dos músculos TA e EDL pela marcação de laminina, por meio de imunofluorescência;

3.2.2 - Avaliar em camundongos jovens e idosos, sedentários e treinados, durante o curso temporal regenerativo após o protocolo de lesão mecânica no músculo TA:

- a característica da extensão da lesão muscular e fase do processo regenerativo (identificação de infiltrados inflamatórios, presença de fibras

basofílicas e de núcleos centralizados), por meio da coloração com hematoxilina-eosina;

- o percentual de fibras necróticas pela marcação com IgG reativo, por meio de imunofluorescência;
- a área de secção transversa das fibras musculares íntegras e em regeneração (identificação de núcleos centralizados), por meio da imunofluorescência para laminina e *Hoechst* ;
- o conteúdo de colágeno por meio da coloração Picrosírius Red;
- a expressão gênica de fatores envolvidos na regulação miogênica (Pax7, Myf5, MyoD, Miogenina, MRF4, SRF e Miostatina), por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real;

4. Materiais e Métodos

4.1 Amostra

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J na faixa etária compreendida entre quatro e vinte e três meses, onde os camundongos do grupo jovem foram estudados aos quatro meses de idade e o grupo idoso foi estudado aos vinte e dois meses de idade. Os camundongos foram mantidos no biotério da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP), com temperatura controlada entre 22 e 25°C, em ciclo claro-escuro invertido em 12:12 horas, com início do período escuro às 7 horas da manhã e início do período claro às 19 horas, no total de 5 animais por caixa. Água e comida foram administradas *ad libitum*. Após o período experimental conforme descrito na Figura 3, os animais foram mortos por meio de deslocamento cervical, os tecidos de interesse foram adequadamente coletados e armazenados conforme as análises que foram avaliadas. Em cada procedimento utilizamos um número amostral entre 5 e 8 animais. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com princípios internacionais de ética em pesquisa animal (COBEA, www.cobea.org.br)[2]. O referido projeto de pesquisa obteve aprovação pelo Comitê de Ética para uso de animais de experimentação da EEFEUSP (CEUA 2014/03).

[1] Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br)

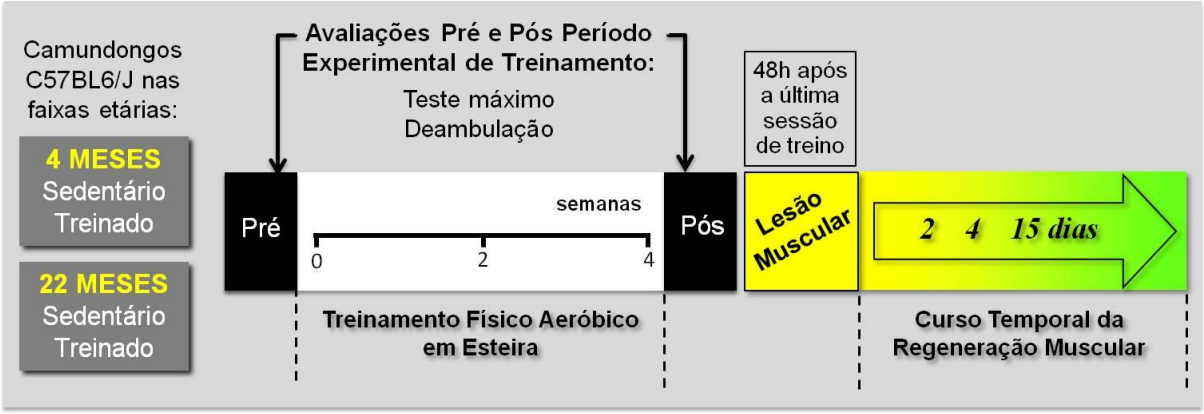

Figura 3 - Desenho experimental.

4.2 Avaliação da capacidade física

A tolerância ao esforço foi avaliada por meio de teste progressivo até a exaustão, em protocolo escalonado em esteira rolante com velocidade inicial de 6m/min (sem inclinação) e incrementos na velocidade de 3 m/min a cada três minutos até a exaustão do animal (FERREIRA et al., 2007). Este teste foi realizado antes e após o período experimental referente a fase do TFA. Os resultados serão apresentados pela distância máxima percorrida, em metros.

O teste de deambulação avalia a função e coordenação motora das patas traseiras dos animais, que foram colocadas em contato com tinta preta não tóxica. Em seguida, os animais foram posicionados dentro de uma caixa retangular de madeira (sem teto e forrada com papel sulfite branco) para caminharem. Posteriormente, o comprimento das passadas foi medido e corrigido pelo comprimento naso-anal dos animais (Figura 4) (KENNEL et al.,1996).

Figura 4 - Teste de deambulação.

4.3 Treinamento físico aeróbico

O TFA foi realizado em intensidade moderada com predomínio de metabolismo aeróbio, conforme padronizado anteriormente em nosso laboratório (FERREIRA et al., 2007). Mais especificamente, realizamos quatro semanas de treinamento físico em esteira rolante, sessões de exercício com duração de 60 minutos, 5 vezes por semana a 60% da velocidade máxima atingida no teste de exercício físico progressivo até a exaustão, que corresponde a intensidade da máxima fase estável do lactato sanguíneo.

4.4 Protocolo da função contrátil *ex vivo* do músculo esquelético

4.4.1 Preparação do músculo e fixação no banho de órgãos

O músculo destinado a análise funcional *ex vivo* (EDL) foi cuidadosamente dissecado e suas duas extremidades (tendões) foram amarradas com linha cirúrgica

e montadas em um banho de órgãos (AVSprojeto, São Paulo, Brasil) para a análise da função contrátil ex vivo. A extremidade distal foi fixada num gancho fixo de uma cuba de vidro (25mL), contendo solução de Krebs aerada com solução carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2), e a extremidade proximal foi fixada a um transdutor de força isométrica (TIM-200; 0-200g), conectado a um sistema computadorizado para aquisição e registro das propriedades contráteis do músculo (AVSprojetos, São Paulo, Brasil).

A solução de Krebs teve a composição de 137mM de NaCl, 5mM de KCl, 2mM de $CaCl_2.2H_2O$, 1mM de $MgSO_4$, 24mM de $NaHCO_3$ e 11mM de glicose, o pH foi ajustado para 7,4, semelhante ao do plasma sanguíneo (WOOTEN, 2003), a qual foi preparada no dia do experimento para evitar a proliferação de microorganismos e a formação de precipitados de fosfatos de cálcio. A temperatura permaneceu controlada em 25°C para evitar concentrações de EROs devido à altas temperaturas (EDWARDS et al.,2007). A solução carbogênica serviu de aporte de oxigênio ao músculo durante o experimento e agente de tamponamento de solução.

4.4.2 Sistema de estimulação elétrica e registro da força muscular isométrica

Os músculos foram estimulados eletricamente, por eletrodos inseridos na cuba, para que ocorresse a contração sem alteração do comprimento do músculo (contração isométrica), utilizando-se um estimulador elétrico (AVS-100) e um amplificador (AECAD04F), controlado por um sistema computadorizado, para gerar pulsos de estímulos elétricos de acordo com os protocolos desejados. O software AQCAD (AVSprojetos, São Paulo, Brasil) foi utilizado para o controle da estimulação, o registro e a análise das tensões geradas pelo músculo.

Estudos prévios do laboratório caracterizaram para o sistema e músculo, os parâmetros de estimulação elétrica capazes de mimetizar os padrões de ativação muscular *in vivo* (pulsos elétricos com 0,2ms de duração e 60V de intensidade) (GUIMARÃES, 2015). Para que todos os músculos fossem avaliados a partir de uma mesma condição inicial, foi definido o comprimento muscular inicial capaz de gerar a maior força de contração isométrica. Para tal, o músculo foi estimulado e estirado (0,5mm) a cada intervalo de 2 min, até atingir a força máxima de contração. Este comprimento foi mantido ao longo de todos os protocolos, sendo trocada apenas a solução de Krebs após o término dos mesmos e deixado um intervalo de 10min de estabilização.

As tensões absolutas aos estímulos foram corrigidas pelo valor da AST do músculo, resultando no valor da força específica. A AST foi calculada pela seguinte fórmula: AST = massa do músculo (g) /[comprimento ótimo das fibras musculares (obtido pelo produto do comprimento ótimo do músculo e 0,44 para o EDL) x densidade do músculo esquelético (valor assumido de 1,06mg/mm^3)] (ENG et al., 2008).

4.4.3 Protocolo de avaliação curva força X frequência

Neste protocolo, o EDL foi avaliado em sua capacidade de gerar força sendo submetido a estímulos de 60V em 0,2ms a cada 3min em progressão nos valores de frequência (1, 10, 20, 30, 50, 80, 100 e 150Hz) e com trens de pulso de 350ms.

4.4.4 Protocolo de indução à fadiga

Neste protocolo, o EDL foi avaliado em sua capacidade de resistir à fadiga sendo submetido a estímulos de 60V durante 0,2ms a uma alta frequência de 150Hz a cada 5s, durante um período de 4min e 30s.

4.5 Protocolo de lesão por perfurações no músculo tibial anterior

Para a realização do protocolo de lesão muscular, inicialmente os animais foram anestesiados com anestésico volátil e a pele que recobre o músculo TA (direito e esquerdo) foi tricotomizada e limpa, a lesão tecidual foi induzida pela incisão de agulha estéril (22 G) por dez vezes, próximo da região do ventre muscular, numa profundidade de 0,9mm (Figura 5). Em seguida, a região foi higienizada com álcool iodado e o animal colocado em observação. As análises foram realizadas nos diferentes tempos: 2, 4 e 15 dias após a lesão muscular, sendo esse curso temporal proposto em estudo piloto conforme demonstrado na seção de anexos. É importante mencionar que a escolha desse protocolo de lesão muscular foi devido a necessidade de um modelo de lesão muscular menos extenso, pois minimiza a variabilidade da resposta regenerativa devido a característica da intervenção ser menos invasiva (ex. incisão na pele).

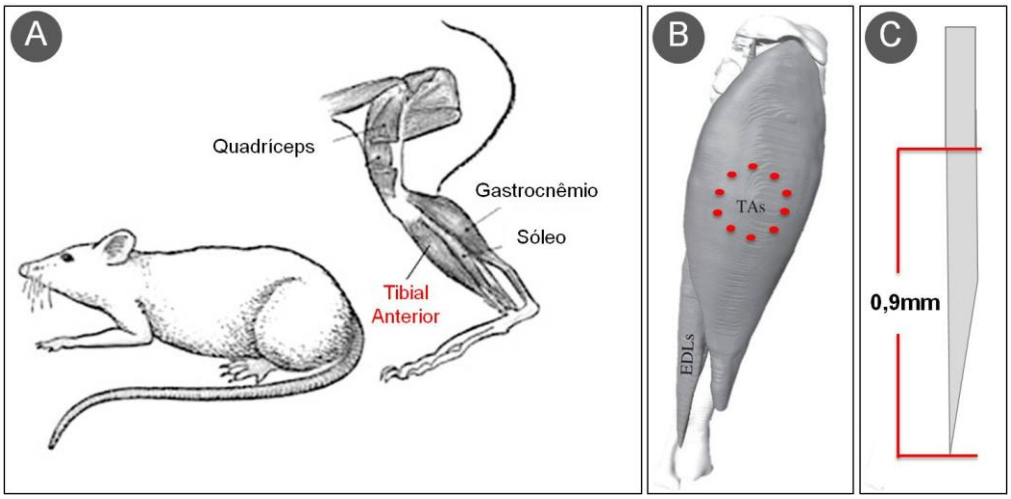

Figura 5 - Localização do músculo tibial anterior em roedores (A). Localização das 10 perfurações com agulha no músculo tibial anterior (B). Profundidade utilizada como padrão para as perfurações com a agulha 22G (C).

4.6 Análises histológicas

Os músculos foram emblocados em Tissue-Tek® (Sakura, EUA), congelados em isopentano, em seguida em nitrogênio líquido, e posteriormente armazenados em freezer -80°C. Os tecidos foram seccionados transversalmente em criostato (*Leica CM1850, Leica Microsystems, Alemanha*) na espessura de 8 µm. A seguir, uma breve descrição das diferentes técnicas de colorações e imagens ilustrativas das colorações deste projeto.

4.6.1 Coloração com Hematoxilina-Eosina.

Após 10 minutos em temperatura ambiente, após os cortes serem fixados em paraformaldeído (*Sigma-Aldrich, HT501128, Brasil*) 4%, as lâminas passaram por uma bateria de coloração iniciada pela coloração por hematoxilina (15 minutos), seguida por 6 minutos no corante eosina. Após a desidratação dos cortes, as lâminas foram montadas com *Entellan*. A coloração pela hematoxilina-eosina (HE),

corantes universais, permite analisar a morfologia das fibras musculares e dos tecidos adjacentes, podendo-se observar a presença de lesão/regeneração, presença e distribuição de tecido conjuntivo e adiposo endomisial e perimisial, infiltrado inflamatório, presença de fibras basofílicas, presença de núcleos picnóticos e núcleos centralizados. Os núcleos das fibras adquirem uma coloração azulada, as fibras musculares tornam-se róseas e o tecido conjuntivo é corado de rosa claro (Figura 6).

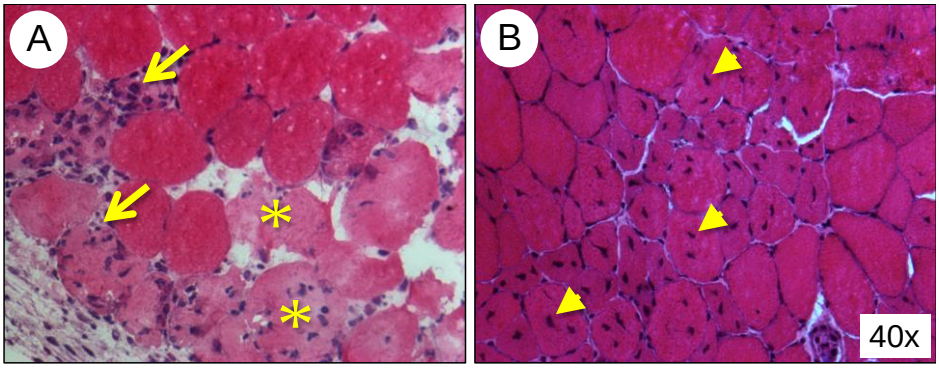

Figura 6 - Coloração por Hematoxilina-Eosina. As setas longas indicam infiltrados inflamatórios e os asteriscos fibras basofílicas após 24h da indução da lesão (A). As setas curtas indicam fibras com o núcleo centralizado 15 dias após a lesão mecânica (B). Imagens adquiridas em 40x de magnificação.

4.6.2 Coloração com Picrosírius Red.

As análises foram realizadas por meio do kit EP-11-20013 (*EasyPath,* São Paulo, Brasil) segundo orientações do fabricante. A coloração por Picrosírius permite a avaliação do conteúdo de colágeno, cuja coloração é vermelha e contra corada por hematoxilina (azulada) (Figura 7).

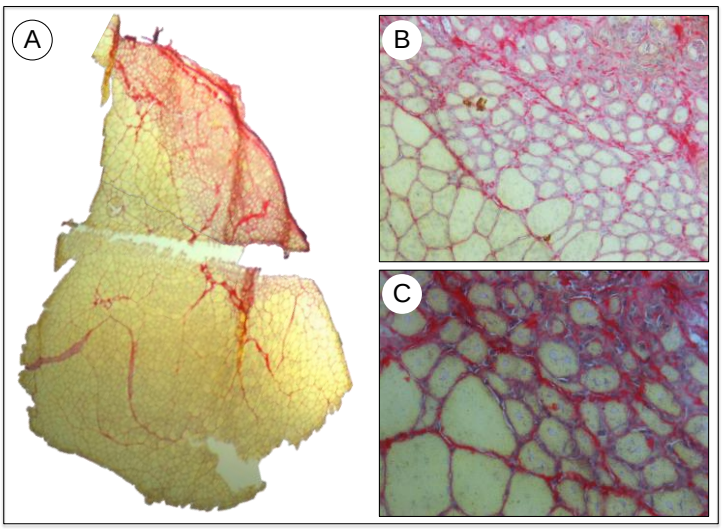

Figura 7 - Coloração por picrosírius em músculo tibial anterior após 15 dias da lesão por perfurações. Imagens adquiridas nas magnificações de 4x (A), 20x (B) e 40x (C).

4.6.3 Imunofluorescência.

As secções foram previamente fixadas em paraformaldeído (*Sigma-Aldrich, HT501128, Brasil*) 4% por 10 minutos em temperatura ambiente, permeabilizadas em 0,2% de Triton X-100 (*Bio-rad, 01-0407, EUA*) e 1% albumina sérica bovina (*BSA; Amresco, E588, EUA*) diluídos em PBS (*Phosphate Buffer Saline; Tampão Fosfato Salino; Sigma-Aldrich, P4417, Brasil*) por 10 minutos. O bloqueio foi feito em 10% em soro de cabra (*Sigma-Aldrich, G9023, Brasil*) em PBS por 45 minutos. As lâminas foram incubadas com solução contendo os anticorpos primários (Quadro 1) com 1,5% de soro de cabra em PBS por 1h e 30 minutos em temperatura ambiente. Após a lavagem com 0,2% de Triton X-100 em PBS (3 vezes de 10 minutos cada), os cortes foram incubados por 40 minutos em sala escura com uma solução PBS contendo 1,5% de soro de cabra, o anticorpo secundário fluorescente com diferentes comprimentos de onda (Alexa Fluor®, Applied Technologies, EUA) e *Hoechst* (diluição 1:1000, para visualização dos núcleos). Após 30 minutos de lavagem em 0,2% de Triton X-100 em PBS as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando-se glicerol tamponado (60% Glicerol, 40% Tris-HCl 0.1M pH 9.3).

Anticorpos primário/secundário	Marcação	Objetivo da marcação
Laminina	Membrana da fibra	Delimitação da fibra para cálculo da área de secção transversa
IgG (Figura 8)	Identificar fibras necróticas	Avaliar a degeneração

Quadro 1- Anticorpos que foram utilizados por imunofluorescência.

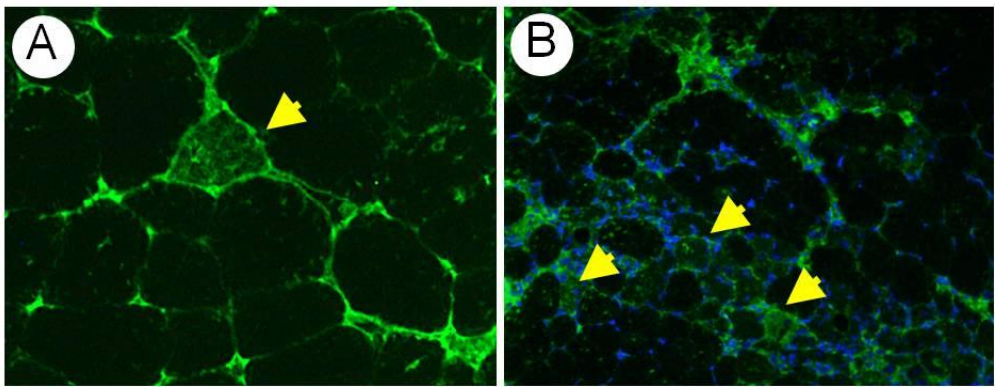

Figura 8 - Marcação de fibras necróticas por imunoglobulinas reativas com a espécie estudada (camundongos). As fibras positivas para necrose estão marcadas em verde e são indicadas nos painéis pelas setas curtas, em magnificação de 40x (A) e em magnificação de 20x (B), após 2dias da indução da lesão. Em azul a marcação para núcleos por Hoechst.

4.6.4 Captura e análise das imagens

A captura das imagens obtidas pelas técnicas de coloração foram realizadas em diferentes aumentos. O registro das imagens foi realizado em computador acoplado a um microscópio de luz ou fluorescente (dependendo da coloração) e conectado a um sistema fotográfico (*Leica Qwin, Leica Microsystems, Alemanha*). A quantificação da AST de fibras por marcação com laminina ou HE foi realizada por meio do programa *Image J.* Os resultados foram expressos em μm^2. As demais análises, foram atribuídos escores ou avaliação qualitativa.

A fração de volume do colágeno foi calculada pela razão percentual da área do tecido muscular em regeneração corado positivamente para as fibras colágenas (quantidade absoluta de colágeno), por *Picrossírius red*, e a área total do tecido em cada região examinada , campo a campo. Um número de 5 a 8 campos foi examinado entre os animais de cada grupo.

4.7 Expressão gênica

A expressão dos genes de interesse de cada fase do processo de regeneração muscular Pax7, Myod, Miogenina, Miostatina, MRF4, SRF e Myf5 foram avaliados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Para isso, foi realizado o isolamento do RNA total utilizando *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Invitrogen, Brasil). As concentrações e a pureza do RNA são determinadas por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) e por gel de agarose 1% marcado com Nancy-520 (Sigma-aldrich, SP, Brasil). A transcrição reversa do RNA (síntese de cDNA) é realizada utilizando *Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A expressão gênica é avaliada por qRT-PCR (ABI Prism 7500, Applied Biosystems, EUA) utilizando primers específicos e *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas, EUA). Os resultados são expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) como descrito pelo produtor do sistema.

Os *primers* específicos de cada gene foram desenhados de acordo com as sequências disponíveis no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) utilizando a ferramenta Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). O gene normalizador foi determinado a partir de padronizações no laboratório (Quadro 2).

PRIMER	SENSE	ANTI-SENSE
PAX7	5'GACTCCGGATGTG GAGAAAA3'	5'GAGCACTCGG CTAATCGAAC3'
Myf5	5'AGGAAAAGAA GCCCTGAAGC3'	5'GCAAAAAGA ACAGGCAGAGG3'
MyoD	5'AGTGAATGAG GCCTTCGAGA3'	5'GCATCTGAGTC GCCACTGTA3'
MyoG	5'ACTCCCTTAC GTCCATCGT3'	5'CAGGACAGCC CCACTTAAAA3'
MRF4	5'ATGGTACCCT ATCCCCTTGC3'	5'ATCTTGGGG GCAGATTTTCT3'
Miostatina	5'CTGTAACCTTCC CAGGACCA3'	5'TCTTTTGGGTGCG ATAATCC3'
SRF	5'ATGCCCCATCCCT TAAAATC3'	5'CGCAGAAGTAGGCTT GTTCC3'
Ciclofilina	5'TGGCAAGCATGT GGTCTTTGGGAAG3'	5'GGTGATCTTCTTGCTG GTCTTGCCATTC3'

Quadro 2 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na expressão gênica por meio de PCR.

4.8 Análise estatística

Inicialmente a distribuição dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a homoscedasticidade por meio do teste de Levene. Para os dados independentes e com distribuição normal e variâncias homogêneas, utilizamos análises paramétricas. Conforme o desenho experimental, foi utilizado análise de variância (ANOVA) para um ou dois caminhos. No caso de interação significante, foi aplicado o teste *post-hoc* de Tukey ou *Duncan.* Para todas as análises foi adotado como nível de significância um $p < 0,05$.

5. Resultados/Discussão

Para o melhor entendimento dos resultados obtidos nesta dissertação, essa seção foi dividida em subtópicos. Primeiramente apresentaremos os efeitos do TFA sobre os parâmetros fisiológicos de camundongos jovens e idosos e, em seguida, os efeitos do TFA sobre a regeneração muscular desses animais. Os dados referentes a padronização de métodos como : a) indução da lesão muscular, b) do curso temporal do processo regenerativo, e c) do efeito de uma única sessão de exercício aeróbio na expressão dos fatores de regulação miogênica estão apresentados na seção de anexos da dissertação.

5.1 Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a tolerância aos esforços e função muscular

O TFA tem sido bastante utilizado por minimizar as alterações decorrentes do envelhecimento, promovendo uma melhor qualidade de vida e autonomia. Dentre os benefícios desencadeados pelo TFA, destacam-se o aumento da capacidade aeróbica, aumento/manutenção da massa muscular e óssea e do equilíbrio, reduzindo a susceptibilidade as quedas. Nesse sentido, os camundongos jovens e idosos foram submetidos a testes de exercício progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante, pré e pós período de TFA, para avaliação da capacidade máxima de realização de esforço físico e a eficácia do protocolo de TFA.

Ao avaliarmos os testes realizados no período pré-TFA, observamos uma diferença significante entre os grupos idosos e os grupos jovens, evidenciando a intolerância aos esforços e menor capacidade física dos animais aos 22 meses de idade. Após o TFA, verificamos um aumento significante na distância total percorrida

nos grupos jovem e idoso, não havendo diferença entre esses grupos. Esse resultado demonstra um importante efeito do TFA moderado, em minimizar os efeitos deletérios do envelhecimento,melhorando a capacidade aeróbica e, dessa forma, a tolerância aos esforços desses animais (Figura 9A).

Já ao avaliarmos o delta das distâncias percorridas, observamos que não houve diferença entre os animais jovens submetidos ao TFA àqueles que se mantiveram sedentários dos quatro aos cinco meses de idade, ou seja, não perderam capacidade de corrida. No entanto, os animais idosos que se mantiveram sedentários durante o protocolo experimental apresentaram uma diminuição na distância percorrida (delta de 98,4 ±25,4m). Contudo, os animais que foram submetidos ao TFA, aumentaram a sua distância percorrida, sendo observada um delta maior ao avaliar os resultados dos testes desses animais (delta de 311,2 ±48,0m), quando comparados aos animais jovens (delta 119,3 ±45,5m) (Figura 9B).

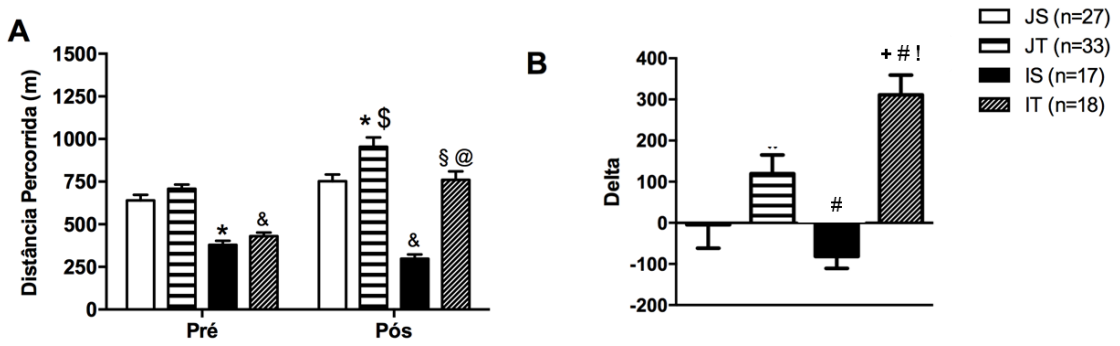

Figura 9 - Distância máxima percorrida em teste de esforço realizado em animais jovens e idosos pré e pós o período de treinamento (A) e (B) Delta da distância percorrida (pós período de treinamento - pré período de treinamento). Os dados foram representados pela média ± erro padrão da média. * *vs*. jovem sedentário pré ($P \leq 0,05$); & *vs.* jovem treinado pré ($P \leq 0,05$); $ *vs.* jovem sedentário pós ($P \leq 0,05$); @ *vs.* idoso sedentário pós ($P \leq 0,05$); § *vs.* idoso treinado pré ($P \leq 0,05$); % vs. jovem treinado pós; + vs. jovem sedentário (p ≤0,001); # vs. jovem treinado (P ≤0,01); ! vs. idoso sedentário (p<0,001). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de *Tukey.* JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

Esses dados demonstram que um período de um mês de sedentarismo em animais jovens não foi suficiente para modificar a capacidade física, porém para os animais idosos esse período foi determinante para a redução da tolerância aos esforços. Tal alteração está associada às alterações metabólicas e estruturais da musculatura esquelética decorrentes do envelhecimento, tais como, menor capacidade oxidativa, menores concentrações plasmáticas de hormônios tróficos como o IGF, além de menor capilarização e força muscular (SCHULTEIS et al., 2001; DOHERTY et al., 2003; KANNAAN et al., 2005).

O protocolo de TFA de quatro semanas, ao qual os animais foram submetidos, foi eficaz em promover um aumento da distância máxima percorrida, da capacidade física dos animais e da tolerância física aos esforços.

A redução da força muscular consiste em um parâmero preponderante para a morbidade no envelhecimento, interferindo diretamente na realização das AVDs e na qualidade de vida. A deambulação, em roedores, tem sido considerada um importante indicador de força muscular, além de possibilitar a avaliação direta da mobilidade e força muscular. Na figura 10, verificamos uma redução tanto no comprimento absoluto da passada (painel A) como no comprimento da passada corrigido pelo comprimento naso-anal do camundongo (painel B) no grupo idoso sedentário, sugerindo uma redução da força muscular nesse grupo, a qual influencia diretamente a locomoção dos mesmos. Já os animais idosos submetidos ao TFA não apresentaram diferença dignificante quando comparados aos grupos de animais jovens, mostrando que o TFA foi eficaz em reestabelecer a força muscular e, assim, a deambulação e mobilidade desses animais. Esse fato pode estar relacionado ao papel homeostático do TFA, o qual desencadeia processos intracelulares que

reestabelecem o equilíbrio dos diferentes sistemas do organismo. De fato em animais que não apresentam alterações em sua homeostase, como os grupos de animais jovens, não foram observadas alterações na deambulação e mobilidade pelo TFA.

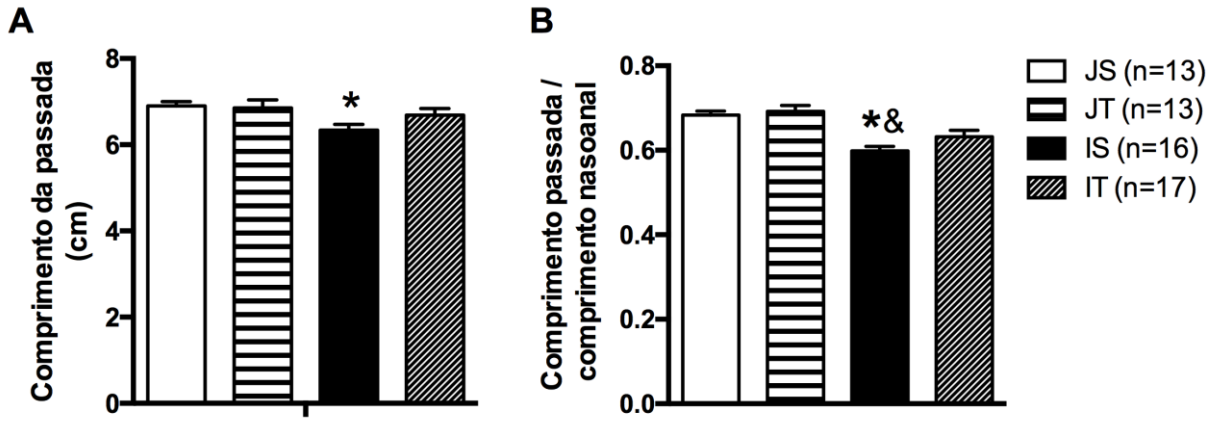

Figura 10 - Avaliação da função muscular por deambulação. (A) comprimento da passada em valores absolutos (cm) e (B) em valores normalizados pelo comprimento naso-anal. Teste realizado em animais jovens e idosos, sedentários e treinados após o período experimental. Os dados estão representados pela média ± erro padrão da média. **vs* jovem sedentário ($p \leq 0.05$); & *vs* jovem treinado ($p \leq 0.05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de *Duncan*. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

A força muscular apresenta correlação significante com o volume muscular (MINOTTI et al., 1993), sendo a AST um importante preditor de força muscular (HARRINGTON et al., 1997). Nesse sentido, a AST dos músculos TA e EDL foram avaliadas em todos os grupos estudados. A escolha desses músculos foi determinada pelo fato do músculo TA ser um dos mais estudados para o entendimento dos mecanismos de regeneração muscular, já que a indução de lesão pode ser realizada *in vivo* e de maneira menos invasiva, além do fato deste ser um músculo mais superficial (BENTZINGER et al., 2012); Já, o EDL foi utilizado por

apresentar um tendão proximal e um distal que possibilitam a análise da função muscular *ex vivo*. Na Figura 11 (painéis A e C), não se observam alterações na AST do músculo TA entre os grupos experimentais. Porém, observa-se um aumento da AST do músculo EDL do grupo idoso treinado (Figura 11B). O resultado diferenciado desses músculos, apesar de ambos apresentarem características glicolíticas, pode estar relacionado às diferentes porcentagens de fibras do tipo IIA entre esses músculos. De fato, o EDL apresenta maior porcentagem de fibras do tipo IIA e essas fibras estão mais susceptíveis à transição para fibras do tipo I por perda de inervação (motoneurônios tipo II) e, assim, à atrofia no processo de envelhecimento. Já o músculo TA parece apresentar mais fibras do tipo IIX, as quais transitam primeiramente para fibras do tipo IIA, o que pode minimizar a redução da AST do grupo idoso sedentário.

Além disso, sobre o aumento na AST dos animais idosos treinados, sabe-se que a corrida é uma forma de exercício aeróbico contínuo, o qual mobiliza, principalmente, os membros inferiores (TYLER et al., 1998). No protocolo utilizado, o músculo EDL foi bastante recrutado nesta atividade, uma vez que os animais devem realizar a flexão dorsal para absorção do impacto na aterrissagem após a fase aérea do movimento de corrida e a extensão dos dedos para a produção do impulso e continuidade do movimento da corrida.

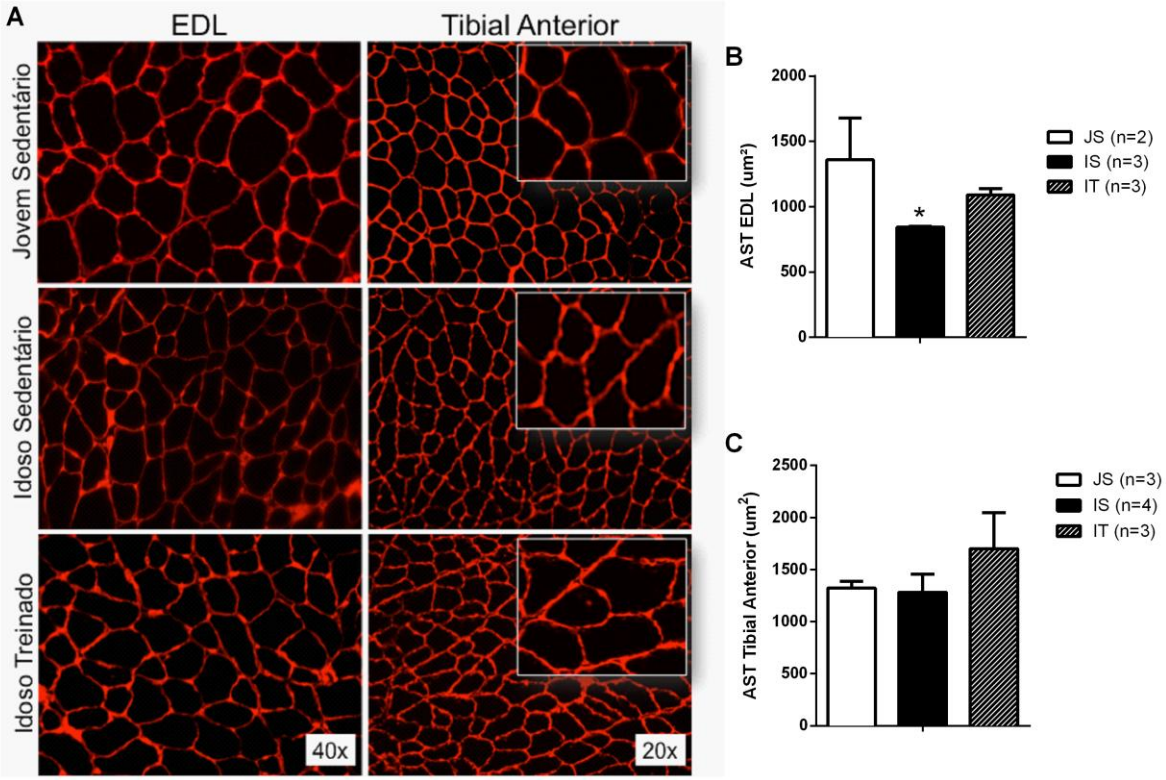

Figura 11 - Marcação por imunofluorescência Laminina (vermelho) (A) e quantificação da área de secção transversa de fibras nos músculos EDL e Tibial Anterior (B e C) de animais jovens e idosos, sedentários e treinados. Os dados foram representados pela média ± erro padrão da média. * vs. jovem sedentário ($p \leq 0.05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de um caminho (ANOVA) seguida de *post-hoc* de *Duncan*. JS, Jovem Sedentário; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado; AST, Área de Secção Transversa; EDL, *extensor digitorum longus.*

Outra análise associada à força muscular é a avaliação da função muscular *ex vivo*. Nessa avaliação, o músculo é estimulado eletricamente de forma progressiva a contrair-se, sendo a resposta a essa estimulação um indicativo da produção de força muscular. Na Figura 12A, observa-se uma redução da produção de força no músculo EDL do grupo idoso sedentário comparado ao grupo jovem sedentário. Contudo, o grupo idoso treinado apresentou um aumento da produção de força isométrica (tensão isométrica desenvolvida em função frequência de estimulação), corroborando os dados de deambulação, os quais também estão relacionados à força muscular. Um outro parâmetro avaliado nessa análise de

função *ex vivo* é a fadiga muscular, a qual está relacionada à menor capacidade de realização de esforços contínuos, à indução precoce do metabolismo anaeróbio, com acidose muscular acelerada, hipóxia muscular e aumento do acúmulo de lactato (MANCINI et al., 1989; HARRINGTON et al., 1997). Ao avaliar os diferentes grupos estudados, foi verificado que o grupo idoso sedentário apresentava maior tolerância à fadiga em relação ao grupo jovem sedentário. No entanto, o grupo idoso submetido ao TFA não apresentou diferença nos valores de fadiga quando comparado ao grupo idoso sedentário. Apesar de não ter sido observado efeito do TFA sobre a fadiga muscular, o TFA de quatro semanas foi eficaz em melhorar a produção de força.

A função muscular depende muito do estado redox do músculo, pois sua produção de força depende da interação e organização das proteínas contratéis, que são extremamente sensíveis a variação das concentrações de EROs. O TFA aumenta a defesa antioxidante o que permite maior equilíbrio redox e melhora da função muscular (ALLEN et al. 2014; JACKSON et. al., 2011). Nesse sentido, uma possível explicação, é que o músculo do idoso tenha até uma compensação, entretanto eu não avaliei a atividade de enzimas oxidativas nesses animais, mas poderia estar diferente - e até - aumentada. a menor intolerância aos esforços apresentada pelos animais idosos também pode estar relacionada à alterações em fatores circulantes que independentemente do músculo isolado estar melhor, levam a uma resposta geral pior. Isso acontece em doenças crônico degenerativas em estágio inicial, como na Insuficiência Cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos (BECHARA et al., 2012). Os resultados inesperados com relação à fadiga muscular, podem estar relacionados ao habitat, pois há de se considerar que a análise com o músculo isolado ex vivo tira o músculo de suas reais condições no

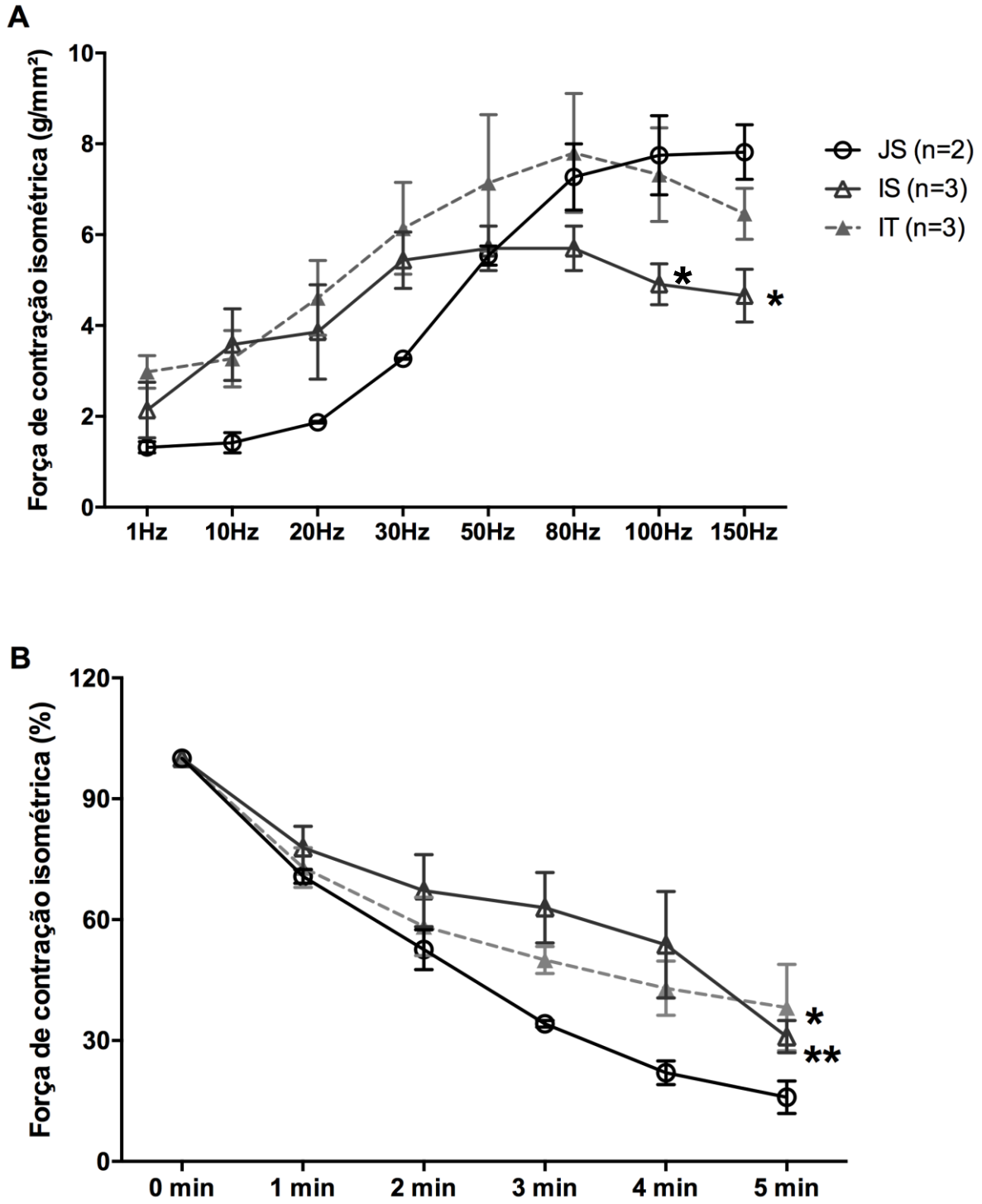

Figura 12 - Função contrátil ex vivo do músculo EDL. Tensão isométrica máxima atingida em protocolo de força vs. frequência muscular (A) e protocolo de indução a fadiga muscular (B). Os dados estão representados pela média ± erro padrão da média. * vs jovem sedentário ($p \leq 0.05$); ** vs jovem sedentário ($p \leq 0.01$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de *Duncan.* JS, Jovem Sedentário; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

organismo, e coloca na cuba em igual condições para todos os grupos, assim acabamos por estudar apenas a propriedade intrínseca de força e resistência a fadiga desses músculos, mas em seus *mileu* poderia existir menor disponibilidade de oxigênio e outros fatores circulantes.

Nessa primeira parte verificamos que o TFA melhorou a capacidade aeróbica, a produção de força estimada pelo teste de deambulação e aferida diretamente no músculo em preparação *ex vivo*, demonstrando que o TFA é realmente uma ferramenta eficaz para minimizar as alterações na função e morfologia do músculo esquelético decorrentes do envelhecimento. No subtópico a seguir, serão apresentados os resultados relacionados aos efeitos do TFA na regeneração muscular.

5.2 Efeitos do treinamento físico aeróbico na regeneração muscular

A regeneração muscular está associada à plasticidade do músculo esquelético, a qual possibilita que esse tecido se adapte a um determinado estímulo; nesse caso, à uma lesão. Essa adaptação desencadeia alguns processos, os quais permitem a “reestruturação” da área lesionada, mantendo, na maioria dos casos, a função do tecido até mesmo auxilia na manutenção da massa muscular, pois uma redução na capacidade regenerativa do músculo lesionado leva a processos atróficos (SEALE & RUDNICKI, 2000). Com o envelhecimento essa capacidade de adaptação é reduzida, desencadeando perda de massa muscular, menor capacidade regenerativa, menor produção de força, menor autonomia e maior susceptibilidade às doenças. Como o TFA tem se mostrado eficaz na modulação da homeostase muscular, essa ferramenta foi utilizada com o objetivo de minimizar/reverter as alterações relacionadas aos estágios envolvidos no processo

de regeneração com o envelhecimento. Para isso, camundongos jovens (4 meses) e idosos (22 meses) foram submetidos ao TFA por 4 semanas em esteira rolante.

Após a realização do protocolo de TFA, esses animais foram submetidos a lesão muscular mecânica no músculo TA de ambas as patas, sendo uma pata destinada a realização de experimentos histológicos e a outra pata destinada a experimentos que avaliaram a expressão gênica de reguladores da regeneração muscular. Para avaliar o desenvolvimento dos estágios do processo de regeneração muscular, as avaliações foram realizadas em um curso temporal após a lesão: 2, 4 e 15 dias. Os resultados dos parâmetros morfológicos referentes à massa corporal, massa dos músculos TA, EDL, gastrocnêmio, plantar e sóleo, dimensões cardíacas (ventrículo esquerdo e direito) e a massa das gorduras retroperitoneal e epididimal encontram-se na Tabela1. À exceção da massa corporal, os demais dados foram normalizados pelo comprimento da tíbia para que fosse eliminado o efeito do aumento do comprimento naso-anal com o avançar da idade observado em roedores.

Na Tabela 1, observa-se um aumento da massa corporal nos grupos de camundongos idosos quando comparados aos grupos de camundongos jovens. De fato, as gorduras retroperitoneal e epididimal estavam aumentadas no grupo idoso sedentário 15 dias após a lesão mecânica quando comparados aos demais grupos. Esses resultados corroboram os dados da literatura que mostram um aumento da massa corporal e do tecido adiposo com o envelhecimento (CABRERA & JACOB FILHO, 2001). O aumento desses parâmetros morfológicos auxilia na proteção do organismo, já que as perdas de massa óssea, muscular, força, capacidade aeróbica e equilíbrio prejudicam a mobilidade e aumentam a fragilidade do indivíduo idoso. Entretanto, esse resultado não foi observado de maneira uniforme em todos os

Tabela 1 – Parâmetros morfológicos de animais jovens e idosos após lesão muscular.

	2 dias				4 dias				15 dias			
	JS (n=7)	JT (n=9)	IS (n=5)	IT (n=6)	JS (n=6)	JT (n=7)	IS (n=5)	IT (n=6)	JS (n=7)	JT (n=6)	IS (n=6)	IT (n=6)
Massa Corporal, *g*	28,2±0,5	27,4±0,4	30,2±0,7*&	31,7±0,7*&	29,9±0,7	26,7±0,6	29,9±0,7#$!	30,7±0,6@&	25,3±0,9#$%§	26,9±0,6#$§	32,1±0,7@!?	30,3±0,5@!?
Tibial Anterior, *g/mm*	2,18±0,09	2,4±0,1	2,7±0,1	2,7±0,2*	2,6±0,11	2,5±1,2	2,3±0,12	2,6±0,1	2,66±0,05*	2,5±0,09	2,4±0,12	2,4±0,1
EDL, *g/mm*	0,48±0,04	0,5±0,04	0,7±0,03*&	0,6±0,1	0,5±0,04	0,50±1,2	0,6±0,04	0,6±0	0,61±0,02	0,5±0,03	0,6±0,06	0,6±0,1
Gastrocnêmio, *g/mm*	6,1±0,19	6,6±0,28	6,5±0,15	7,1±0,1	6,8±0,1	6,7±0,12	6,3±0,21	6,3±0,3	7,2±0,1	6,8±0,13	6,4±0,18	6,5±0,2
Plantar, *g/mm*	0,87±0,05	0,9±0,03	1,0±0,14	0,9±0,1	1,0±0,03	1,02±1,2	0,9±0,03	0,9±0,1	0,9±0,03	1±0,04	0,9±0,08	0,9±0,1
Sóleo, *g/mm*	0,45±0,02	0,4±0,03	0,5±0,01	0,6±0	0,5±0,02	0,5±1,2	0,5±0,03	0,5±0,03	0,5±0,03	0,5±0,03	0,5±0,03	0,5±0,03
VE, *g/mm*	4,78±0,14	4,8±0,11	5,2±0,24	5,8±0,2	5,0±0,13	4,9±1,2	5,6±0,45	5,9±0,4	5,13±0,22	4,9±0,12	5,8±0,27	5,5±0,3
VD, *g/mm*	1,5±0,01	1,4±0,03	1,5±0,01	1,4±0,03	1,5±0,04	1,3±0,05	1,5±0,04	1,3±0,05	1,3±0,07	1,3±0,07	1,3±0,07	1,3±0,07
G. Retroperitoneal, *g/mm*	2,79±0,4	5,2±0,74	5,7±0,83	4,7±0,5	3,7±0,49	4,7±1,2	4,5±0,68	4,5±0,7	4,29±0,49	4,9±0,37	7,5±1,49%$!	4,8±0,5
G. Epididimal, *g/mm*	15,2±1,76	23,3±1,6	26,2±2,95	24,8±2,2	21±2,34	23,9±1,2	21,9±2,57	21,8±3,8	21,4±1,14	23,1±1,66	30,2±4,01*	20,7±1,9

JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado; VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito; G, gordura; *mm*, normalizado pelo comprimento da tíbia. * vs. Jovem Sedentário 2dias ($p<0,05$); & vs. Jovem Treinado 2 dias ($p<0,03$); # vs. Idoso Sedentário 2dias ($p<0,05$); $ vs. Idoso Treinado 2 dias ($p<0,001$); @ vs. Jovem Treinado 4dias ($p<0,01$); % vs. Idoso Sedentário 4dias ($p<0,01$); § vs. Idoso Treinado 4dias ($p<0,001$); ! vs. Jovem Sedentário 15dias ($p<0,001$); ? vs. Jovem Treinado 15dias ($p<0,001$). Média ±erro padrão da média. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de post-hoc de Tukey.

grupos de animais idosos. A massa dos músculos TA e EDL mostrou-se alterada em diferentes pontos do curso temporal de regeneração nos diferentes grupos. Foi observado um aumento na massa do TA dos animais jovens sedentários 15 dias após a lesão quando comparados ao mesmo grupo 2 dias após a lesão. A massa do músculo EDL estava aumentada no grupo idoso sedentário após 2 dias de lesão em relação aos grupos jovens nesse mesmo estágio do curso temporal.

Essas alterações na massa dos músculos podem estar relacionadas ao acúmulo de edema intramuscular na área lesada e seus arredores, já que o TA sofreu lesão mecânica e o músculo EDL está posterior a ele. Afinal, uma das formas de se avaliar o grau da lesão é a ocorrência de edema focal no local da lesão devido a ruptura ocorrida nas junções miotendíneas (STEPHENS & ANDERSON, 1987; FERNANDES et al., 2009 e 2011). A massa dos ventrículos esquerdo e direito não apresentou diferença entre os grupos avaliados. Também não foi observado efeito do TFA nos parâmetros morfológicos.

Para avaliar os estágios relacionados ao processo de regeneração das fibras musculares do TA nos diferentes pontos do cursos temporal após a lesão e o efeito do TFA, foram realizadas diferentes análises histológicas. Essas análises apresentam um número reduzido de animais (3 em cada grupo) devido, principalmente, aos problemas encontrados no congelamento de alguns tecidos e padronização de determinadas colorações; o que prejudicou a realização da coloração e análise dos dados. Dessa forma, nesse momento, a descrição dos resultados e sua discussão foram pautadas em análises de características mais qualitativas. No entanto, para a confecção do manuscrito finalizaremos os experimentos e análise dos dados, permitindo uma melhor compreensão do papel do TFA na regeneração.

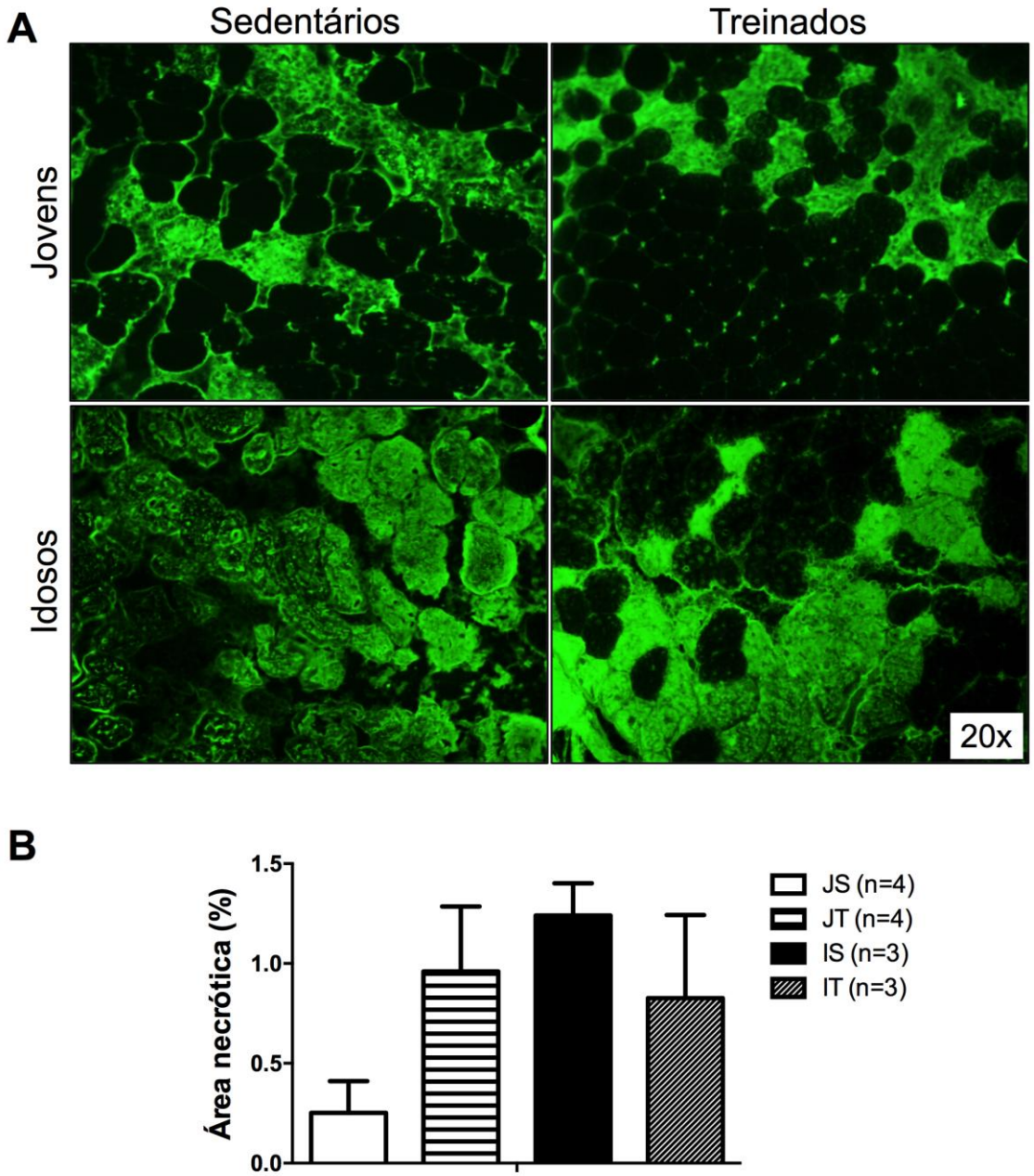

Figura 13 - Marcação de fibras necróticas por imunoglobulinas (IgG) verde (A) e (B) quantificação da área necrótica no músculo tibial anterior 2 dias após lesão mecânica em animais jovens e idosos, sedentários e treinados. Os dados foram representados pela média ± erro padrão da média. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado

Na figura 13, observamos o processo de degeneração das fibras musculares que ocorre logo após a lesão e perdura, geralmente, por até 48 horas. Essa degeneração é o resultado de uma rápida necrose derivada do aumento no influxo

de Ca^{2+} extracelular na fibra muscular, seguido pela ruptura do sarcolema. A quantidade (em porcentagem) de fibras necróticas foi observada a partir da ruptura do sarcolema dois dias após a lesão nos diferentes grupos experimentais. Nesse sentido, observando a figura 13A, verificamos um aumento da quantidade de fibras necróticas no grupo idoso sedentário quando comparado ao grupo jovem sedentário.

Essa resposta pode estar relacionada à menor eficácia dos neutrófilos e macrofágos na remoção de debris celulares com o envelhecimento, atrasando o processo de regeneração (RIPKISS & LANZA, 2010; ESQUENAZI et al., 2012). O TFA, por sua vez, pareceu modular esse processo de maneira distinta nos diferentes grupos, pois aumentou a quantidade de fibras necróticas no grupo jovem treinado comparado ao jovem sedentário; mas diminuiu a quantidade dessas fibras no grupo idoso treinado comparado ao que se manteve sedentário. Dessa forma, os dados sugerem, mais uma vez, o efeito homeostático do TFA no grupo idoso, minimizando os efeitos deletérios do envelhecimento sobre a degeneração muscular. Esse efeito benéfico pode estar relacionado também ao aumento da vascularização na musculatura esquelética advinda do treinamento, aumentando o fluxo de monócitos para o local da lesão e, assim permitindo a contenção da extensão da área lesionada nos animais idosos. Entretanto, o aumento da porcentagem de fibras necróticas no grupo jovem treinado em relação ao jovem sedentário, pode estar relacionado ao aumento de metabólitos intracelulares inerentes ao treinamento físico, tais como, o aumento da creatina quinase, superóxido desmutase, EROs e outros aldeídos, que promoveriam maior dano ao redor da área lesionada e aumento na área necrótica (BOFF, 2008; LIU et al., 2009; FERRARESI et al., 2012)

O processo inflamatório ocorre quase que simultaneamente à degeneração muscular, se estendendo por um período maior e promovendo a migração de

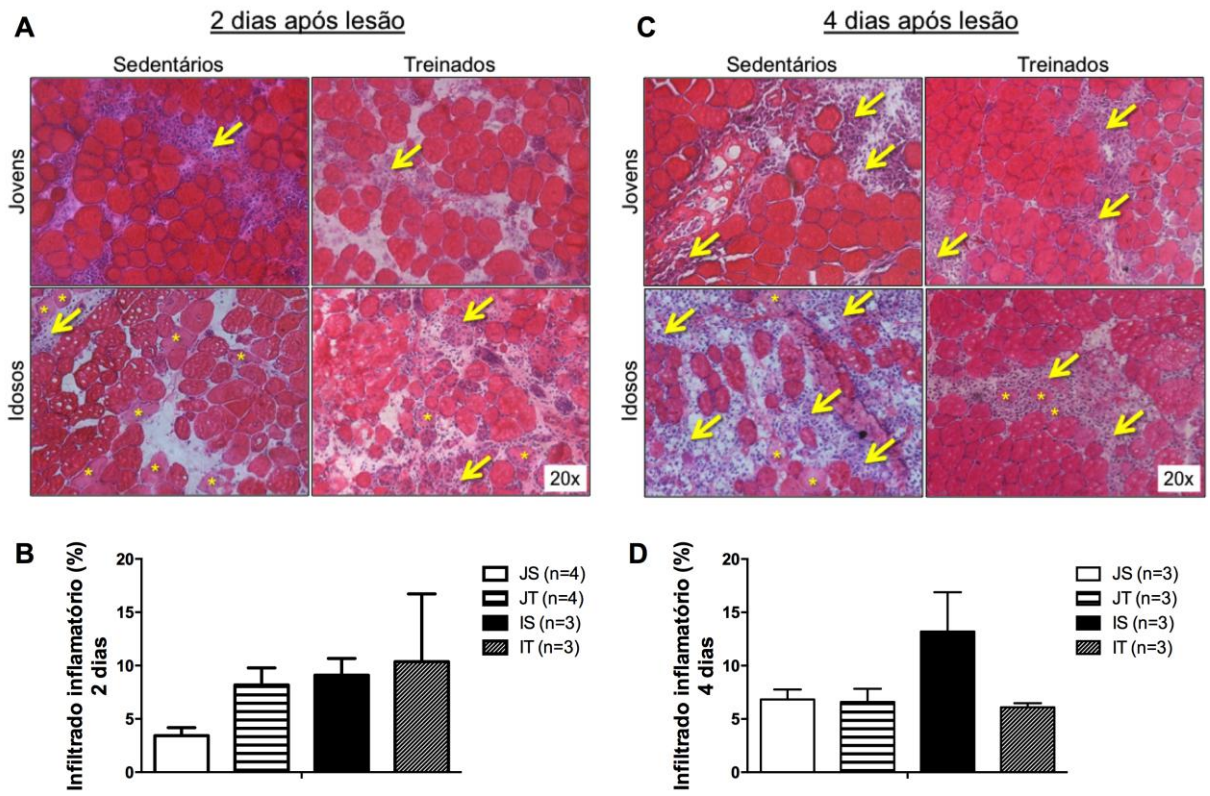

Figura 14 - Coloração por hematoxilina-eosina para análise de área do infiltrado inflamatório no músculo tibial anterior 2 (A e B) e 4 (C e D) dias após lesão mecânica em animais jovens e idosos, sedentários e treinados. Setas, infiltrado inflamatório. Asteriscos, fibras basofilicas/necróticas. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

macrófagos para a remoção dos debris celulares (CAROSIO et al., 2011). Ao observar a Figura 14, podemos notar que no Painel C houve uma maior magnitude e permanência da quantidade de infiltrado inflamatório no grupo idoso sedentário com quatro dias após a lesão quando comparado aos demais grupos. O envelhecimento parece postergar o reparo da área lesionada, aumentando a inflamação sistêmica e local. Já o TFA parece reestabelecer e acelerar o reparo muscular nos animais jovens e idosos, pois visualmente há menor área com infiltrados inflamatórios e maior quantidade de fibras centro nucleadas com pequeno calibre em ambos os grupos treinados, contribuindo para a melhora do processo inflamatório. Essa

melhora pode estar relacionada à uma maior ativação de CS e células precursoras miogênicas para o reparo da musculatura.

Após a inflamação inicia-se o processo de reparo da musculatura esquelética. Esse processo consiste na ativação, proliferação e diferenciação de CS em miofibrilas, na migração de fibroblastos e na deposição de colágeno na área a ser reparada. Na Figura 15, verificamos um aumento na fração de colágeno dos animais idosos sedentários após 15 dias de lesão em relação aos demais grupos experimentais. O TFA parece reduzir a deposição de colágeno no grupo idoso treinado.

Em condições basais a fina rede de colágeno intersticial fornece integridade estrutural que auxilia na junção miotendínea e integridade da matriz extracelular, facilitando o encurtamento muscular, o que se traduz na produção de força de maneira eficiente. Por outro lado, com o envelhecimento ocorre uma expressão excessiva de colágeno e uma mudança em seu tipo (para um mais rijo e menos complacente) e, maior migração de fibroblastos, prejudicando a produção de força muscular, ao passo que distintas estratégias com exercício físico tem demonstrado minimizar o efeito do envelhecimento - com maior expressão de colágeno mais complacente e melhora na transmissão de força muscular (ZOTZ et al., 2016; GIANELO et al., 2016; BRAGGION et al., 2016).

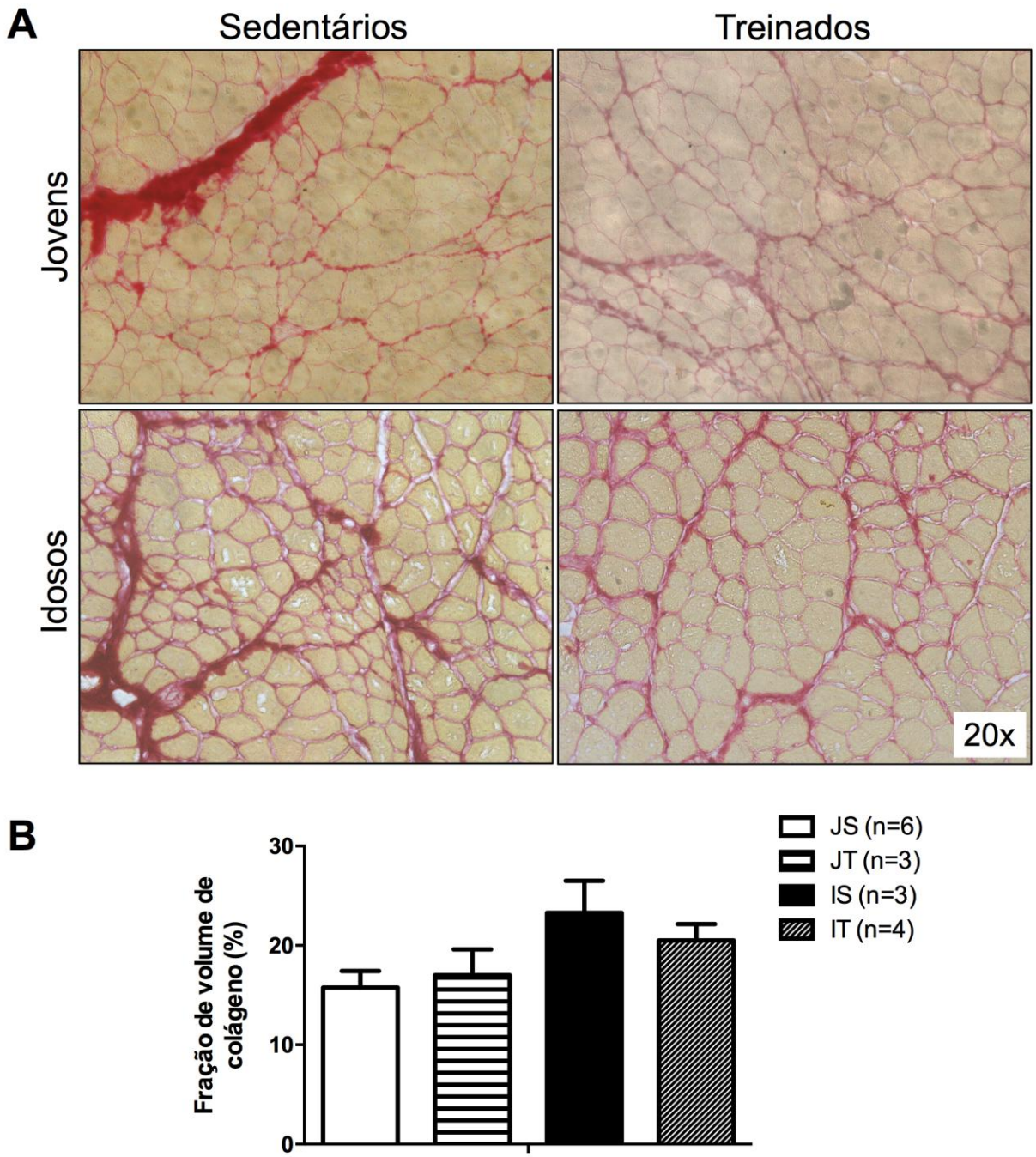

Figura 15 - Coloração por picrossirius red (A) e (B) análise da fração de colágeno no músculo tibial anterior 15 dias após lesão mecânica em animais jovens e idosos, sedentários e treinados. Os dados estão representados pela média ± erro padrão da média. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

De fato, ao observarmos a figura 16 (painéis B e C), podemos notar que a AST das fibras centro nucleadas do grupo idoso sedentário está menor em relação aos demais grupos, independentemente da quantidade de núcleos centralizados. Já

na figura 16D, observamos o efeito do TFA em ambos os grupos, melhorando a distribuição das fibras em regeneração de acordo com sua AST. Os resultados relacionados ao TFA apontam para a recuperação da função da área lesionada, pois o colágeno é um tecido cicatricial e não funcional interferindo diretamente na capacidade contrátil muscular. Além disso, o aumento da AST está diretamente relacionado ao aumento da força muscular, evidenciando o importante papel do reparo nesse processo.

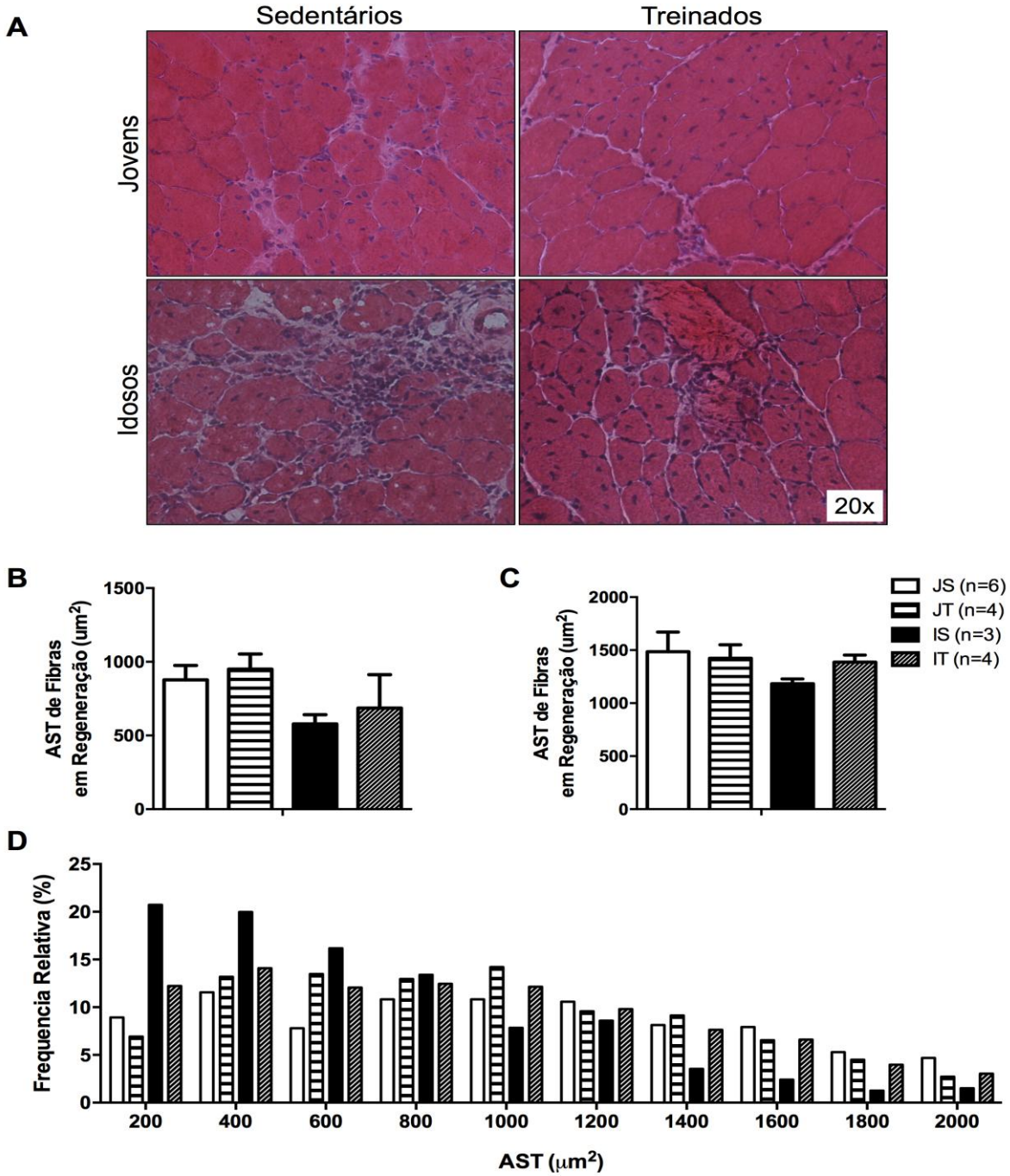

Figura 16 - Coloração por hematoxilina-eosina para análise de área de secção transversa das fibras com núcleo centralizado no músculo tibial anterior 15 dias após lesão mecânica em animais jovens e idosos, sedentários e treinados (A). Área de secção transversa de fibras com apenas um núcleo centralizado (B). Área de secção transversa de fibras com dois ou mais núcleos centralizados (C). Histograma da área de secção transversa das fibras com núcleos centralizados. Os dados estão representados pela média ± erro padrão da média. JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

Para verificar o papel do TFA na modulação da expressão de genes envolvidos na regeneração muscular foram avaliados PAX7, Myf5, MyoD, MyoG,

MRF4, SRF e miostatina de forma quantitativa, por meio de análise estatística ANOVA de dois caminhos com *poshoc* de Tukey. Na Figura 17 verificamos a expressão desses reguladores da regeneração muscular nos três pontos do curso temporal: 2, 4 e 15 após a lesão. O primeiro gene a ser avaliado foi PAX7, o qual mostrou-se aumentado nos grupos idosos após quatro dias de lesão e reduzido com 15 dias após a lesão nesses mesmos grupos. Bentzinger e colaboradores (2012) observaram um aumento de PAX7 3 dias após a lesão em camundongos jovens. Considerando esse resultado podemos sugerir que não verificamos alteração na expressão desse gene nos grupos jovens, pois o pico de ativação pode ter ocorrido, muito possivelmente, em período anterior ao estudado nesse trabalho. A redução de PAX7 nos grupos idosos comparados aos grupos jovens pode estar relacionada à menor renovação do pool de CS. O TFA não modulou a expressão de PAX7, porém observamos um aumento de Myf5 no grupo jovem treinado dois dias após lesão, o que sugere uma maior ativação e proliferação de CS nesse ponto do curso temporal.

Após a ativação e proliferação das CS, os genes responsáveis por sua diferenciação são MyoD e MyoG. Ao avaliarmos os três pontos do curso temporal, observamos uma diminuição na expressão desses genes nos grupos idosos em relação aos jovens. Esse resultado já era esperado pelo fato do envelhecimento reduzir a quantidade de CS. Da mesma forma, não observamos efeito do TFA sobre a expressão desses genes.

MRF4 está associado ao processo de diferenciação, contribuindo para a fusão dos mioblastos em miotúbulos. Verificamos uma redução de MRF4 nos grupos idosos com 15 dias após a lesão, quando comparados ao jovem. Não observamos efeito do TFA na expressão desse gene.

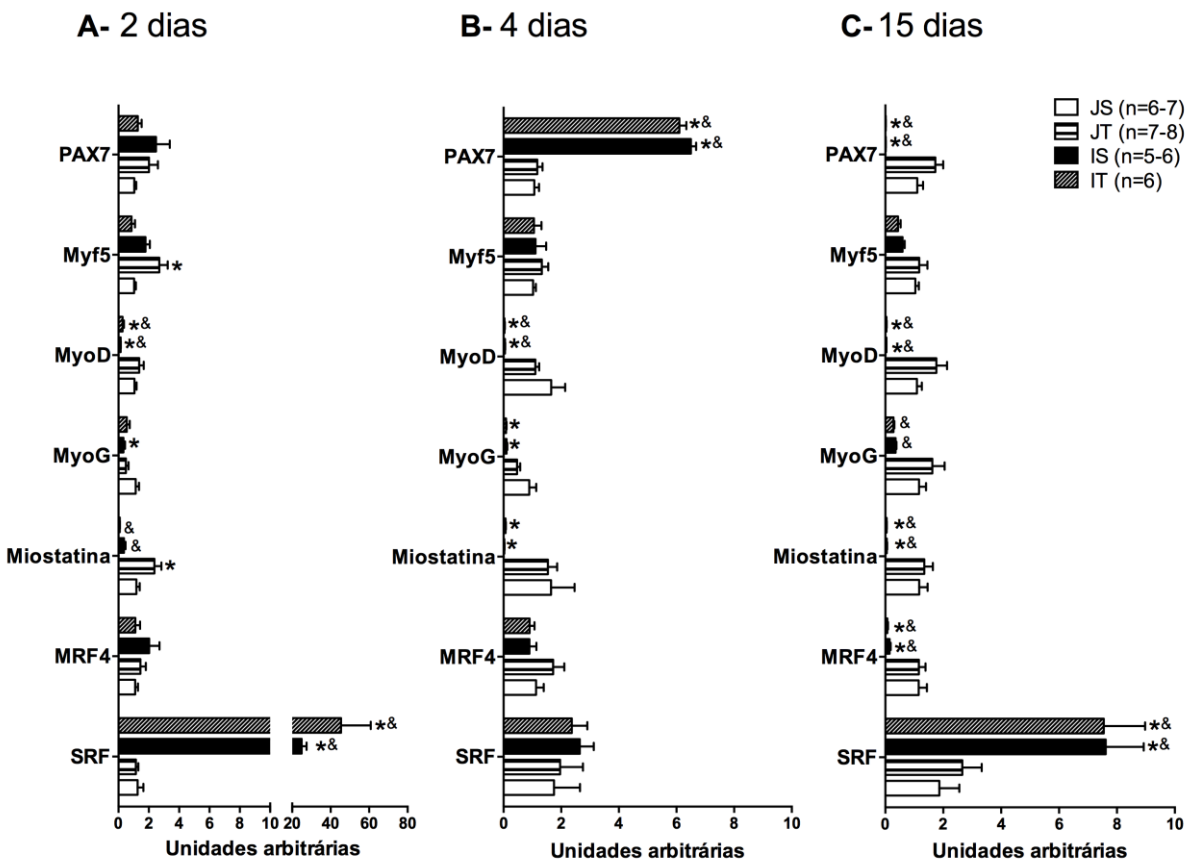

Figura 17 - Expressão gênica de reguladores da regeneração muscular 2 (A), 4 (B) e 15 (C) dias após a lesão mecânica. Os dados foram apresentados pela média ± erro padrão da média e foram comparados pela análise de variância ANOVA) de dois caminhos seguida de *pos hoc de Duncan*. * *vs*. jovem sedentário pré ($P \leq 0,05$); & *vs.* jovem treinado pré ($P \leq 0,05$); JS, Jovem Sedentário; JT, Jovem Treinado; IS, Idoso Sedentário; IT, Idoso Treinado.

O SRF é um gene envolvido nas diferentes etapas do processo regenerativo. Nos grupos idosos verificamos um aumento de sua expressão com 2 e 15 dias após a lesão, sem efeito do TFA sobre os diferentes grupos, independente do ponto do curso temporal. O que podemos observar com esses dados é que parece haver um desequilíbrio na ativação desses reguladores. Como os genes de ativação parecem estar com seu pico de ação atrasado, os genes responsáveis pela diferenciação parecem tentar contra regular a expressão desses genes de ativação. O SRF, por exemplo, poderia manter sua expressão nos grupos idosos para minimizar a inflamação prolongada. Nesse sentido, observamos que mesmo o contra regulador desses genes, a miostatina, apresenta um comportamento inesperado, com sua

expressão diminuída em todos os pontos do curso temporal nos idosos em relação aos jovens, uma vez que já há um desequilíbrio e uma menor ativação dos reguladores miogênicos. Dessa forma, a partir desse desequilíbrio, podemos sugerir que o TFA esteja atuando na regulação de outros genes ou outros aspectos envolvidos nesse processo. Além disso, o TFA pode ter desencadeado alterações em pontos que não foram avaliados na presente dissertação.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados da presente dissertação mostram que o TFA foi eficaz em aumentar a capacidade aeróbica e a força dos animais idosos, otimizando a função muscular. Quanto aos parâmetros histológicos referentes à regeneração muscular pós-lesão, a análise qualitativa dos resultados sugere que o TFA exerça um importante papel na regulação do processo inflamatório exarcebado observado nos camundongos idosos. Por outro lado, o TFA parece não estar diretamente associado a regulação gênica dos marcadores miogênicos nos pontos avaliados no curso temporal pós lesão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIHETTY PJ, IRRCHER I, JOSEPH AM, LJUBICIC V, HOOD DA. EXPERIMENTAL BIOLOGY, 88(1):99-107, 2003.

AGARWALL S, BUSSE PJ. (2010). ANN ALLERGY ASTHMA IMMUNOL. MAR; 104(3): 183-90. REVIEW INNATE AND ADAPTIVE IMUNOSENESCENCE.

AKIMOTO T, FURUDATE M, SAITOH M, SUGIURA K, WAKU T, AKAMA T, KONO I. (2002) EUR J APPL PHYSIOL 86(3):185-90.

ALLEN RE, AND BOXHORN LK. (1989). J CELL PHYSIOL, 138(2):311-5.

ALLEN, DG; LAMB, GD, WESTERBLD, H. SKELETAL MUSCLE FATIGUE: CELLULLAR MECHANISMS. PHYSIOL REV, V.88, N.1, P.1-6, 2014.

ALWAY SE, MYERS MJ, MOHAMED JS (2014). FRONTIERS IN AGING NEURSCIENCE 6, 246:1-15.

ANKER MS, VON HAEHLING S, SPRINGER J, BANACH M, ANKER SD (2013). ARCH MED SCI 9: 166-171.

ASAKURA A, SEALE P, GIRGIS-GABARDO A, RUDNICKI MA (2002). J CELL BIOL 159: 123-134.

BALTUNISKAS J, KLIKEVICUS, VENCKUMAS T, FOKIN A, (2014). APPL PHYSIOL NUTR METAB, 40(2):129-33.

BASSEL-DUBY, AND OLSON EM. (2006). ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, 75:19-37.

BASSET, 2004 MEDICINE SCIENCE IN SPORTS EXERCISE,2004;36910:79-85)

BAUMGARTNER RN (2000). ANN N Y ACAD SCI, 904:437-48.

BECHARA, LRG. CONTRIBUIÇÃO DO COMPLEXO ENXIMÁTICO NADPH OXIDASE NA ATROFIA MUSCULAR DE RATOS INFARTADOS: INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO. ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE, USP, SÃO PAULO, SP, 2012. 146P.

BELCASTRO, A.N., ARTHUR, G.D., ALBISSER, T.A., AND RAJ, D.A. (1996). J APPL PHYSIOL (1985) *80*, 1331-1335.

BENTZINGER F, WANG YX, MALTZAHN JV, SOLEIMANJ VD, YIN H. (2012). CELL STEM CELL 12, 75-87, JANUARY 3.

BORTOLI S, RENAULT V, EVENO E, AUFFRAY C, BUTLER-BROWNE G ET AL. (2005). GENE 347:65-72.

BRACK AS, CONBOY IM, CONBOY MJ, SHEN J, RANDO TA (2008). CELL STEM CELL 2: 50-59.

BRACK AS, CONBOY MJ, ROY S, LEE M, KUO CJ, KELLER C, ET AL. INCREASED WNT SIGNALING DURING AGING ALTERS MUSCLE STEM CELL FATE AND INCREASES FIBROSIS. SCIENCE (2007);317:807E10.

BRAGGION GF, ORNELAS E, CURY JCS, LIMA NEA, AQUINO RC, FONSECA FLA, MAIFRINO LBM. 2016. OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR LONGEVITY. ARTICLE ID 9251064, 10P.

BRICKSON, S., HOLLANDER, J., CORR, D.T., JI, L.L., AND BEST, T.M. (2001). MEDICINE AND SCIENCE IN SPORTS AND EXERCISE *33*, 2010-2015.

BOFF SR (2008). A FIBRA MUSCULAR E FATORES QUE INTERFEREM NO SEU FENÓTIPO. ACTA FISIATR; 15(2):111-116.

CABRERA MA, GEBARA OC, DIAMENT J, NUSSBACHER A, ROSANO G ET AL. (2007). INT J CARDIOL, 99(4):541-8.

CABRERA MAS, JACOB FILHO W. (2001). OBESIDADE EM IDOSOS: PREVALÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E ASSOCIAÇÃO COM HÁBITOS E COMORBIDADES. ARQ BRAS ENDOCRINOL METAB. 45(5):494-501.

CARLSON BM, DEDKOV EI, BORISOV AB, FAULKNER JA (2001). J GERONTOL A BIOL SCI MED SCI 56: 224-233.

CAROSIO S, BERARDINELLI MG, AUCELLO M, MUSARO A (2011). AGEING RES REV 10: 35-42.

CHABI B, LJUBICIC V, MENZIES KJ, HUANG JH, SALLEEM A, HOOD DA (2007). AGING CELL 7:2-12.

CHARGE, S.B., AND RUDNICKI, M.A. (2004). PHYSIOLOGICAL REVIEWS *84*, 209-238.

CHEN, J.C., AND GOLDHAMER, D.J. (2003). REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY : RB&E *1*, 101.

COLLINS CA, ZAMMIT PS, RUIZ AP, MORGAN JE, PARTRIDGE TA (2007). STEM CELLS 25:885-894.

CONBOY IM, RANDO TA (2005). CELL CYCLE 4:407-410.

CONBOY, I.M., CONBOY, M.J., SMYTHE, G.M., AND RANDO, T.A. (2003). SCIENCE *302*, 1575-1577.

CORNELISON, D.D., AND WOLD, B.J. (1997). DEVELOPMENTAL BIOLOGY *191*, 270-283

CRAICK FIM, editor. (1990). CHANGES IN MEMORY WITH NORMAL AGING: A FUNCTIONAL VIEW. V.51, NOVA YORK:RAVEN PRESS.

CRIGHTON MH, PUPPIONE AA. (2006). GERIATRIC NEUTROPHILS: IMPLICATIONS FOR OLDER ADULTS. SEMIN ONCOL NURS 22(1):39

CRISCO, J.J., JOKL, P., HEINEN, G.T., CONNELL, M.D., AND PANJABI, M.M. (1994). THE AMERICAN JOURNAL OF SPORTS MEDICINE *22*, 702-710

CUNHA TF, BACURAU AV, MOREIRA JB, PAIXAO NA, ET AL. (2012). PLOS ONE, 7(8):E41701.

DALLA LIBERA L, SABBADINI R, RENKEN C, RAVARA B, SANDRI M, ET AL. (2001). J MOL CELL CARDIOL 33: 1871-1878.

DEDKOV, E.I., BORISOV, A.B., WERNIG, A., AND CARLSON, B.M. (2003). THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY : OFFICIAL JOURNAL OF THE HISTOCHEMISTRY SOCIETY *51*, 853-863

DEGENS H. AGE-RELATED SKELETAL MUSCLE DYSFUNCTION: CAUSES AND MECHANISMS. J MUSCULOSKELET NEURONAL INTERACT. 2007;7(3):246-52

DEGENS H (2007). J MUSCULOSKELET NEURONAL INTERACT, 7(3):246-252.

DOHERTY TJ. (2003). J APPL PHYSIOL, 95(4):1717-27.

DOUGLAS MR, MORRISON KE, SALMON M, BUCKLEY CD (2002). EXPERT REV MOL MED 4: 1-18.

EAGAN B, AND ZIERATH JL. (2013). CELL METABOLISM, 17:161-184.

ENG CM, SMALLWOOD LH, RAINIERO MP, LAHEY M, WARD SR, LIEBER RL. 2008. J EXP BIOL, 211(PT14):2336-2345.

ESQUENAZI DA. IMUNOSSENESCÊNCIA: AS ALTERAÇÕES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO PROVOCADAS PEPELO ENVELHECIMENTO.

REVISTA HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO. 2008;7(1):38-45

FAULKNER JÁ, LARKIN LM, CLAFFIN DR, BROOKS SV (2007). CLIN EXP PHARM AND PHYSIOL, 34:1091-1096.

FERNANDES TL, PEDRINELLI A, HERNANDEZ AJ. DOR NA COXA E NA PERNA. IN: NOBREGA A, EDITOR. MANUAL DE MEDICINA DO ESPORTE. SÃO PAULO:ATHENEU; 2009. P. 140-1.

FERNANDES TL, PEDRINELLI A, HERNANDEZ AJ. (2011). REV BRAS ORTOP; 46(3): 247-55.

FERRARESI C, PANEPUCCI R, REIFF R, ET AL. (2012) MOLECULAR EFFECTS OF LOW-LEVEL LASER THERAPY (808NM) ON HUMAN MUSCLE PERFORMANCE. PHYSICAL THERAPY IN SPORT. 2012;13:E5.

FERRARI G, CUSELLA-DE ANGELIS G, COLETTA M, PAOLUCCI E, STORNAIUOLO A, ET AL. (1998). SCIENCE 279: 1528-1530.

FERREIRA JC, ROLIM NP, BARTHOLOMEU JB, GOBATTO CA, KOKUBUN E, ET AL. (2007). CLIN EXP PHARMACOL PHYSIOL 34: 760-765.

FIELDING RA, MANFREDI TJ, DING W, FIATARONE MA, EVANS WJ, ET AL. (1993). AM J PHYSIOL 265: R166-172.

FOLLAND JP, WILLIAMS AG (2007). SPORTS MED 37: 145-168.

FRONTERA WR, MEREDITH CN, O'REILLY KP; KNUTTGEN HG, EVANS WJ (1988) J APPL PHYSIOL, 64(3):1038-44.

FULOP JR. T, FOUQUET C, ALLAIRE P ET AL. CHANGES IN APOPTOSIS OF HUMAN POLYMORPHONUCLEAR GRANULOCYTES WITH AGING. MECH AGEING DEV (1997) 96:15-34.

GIANELLO MC, POLIZELLO JC, CHESCA D, MARTTIELLO-SVERZUT AC. (2016). BRAZ J MED BIOL RES. FEB;49(2):E4118

GOETSCH, S.C., HAWKE, T.J., GALLARDO, T.D., RICHARDSON, J.A., AND GARRY, D.J. (2003). PHYSIOLOGICAL GENOMICS *14*, 261-271

GUIMARAES, FLR. EEITOS DA INIBIÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO NADPH OXIDASE NAS ADAPTAÇÕES DO ESTADO REDOX E

DAFUNÇÃO CONTRÁTIL DO MÚSCULO ESQUELÉTICO INDUZIDAS PELO TF EM RATOS. MESTRADO, EEFE USP, 2015

HARRINGTON, D.; ANKER, S.D.; CHUA, T.P.; WEBB-PEPLOE, K.M.; PONIKOWSKI, P.P.; POOLE-WILSON, P.A.; COATS, A.J.S. SKELETAL MUSCLE FUNCTION AND ITS RELATION TO EXERCISE TOLERANCE IN CHRONIC HEART FAILURE. JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE CARDIOLOGY, 1997. V.30, N.7, P.1758–1764.

HAYFLICK, L. (1996). IN: CAP.11: O ENVELHECIMENTO DAS CABEÇA AOS PÉS. IN:COMO E POR QUE ENVELHECEMOS, EDITORA CAMPUS.

HAWKE TJ, GARRY DJ (2001). J APPL PHYSIOL (1985) 91: 534-551.

HAWKE TJ, KANATOUS SB, MARTIN CM, GOETSCH SC, GARRY DJ (2006). AM J PHYSIOL CELL PHYSIOL 290: C379-387.

HIKIDA RS, VAN NOSTRAN S, MURRAY JD, STARON RS, GORDON SE, ET AL. (1997). ANAT REC 247: 350-354.

HOOD DA, AND SALEEM A. (2007). NUTR METAB CARDIOVASC DIS, 17(5):332-7.

HOOD DA. (2009). APLIED PHYSIOLOGY, NUTRITION, AND METABOLISM, 34(3):465-72.

HUAYLLAS, 2001;ARQUIVOS BRASILEIROS DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA,2001;45(2):157-166.

IBGE (2013). SÍNTESE DE INDICADORES SOCIAIS UMA ANÁLISE DAS CONDIÇÕES DE VIDA DA POPULAÇÃO BRASILEIRA 32.

INOUYE SK, STUDENSKI, S; TINETTI ME, KUCHEL G. (2007) J AM GERIATR SOC, 55(5):P780-91.

JACKSON MJ. CONTROL OF REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION IN CONTRACTING SKELETAL MUSCLE. ANTIOXID REDOX SIGNAL, V.15, N.9, P. 2247-1486, 2011.

JANG YC, SINHA M, CERLETTI M, DALL'OSSO C, WAGERS AJ (2011). COLD SPRING HARB. SYMP. QUANT. BIOL. 76, 101-111.

JARVINEN TAH, JARVINEN TLN, KÄÄRIÄNIEN M, JÄRVINEN M. 2005. BIOLOGY OF MUSCLE TRAUMA. AM J SPORTS MED 33:745-766

JASH S, AND ADHYA S. (2012). THE FASEB JOURNAL, 26:4187-92.

JEJURIKAR, S.S., AND KUZON, W.M., JR. (2003). APOPTOSIS : AN INTERNATIONAL JOURNAL ON PROGRAMMED CELL DEATH *8*, 573-578

JESPERSEN, J., KJAER, M., AND SCHJERLING, P. (2006). SCANDINAVIAN JOURNAL OF MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS *16*, 74-82

KANNAAN S, GARCIA MAT, CARVALHO CB. (2005). J BRAS MED 89 (5/6):12-24, NOV-DEZ, 2005.

KENNEL PF, FONTENEAU P, MARTIN E, SCHMIDT JM, AZZOUZ M, BORG J, GUENET JL, SCHMALBRUCH H, WARTER JM, POINDON P. (1996). NEUROBIOLOGY OF DISEASE, LONDON, V.3, P. 137-147.

KRIPPENDORF BB, RILEY DA (1993). MUSCLE NERVE 16: 99-108.

KUSCHEL, R., YABLONKA-REUVENI, Z., AND BORNEMANN, A. (1999). THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY : OFFICIAL JOURNAL OF THE HISTOCHEMISTRY SOCIETY *47*, 1375-1384

KYRIAKIDES, C., JASLEEN, J., WANG, Y., MOORE, F.D., JR., ASHLEY, S.W., AND HECHTMAN, H.B. (2001). PANCREAS *22*, 40-46

LA BARGE MA, BLAU HM (2002). CELL 111: 589-601.

LANG T, STREEPER T, CAWTHON P, BALDWIN K, TAAFFE DR, HARRIS TB. SARCOPENIA: ETIOLOGY, CLINICAL CONSEQUENCES, INTERVENTION, AND ASSESSMENT. OSTEOPOROS INT. 2010;21(4):543-9

LEES S, RATHBONE CR, BOOTH FW. AGE-ASSOCIATED DECREASE IN MUSCLE PRECURSOR CELL DIFFERENTIATION. AM J PHYSIOL CELL PHYSIOL. 2006;290:C609-C15.

LIU XG, ZHOU YJ, LIU TC, YUAN JQ. 2009. PHOTOMED LASER SURG. DEC; 27(6):863-9.

LUO D, RENAULT VM, RANDO TA (2005). SEMIN CELL DEV BIOL 16: 612-622.

MANCINI, D.M.; COYLE, E.; COGGAN, A.; BELTZ, J.; FERRARO, N.; MONTAIN, S.; WILSON, J.R. CONTRIBUTION OF INTRINSIC SKELETAL MUSCLE CHANGES TO 31P NMR SKELETAL MUSCLE

METABOLIC ABNORMALITIES IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE. CIRCULATION, 1989. N.80, N.5, P.1338–1346.

MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, ET AL. (2004). TRENDS IMMUNOL 25: 677-686.

MARANHÃO NETO GA, PONCE DE LEON AC, FARINATTI PT. (2008). CAD SAUDE PUBLICA 24(11)2499-510.

MARTEL GF, ROTH SM, IVEY FM, HURLBULT DE, METTER EJ, HURLEY BF, TRACY BL, LEMMER JT, ROGERS MA. EXPERIMENT. (2006); 91(2):457-464.

MARTINEZ PF, OKOSHI K, ZORNOFF LA, CARVALHO RF, OLIVEIRA JUNIOR AS, ET AL. (2010). MED SCI MONIT 16:BR374-383.

MATSUDO, S. M.; MATSUDO, V. K. R.; BARROS NETO, T. L. IMPACTO DO ENVELHECIMENTO NAS VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS, NEUROMOTORAS E METABÓLICAS DA APTIDÃO FÍSICA. *REV. BRAS. CIÊN. MOV*., V. 8, N. 4, 2000, P. 21-32.

MAURO A (1961). J BIOPHYS BIOCHEM CYTOL 9: 493-495.

MCALLISTER R, JASPERSE J, LAUGHLIN M. (2005).

MEESON AP, HAWKE TJ, GRAHAM S, JIANG N, ELTERMAN J, ET AL. (2004). STEM CELLS 22: 1305-1320.

MESCHER, A.L., AND NEFF, A.W. (2005). ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING/BIOTECHNOLOGY *93*, 39-66.

MINOTTI, J.R.; PILLAY, P.; OKA, R.; WELLS, L.; CHRISTOPH, I.; MASSIE, B.M. SKELETAL MUSCLE SIZE: RELATIONSHIP TO MUSCLE FUNCTION IN HEART FAILURE. JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY, 1993. V.75, N.1, P.373–381.

MORELAND JD, RICHARDSON JÁ, GOLDSCHIMITH CH, CLASE CM (2004). J AM GERIATR SOC, 52(7):1121-9.

MORIMOTO, H., TAKAHASHI, M., SHIBA, Y., IZAWA, A., ISE, H., HONGO, M., HATAKE, K., MOTOYOSHI, K., AND IKEDA, U. (2007). THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY *171*, 755-766

NÓBREGA ACL, FREITAS EV, OLIVEIRA MAB, LEITÃO MB, LAZZOLI JK, NAHAS RM, ET AL. (1999) REV BRAS MED ESPORTE, 5(6):207-11.

NOSAKA K, NEWTON M, SACCO P. (2002) SCAND J MED SCI SPORTS, 12(6):337-46.

PALERMO AT, LABARGE MA, DOYONNAS R, POMERANTZ J, BLAU HM (2005). DEV BIOL 279: 336-344.

PENG H, HUARD J (2004). TRANSPL IMMUNOL 12: 311-319.

PHILIPS T, CHILDS AC, DREONI DM, PHINNEY S. (2003). MED SCI SPORTS EXERC, 35(12):2032-7.

PHILLIPS, G.D., AND KNIGHTON, D.R. (1990). PROCEEDINGS OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE *193*, 197-202.

RENAULT, V., PIRON-HAMELIN, G., FORESTIER, C., DIDONNA, S., DECARY, S., HENTATI, F., SAILLANT, G., BUTLER-BROWNE, G.S., AND MOULY, V. (2000). EXPERIMENTAL GERONTOLOGY *35*, 711-719

ROBINSON, K. A. ET AL. EPIDEMIOLOGY OF INVASIVE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE INFECTIONS IN THE UNITED STATES, 1995-1998: OPPORTUNITIES FOR PREVENTION IN THE CONJUGATE VACCINE ERA. *JAMA,* V. 285, 2001. P. 1729-1735.

PEREIRA DS. (2012). INTERAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES DAS CITOCINAS TNF, IL6, IL10 E OS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM IDOSAS. 211F. MANUSCRITO. TESE, UFMG.

SABOURIN, L.A., AND RUDNICKI, M.A. (2000). CLINICAL GENETICS *57*, 16-25

SACHECK JM, MILBURY PE, CANNON JG, ROUBENOFF R, BLUMBERG JB (2003) FREE RADIC BIOL MED, 34(12):1575-88

SAKUMA K, AKIHO M, NAKASHIMA H, AKIMA H, YASUHARA M (2008) AGE-RELATED REDUCTIONS IN EXPRESSION OF SERUM RESPONSE FACTOR AND MYOCARDIN-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR A IN MOUSE SKELETAL MUSCLES. BIOCHIM BIOPHYS ACTA MOL BASIS DIS 1782:453–461

SAKUMA K, NISHIKAWA J, NAKAO R, NAKANO H, SANO M, WATANABE K, TOTSUKA T (2003) SERUM RESPONSE FACTOR PLAYS AN

IMPORTANT ROLE IN THE MECHANICALLY OVERLOADED PLANTARIS MUSCLE OF RATS. HISTOCHEM CELL BIOL 119:149–160

SAKUMA K, AKIHO M, NAKASHIMA H, AKIMA H, YASUHARA M. (2008) BIOCH ET BIOPHY ACTA 1782:453-461

SAKUMA K, YAMAGUCHI A (2011) SERUM RESPONSE FACTOR (SRF)-DEPENDENT PATHWAY: POTENTIAL MEDIATORS OF GROWTH, REGENERATION, AND HYPERTROPHY OF SKELETAL MUSCLE. IN: PANDALAI SG, EDS. RECENT RES. DEVEL. LIFE SCI. 5. RESEARCH SIGNPOST, KERALA, INDIA, PP. 13-37.

SANTORO M, PIACENTINI R, MASCIULLO M, BIANCHI ML, MODONI A, PODDA MV, RICCI E, SILVESTRI G, GRASSI c. 2014. NEUROPATHOL JUN; 40(40: 464-76.

SCHOENFELD BJ (2010). J STRENGTH COND RES 24: 2857-2872.

SCHULTHEIS L. (1991). EXPERIMENTAL GERONTOLOGY, 26, 203-214.

SCHULTZ, E. (1989). MEDICINE AND SCIENCE IN SPORTS AND EXERCISE *21*, S181-186

SEALE, P., AND RUDNICKI, M.A. (2000). DEVELOPMENTAL BIOLOGY *218*, 115-124.

SEALE, P., SABOURIN, L.A., GIRGIS-GABARDO, A., MANSOURI, A., GRUSS, P., AND RUDNICKI, M.A. (2000).. CELL *102*, 777-786.

SHEFER G, AND BENAYAHU D. (2012). FRONTIERS IN BIOSCIENCE (ELITE EDITION), 4:230-9.

SHEFER, G., CARMELI, E., RAUNER, G., YABLONKA-REUVENI, Z., AND BENAYAHU, D. (2008). JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY *215*, 265-275.

SINHA M, JANG YC, OH J, KHONG D, WU EY, MANOHAR R, MILLER C, REGALADO SG, ET AL.(2014) SCIENCE, 344(6184):649-652.

SOUSA-VICTOR P, GUTARRA S, GARCIA-PRAT L, RDRIGUEZ-UBREVA J, ORTET L ET L. (2014). NATURE 506, 316-21.

ST PIERRE BA, TIDBALL JG (1994). J APPL PHYSIOL (1985) 77: 290-297.

STEPHENS BO, ANDERSON GV. 1987. SIMULTANEOUS BILATERAL QUADRICEPS TENDON RUPTURE: A CASE REPORT AND SUBJECT REVIEW. J EMERG MED. 5(6):481-5.

SULTAN KR, DITTRICH BT, PETTE D (2000). AM J PHYSIOL CELL PHYSIOL 279: C639-647.

SUZUKI, K., SATO, H., KIKUCHI, T., ABE, T., NAKAJI, S., SUGAWARA, K., TOTSUKA, M., SATO, K., AND YAMAYA, K. (1996). J APPL PHYSIOL (1985) *81*, 1213-1222

THOMSON DM, AND GORDON SE (2006). J PHYSIOL 574(PT 1):291-305.

TIDBALL JG, AND WEHLING-HENRICKS M.(2007). J PHYSIOL 578(PT 1):327-36.

TIDBALL JG, VILLALTA SA (2010). AM J PHYSIOL REGUL INTEGR COMP PHYSIOL 298: R1173-1187.

TYLER, C. M. ET AL. SKELETAL MUSCLE ADAPTATION TO PROLONGED TRAINING, OVERTRAINING AND DETRAINING IN HORSES. EUR. J. PHYSIOL., V. 436, P. 391-397, 1998.

TURGEMANN T, HAGAI Y, HUEBNER K, JASSAL DS, ANDERSON JE, GENIN O, ET AL. ((2008). NEUROMUSCUL DISORD, 18(11)857-68.

UMNOVA, M.M., AND SEENE, T.P. (1991). INTERNATIONAL JOURNAL OF SPORTS MEDICINE *12*, 501-504

VALERO MC, HUNTSMAN HD, LIU J, ZOU K, BOPPART MD (2012). PLOS ONE 7: E29760.

VIERCK, J., O'REILLY, B., HOSSNER, K., ANTONIO, J., BYRNE, K., BUCCI, L., AND DODSON, M. (2000). CELL BIOLOGY INTERNATIONAL *24*, 263-272

WAGNER KR (2005). CURR OPIN RHEUMATOL 17: 720-724.

WAGNER KR, LIU X, CHANG X, ALLEN RE (2005). PROC NATL ACAD SCI U S A, 102(7):2519-2524.

WANG H, PICKRELL AM, ROSSI SG, PINTO M, DILLO LM, HIDA A ET AL. (2013). HUM MOL GENET 22, 3976-86.

WARREN, G.L., O'FARRELL, L., SUMMAN, M., HULDERMAN, T., MISHRA, D., LUSTER, M.I., KUZIEL, W.A., AND SIMEONOVA, P.P. (2004). AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY CELL PHYSIOLOGY *286*, C1031-1036

YACINE KHARRAZ (2013). MEDIATORS OF INFLAMATION. 2013:491497.

ZAMMIT PS, RELAIX F, NAGATA Y, RUIZ AP, COLLINS CA, ET AL. (2006). J CELL SCI 119: 1824-1832.

ZAMPIERI S, PIETRANGELO L, LOEFLER S, FRUHMANN H, VOGELAUER M, BURGGRAF S, POND A, ET AL.(2014) J GERONT A BIOL SCI MED SCI, 1-11

ZIMOWSKA, M., SZCZEPANKOWSKA, D., STREMINSKA, W., PAPY, D., TOURNAIRE, M.C., GAUTRON, J., BARRITAULT, D., MORACZEWSKI, J., AND MARTELLY, I. (2001). JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY *188*, 178-187

ZOTZ TG, CAPRIGLIONE LG, ZOTZ R, NORONHA L, VIOLA DE AZEVEDO ML, FIUZA MARTINS HR, SILVEIRA GOMES AR. (2016). ACTA HISTOCHEM. JAN;118(1):1-9.

ANEXO 1

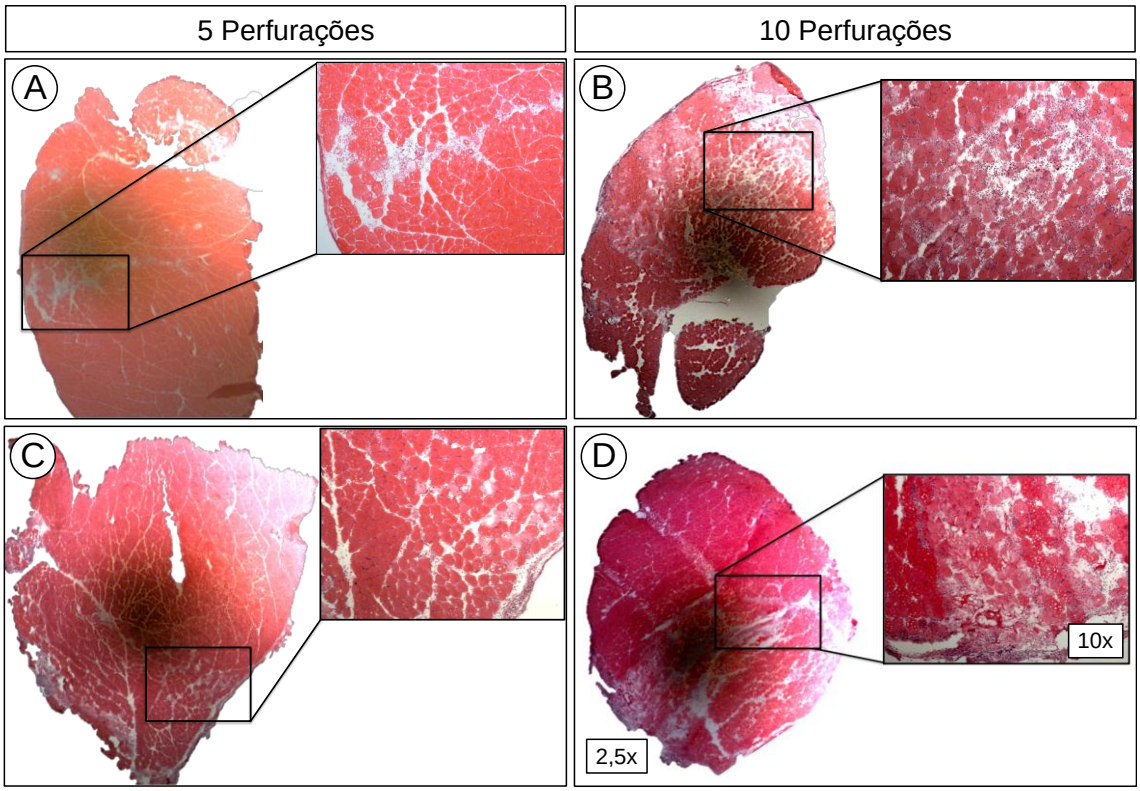

Figura 1- Secções transversais do músculo tibial anterior após 48h da lesão por 5 perfuração (A e C) ou 10 perfurações. Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina em magnitude de 2,5x e 20x.

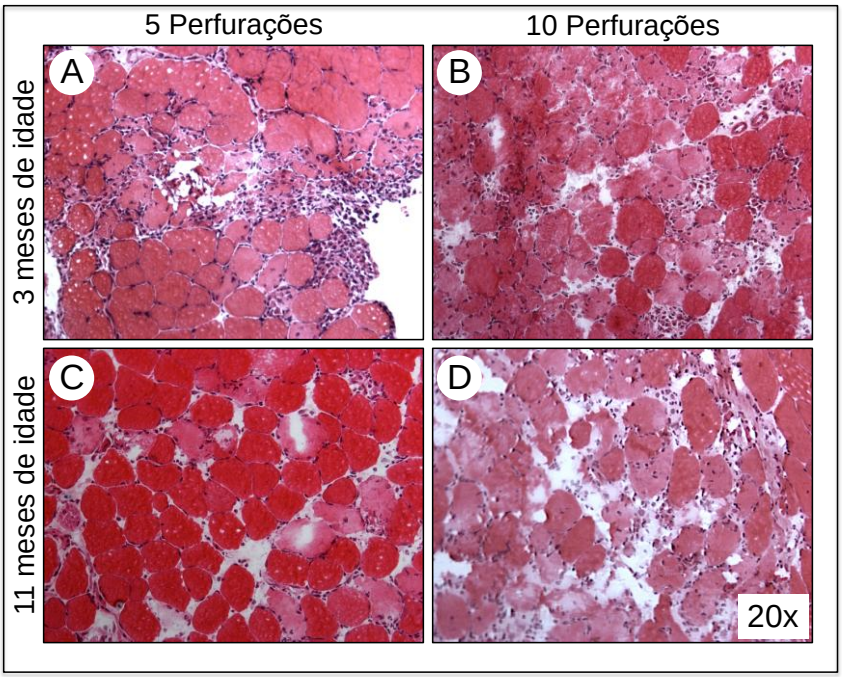

Figura 2- Secções transversais do músculo tibial anterior após 48h da lesão por 5 perfuração (A e C) ou 10 perfurações em animais aos 3 meses de idade (A e B) e aos 11 meses de idade (C e D). Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina em magnitude de 20x.

ANEXO 2

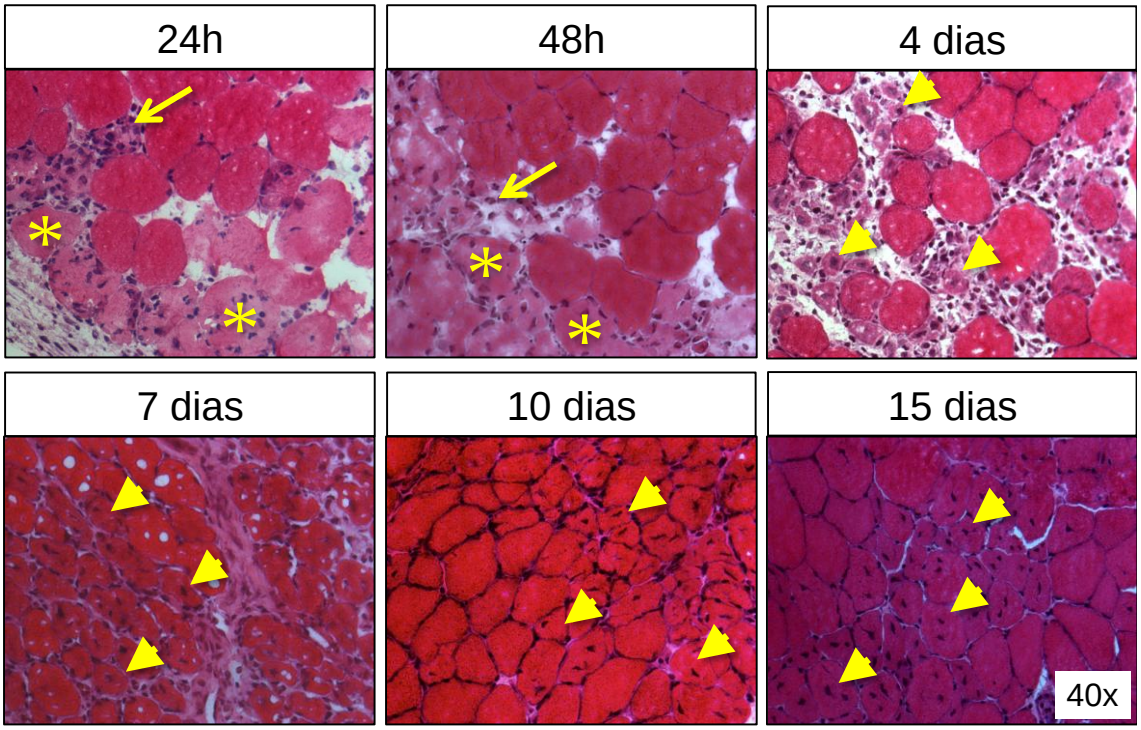

Figura 1 - Cortes histológicos corados com hematoxilina e Eosina em músculo tibial anterior de camundongos aos 3 meses de idade após 24h, 48h, 4, 7, 10 e 15 dias da lesão por 10 perfurações. As setas longas indicam infiltrados inflamatórios, os asteriscos fibras basofílicas e as setas curtas indicam fibras com o núcleo centralizado. Imagens adquiridas em 40x de magnificação.

ANEXO 3

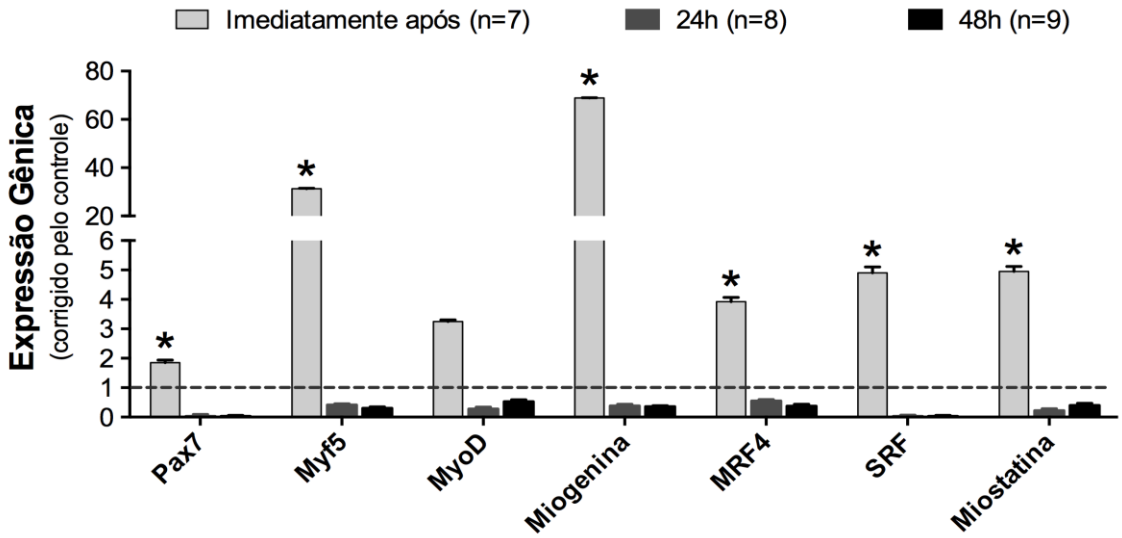

Figura 1- Expressão gênica de marcadores de regulação miogênica em músculo plantar de camundongos aos 5 meses de idade imediatamente, 24 e 48h após uma única sessão de exercício com carga progressiva até a exaustão. * $P \leq 0,05$ *vs.* 24 e 48h. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de *Tukey*.

ANEXO 5 - artigos publicados

Life Sciences 125 (2015) 9–14

Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Review article

Aerobic exercise training as therapy for cardiac and cancer cachexia

Christiano Robles Rodrigues Alves, Telma Fátima da Cunha, Nathalie Alves da Paixão, Patricia Chakur Brum *

School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 August 2014
Accepted 25 November 2014
Available online 10 December 2014

Keywords:
Heart failure
Myopathy
Muscle wasting
Muscle atrophy
Proteasome
Autophagy

ABSTRACT

Aerobic exercise training (AET) induces several skeletal muscle changes, improving aerobic exercise capacity and health. Conversely, to the positive effects of AET, the cachexia syndrome is characterized by skeletal muscle wasting. Cachexia is a multifactorial disorderassociated with other chronic diseases such as heart failure and cancer. In these diseases, an overactivation of ubiquitin–proteasome and autophagy systems associated with a reduction in protein synthesis culminates in severe skeletal muscle wasting and, in the last instance, patient's death. In contrast, AET may recycle and enhance many protein expression and enzyme activities, counteracting metabolism impairment and muscle atrophy. Therefore, the aim of the current review was to discuss the supposed therapeutic effects of AET on skeletal muscle wasting in both cardiac and cancer cachexia.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Hindawi Publishing Corporation
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Article ID 464195

Research Article

Increased Clearance of Reactive Aldehydes and Damaged Proteins in Hypertension-Induced Compensated Cardiac Hypertrophy: Impact of Exercise Training

Juliane Cruz Campos,[1] Tiago Fernandes,[2] Luiz Roberto Grassmann Bechara,[1] Nathalie Alves da Paixão,[2] Patricia Chakur Brum,[2] Edilamar Menezes de Oliveira,[2] and Julio Cesar Batista Ferreira[1]

[1] *Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, 05508-000 Sao Paulo, SP, Brazil*
[2] *School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, SP, Brazil*

Correspondence should be addressed to Julio Cesar Batista Ferreira; julocf@gmail.com

Received 8 December 2014; Revised 17 March 2015; Accepted 17 March 2015

Academic Editor: Gabriele Saretzki

Copyright © Juliane Cruz Campos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. We previously reported that exercise training (ET) facilitates the clearance of damaged proteins in heart failure. Here, we characterized the impact of ET on cardiac protein quality control during compensated ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Methods and Results.* SHR were randomly assigned into sedentary and swimming-trained groups. Sedentary SHR displayed cardiac hypertrophy with preserved ventricular function compared to normotensive rats, characterizing a compensated cardiac hypertrophy. Hypertensive rats presented signs of cardiac oxidative stress, depicted by increased lipid peroxidation. However, these changes were not followed by accumulation of lipid peroxidation-generated reactive aldehydes and damaged proteins. This scenario was explained, at least in part, by the increased catalytic activity of both aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) and proteasome. Of interest, ET exacerbated cardiac hypertrophy, improved ventricular function, induced resting bradycardia, and decreased blood pressure in SHR. These changes were accompanied by reduced cardiac oxidative stress and a consequent decrease in ALDH2 and proteasome activities, without affecting small chaperones levels and apoptosis in SHR. *Conclusion.* Increased cardiac ALDH2 and proteasomal activities counteract the deleterious effect of excessive oxidative stress in hypertension-induced compensated cardiac hypertrophy in rats. ET has a positive effect in reducing cardiac oxidative stress without affecting protein quality control.

1. Introduction

Hypertension affects 1.5 billion people worldwide and costs annually ~1 trillion dollars [1, 2]. Hypertension-induced cardiac hypertrophy represents a compensatory adaptation in response to pressure overload and results in preserved ventricular function at early stages. However, sustained pressure overload lately results in pathological cardiac remodeling and ventricular dysfunction and ultimately leads to heart failure [3]. Therefore, blocking the transition from early-stage cardiac hypertrophy to decompensated ventricular remodeling is a crucial step to reduce hypertension-related morbidity and mortality [4, 5].

Despite the growing knowledge regarding the molecular basis of hypertension pathophysiology, little is known about the protein quality control profile in hypertension-induced cardiac hypertrophy. The protein quality control plays a central role in the maintenance of cardiac homeostasis by detecting, repairing, and disposing cytotoxic damaged proteins [6]. We have previously demonstrated that pharmacological activation of protein quality control-related machinery protects against cardiac ischemia-reperfusion injury and heart failure in rodents [7, 8]. More recently, we showed that aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2), a mitochondrial enzyme responsible for the detoxification of reactive aldehydes, plays a key