

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU EM EDUCAÇÃO FÍSICA

EFEITOS DO ENVELHECIMENTO E DO TREINAMENTO DE FORÇA SOBRE A
MORFOLOGIA E VIAS DE SINALIZAÇÃO DE ATROFIA E HIPERTROFIA NOS
MÚSCULOS GASTROCNÊMIO E SÓLEO EM RATOS

Manoel Benício Teixeira Ribeiro

Brasília, DF

2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU EM EDUCAÇÃO FÍSICA

Manoel Benício Teixeira Ribeiro

EFEITOS DO ENVELHECIMENTO E DO TREINAMENTO DE FORÇA SOBRE A
MORFOLOGIA E VIAS DE SINALIZAÇÃO DE ATROFIA E HIPERTROFIA NOS
MÚSCULOS GASTROCNÊMIO E SÓLEO EM RATOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Educação
Física da Universidade de Brasília, como requisito
para a obtenção do grau de Mestre em
Educação Física.

Orientador: Prof^o Dr^o João Luiz Quagliotti Durigan
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Rosângela Vieira de Andrade

Brasília, DF

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BB467e Benício, Manoel Teixeira Ribeiro
Efeitos do envelhecimento e do treinamento de força sobre a morfologia e vias de sinalização de atrofia e hipertrofia nos músculos gastrocnêmio e sóleo em ratos / Manoel Teixeira Ribeiro Benício; orientador João Luiz Quagliotti Durigan; co-orientador Rosângela Vieira de Andrade. -- Brasília, 2015.
66 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Educação Física) -- Universidade de Brasília, 2015.

1. Expressão gênica. 2. Músculo esquelético. 3. Treinamento de Força. I. Quagliotti Durigan, João Luiz, orient. II. Vieira de Andrade, Rosângela, co orient. III. Título.

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Thereza Neumann Teixeira Ribeiro (In memorian) e a minha irmã Luciana Neumann Teixeira Ribeiro (In memorian) que sonharam comigo o Mestrado e o Doutorado, me incentivando a buscar e realizar meus sonhos.

À minha mãe, que me ensinou que a justiça e a retidão são as maiores virtudes do homem. Obrigado por ter me orientado. Sou eternamente grato por tudo.

À minha irmã Luciana, que com sua ingenuidade, carinho, força e superação me marcaram durante o período que passamos juntos.

Ao meu pai José Miguel Ribeiro (In memorian), que me ensinou que o trabalho e o dever com a família são as coisas mais importantes da vida.

AGRADECIMENTOS

Aos Deuses, Deus, Zeus, Odin, Thor, Kron e Hércules por me darem coragem e perseverança e me manter no caminho da força.

Ao meu irmão Elias, que muito cedo, aos 8 anos, me levou para o Ginásio e me mostrou que a Força era um caminho a seguir. Que há muitos anos se tornou minha grande paixão. Mesmo que a distância nos separe, sempre me lembrarei dos nossos treinos e serei eternamente grato.

À Luciana minha esposa. Desde o início me incentivou a estudar. Admiro a sua vontade de melhorar, responsabilidade e determinação. Tanto na minha Especialização quanto no Mestrado você me apoiou e me apoia nos momentos mais difíceis da minha vida. Agradeço pelo seu companheirismo.

À minha amiga Marcia Carvalho, agradeço por me fazer acreditar que as palavras do poeta são verdadeiras, “amigo é coisa para se guardar...”, em especial, por ter me ajudado em todas as fases experimentais e escrita do artigo e dissertação.

Ao amigo Fabrício Barin, que na minha chegada em Brasília, foi uma pessoa muito importante nos momentos de aprendizagem técnica, dúvidas, incertezas, raiva, frustração e desânimo, e mesmo assim, me apoiou com sua amizade. Sei que chegaremos à tão sonhada coroação.

Ao amigo Thiago e D. Ana, que abriram as portas de sua família e me receberam muito bem no início de minha vida em Brasília. Agradeço do fundo do coração ao que vocês fizeram por mim.

A Professora Maria José, que me incentivou a buscar cada vez mais conhecimento. Obrigado Professora por me mostrar como a Biologia Molecular é fascinante.

Ao Professor Jonato Prestes, que com sua experiência me incentivou a buscar mais respostas a respeito do Treinamento de Força e a me aperfeiçoar na área. Admiro muito você Professor. Obrigado por compartilhar conhecimento e por sempre ser muito acessível.

Ao meu orientador, professor João Durigan, por ter me aceito. Admiro muito a sua dedicação e competência. Obrigado por me ensinar que o Mestrado e o Doutorado vão muito além dos portões da Academia.

À professora Rita Marqueti. Obrigado pela paciência ao ensinar, falar e lidar comigo. Sempre com palavras de incentivo e motivação, nunca se esquecendo da responsabilidade e o alto rendimento acadêmico.

À professora Rosângela Andrade, por ter me co-orientado, aberto as portas da Genômica e me incentivado ao longo deste processo. Obrigado pela disponibilidade e confiança em mim depositado.

Ao professor Octávio Franco, agradeço imensamente por ter aberto as portas do Laboratório de Proteômica e ter me recebido com tamanho respeito e amizade.

Obrigado ao Professor Ludovico Migliolo pelo conhecimento, amizade e conselhos nos momentos de fúria.

Meu muito obrigado ao Professor Jeeser Almeida. “Sensei” agradeço pela paciência, simplicidade, calma, bom humor e competência, que me motivaram a seguir rumo aos meus objetivos. Tenho você como modelo de Profissional e Ser Humano.

Agradeço também aos colegas do Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília, Nelson Júnior, Mirna, Ana Paula, Stela, Flávia Dutra e Daniel “Dan” por terem me recebido no Laboratório com amizade e respeito. Agradeço em especial à Vivian Miranda, por ter me ajudado e orientado em todas as fases experimentais, e ter refinado a minha técnica nos caminhos delicados do PCR. Obrigado por tudo. Sinto-me honrado por fazer parte desse grupo.

Aos técnicos do laboratório da Universidade Católica de Brasília, Davi e Adeilton, em especial a Kênia pela simpatia, disponibilidade e belas canções. Obrigado por fazerem do meu tempo na Universidade, produtivo e prazeroso.

Aos membros da banca, professores Ricardo, Jonato e Gracielle, os quais aceitaram o convite. Estou certo que contribuirão muito com o presente trabalho.

Obrigado à CAPES pelo apoio concedido.

À todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente de mais essa conquista.

EPÍGRAFE

“Eu pertenço ao guerreiro que uniu o velho estilo ao novo”

The Last Samurai

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE SIGLAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Características gerais do músculo esquelético.....	16
2.2 Alterações do músculo esquelético decorrentes do processo de envelhecimento.....	18
2.3 Vias de Sinalização de Atrofia e Sarcopenia.....	20
2.4 Vias de Sinalização de Hipertrofia Muscular.....	23
2.5 Treinamento de Força no Envelhecimento.....	23
3. OBJETIVO.....	27
4. HIPÓTESE.....	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1 Animais.....	29
5.2 Grupos Experimentais.....	29
5.3 Treinamento de Força.....	29
5.4 Eutanásia de animais, retirada e armazenamento dos músculos....	30
5.5 Análise Histológica.....	31
5.6 Extração de RNA Total.....	31
5.7 Análise da Qualidade e Quantificação das amostras.....	33
5.8 Espectrofotômetro.....	34
5.9 Qualidade do Gel de Agarose 1%.....	34
5.10. Tratamento com DNase.....	35
5.11 qPCR (Transcriptase Reversa) Síntese de cDNA.....	35
5.12 Real Time PCR.....	36
5.13 Primers.....	37
5.14 Análise Histológica.....	38
5.15 Análise Estatística.....	38

6. RESULTADOS.....	39
6.1 Peso Corporal.....	39
6.2 Área de Secção Transversa.....	39
6.3 Nível de RNA.....	41
6.3.1 Gastrocnêmio.....	41
6.3.2 Sóleo.....	42
7. DISCUSSÃO.....	45
8. CONCLUSÃO.....	55
9. REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência Iniciadora de PCR definida. Primers senso e antisenso. As sequências dos iniciadores foram acessada no GenBank. Tm de 60 ° C.

Tabela 2. Peso corporal entre os grupos: médias de peso corporal de Jovem Sedentário (J), Jovem Treinado (JT), Senil Sedentário (S) e Senil Treinado grupos (ST) no início e após a conclusão do treinamento de força. Diferença de peso entre os grupos na fase inicial: J * significativamente diferente ($p < 0,05$); † JT significativamente diferente ($p < 0,05$); # S significativamente diferente ($p < 0,05$). Diferença de peso entre os grupos na fase final: nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$). O peso corporal inicial e final. Os dados foram expressos como média e desvio padrão (SD). a inicial J significativamente diferente ($p < 0,05$); b JT inicial significativamente diferente ($p < 0,05$); c S inicial significativamente diferente ($p < 0,05$); d ST inicial significativamente diferente ($p < 0,05$). Ganho (%) diferente peso e última inicial. O peso médio dos músculos: gastrocnêmio e sóleo. J * significativamente diferente ($p < 0,05$). Área de secção transversal (AST) normalizado corrigido pelo peso corporal. Os dados foram expressos como média e desvio padrão (SD). J * significativamente diferente ($p < 0,05$); † JT significativamente diferente ($p < 0,05$); # S significativamente diferente ($p < 0,05$).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Padronização da extração de RNA total. A. Maceração do tecido muscular com almofariz e pistilo em N₂; B. Tecido muscular macerado, com aspecto de pó; C. Coleta do tecido macerado; D. Armazenamento do tecido macerado.

Figura 2. Eletroferograma a partir do Bioanalyzer 2100 para extração de RNA total do tecido muscular. Para obter uma amostra de RNA total de elevada qualidade, dois picos bem definidos, correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S deve ser observados, semelhante a um gel de agarose desnaturante.

Figura 3. Eletroforese em Gel de Agarose a 1%. Bandas 18S e 28S de amostra de gel padrão após tratamento com DNase.

Figura 4. A Gastrocnêmio. B Sóleo. Níveis de mRNA expresso em unidades arbitrárias para os músculos gastrocnêmio e sóleo. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. Os grupos experimentais foram representados como Jovens Sedentários (J), o Jovem Treinado (JT), Senil Sedentário (S) e Senil Treinado (ST) a partir das seguintes genes: TNF- α , TWEAK, Fn14, FoxO1, Atrogina-1, MuRF1, Miostatina, IGF-1, mTOR, p70S6K-1, MyoD e RPLP0. a = p <0,05: comparação com o grupo J; b = p <0,05: comparação com o grupo JT; c = p <0,05: comparação com o grupo S.

Figura 5. Envolvimento das principais vias que controlam o equilíbrio entre síntese e degradação de proteínas musculares, reguladas pelo envelhecimento e TF. A. Gastrocnemius, B. Soleus: \approx não houve diferença na expressão dos marcadores de síntese e degradação de mioproteínas; \uparrow houve aumento na expressão; \downarrow diminuição na expressão. Os genes alvo são representados pelas siglas: fator de necrose tumoral- α (TNF α); fator de necrose tumoral indutor de apoptose (TWEAK); fator de crescimento de fibroblastos receptor indutível-14 (Fn14); fator de transcrição em forquilha (FoxO1); ubiquitina ligases (Atrogina-1); muscle ring finger1 (MuRF1); fator de crescimento e diferenciação (Miostatina); fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1); alvo de

rapamicina em mamíferos (mTOR); p70 S6 quinase-1 (p70S6K-1); fator de crescimento miogênico 1 (MyoD).

LISTA DE SIGLAS

TWEAK - fator de necrose tumoral indutor de apoptose

Fn14 - fator de crescimento de fibroblastos recetor indutível 14

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina-1

IRS - substrato responsivo à insulina

PI3K - fosfatidil inositol 3-quinase

Akt - serina treonina quinase

mTOR - alvo de rapamicina em mamíferos

p70S6K-1 - p70 peso molecular S6 quinase-1 proteína ribossômica S6.

TNF α - fator de necrose tumoral- α

Myostatin - fator de crescimento e diferenciação

TGF β - fator crescimento transformante- β

MyoD - fator de crescimento miogênico 1

FoxO1 - fatores de transcrição em forquilha

Atrogina-1 - ubiquitina ligase

MuRF1 - Muscle RING Finger 1

NF κ β - fator de modulação nuclear- κ β

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

RPLP0 - proteína ribossomal grande P0 ribossômica

RESUMO

Introdução: A sarcopenia é associada ao declínio progressivo de massa muscular, força e qualidade de contração, como resultado da diminuição da síntese e aumento da degradação de mioproteínas durante o envelhecimento biológico. O Treinamento de Força (TF) é indicado para minimizar os efeitos deletérios inerentes ao envelhecimento, como a sarcopenia, promovendo mudanças intracelulares que levam a hipertrofia, aumento de força e função muscular. O conhecimento das alterações moleculares após o TF em um modelo de envelhecimento é pouco estudado. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do TF, sobre a expressão de mRNA e fatores relacionados com a atrofia e hipertrofia e na AST das fibras musculares dos músculos gastrocnêmio e sóleo em ratos idosos. **Metodologia:** Vinte e quatro *Rattus Norvegicus* foram divididos em 4 grupos: jovem sedentário (J), jovem treinado (JT), senil sedentário (S) e senil treinado (ST). Durante 12 semanas os ratos foram treinados no protocolo de TF de subida de escada vertical com pesos anexados à cauda. As sessões de treinamento consistiram em quatro subidas na escada com 65, 85, 95 e 100% da capacidade máxima de carregamento do rato, conforme determinado na sessão anterior. Após 48 horas, os músculos gastrocnêmio e sóleo foram extraídos e divididos para análise de PCR em Tempo Real e AST. **Resultados:** O envelhecimento aumentou as citocinas inflamatórias como TNF α em ambos os músculos, porém sem modificação do TWEAK no gastrocnêmio. Os atrogenes e miostatina também aumentaram ($p < 0,05$). O eixo IGF-1/mTOR/p70S6K-1 foi reduzido no musculo gastrocnêmio ($p < 0,05$). Para o sóleo não houve diferença. No músculo gastrocnêmio o Fn14 aumentou ($p < 0,05$) e no sóleo houve redução ($p < 0,05$). MyoD aumentou no gastrocnêmio ($p < 0,05$) e no sóleo não apresentou diferença. Para as citocinas TNF α e TWEAK houve aumento no músculo gastrocnêmio ($p < 0,05$) e no sóleo não houve diferença modulados pelo TF. O eixo IGF-1/mTOR/p70S6K e o MyoD no gastrocnêmio e sóleo aumentou ($p < 0,05$). Nós observamos redução na AST para ambos os músculos no envelhecimento ($p < 0,05$), porém no TF houve um aumento da AST ($p < 0,05$). **Conclusão:** O TF minimizou a redução da AST por meio do aumento dos níveis de mRNA relacionados a fatores de síntese proteica, redução de atrogenes e citocinas nos músculos gastrocnêmio e sóleo em ratos idosos. As alterações no tamanho das fibras musculares, a modulação das vias de síntese e degradação nos músculos estudados, demonstraram a importância do TF como estratégia para reduzir os efeitos deletérios inerentes ao envelhecimento biológico.

Palavras - chave: Expressão gênica. Músculo esquelético. Treinamento de força.

ABSTRACT

Background: Sarcopenia is associated with a progressive decline in muscle mass, strength and quality of contraction as a result of decreased synthesis and increased myoprotein degradation during biological aging. Strength training (ST) has been indicated to minimize the deleterious effects inherent to aging, such as sarcopenia, promoting intracellular changes that lead to hypertrophy, increasing strength and function. Knowledge of molecular changes after ST in an aging model has been little studied. **Purpose:** This study aimed to evaluate the effects of ST in mRNA levels of factors related to atrophy and hypertrophy and cross sectional area (CSA) of the muscle fibers in the gastrocnemius and soleus muscles in aged rats. **Methods:** Twenty-four Wistar rats divided into 4 groups: young sedentary (YS), young trained (YT), old sedentary (OS) and old trained (OT). For 12 weeks, the mice were trained using a ST protocol consisting of a vertical ladder climb with weights attached to the tail. Training sessions consisted of four climbs on the ladder with 65, 85, 95 and 100% of the maximum rat loading capacity as determined in the previous session. After 48 hours, the gastrocnemius and soleus muscles were extracted and separated for Real-Time PCR analysis and CSA measurement. **Results:** Aging increased inflammatory cytokines such as TNF α in both muscles, but without modifying TWEAK in the gastrocnemius. Atrogenes and Myostatin also increased ($p < 0.05$). The IGF-1 / mTOR / p70S6K-1 axis was reduced in the gastrocnemius muscle ($p < 0.05$). However, for the soleus no difference was observed. In the gastrocnemius muscle Fn14 increased ($p < 0.05$) and the soleus was reduced ($p < 0.05$). MyoD increased in the gastrocnemius ($p < 0.05$) yet the soleus presented no difference. For the TNF α and TWEAK cytokines there was an increase in the gastrocnemius muscle ($p < 0.05$), yet in the soleus no difference was observed after ST. The IGF-1 / mTOR / p70S6K-1 axis and MyoD increased in the gastrocnemius and soleus ($p < 0.05$). We observed a reduction in CSA for both muscles in aging ($p < 0.05$), however, there was an increase in CSA after ST ($p < 0.05$). **Conclusion:** ST minimized the reduction of AST through increased mRNA levels related to protein synthesis factors, and reduced cytokines and atrogenes in the gastrocnemius and soleus muscle in aged rats. Changes in the size of muscle fibers, synthesis modulation and degradation pathways in the muscles studied demonstrated the importance of ST as a strategy to reduce the deleterious effects inherent to biological aging.

Key - words: Gene expression. Skeletal muscle. Strength training.

1. INTRODUÇÃO

A sarcopenia é associada ao declínio progressivo de massa muscular, força e qualidade de contração, como resultado da diminuição da síntese e aumento da degradação de mioproteínas durante o envelhecimento biológico (40,80,100). Ocorre ainda redução da área de secção transversa (AST) das fibras musculares e da quantidade das fibras, em especial as de contração rápida (tipo II) (22,58,72,81). Essas modificações são iniciadas pela sinalização de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF α), fator de necrose tumoral indutor de apoptose (TWEAK) e seu receptor, o fator de crescimento de fibroblastos receptor indutível-14 (Fn14) membros da superfamília fator necrose tumoral (TNF) (25,26,84). Por consequência, ocorre aumento da expressão de duas ubiquitinas ligases Atrogina-1 e muscle ring finger1 (MuRF1) modulado pelo fator de transcrição em forquilha1 (FoxO1) para a degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina proteassoma (SUP) (28,103,109).

Não obstante o estímulo de síntese proteica muscular é sinalizado pelo fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), que através do seu receptor insulínico (IRS) ativará o alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) e a p70S6 quinase-1 (p70S6K-1), conhecida como o eixo IGF-1/mTOR/p70S6K-1, um potente estimulador da síntese proteica (5,16,115). IGF-1 também estimula a proliferação, a diferenciação e a fusão das células satélites (CS) durante o processo de síntese proteica (124). As CSs são reguladas pelos fatores regulatórios miogênicos (MRFs), como a fator de crescimento miogênico 1 (MyoD) e o fator de crescimento miogênico 5 (Myf5) que ativam as CSs para a sua diferenciação em mioblastos, enquanto a Miogenina e o fatores regulatórios miogênicos 4 (MRF4) promovem a maturação da fibra muscular (124). Outro fator que controla a massa muscular é a miostatina, um membro da família fator de crescimento transformante- β (TGF- β), tanto no período embrionário como no músculo já desenvolvido, sendo correlacionado com a perda de massa muscular durante o envelhecimento (12,13,57,123,126). Interessantemente, quando as vias da atrofia muscular estiverem ativadas, a sinalização mediada pelo IGF-1/mTOR/ p70S6K-1 estará reduzida, permitindo FoxO1 sinalizar para a ativação de Atrogina-1 e MuRF1. Além disso, as

citocinas TNF α , eixo TWEAK/Fn14 e miostatina são reguladores do crescimento muscular expressos no envelhecimento e participam do equilíbrio dessas vias (64). Desse modo, foi analisado fatores-chaves relacionados a síntese e degradação proteica com intuito de estabelecer a inter-relação entre as vias de hipertrofia e atrofia muscular durante o envelhecimento, bem como estudar os efeitos do treinamento de força (TF) sobre esse processo.

O TF é a estratégia terapêutica amplamente recomendada para minimizar a perda da massa muscular, força e função relacionada com a idade (80). Uma recente revisão sistemática com meta-análise confirmou que até mesmo os idosos acima de 75 anos, podem desenvolver hipertrofia muscular e aumentar a força muscular em resposta ao TF (110). Outro recente estudo demonstrou que idosos treinados (>65anos), (3 x por semana, durante 12 semanas) com progressão de carga, aumentaram a AST das fibras do tipo de fibra I e II, além da força e função muscular (14). Alguns estudos têm fornecido dados de microarranjos mais completos relacionados a regulação da expressão genica após TF durante o envelhecimento. Raue e colaboradores (2012) demonstraram que 661 genes responderam ao TF e estavam relacionados com o aumento da massa muscular, assim como Phillips et al, 2013 também mostraram modulação de 580 genes através de análise transcriptômica em idosos e jovens após 20 semanas de TF. A interpretação biológica dos genes responsivos ao TF mostraram evidência de um estímulo anabólico, que suportam as adaptações fisiológicas tipicamente observado no músculo envelhecido após TF. Apesar destes dados, nenhum estudo investigou as principais vias de sinalização relacionadas com a hipertrofia e a atrofia, com base molecular para minimizar a perda de massa muscular promovida pela sarcopenia e o impacto do TF no músculo envelhecido. Além disso, tivemos como objetivo investigar o eixo TWEAK/Fn14, a fim de descrever o seu papel na regulação da massa muscular no envelhecimento e após o TF.

Com base nestes resultados prévios, nos hipotetizamos que o TF pode amenizar os efeitos prejudiciais inerentes à sarcopenia, por meio do aumento da expressão de fatores relacionados com a hipertrofia (IGF-1/mTOR/p70S6K-1 e MyoD) e redução dos fatores associados à atrofia (FoxO1, Atrogin-1, MuRF1, miostatina e as citocinas TNF α e o eixo TWEAK/Fn14) que culminará no aumento da AST das fibras musculares. Portanto, o objetivo deste estudo foi

avaliar os efeitos da TF, nos níveis de mRNA de fatores relacionados com a atrofia e hipertrofia e na AST das fibras musculares dos músculos gastrocnêmio e sóleo em ratos idosos. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou as vias moleculares sobre os níveis de mRNA envolvidos nas adaptações musculares após TF crônico em um modelo de envelhecimento biológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais do músculo estriado esquelético

O músculo estriado esquelético forma o maior tecido presente nos vertebrados e está envolvido na locomoção, postura e movimentos respiratórios (53). O músculo esquelético é descrito como estriado devido à alternância das bandas claras e escuras, ou estriações, criada pelo padrão de sobreposição dos filamentos protéicos citoplasmáticos que causam a contração muscular (101).

Os parâmetros mais importantes que determinam as propriedades funcionais do músculo são arquitetura e composição do tipo de fibra. A arquitetura do músculo esquelético é definida pelo arranjo das fibras do músculo em relação ao eixo de geração da força. Já o tipo de fibra muscular influencia na força contrátil, na velocidade máxima e no tempo para fadiga (32). Há uma série de artigos sobre os tipos de fibras orientados por várias disciplinas, como: fisiologia, histoquímica, bioquímica e microscopia eletrônica, mas a literatura é contraditória e confusa devido ao uso de diferentes critérios para essa classificação (31).

Nesse texto, classificaremos as fibras musculares por meio dos métodos de coloração, fisiologia, metabolismo e limiar de fadiga, descritos a seguir:

Coloração:

A coloração do músculo foi utilizada em um dos primeiros relatos documentados sobre a classificação das fibras musculares (86). Por esse método descobriu-se, então, que a maioria dos músculos de mamíferos é composta por dois tipos de fibras: as fibras vermelhas - usualmente finas, escuras e com muitas mitocôndrias e gotículas de gordura; e as fibras brancas - mais espessas, mais claras e com algumas mitocôndrias e gotículas de gordura.

Fisiologia:

A miosina possui múltiplas isoformas que contribuem para a diversidade funcional das fibras musculares. As maiores diferenças funcionais das

isoformas da miosina residem na porção da cadeia pesada da molécula (MHC) (86).

A MHC é a porção da cabeça da molécula de miosina que determina a velocidade da reação das pontes cruzadas da miosina com os filamentos de actina e, conseqüentemente, a velocidade de contração muscular. De acordo com as principais isoformas de MHC encontradas no músculo esquelético de mamíferos, existem os seguintes tipos de fibras puras: uma fibra lenta tipo I com MHCII β e duas fibras rápidas chamadas tipo IIA com MHCIIa e tipo IIB com MHCIIb e MHCIIx (86).

Um método útil para o traçado dos tipos de fibras musculares nessa classificação é a histoquímica adenosina trifosfatase miofibrilar (mATPase), pois a ATPase na qual a atividade é analisada está associada com a cabeça globular da cadeia pesada da miosina e, conseqüentemente, com a velocidade de contração, permitindo a correlação dos tipos de fibras com os perfis específicos da MHC (86).

Metabolismo:

Toda energia necessária para as funções celulares, incluindo atividade contrátil, é fornecida pela hidrólise de ATP para ADP e Pi (fosfato inorgânico). Esse consumo de ATP varia com o tipo de fibra e, por isso, são necessários mecanismos rápidos e eficientes para a sua resíntese. Existem três desses mecanismos nas fibras musculares: atividade creatina quinase (CK), glicólise e fosforilação oxidativa mitocondrial (101).

A CK é associada a fosfocreatina (PCr) que serve como reserva de fosfato de alta energia para rápida regeneração do ATP evitando, assim, acúmulo ADP. Esse sistema PCr-CK possui alta potência e baixa capacidade de regenerar o ATP. Já a glicólise é responsável pelo metabolismo do glicogênio e da glicose produzindo piruvato e lactato e representa uma segunda fonte de ATP com baixa potência, mas grande capacidade quando comparada com o sistema PCr-CK. A fosforilação oxidativa mitocondrial é caracterizada por uma potência ainda mais baixa, mas uma grande capacidade na regeneração do ATP. Esse processo utiliza Acetil-CoA como substrato fornecido pelo piruvato, ácidos graxos e corpos cetônicos (101).

As fibras são então separadas, nessa classificação, pelo tipo de metabolismo capaz de realizarem, onde algumas geram a maior parte do ATP por meio do processo mitocondrial oxidativo; outras através do processo glicolítico; e as intermediárias por ambos os mecanismos. O tipo de metabolismo utilizado pelas fibras musculares foi associado à velocidade de contração, baseado nas propriedades bioquímicas, onde essas foram, então, classificadas como fibras lentas e oxidativas, fibras rápidas glicolítica oxidativa e fibras rápidas glicolíticas (104).

2.2 Alterações no músculo esquelético decorrentes do processo de envelhecimento

O envelhecimento representa um processo complexo e inevitável caracterizado pela diminuição das funções fisiológicas e bioquímicas dos principais sistemas, além de alterações morfológicas e celulares (27,43,108). O músculo esquelético pode ser considerado o maior órgão do corpo e, no processo de envelhecimento, está associado com perda de massa, força e função, além do aumento da concentração de colágeno e presença de ligações cruzadas entre as fibras de colágeno (cross-link) na matriz extracelular (MEC) (27,61). Além disso, o envelhecimento associa-se ao declínio fisiológico dos sistemas cardiovascular e neuromuscular, levando a diminuição da capacidade e performance das atividades diárias (1).

O déficit de massa e força muscular, conhecido como sarcopenia, prejudica a qualidade de vida do idoso e os predispõe ao aumento dos riscos de morbidade, invalidez e mortalidade (40,56). O termo sarcopenia origina-se da palavra grega *sarx* (*flesh*, tecido, carne) and *penia* (*loss*, perda) (75). Esse termo é adotado clinicamente para denotar perda de massa muscular e é comumente usado para descrever condições como desnervação, disfunção mitocondrial, alterações inflamatórias, alterações hormonais, diminuição da força muscular, diminuição da mobilidade e função, aumento da fadiga e risco de quedas. Tal como a osteoporose, a sarcopenia tem sido reconhecida como uma condição de diagnóstico definitivo (11,80). Após os 50 anos de idade, há uma progressiva diminuição da massa muscular a uma taxa de 1-2% ao ano. Similarmente, a força muscular também diminui 3% ao ano após os 60 anos de

idade enquanto a AST do músculo esquelético é reduzido cerca de 25-30% ao ano após os 70 (27).

Essa perda de massa muscular está relacionada com a diminuição no número e atrofia das fibras musculares, principalmente das fibras tipo II, e com mudanças na qualidade do músculo, como substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo e adiposo e diminuição da quantidade de Ca^{2+} intramuscular (36,45,108).

A alteração na quantidade e no tipo de fibra ocorre devido ao aumento do número de fibras por unidade motora. Dessa forma, ocorre transformação das fibras musculares onde há transição da fibra muscular do tipo IIA para o tipo I, assim, a quantidade de fibras rápidas diminui e as fibras lentas aumentam (70,104).

Estudos mostraram que, tanto nos músculos de contração rápida, como nos de lenta, o conteúdo de colágeno insolúvel aumenta em ratos entre cinco e 25 meses de idade. Esse aumento, afeta tanto o colágeno tipo I, responsável por formar fortes fibras paralelas e conferir resistência ao tecido, quanto o tipo III, responsável por formar uma malha de fibras mais frouxa e dar conformidade ao mesmo, e ocorre devido redução da degradação da fibra colágena e da redução na taxa de síntese do colágeno (60). Além do aumento das fibras de colágeno, também ocorre aumento de *cross-link* dentro e entre as fibrilas, durante o envelhecimento. A presença de altos níveis desses *cross-link* torna as fibras frágeis aumentando a rigidez e diminuindo a força tênsil muscular (61).

As consequências de todas essas alterações envolvem redução da atividade contrátil, atrofia progressiva e perda de fibras musculares individuais causando diminuição na produção da força muscular, além da diminuição da reserva biológica e diminuição da resistência ao estresse, colocando os indivíduos mais velhos em risco. Essas mudanças associadas ao envelhecimento causam e/ou exacerbam os problemas de saúde relacionados com a idade (9).

2.3 Vias de sinalização da atrofia muscular e sarcopenia

O TNF α é expresso na membrana citoplasmática do macrófago, sua principal função é promover a resposta imune, por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. Constitui-se no principal mediador da resposta inflamatória aguda e atua nas células endoteliais, bem como, ativa a expressão de novos receptores celulares, que irão promover a adesão de neutrófilos, monócitos e linfócitos. Também estimula as células endoteliais a secretarem as quimiocinas com ação quimiotática sobre os leucócitos. Está bem estabelecido que a ativação das vias de atrofia no músculo esquelético em condições desuso, tem mostrado ação de citocinas pró-inflamatórias tradicionalmente sugeridas como os mediadores do músculo esquelético em várias condições como doenças crônicas. Nesse contexto, o TNF α induz atrofia muscular em vários modelos experimentais, tais como atrofia por desuso, desnervação, bem como em situações de doenças crônicas (35). Porém, pouco se sabe do papel do TNF α como sinalizador da atrofia muscular no envelhecimento, especialmente sua modulação pelo treinamento de força.

Recentemente, outra citocina inflamatória indutora de apoptose denominada TWEAK foi considerada como importante mediador de atrofia do músculo esquelético, em condições de desuso e desnervação. A expressão do receptor Fn14 foi aumentada cerca de 6 a 7 vezes no músculo esquelético 4 dias após a desnervação. O papel do sistema de TWEAK/Fn14 envolve a via de sinalização de NF- κ B, a expressão de MuRF1 que culmina na ativação do SUP e assim leva a proteólise muscular (3,66). TWEAK parece ser a primeira citocina envolvida na perda de massa muscular em condições de desuso. No presente estudo, analisamos o conhecimento atual e discutiremos os mecanismos pelos quais o sistema TWEAK/Fn14 regula a atrofia dos músculos sóleo e gastrocnêmio em ratos idosos. Até onde sabemos, o estudo do TWEAK em idosos treinados é ainda pouco estudado na literatura.

O eixo TWEAK/Fn14 parece estar envolvido na sarcopenia, tanto em humanos como em ratos (94,95). O Fn14 foi esta relacionado com a degradação muscular no envelhecimento (5,18). Sugere-se que TWEAK/Fn14 tem um papel na regulação da massa muscular durante o envelhecimento,

mostrando que a expressão de Fn14 é aumentada significativamente no músculo com o avançar da idade. Além disso, o eixo TWEAK/Fn14 pode estar relacionado a filotipagem das fibras musculares do gastrocnêmio e soleo (111), e, mesmo quando seu receptor Fn14 está suprimido, o TWEAK também pode sinalizar genes nas vias de atrofia como MuRF1 e Atrogina-1 (78).

Considerando que no envelhecimento ocorre atrofia e fraqueza no músculo esquelético, será muito importante conhecer os mecanismos e vias de sinalização envolvidas nesse processo. Poucos estudos abordaram as vias de sinalização envolvidas nesse processo. Um aspecto de extrema relevância é verificar se o TWEAK está envolvido nas vias de sinalização, bem como caracterizar o seu papel modulatório no processo de atrofia no envelhecimento. Além disso, descrever as vias de atrofia será necessário para entender como o treinamento de força as modulam na degradação proteica (78).

O FoxO1, quando fosforilado, permanece no citosol, sendo incapaz de transcrever genes envolvidos no processo de atrofia muscular. Por outro lado, em situações de atrofia muscular, a diminuição da via de sinalização da Akt permite a transcrição da Atrogina-1 e MuRF1 (64).

De forma interessante, quando as vias da atrofia muscular estiverem ativadas, a sinalização mediada pelo IGF-1 estará reduzida, fato que diminui a sinalização da serina-treonina-quinase (Akt) e permite o FoxO1 ativar os genes de atrofia. Dessa forma, há uma inter-relação entre as vias de hipertrofia e atrofia muscular, fato que modula a transcrição gênica envolvida no trofismo muscular em resposta a demanda de trabalho no sistema músculo esquelético (4, 64,96,102).

A Atrogina-1 é um gene fortemente ativado em músculos que passam por processos de atrofia das mais variáveis etiologias como câncer, imobilização, caquexia e desnervação (65). Essa atrofia muscular está relacionada a um sistema de proteólise chamado ubiquitina/proteassoma (64,65). O envolvimento da via ubiquitina-proteassoma na atrofia do músculo esquelético está bem estabelecido: os níveis de mRNA de genes que codificam componentes distintos dessa via encontram-se aumentados no músculo em condições desuso (64, 4); enquanto a inibição da via proteossoma bloqueia os níveis aumentados da proteólise durante a atrofia (59,60).

Atrogina-1 é constituída por um domínio F-box, o qual caracteriza uma classe de proteínas ubiquitina-ligases (E3) (44). Atrogina-1 desempenha papel primordial na ligação da proteína que será ubiquitinada e degradada (65). Deste modo, a Atrogina-1 é conhecida como uma proteína nuclear regulatória, de fundamental importância no mecanismo de diminuição da síntese e aumento da degradação de proteínas, no músculo esquelético em processo de atrofia (126).

Além da via de degradação de mioproteínas pela Atrogina-1, outra proteína ubiquitina-ligase E3 chamada MuRF1 também exerce papel de destaque na quebra de proteínas (4). Os membros da família MuRF foram encontrados associados a componentes miofibrilares, como a titina na linha M do sarcômero, sendo estes componentes possíveis alvos da degradação pela MuRF1 no músculo esquelético. Interessantemente, tanto a atrogina-1 como o MuRF1 são expressos seletivamente no tecido muscular (cardíaco e esquelético) de humanos e ratos, indicando uma importante função na adaptação destes tecidos (4). Dessa forma, sabendo-se da importância da via ubiquitina-proteassoma como mediadora da atrofia muscular, esse projeto irá avaliar os genes MuRF1 e a atrogina-1 como marcadores precoces da atrofia muscular em ratos idosos.

A miostatina também exerce importante função no controle da massa muscular, tanto no período embrionário como no músculo já desenvolvido. Ela é também conhecida como fator de crescimento e diferenciação e é membro da superfamília TGF- β . Sabe-se que a inibição de sua expressão gera um expressivo aumento da massa muscular, causada pela combinação de hipertrofia e hiperplasia. Pelo fato dos níveis de expressão da miostatina estarem correlacionados à perda de massa muscular em diferentes situações como desuso (13) e desnervação (126), torna-se interessante também avaliar sua expressão no envelhecimento. Teoricamente, o aumento dos níveis de miostatina pode bloquear o eixo IGF-1/mTOR/p70S6K-1, reduzindo a via de síntese, culminando no aumento da degradação proteica, levando à diminuição da AST (64,105). O declínio dessas vias de sinalização está relacionado com as alterações deletérias na composição corporal e a função física com o envelhecimento (42).

2.4 Vias de sinalização de hipertrofia muscular

Nos períodos pré e pós-natal, o desenvolvimento dos tecidos é amplamente regulado pelo hormônio do crescimento (GH), produzido na hipófise, que por sua vez, induz a produção do IGF-1 pelo fígado. O IGF-1 é o mediador primário da maioria das respostas do hormônio GH em todos os tecidos (5). Ele se liga ao receptor insulínico no sarcolema que irá recrutar o IRS causando a ativação da fosfaditil-inositol 3 quinase (PI3K), que adiciona fosfato na Akt, tornando-a ativa para fosforilar o mTOR e a p70S6K-1 que atua como um potente estimulador da síntese protéica (5,16,115).

A Akt também tem um papel determinante na regulação da transcrição gênica por meio da inativação de FoxO1. O FoxO1 é um fator de transcrição responsável pela ativação de genes envolvidos com componentes do sistema proteolítico coordenado pelo SUP (46). As isoformas da proteína FoxO, quando fosforiladas pela Akt, permanecem seqüestradas no citosol, sendo incapazes de transcrever genes envolvidos no processo de hipotrofia muscular. Por outro lado, em situações de hipotrofia muscular, a diminuição da via de sinalização da Akt permite a transcrição da Atrogina-1 e MuRF1 pelo FoxO1 (64).

De forma interessante, quando as vias da hipotrofia muscular estiverem ativadas, a sinalização mediada pelo IGF-1 estará reduzida, fato que diminui a sinalização da Akt e permite a FoxO1 transcrever os genes de hipotrofia muscular. Dessa forma, há uma inter-relação entre as vias de hipertrofia e hipotrofia muscular, fato que modula a transcrição gênica envolvidos no trofismo muscular em resposta a demanda de trabalho no sistema músculo esquelético (64).

2.5 Treinamento de força no envelhecimento

O TF, também conhecido como treinamento contra-resistência ou treinamento com pesos, tornou-se uma das formas mais populares de exercícios para melhorar a aptidão física de um indivíduo e para o condicionamento de atletas. Esses termos têm sido utilizados para descrever um tipo de exercício que exige que a musculatura do corpo promova

movimentos dinâmicos ou isométricos contra a oposição de uma força geralmente exercida por algum tipo de equipamento (125).

O treinamento do músculo é tipicamente dividido em 2 categorias: resistência (endurance) ou força. O treinamento de resistência refere-se ao exercício direcionado à melhora da resistência (duração em que a pessoa pode permanecer em atividade física) e capacidade aeróbica, caracterizado por atividades com frequência diária, intensidade moderada a vigorosa e duração de, pelo menos, 30 minutos por dia (37,120). Já o TF está relacionado a exercícios direcionados à melhoria da capacidade de geração de força no músculo esquelético e, por isso, é considerado uma modalidade apropriada para alterar, diminuir ou reverter parcialmente algumas alterações fisiológicas que ocorrem no músculo esquelético durante o processo de envelhecimento (37,120).

O TF representa é, atualmente, a estratégia primária recomendada para prevenir e reverter a diminuição de massa muscular, força e função relacionada à idade (80). Atualmente as recomendações de órgãos de saúde pública para idosos (> 65 anos), tanto no Canadá quanto nos Estados Unidos prescrevem 150 minutos de atividade física aeróbica moderada a vigorosa por semana, com exercícios de força adicionais realizados duas vezes por semana (14).

Geralmente, em adultos jovens, o TF provoca maior aumento no tamanho das fibras do tipo II em comparação com o tipo Fibras I (2, 110) O estudo realizado por Mitchell et al., 2013, verificou que, em um período de 16 semanas de TF realizados por 23 adultos jovens, houve aumento da força para 1RM e aumento da área de secção trasnversa nos membros inferiores. Além disso, foi observado um aumento na fosforilação do IGF-1 e p70S6K e mudanças no conteúdo de proteína muscular correlacionada com a hipertrofia.

Porém, para que o treinamento de força seja eficaz em idosos é necessário um programa de treinamento específico. Mayer e colaboradores (2011), demonstraram que o treinamento de força com 3 séries de 8-12 repetições e intensidade de 70-85% de uma repetição máxima; frequência de 2-3 vezes por semana por, pelo menos, 8-12 semanas, otimizaria os efeitos benéficos do treinamento físico durante o processo de envelhecimento. Esse estudo confirmou a recomendação feita pelo American College of Sports Medicine em sua declaração oficial de 2009, que defende o programa de

treinamento, formado por 3 séries de 8-12 repetições com 60-80% de 1 RM, 1-3 minutos de descanso entre as séries e de 2-3 vezes por semana, para melhoria da força e hipertrofia em idosos (90).

Os benefícios do TF para população mais velha, foi estudada em uma recente revisão sistemática que confirmou que até mesmo os muito idosos (> 75 anos) mantêm a capacidade para a hipertrofia muscular e aumento da força de resposta ao exercício de treinamento (110). Especificamente, o treinamento de força tem sido mostrado para melhorar a força muscular de idosos contrariando os efeitos da sarcopenia (39,114). Foi relatado um aumento de 11% no meio da coxa na área de secção transversal após 12 semanas de treinamento de resistência 3 dias por semana 3 séries de oito repetições, dois minutos de intervalo com 80% de 1-repetição máximo (1RM) nos exercícios cadeira flexora e extensora em homens idosos (Frontera, 1988). Isto pode ser devido à hipertrofia da fibras musculares, tal como treinamento de força aumenta a síntese de proteína muscular, número de miofibrilas, actina e miosina, sarcoplasma e do tecido conjuntivo (33,122).

O treinamento de força pode, portanto, aumentar a força muscular durante o envelhecimento atuando nos seguintes fatores: aumento da área de secção transversa; melhora da função neural com aumento das unidades motoras; mudança na arquitetura muscular e adaptações no aumento dos metabolitos intramusculares (90).

O aumento da área de secção transversa do músculo ocorre devido a hipertrofia das fibras musculares, principalmente as do tipo II, causada pelo treinamento (108). Além disso, há uma alteração na distribuição dessas fibras onde o percentual de fibras tipo IIb diminui e de fibras tipo IIa aumenta devido conversão de um tipo de fibra para outra (17, 120). Essa conversão da fibra rápida fadigável para fibra lenta oxidativa, pode ser gerada pelos níveis de expressão das proteínas intracelulares que regulam a cinética do Ca^{2+} (41).

A MEC, do músculo esquelético, é conhecida por responder ao aumento da carga causado pelo treinamento de força, exercício agudo ou hipertrofia compensatória experimental por meio do aumento da expressão, síntese e acúmulo de colágeno I e III (112). Assim, a carga mecânica reduz os níveis de *cross-links*, fortemente presentes na MEC durante o processo de envelhecimento (como citado anteriormente), devido à orientação mais paralela

das fibras colágenas ao longo do eixo do estresse aplicado e ao aumento na taxa de deposição e degradação do colágeno, ou seja, aumento na taxa de “*turnover*” (47,60). A redução dos cross-links presentes na MEC promove, portanto, a diminuição na rigidez muscular e beneficia as propriedades mecânicas musculares no idoso (61).

3. OBJETIVO

Avaliar os efeitos do TF, nos níveis de mRNA nos fatores relacionados com a atrofia e hipertrofia e na AST das fibras musculares dos músculos gastrocnêmio e sóleo em ratos idosos.

4. HIPÓTESE

A hipótese do presente trabalho é que o TF pode amenizar os efeitos prejudiciais inerentes à sarcopenia, por meio do aumento da expressão de fatores relacionados com a hipertrofia (IGF-1/mTOR/p70S6K-1 e MyoD) e redução dos fatores associados à atrofia (FoxO1, Atrogina-1, MuRF1, Miostatina e as citosinas TNF α e o eixo TWEAK/Fn14) que culminará no aumento da AST das fibras musculares.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 28 ratos, *Wistar novergicus albinos* de 3 meses (jovens, n = 14) e 20 meses (senis, n = 14), provenientes do Biotério Central da UFSCAR (Universidade de São Carlos). Os ratos foram mantidos no Biotério Central da UFSCAR em temperatura ambiente, entre 22 e 24°C, com luz controlada em ciclo de 12 h (claro/escuro). A água e a comida foram administradas *ad libitum*. O experimento foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (National Research Council, 1996). Esse projeto, com a descrição minuciosa de todos os procedimentos, foi encaminhado a Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos.

5.2 Grupos experimentais

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (7 animais/grupo), na seguinte ordem: jovens (J); senis (S); jovens que realizarão o treinamento de força (JT); senis que realizarão o treinamento de força (ST).

5.3 Treinamento de força

O treinamento de força de 12 semanas foi realizado 3 vezes por semana. Inicialmente, os ratos foram adaptados ao protocolo de treinamento de força que exigiu que os animais escalassem uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2 cm, inclinação de 80°) com pesos presos as suas caudas. O tamanho da escada fez com que os animais realizassem 8-12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi preso na porção proximal da cauda com uma fita auto-adesiva. Com o aparato fixado à cauda, os ratos foram colocados na parte inferior da escada e familiarizados com a mesma. Quando necessário, um estímulo de pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento. No topo da escada os ratos alcançaram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram durante 2 minutos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem, voluntariamente, escalar três vezes

consecutivas e sem estímulo. Três dias após esta familiarização, a primeira sessão de treinamento consistiu de 4-8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas. A escalada inicial consistiu em carregar uma carga de 75% do peso corporal do animal. Em seguida, foi adicionado um peso de 30 g até uma carga com a qual o rato não conseguisse escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguiu progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento do rato para aquela sessão de treinamento. As sessões de treinamento consistiram de quatro escaladas na escada, 65%, 85%, 95% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subsequentes foram adicionados 30 g até que uma nova capacidade máxima de carregamento seja determinada. O protocolo de treinamento de força apresenta metodologia similar aos usados em humanos e foi adaptado de Hornerberg e Farrar (2004), de acordo com as necessidades do presente estudo.

5.4 Eutanásia dos animais, retirada e armazenamento dos músculos

Peso corporal inicial foi registrado em gramas antes do treino de força e peso corporal final foi registrada 48 horas após a última sessão de treinamento. As médias foram calculadas para todos os grupos como mostrado na Tabela 2.

Após 48h do término do período experimental, todos os procedimentos experimentais foram realizados com os animais anestesiados, utilizando injeção intraperitoneal de solução de xilazina (12mg/kg/peso corporal) e quetamina (95 mg/kg/peso corporal). Os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com as patas presas e mantidas em extensão, para assim efetuar a retirada dos músculos gastrocnêmio e sóleo.

Utilizamos, neste estudo, o músculo sóleo cuja composição é predominantemente de fibras lentas (tipo I) e intermediárias (tipo IIa) e o músculo gastrocnêmio cuja composição é predominantemente de fibras rápidas (tipo IIb), facilitando a visualização das alterações nos três tipos de fibras durante o envelhecimento e após o treinamento de força (Eng, 2008). Os

músculos da pata posterior direita de cada animal foram separados em porções proximais e distais, depois de removidas, as amostras foram transportadas em nitrogênio líquido e armazenadas à temperatura de -80°C . Neste estudo, foram utilizadas as porções proximais para a histologia e a distal para o ensaio de PCR em tempo real.

5.5 Análise histológica

Cortes histológicos transversais ($10\ \mu\text{m}$) a partir do meio de cada músculo gastrocnêmio e sóleo foram obtidos em criostato (Micron HE 505, Jena, Alemanha), coradas com Touluidine Azul / 1% de bórax (TB) e acessado por microscopia de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) para avaliar a morfologia muscular geral. Fotos de cinco regiões diferentes foram obtidas utilizando um microscópio de luz equipada com uma câmera digital (Sony DSC S75, Tóquio, Japão) foram feitas para acessar a área da seção transversal da fibra muscular (AST). A AST de 100 fibras escolhidos aleatoriamente a partir de cada imagem foi medido utilizando o software Axiovision 3.0.6 SP4 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), totalizando 600 fibras musculares por animal. Em seguida, a normalização destes valores foi realizada calculando a média da área da seção transversal e dividindo pelo peso do corpo de cada animal (AST / peso corporal).

5.6 Extração de RNA total

Para extração do RNA total foi utilizado o mecanismo manual de maceração tecidual com almofariz e pistilo em nitrogênio líquido (N_2). O objetivo dessa maceração é obter um produto de granulação menor possível semelhante a um “pó” que garanta o rompimento das células. O uso de almofariz e pistilo é uma técnica amplamente utilizada em laboratórios para ruptura de diversos tecidos tanto vegetal quanto animal.

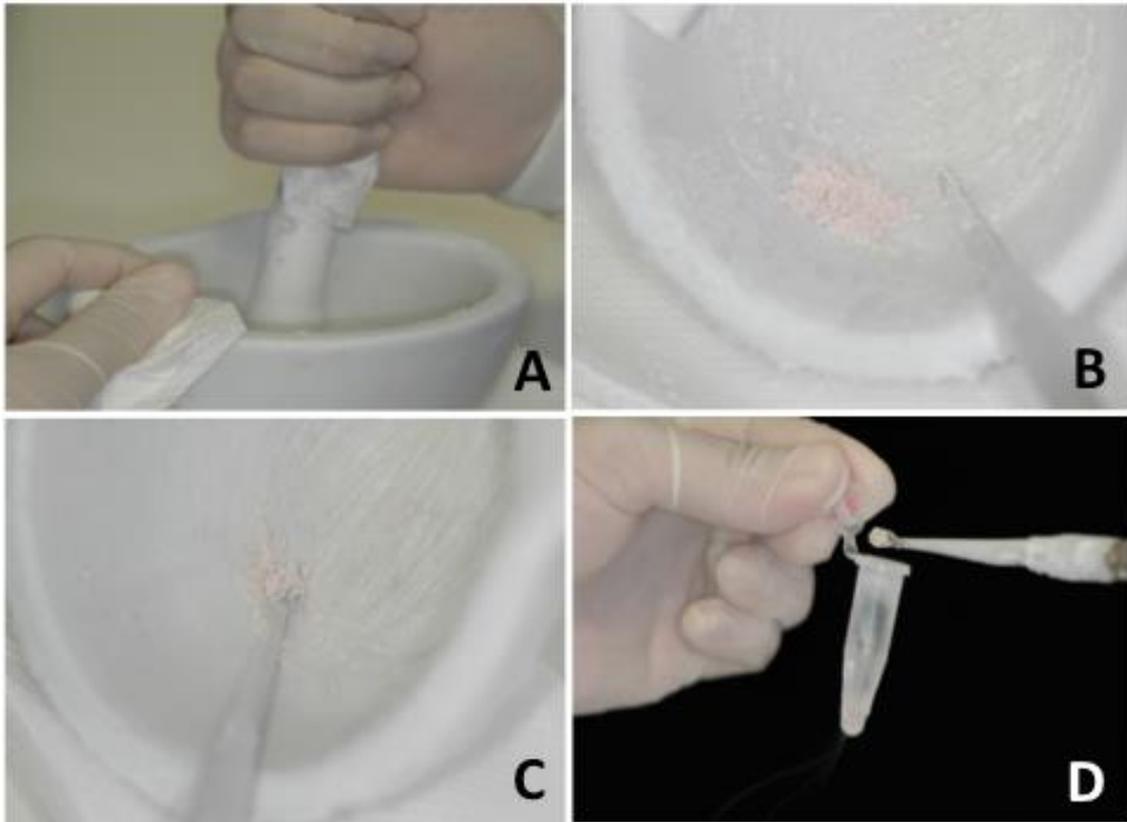


Figura 1. Padronização da extração de RNA total. A. Maceração do tecido muscular com almofariz e pistilo em N_2 ; B. Tecido muscular macerado, com aspecto de pó; C. Coleta do tecido macerado; D. Armazenamento do tecido macerado.

Após várias tentativas de extração do RNA total, o mesmo foi extraído de cada animal utilizando o reagente Trizol® *Reagent* (Life Technologies), de acordo com o seguinte protocolo: A. Após a maceração, as amostras foram colocadas em um tubo de ensaio de plástico e adicionado a ela 1 ml de Trizol® *Reagent* (Life Technologies); B. A amostra foi homogeneizada no equipamento (Omni Tip Plastic Homogenizer Probes ® Kennesaw, GA, USA) durante 30 segundos e logo em seguida colocada durante 2 minutos no gelo a $0^{\circ}C$. Esta sequência foi repetida três vezes seguidas; C. Em seguida, a amostra junto com o Trizol® *Reagent* (Life Technologies) foi transferida para um tubo de 1,5 ml; D. Foi adicionado 200 μ l de clorofórmio, vortéx por 15 segundos e 7 minutos em temperatura ambiente; E. Centrifugação durante 15 minutos, 12.000 rpm a $4^{\circ}C$; F. Separar o sobrenadante (fase líquida contendo o RNA total); G. Pipetagem do sobrenadante para outro tubo e adição do mesmo volume de

isopropanol; H. Mexer por inversão 10x (com as mãos) 7 minutos em temperatura ambiente; I. Centrifugação durante 8 minutos a 12.000 rpm de 4-25°C; J. Foi retirado o sobrenadante e descartado, preservando o pellet; L. Foi adicionado ao pellet 1 ml de etanol a 75%; M. Centrifugação a 12.000 rpm durante 5 minutos de 4-25°C; N. Extração do sobrenadante e preservação do pellet; O. Adicionar ao pellet 1 ml de etanol a 75%; P. O tubo contendo o pellet foi deixado com a tampa aberta em temperatura ambiente para que o etanol fosse totalmente evaporado entre 10 e 20 minutos; Q. Após a secagem, o pellet foi ressuspenso em 30µl água RNase Free, vortex de 5 a 10 segundos e spin de 15 a 30 segundos a 12.000 rpm. R. O RNA total foi extraído e posteriormente armazenado a -80°C. Esse protocolo é elucidado de acordo com os passos de A a R descritos acima.

5.7 Análise da qualidade e quantificação das amostras

A quantidade de RNA total foi quantificado pelo método fluorimétrico Qubit® (Life Technologies) utilizando 1 µl de cada amostra. A integridade e a qualidade do RNA total obtido foi testado em um Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc. EUA) para análise da qualidade do RNA extraído das amostras. O valor RIN (Número de Integridade do RNA) variou 8,0 a 10,0, e a proporção variou entre 1,8 e 2,0.

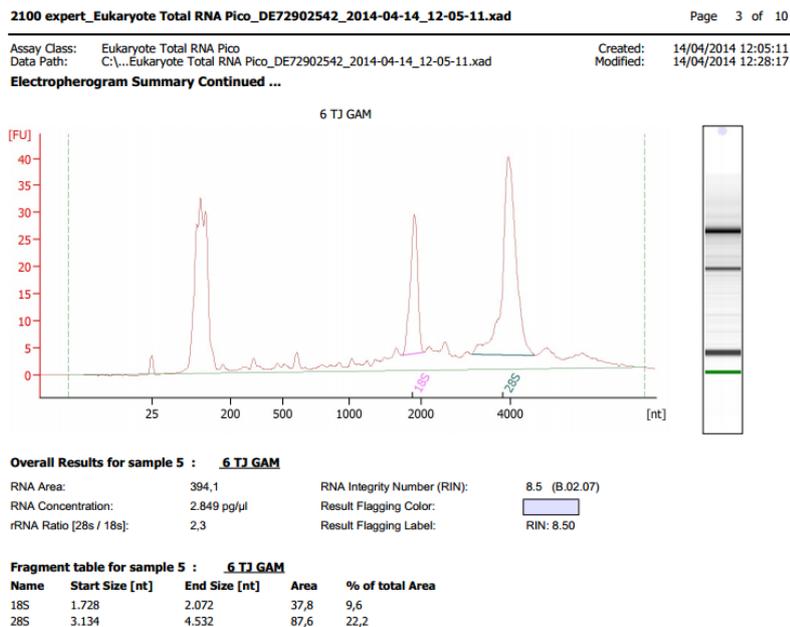


Figura 2. Eletroferograma a partir do Bioanalyzer 2100 para extração de RNA total do tecido muscular. Para obter uma amostra de RNA total de elevada qualidade, dois picos bem definidos, correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S deve ser observados, semelhante a um gel de agarose desnaturante.

5.8 Espectrofotometro

A densidade óptica (DO) das amostras foram determinada por espectrofotometria Ultrospec 2100 *pro* (Amersham Biosciences), no comprimento de onda de 260nm. Para avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm (razão ≥ 1.8).

5.9 Qualidade (gel de agarose 1%)

Também foi avaliada a qualidade do material por eletroforese das amostras (25 μ g de RNA total) em gel de agarose (1%), em tampão TBE (triborato EDTA). Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídeo.

As amostras de RNA extraídas foram avaliadas por eletroforese gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10mg/ μ L). Inicialmente foi feito um gel de agarose 0,3 g onde foi adicionado 30 ml de TBE e 7,5 μ L de brometo de etídeo e foi vertido em uma cuba de eletroforese horizontal (Thermo Scientific, Portsmouth, NH, USA). Em seguida, 2 μ L de cada amostra foi misturada a

3 μ L do tampão de amostra (TBE 50%, Glicerol 50%, Azul de bromofenol 1%) aplicadas no gel. As amostras foram colocadas em poços no gel de agarose a 1% que posteriormente foi realizada uma corrida a 80-100 mA. Após a corrida, o gel foi avaliado em um transiluminador com radiação ultravioleta (Biosystems). A imagem digital foi capturada a partir de um sistema de fotodocumentação de géis acoplado ao transiluminador (Biosystems) e conectado a um computador. A integridade das bandas de RNA ribossomal em 18 e 28S foram verificadas.

5.10 Tratamento com DNase

Após a verificação da qualidade de RNA, por meio verificação das bandas de 18 e 28S, foi observado presença de DNA Genômico sendo necessário tratamento com DNase. Foi utilizado o DNase Treatment e Removal (Life Technologies $\text{\textcircled{R}}$) de acordo com o seguinte protocolo: A. Foi adicionado 0,1 μ L de Buffer 10x DNase; B. Adição de 0,8 μ L de rDNA I; C. As amostras foram colocadas no banho seco a 37°C durante 30 minutos; D. Adicionou-se 3,0 μ L rDNA Inactivation; E. Foi incubado em temperatura ambiente durante 2 minutos; Centrifugação a 12.000 rpm durante 1,5 minutos; F. O sobrenadante foi transferido para outro tubo.

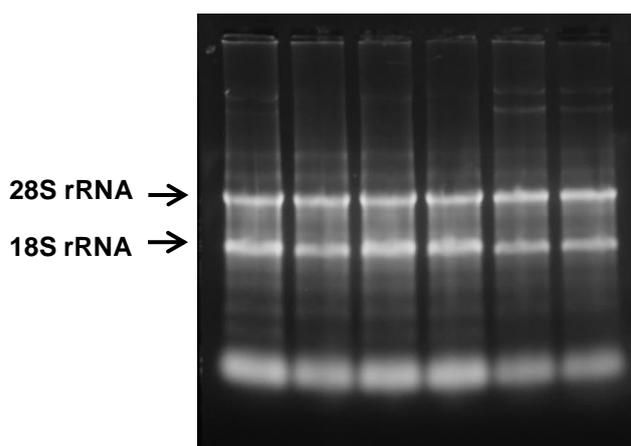


Figura 3. Eletroforese em Gel de Agarose a 1%. Bandas 28S e 18S de amostra de gel padrão após tratamento com DNase.

5.11 qPCR (Reverse Transcriptase) Síntese de cDNA

Após a quantificação das amostras de RNA, 1µg/µL de RNA foi utilizado para síntese do cDNA, utilizando o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) a reação constou das seguintes etapas: 2µL de 10X RT Buffer; 0,8µL de 25X dNTP (100nM); 2µL de 10X Random primers; 1µL de RNase inhibitor; 1µL de transcriptase reverse; 3,2µL de água miliQ e 1µL da amostra de RNA. O volume final de 20µL foi incubado a diferentes temperaturas utilizando o termociclador (Veriti- Applied Biosystems). O programa utilizado foi o sugerido pelo fabricante. Após a síntese o cDNA foi armazenado a -20°C.

5.12 Real Time-PCR

Atualmente, o uso de qPCR tem sido uma técnica mais precisa para quantificar níveis de expressão em diferentes amostras com quantidades mínimas e também quando há presença de genes raros. Esta metodologia consiste em uma reação de amplificação em tempo real. Para isso, um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação é utilizado.

Em seguida, diferentes frações das RTs foram utilizadas na amplificação em cadeia por Polimerase (PCR) em um equipamento que monitora a geração de amplicons em tempo real StepOne (Applied Biosystems). As amplificações por PCR serão efetuadas utilizando-se 10-80ng/µl de cDNA adicionado a uma reação contendo 15 µl de SYBR Green PCR master mix, 100-300nM dos primers (senso e antisenso) em uma solução com volume final de 30µl, dividido em três tubos (triplicata). As condições de ciclagem ocorrerão conforme a padronização de cada primer. Após a reação de PCR, é possível determinar o início da fase de amplificação exponencial *C_q* (*Cycle Quantification*) de cada amostra, que será utilizado como dado para a análise da expressão gênica.

O valor *C_q* (*Cycle Quantification*) de cada amostra foi calculado utilizando o *software* StepOne (Applied Biosystems). A média dos valores *C_q* das triplicatas para cada amostra foram utilizadas para a análise da expressão relativa de mRNA, usando os genes constitutivos *GAPDH* e *RPLP0* como alvos de referência para a normalização de entrada.

5.13 Primers

Os oligonucleotídeos, que foram utilizados como primers, para as reações de polimerase em cadeia para o fator transcricional músculo-específicos Myo-D, foi retirado de Hill e Goldspink, 2003; Os primers da Miostatina, IGF-1, mTOR e p70S6K-1 e os controles internos (GAPDH e RPLP0) foram construídos utilizando-se o Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA), como mostrado na tabela 1.

Gene	Forward	Reverse	NCBI (Reference Sequence)	Amplicon Size, bp
IGF-1	GCTCTTCAGTTCGTGTGTGGA	AGATCACAGCTCCGGAAGCA	NM_184052.3	125
mTOR	CACCCAAGCCTGGGACCTCTA	GGCTGGTTGGGGTCATATGTT	NM_019906.1	156
p70S6K-1	CTACAGAGACCTGAAGCCGGAGA	AATGTGTGCGTGACTGTTCCATC	NM_031985.1	114
Miostatina	CTACCACGGAAACAATCATTACCA	AGCAACATTGTTGGCTTTCCAT	NM_019151.1	78
MyoD	ACTACAGCGGCGACTCAGAC	ACTGTAGTAGGCGGCGTCGT	NM_176079.1	122
TNF α	GCCACCACGCTCTTCTGTCT	GTCTGGGCCATGGAACTGAT	NM_012675.3	101
TWEAK	GCTACGACCGCCAGATTGGG	GCCAGCACACCGTTCACCAG	NM_011614.3	130
Fn14	AAGTGCATGGACTGCGCTTCTT	GGAAACTAGAAACCAGCGCCAA	NM_181086.3	154
FoxO1	TCAAGGATAAGGGCGACAGC	GTTCTTCATTCTGCACTCGAAT	NM_019739.3	103
Atrogina-1	CCATCAGGAGAAGTGGATCTATGTT	GCTTCCCCCAAAGTGCAGTA	NM_133521.1	75
MuRF1	TGTCTGGAGGTCGTTTCCG	ATGCCGGTCCATGATCACTT	NM_080903.1	59
RPLP0	AGGGTCCTGGCTTTGTCTGTGG	AGCTGCAGGAGCAGCAGTGG	NM_022402.2	135
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTA	GGATGCAGGGATGATGTTC	NM_017008.4	177

Tabela 1: Primers construídos com senso e antisenso. As sequencias dos primers foram acessadas no GeneBank. Temperatura de anelamento 60° C.

5.14 Análise Histológica

Cortes histológicos transversais e seriados (10 μm) foram obtidos em micrótomo criostato, mantido à temperatura de -25°C . As lâminas com os cortes histológicos foram coradas com azul de toluidina (TB) para avaliação morfológica e morfométrica.

Uma vez os cortes corados com TB, foi realizada uma análise morfológica geral sobre a estrutura muscular, comparando entre os diferentes grupos. Além disso, a morfometria da área de secção transversa das fibras musculares foi realizada em microscopia de luz, usando o software Axion Vision (Carl Zeis). A área de secção transversal de cem fibras musculares, escolhidas aleatoriamente, de cada músculo (gastrocnêmio e sóleo), foi mensurada a partir da imagem obtida da região central do ventre muscular. O colágeno total foi avaliado por meio da coloração de Tricrômio de Masson's e os resultados foram obtidos pela análise de densitometria no software Image J (National Institutes of Health NIH).

5.15 Análise Estatística

O valor dos pesos corporais e dos pesos relativos, dos músculos gastrocnêmio e sóleo, dos grupos Jovem (J), Jovem Treinado (JT), Senis (S) e Senis Treinado (ST) foram comparadas utilizando o teste de Tukey da análise de variância ANOVA *two-way*. Para verificar os efeitos do treinamento de força em animais jovens e senis foi utilizada a análise de variância multifatorial. Foi adotado para todos os experimentos um $p \leq 0,05$. Os resultados foram apresentados na forma de média e \pm erro padrão da média (EPM).

6. RESULTADOS

6.1 Peso Corporal

Como esperado, média de valores de peso corporal iniciais para o sistema operacional e grupos ST foram encontrados para ser 59,3% e 73,4% mais elevado do que os valores médios para o grupo J ($p < 0,05$) e 47,5% e 74,3% mais elevado do que o grupo JT, respectivamente (Tabela 2; $p < 0,05$). Os valores médios para peso corporal final não foram significativamente diferentes quando comparados entre os grupos experimentais (Tabela 2, $p < 0,05$). Além disso, comparando o peso médio inicial do corpo com o peso corporal final dentro do mesmo grupo, revelou-se que houve um aumento de 57,8% e 44,4% no peso final dos grupos J e JT, respectivamente (Tabela 2; $p < 0,05$). No entanto, o peso final dos grupos S e ST diminuíram (6,8% e 15%, respectivamente) quando comparadas com o peso inicial dos mesmos grupos (Tabela 2; $p < 0,05$).

6.2 Área de Secção Transversa

Os animais senis mostraram um menor AST (área da secção transversal) em ambos os músculos (gastrocnêmio 58,1% e sóleo: 59,4%; $p < 0,05$) em comparação com os animais jovens. A partir daí, o TF aumentou o AST em ambos os animais jovens no músculo gastrocnêmio (18,7%; $p < 0,05$), bem como nos animais senis em ambos os músculos (gastrocnêmio: 40,4% e sóleo: 37,6%; $p < 0,05$). Estes dados estão ilustrados na Tabela 2.

	J	JT	S	ST
Peso Inicial (g)	295,66±34,65	301,83±30	508,33±76,69*†	527,33±75,92*†
Peso Final (g)	508,3±85,56 ^a	434±52,47 ^b	452±86,48 ^c	480,4±66,53 ^d
Ganho (%)	57.8	44.4	- 6.8	- 15
Gastrocnêmio peso (mg)	1,190±0,16	1,121±0,11	1,072±0,10	0,976±0,12
Sóleo peso (mg)	0,279±0,04	0,248±0,02	0,237±0,04	0,260±0,02
Gastrocnêmio AST (µm ²)	8,291±1,676	9,845±0,851*	3,469±0,547*†	4,871±1,011*†#
Sóleo AST (µm ²)	10,982±2,104	11,513±1,518	4,456±0,703*†	6,136±1,194*†#

Tabela 2. Peso corporal entre os grupos: médias de peso corporal de Jovem Sedentário (J), Jovem Treinado (JT), Senil Sedentário (S) e Senil Treinado grupos (ST) no início e após a conclusão do treinamento de força. Diferença de peso entre os grupos na fase inicial: J * significativamente diferente (p <0,05); † JT significativamente diferente (p <0,05); # S significativamente diferente (p <0,05). Diferença de peso entre os grupos na fase final: nenhuma diferença significativa (p > 0,05). O peso corporal inicial e final. Os dados foram expressos como média e desvio padrão (SD). a inicial J significativamente diferente (p <0,05); b JT inicial significativamente diferente (p <0,05); c S inicial significativamente diferente (p <0,05); d ST inicial significativamente diferente (p <0,05). Ganho (%) diferente peso e última inicial. O peso médio dos músculos: gastrocnêmio e sóleo. J * significativamente diferente (p <0,05). Área de secção transversal (AST) normalizado corrigido pelo peso corporal. Os dados foram expressos como média e desvio padrão (SD). J * significativamente diferente (p <0,05); † JT significativamente diferente (p <0,05); # S significativamente diferente (p <0,05).

6.3 Nível de mRNA.

6.3.1 Gastrocnêmio

No músculo gastrocnêmio, os níveis de TNFa foram aumentados no grupo S três vezes quando comparado com o J ($p = 0,0001$) e JT grupos ($p = 0,0002$). Além disso, um aumento de cinco vezes foi observada no ST quando comparado com o J ($p = 0,0001$) e JT grupos ($p = 0,0001$). Um aumento semelhante foi observado no grupo ST em comparação com o grupo S ($p = 0,0001$). TWEAK mostrou um aumento da expressão no grupo ST ($p = 0,008$), quando comparado com J. No entanto, Fn14 mostrou uma expressão reduzida nos grupos JT ($p = 0,0001$) e aumento no S ($p = 0,0001$) quando comparado ao grupo J. Além disso, o grupo ST exibiu uma redução significativa ($p = 0,0001$) em comparação com todos os grupos experimentais. A análise da expressão do mRNA por FoxO1 mostrou atividade reduzida nos grupos de JT e J quando comparado com o grupo S ($p = 0,001$). A sua expressão no grupo ST foi inferior em comparação aos grupos J ($p = 0,002$), JT ($p = 0,0002$) e S ($p = 0,0001$). A expressão de Atrogina-1 e MuRF1 não foi alterado em relação aos grupos analisados ($p > 0,05$). No grupo S, a Miostatina foi expresso com duas vezes nos grupos JT ($p = 0,002$) e J ($p = 0,0005$). Em comparação com o ST, o grupo S teve um aumento da sua expressão de duas vezes ($p = 0,004$). Dados ilustrados na Figura 4.A.

A redução foi observada nos níveis de mRNA de IGF-1 no grupo S quando comparado com o J ($p = 0,0001$) e JT ($p = 0,0001$). Por outro lado, no grupo ST foi observado um aumento de quatro vezes para o IGF-1, quando comparado a expressão do mRNA para o J ($p = 0,001$), JT ($p = 0,001$) e S ($p = 0,0001$). mTOR aumentou no grupo JT duas vezes ($p = 0,002$), quando comparado com o J ($p = 0,002$). Por outro lado, o grupo S não mostrou nenhuma diferença estatística em relação aos J. Curiosamente, o grupo ST mostrou um aumento de quatro vezes nos níveis de mTOR, quando comparado aos grupos S ($p = 0,0001$), JT ($p = 0,0001$) e J ($p = 0,0001$). Resultados semelhantes foram observados em p70S6K-1, ou seja, o grupo JT teve maior expressão em comparação com o J ($p = 0,03$), e um aumento significativo no grupo ST ($p = 0,0001$) em comparação com os grupos experimentais J, JT, e S. No grupo JT ($p = 0,009$), MyoD mostrou uma maior expressão duas vezes

quando em comparação com ao J ($p = 0,009$). Quando o grupo ST foi comparado com o JT ($p = 0,0001$), S ($p = 0,0001$) e J grupos ($p = 0,0001$), houve um aumento significativo na expressão deste gene.). Dados ilustrados na Figura 4.A.

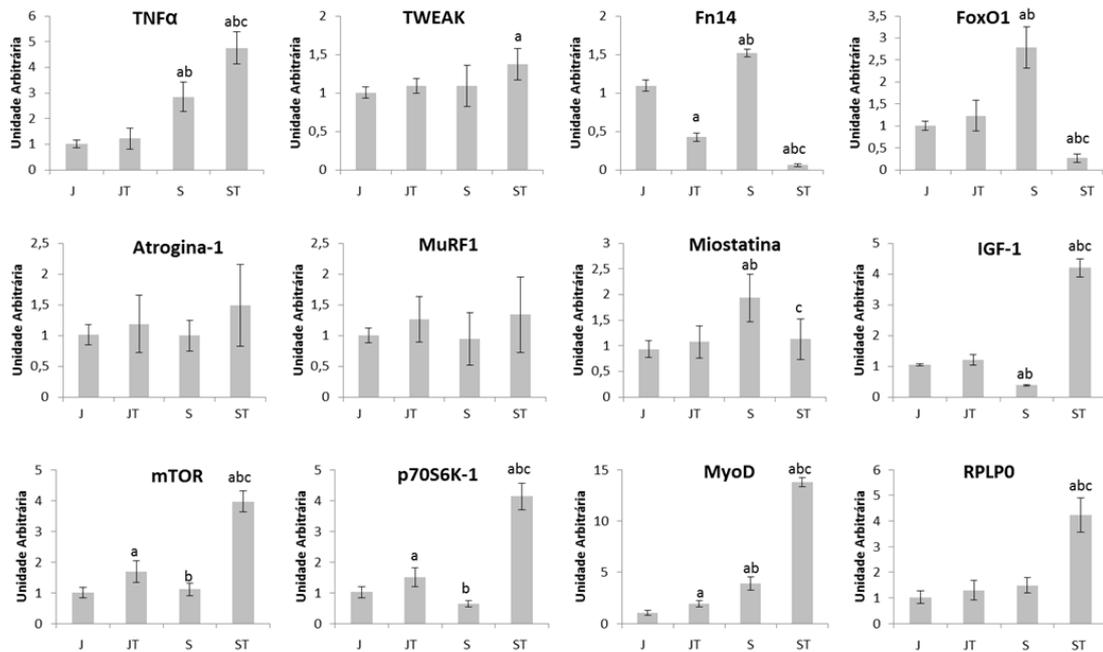
6.3.2 Sóleo

No músculo sóleo, os resultados encontrados para a expressão de TNFa no grupo JT foram reduzidos de forma significativa ($p = 0,005$) comparado com o grupo J. No grupo ST, menor expressão foi encontrado quando comparado com o grupo S ($p = 0,0001$). Quando comparamos o grupo S ($p = 0,0001$) com os grupos jovens, foi observado um aumento de duas vezes. Resultados semelhantes foram observados para TWEAK no grupo JT, que foi reduzida em relação ao grupo J ($p = 0,03$). No grupo ST, duas vezes menor expressão foi encontrado quando comparado com o grupo S ($p = 0,0001$). Quando se compara a S e J grupos ($p = 0,0001$), um aumento da expressão de duas vezes foi observada no grupo S. Fn14 mostrou uma redução na expressão dos grupos JT ($p = 0,0001$), S ($p = 0,0001$) e ST ($p = 0,0001$) quando comparado com ao grupo J. A expressão do FoxO1 reduziu significativamente nos grupos JT ($p = 0,0001$) e ST ($p = 0,0002$) em comparação com o grupo J. As diferenças entre os grupos treinados, JT e ST, foram também observadas quando comparado com o grupo S ($p = 0,001$). Análise da Atrogina-1 mostrou-se três vezes maior expressão no grupo S em comparação com o grupo J ($p = 0,0001$). O mesmo resultado foi encontrado quando se compara o grupo S ($p = 0,0001$) para o ST. Dados ilustrados na Figura 4.B.

Para MuRF1, o grupo JT quando comparado com o grupo J reduziu a sua expressão ($p = 0,01$). No grupo S ($p = 0,01$), houve um aumento na expressão de MuRF1 em comparação com o grupo J. O grupo ST ($p = 0,0001$), mostrou uma expressão reduzida em comparação com o grupo J. A expressão da Miostatina mostrou uma diminuição significativa no grupo JT ($p = 0,01$) quando comparado com o grupo J. Resultado semelhante foi encontrado na comparação entre o grupo ST ($p = 0,0002$) e os grupos S e J ($p = 0,003$). Um aumento de quatro vezes foi observado no IGF-1 para o grupo ST quando comparado com o J ($p = 0,0001$), JT ($p = 0,0001$) e o grupo S ($p = 0,0001$),

respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados para mTOR no grupo ST, que apresentou um aumento de três vezes em comparação aos grupos experimentais J ($p = 0,0001$), JT ($p = 0,0001$) e S ($p = 0,0001$). Houve um decréscimo na expressão de p70S6K-1 no grupo S ($p = 0,001$) comparado com o grupo J. O grupo ST mostrou um aumento em comparação com o grupo S ($p = 0,002$). A análise de MyoD mostrou um aumento de quatro vezes na expressão no grupo ST em comparação aos grupos J ($p = 0,0001$), JT ($p = 0,0001$) e S ($p = 0,0001$). Dados ilustrados na Figura 4.B.

A. Gastrocnêmio



B. Sóleo

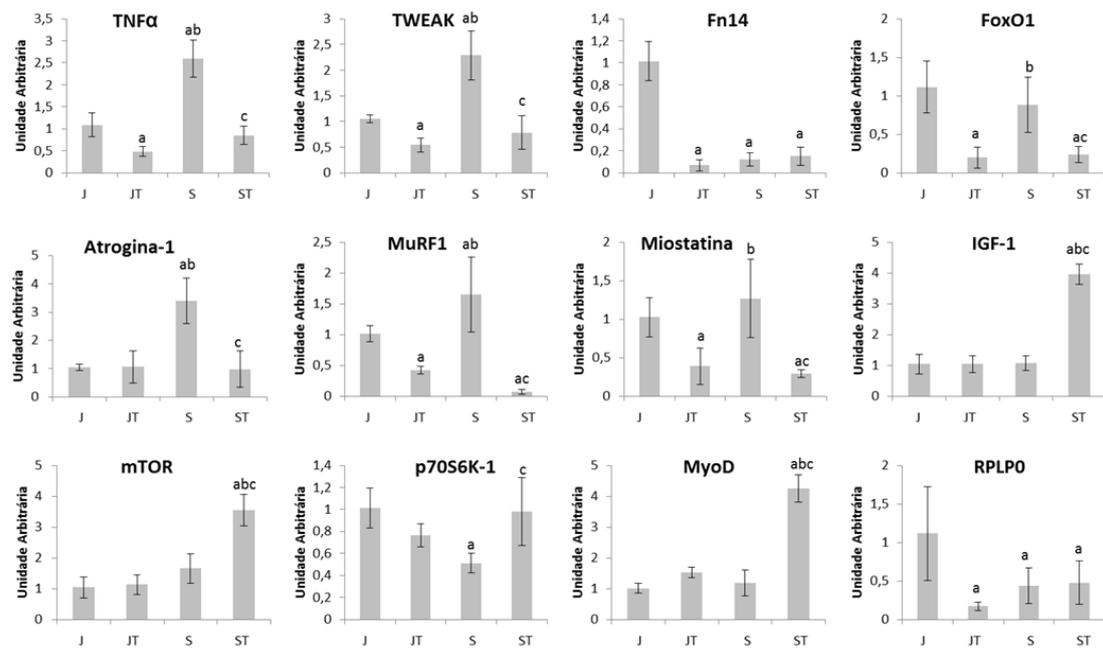


Figura 4. A Gastrocnêmio. B Sóleo. Níveis de mRNA expresso em unidades arbitrárias para os músculos gastrocnêmio e sóleo. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. Os grupos experimentais foram representados como Jovens Sedentários (J), o Jovem Treinado (JT), Senil Sedentário (S) e Senil Treinado (ST) a partir das seguintes genes: TNF α , TWEAK, Fn14, FoxO1, Atrogina-1, MuRF1, Miostatina, IGF-1, mTOR, p70S6K-1, MyoD e RPLP0. a = p < 0,05: comparação com o grupo J; b = p < 0,05: comparação com o grupo JT; c = p < 0,05: comparação com o grupo S.

7. DISCUSSÃO

Esse estudo forneceu novas informações a respeito dos efeitos do envelhecimento e do TF nas vias moleculares envolvidas na hipertrofia e atrofia dos músculos gastrocnêmio e sóleo em modelo de ratos idosos. De modo geral, o envelhecimento aumentou as citocinas inflamatórias no músculo gastrocnêmio como TNF α , sem modificação no TWEAK, atrogenes e miostatina. A sinalização do eixo IGF-1/mTOR/p70S6K-1 foi reduzida no musculo gastrocnêmio. No músculo sóleo, houve aumento nos níveis de mRNA do TNF α e TWEAK, porém sem alteração no seu receptor Fn14. Além disso, FoxO1, Atrogina-1, MuRF1, e miostatina também aumentaram seus níveis de expressão e o eixo IGF-1/mTOR/p70S6K-1 praticamente não foi modificado. Apesar de diferenças na sinalização que controlam a síntese e degradação de mioproteínas, foi observada redução na AST para ambos os músculos. Interessantemente, o TF aplicado nos ratos idosos aumentou os níveis do eixo IGF-1/mTOR/p70S6K-1 e MyoD, fato relacionado com o aumento da AST tanto no músculo gastrocnêmio quanto no sóleo. Ainda que o envelhecimento promova atrofia e alterações drásticas nos níveis de mRNA que regulam a síntese e degradação de mioproteínas, o TF foi capaz de amenizar os níveis de atrogenes e citocinas relacionadas a atrofia, além de aumentar a sinalização de síntese proteica e a AST, independente do tipo de músculo avaliado. Vias de sinalização ilustrada na Figura 5.

No envelhecimento, o processo inflamatório ocorre de forma crônica devido à redução do metabolismo do idoso, fenômeno denominado “*inflammaging*” (35), que indica uma regulação positiva das respostas inflamatórias que ocorrem com a idade, resultando em um alto grau de inflamação sistêmica e crônica. No presente estudo, TNF α apresentou aumento de expressão nos animais idosos no músculo gastrocnêmio e sóleo. Nesse sentido, Merrit et al (2013), demonstraram que em idosos sedentários, os níveis basais de TNF α e o eixo TWEAK/Fn14 musculares estão aumentados, além de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) (20,118). Esse fato está relacionado com a sarcopenia, pois TNF α pode interferir nas propriedades contráteis do musculo esquelético causando a diminuição da capacidade de geração de força (95,127).

Ademais, o eixo TWEAK/Fn14 parece estar envolvido na sarcopenia, tanto em humanos como em ratos (94,95). Em nosso estudo, observamos que o Fn14 foi regulado positivamente no músculo gastrocnêmio, dados que estão relacionados à degradação muscular no envelhecimento (5,18). Para o músculo sóleo, o TWEAK apresentou aumento significativo, porém, o nível de mRNA do seu receptor Fn14 foi menor em relação ao controle. Assim, é possível sugerir que TWEAK/Fn14 tem um papel na regulação da massa muscular durante o envelhecimento, mostrando que a expressão de Fn14 é aumentada significativamente no músculo com o avançar da idade. Curiosamente, nos mostramos diferentes padrões de expressão no eixo TWEAK/Fn14, fato que pode estar relacionado a filotipagem das fibras musculares do gastrocnêmio e sóleo (111). No gastrocnêmio, o TWEAK não apresentou diferença, porém seu receptor Fn14 foi aumentado, o que pode ser relacionado a ativação da via de atrofia NF κ B (fator de transcrição nuclear- κ B) resultando em degradação muscular (93,103,111). TWEAK aumentou somente no músculo sóleo e está relacionado com o processo de degeneração muscular e sarcopenia (103). Como o sóleo possui cerca de 40 a 50% mais colágeno que o gastrocnêmio, e essa deposição tende a aumentar durante o envelhecimento (106), a nossa hipótese é que o TWEAK foi mais expresso no sóleo devido a degeneração presente na sarcopenia e um possível aumento do tecido conjuntivo neste músculo. Além disso, mesmo quando seu receptor Fn14 está suprimido, o TWEAK também pode sinalizar genes nas vias de atrofia como MuRF1 e Atrogina-1 (78).

Nós mostramos que o envelhecimento não modificou os níveis de mRNA de FoxO1, porém, houve aumento para Atrogina-1 e MuRF1 no músculo sóleo. Para o músculo gastrocnêmio, o nível de mRNA do gene FoxO1 aumentou significativamente, no entanto, os genes Atrogina-1 e MuRF1 não apresentaram diferença. Similarmente, Williamson et al (2010) observaram no vasto lateral em idosas sedentárias, os níveis de mRNA aumentaram para o FoxO, porém, não observaram diferenças na expressão de Atrogina-1 e MuRF1. Scott-Pattison e colaboradores (2003) também não relataram diferença nos níveis de MuRF1 no músculo sóleo em ratos idosos. No entanto, Edstrom et al., 2007, ao contrário do conceito clássico relacionando os atrogênes à atrofia muscular, demonstraram redução nos níveis de FoxO1, Atrogina-1 e

MuRF1 no processo de envelhecimento para o músculo gastrocnêmio. De Ruisseau et al (2005), encontraram regulação diminuída dos níveis de mRNA para MuRF1, mas não houve alteração significativa na Atrogin-1 no músculo sóleo em ratos idosos. Esses estudos demonstraram claramente que existe uma divergência entre os achados relacionados aos atrogênes em diferentes modelos experimentais. Esse fato pode estar com a distribuição de Atrogin-1 e MuRF1 de forma não homogênea entre os diferentes tipos de músculos. MuRF1 não está distribuída uniformemente no tecido muscular, e é preferencialmente expressa em fibras do tipo II. MuRF1 parece relacionar-se com a especificidade de fibra tipo II, implicando, assim, em condições de remodelamento fisiopatológicos e crônicos, como ocorre durante a desnervação e envelhecimento (79). Mais estudos são necessários para determinar a especificidade da ação de Atrogin-1 e MuRF1 durante o envelhecimento comparando diferentes tipos de músculos.

Destaca-se ainda que vários mecanismos relacionados com a atrofia e sarcopenia já foram descritos, no entanto, a contribuição exata de cada um é ainda desconhecida. A redução da massa muscular relacionada à idade é um resultado da diminuição no tamanho e número de fibras musculares, possivelmente devido a um processo multifatorial que envolve, a redução da atividade física, a ingestão nutricional, estresse oxidativo e alterações hormonais (100). Na sarcopenia, há uma produção maior de espécies reativas de oxigênio (ROS), e uma liberação acentuada dos mediadores apoptóticos que resultam na morte celular (73). Dentre esses fatores, destaca-se a via reguladora de apoptose (Bax), que promove apoptose celular e apresenta aumento no processo de envelhecimento (10). Apesar do envolvimento dessas vias na degradação muscular durante o envelhecimento biológico, o presente estudo não teve por objetivo avaliá-las. Outros estudos precisam ser realizados para que possamos ter maiores esclarecimentos a respeito de como essas vias se comunicam durante o envelhecimento e, especialmente, como são moduladas pelo TF.

Assim como o eixo TWEAK/Fn14, a miostatina também é um regulador do crescimento muscular no envelhecimento (64). Teoricamente, o aumento dos níveis de miostatina pode bloquear o eixo IGF-1/mTOR/p70S6K-1, reduzindo a via de síntese, culminando no aumento da degradação proteica,

levando à diminuição da AST (5,64). De modo geral, os nossos resultados demonstram a redução da sinalização do eixo IGF-1/mTOR /p70S6K-1 em ambos os músculos avaliados, resultando no desequilíbrio das vias de síntese e degradação durante o envelhecimento. O declínio dessas vias de sinalização está relacionado com as alterações deletérias na composição corporal e a função física com o envelhecimento (42). Apesar do IGF-1 não ter se alterado no músculo sóleo, o p70S6K-1 que é o seu downstream relacionado ao aumento da síntese proteica, foi reduzido, o que mostra que essa via foi ativada. Essas diferenças de regulação do eixo IGF-1/mTOR /p70S6K-1 podem estar relacionadas ao momento da retirada do músculo na fase experimental e a observação do mRNA, devido as modificações pré e pós transcricionais, como por exemplo, *splicing* alternativo. Muitos transcritos contêm regiões sujeitas a seleções alternativas, o que leva a produção de diferentes isoformas de mRNA. Esse processo aumenta a diversidade funcional do proteoma e introduz erros adicionais para expressão e regulação dos genes por causa de diferentes isoformas de mRNA que alteram a capacidade de codificar genes e estabilizar o RNA. O *splicing* alternativo está relacionado a diversas vias biológicas no envelhecimento e desuso (50,51).

Curiosamente, MyoD aumentou somente no músculo gastrocnêmio, assim como em outros estudos, que observaram aumento da expressão dos níveis de mRNA de MRFs em idosos sedentários. Com isso, no processo de envelhecimento, mecanismos são acionados a fim de manter a massa muscular para a preservação do músculo em processo de atrofia, resultando no recrutamento de células satélites que é aumentado, possivelmente pela redução de Atrogina-1 (8,51,91). No sóleo, esse fator miogênico não foi modificado, possivelmente devido ao aumento da expressão da Atrogina-1 (71). A sinalização da via miostatina /Atrogina-1 bloqueia a MyoD, o que leva a diminuição da miogênese, pois inibe a saída dos mioblastos do ciclo celular, evitando também a diferenciação de mioblastos pela expressão seletiva de genes específicos do músculo (7).

O envelhecimento causou diminuição na AST das fibras musculares nos músculos gastrocnêmio e sóleo em ratos senis, demonstrando alterações significativas no tamanho e composição celular. A diminuição da massa muscular, uma das características da sarcopenia durante o envelhecimento,

tem sido relatada em humanos (48, 69) e em roedores (29,59,97,113). Comparando a média de vida de 30 meses para os ratos com a de 75 anos para humanos, a massa muscular atinge o seu pico no segundo quinto de vida (\approx 10 meses em ratos e 30 anos em humanos) mantendo-se relativamente estável até o terceiro quinto (13 a 18 meses em ratos e 31 a 45 anos em humanos) e declinando drasticamente em seguida (após os 18 meses em ratos e 50 anos em humanos) (55). Esses dados são similares aos resultados encontrados no presente estudo, já que a AST das fibras dos músculos gastrocnêmio e sóleo mostrou-se menor nos animais senis, com 20 meses, quando comparada aos animais jovens, com 3 meses de idade.

Interessantemente, o TF minimizou a perda da AST dos animais senis, nos músculos gastrocnêmio e sóleo. Verdijk, 2009 analisou indivíduos idosos após realizarem TF por 12 semanas e concluiu que há relação entre o aumento da AST e o aumento na força do músculo esquelético. Além de Verdijk, outros trabalhos, como os de Frontera, 1988, Hornberger e Farrar, 2004, Kryger e Andersen, 2007 e Slivka, 2008, também encontraram aumento da AST em indivíduos e animais idosos que passaram por programas de TF durante o período de 8 a 12 semanas. Apesar de pequenas alterações a longo prazo com TF crônico ($>$ 3 meses), programas de treinamento têm sido mostrados como uma alternativa para aumentar o tamanho e a capacidade de geração de força das fibras musculares em idosos (15,116,117,121).

Vale destacar que o TF nos animais jovens não apresentou diferença no gastrocnêmio para o mRNA das citocinas TNF α e TWEAK. Para o receptor Fn14 houve uma redução comparado ao controle. No entanto, para os atrogenes FoxO1 Atrogina-1, MuRF1, e o fator de crescimento e diferenciação Miostatina não demonstraram diferença na expressão. No músculo sóleo, para os mesmos genes, apresentaram uma redução quando comparado ao controle. Em observação aos genes de hipertrofia IGF-1, mTOR, p70S6K-1 e MyoD para o músculo gastrocnêmio, um aumento nos níveis de mRNA foi demonstrado, no sóleo, não houve diferença. Mitchell et al (2013), observou em um período de 16 semanas de TF realizados por 23 adultos jovens, um aumento da força para 1RM e aumento da AST nos membros inferiores, além do aumento na fosforilação do IGF-1, p70S6K-1 e mudanças no conteúdo de proteína muscular correlacionada com a hipertrofia. Essa diferença de expressão gênica

pode ser devido ao fato do músculo gastrocnêmio, por ser multi-articular, gerar maior força em relação ao músculo sóleo, que além de gerar menor força, por ser mono-articular (63) necessita de menores unidades motoras para sua ativação, sendo recrutado com maior frequência devido sua característica de resistência (89).

Embora os mecanismos moleculares não sejam ainda totalmente compreendidos, os resultados do TF sugerem que esses exercícios podem ser uma ferramenta altamente eficaz para combater a perda de massa muscular relacionada com o envelhecimento (49). A análise do grupo TV no músculo gastrocnêmio, mostrou aumento das citocinas TNF α e TWEAK em relação ao controle. No entanto, o receptor Fn14 apresentou redução para o mesmo grupo. A diferença em relação a expressão do mRNA no gastrocnêmio modulado pelo TF, sugere que a inflamação crônica estimulada pelas citocinas devido ao processo natural de envelhecimento, somadas a respostas fisiológicas inerente ao TF, levaram ao aumento da expressão do mRNA dessas citocinas. Como demonstrado previamente por Della Gatta et al., 2014, após 12 semanas de TF, houve aumento de citocinas pró-inflamatórias tanto em jovens quanto em idosos. As respostas pró-inflamatórias ao exercício agudo antes do treinamento, foram aumentadas no grupo jovem e ainda mais elevadas nos idosos, sendo que, com o treinamento crônico, esta diferença foi diminuída. No músculo sóleo, tanto o TNF α quanto o TWEAK não obtiveram diferença, enquanto o Fn14 apresentou redução nos níveis de mRNA. Essas citocinas, como exposto acima, tem uma maior expressão em músculo com predominância de fibras do tipo II comparadas as fibras do tipo I (1, 68), o que pode ser devido a maior degradação dessas fibras no envelhecimento, por causa da mudança de tipagem de fibras relacionadas a um ajuste do sistema nervoso central (junção neuromuscular) que diminui a intensidade e frequência de impulsos elétricos como resultado do desuso (55). Em resumo, os resultados do presente estudo sugerem que o eixo TWEAK/Fn14 está envolvida em várias alterações patológica relacionadas à idade. A redução da sinalização desse eixo pelo TF, pode ser uma abordagem potencial para prevenir a deterioração do músculo esquelético em idosos (111).

O TF nos animais senis reduziu os níveis de FoxO1 no músculo gastrocnêmio, e para Atrogina-1 e MuRF1 não apresentaram diferença, dados

similares foram encontrados por Williamson et al (2010), mostrando que o TF crônico aumenta a fosforilação da via de síntese e diminui expressão do FoxO, mas sem diferença na expressão de MuRF1 ou Atrogina-1. No músculo sóleo, foi demonstrado níveis mais baixos para os mesmos genes, o que pode estar relacionado com a preservação de fibras do tipo I, já que o músculo sóleo tem maior predomínio desse tipo de fibra (32). Esses dados mostram que a expressão desses genes podem ser minimizados em resposta ao TF. Tem sido demonstrado que o SUP pode ser ativado com o envelhecimento (88). A Atrogina-1 e o MuRF1 tem um papel importante na degradação do músculo esquelético no envelhecimento (99) e o exercício físico tem mostrado retardar a perda de massa muscular relacionada com a idade (24,82). Estudo realizado por Ziaaldini et al (2015) observou que o envelhecimento resulta na diminuição significativa de processos anabólicos do músculo esquelético. A ativação da, Atrogina-1, MuRF1, SUP e Miostatina em animais idosos, sugere perda de massa muscular associada à idade, tendo como resultado o desequilíbrio entre síntese e degradação de proteína muscular. Nossos resultados mostraram claramente que o TF reverteu o declínio desses processos, e aumento da AST em ambos músculos avaliados, demonstrando ser uma ferramenta importante para minimizar a sarcopenia.

A miostatina, geralmente, é muito expressa no envelhecimento devido ao aumento de seus níveis no controle do desenvolvimento muscular podendo ser reduzida no músculo esquelético com exercício resistido em homens idosos (6,19,67). Os nossos dados mostraram que as alterações nos níveis de mRNA de miostatina nos músculos avaliados após o período de TF apresentaram redução no grupo ST comparado ao S. O principal resultado foi que o TF inibiu a ação da miostatina nos grupos jovem e treinados tanto no músculo gastrocnêmio quanto no músculo sóleo. Assim, parece que a miostatina, em resposta ao TF crônico, pode influenciar na manutenção da massa muscular. Entretanto o IGF-1 favorece o estímulo a ativa a proliferação, diferenciação e fusão das CS durante o processo de síntese proteica (124), além disso, o IGF-1 sinaliza a MyoD favorecendo hipertrofia muscular mesmo no processo de envelhecimento (124). A MyoD para o grupo ST nos músculos gastrocnêmio e sóleo obteve um aumento significativo e pode ser relacionado com o aumento do IGF-1 e a baixa expressão dos atrogenes FoxO1, Atrogina-1 e MuRF1,

sendo o aumento da MyoD uma tentativa para evitar atrofia muscular, resultando em hipertrofia (51).

Nós mostramos que o TF aumentou os níveis de mRNA para IGF-1/mTOR/p70S6K-1 nos músculos avaliados para o grupo ST, tendo em vista que o IGF-1 se liga ao receptor insulínico, ativa a via de síntese levando a fosforilação do mTOR, e da p70S6K-1, e atua como um potente estimulador da síntese proteica (5,16,115). Visto que essas vias se comunicam e podem ser moduladas, o TF vem sendo utilizado como um importante estimulador dessas vias hipertróficas, como mostrou Mitchell et al (2013), em estudo realizado com 23 adultos jovens que treinaram 4 vezes por semana durante um período de 16 semanas de TF. O protocolo de treino consistiu de 3-4 séries de 6-12 repetições e um intervalo de 1-2 minutos até o ponto de falha muscular momentânea. Foram realizados quatro exercícios para membros superiores e quatro para membros inferiores. Houve aumento da força para 1RM e aumento da AST nos membros inferiores associados ao aumento na fosforilação do IGF-1 e p70S6K e mudanças no conteúdo de proteína muscular correlacionada com a hipertrofia.

Em resposta a maior ativação do IGF-1 pelo TF a MyoD foi aumentado significativamente no grupo ST em ambos os músculos estudados. Após uma única sessão de exercícios de resistência, foi observado que indivíduos idosos tiveram maior ativação do eixo IGF-1/mTOR/p70S6K-1, além de reduzida expressão da miostatina e aumento da expressão de gene MyoD (9,40,49). Em estudo realizado com TF agudo proposto por Raue et al., 2006, mostrou um aumento de vários transcritos de mRNA no grupo de idosas comparadas ao grupo jovem para os genes MyoD, além de uma redução nos níveis de miostatina. Quando treinadas com exercícios de força, as mulheres jovens e idosas tiveram semelhante resposta na expressão desses genes, o que pode favorecer a preservação da massa muscular e função. Além disso, outros estudos mostraram que o TF é importante para a manutenção dos níveis de força com o passar dos anos. Estudo realizado com praticantes de TF, que treinaram ao longo da vida que tinham em média 80 anos de idade, foi observado que cerca de 40% da sua força foi preservada quando comparados com sua melhor marca realizada na juventude (34). Zampieri et al (2015) em estudo com idosos treinados (média de 70 anos), que exerceram atividades

esportivas regularmente, em seus 30 anos anteriores foram comparados com os idosos sedentários e saudáveis da mesma idade e jovens ativos (média de 27 anos). Os resultados mostram que em relação ao grupo idoso sedentário, os atletas seniores aumentaram a massa muscular, força isométrica máxima e função. Além disso, houve aumento do tamanho das fibras por reinervação e redução da expressão de genes de atrofia, autofagia, e ROS, sendo esse, um dos poucos estudo a avaliar atrogenes no envelhecimento.

Finalmente, é importante destacar algumas limitações do presente estudo. Foram avaliados genes de atrofia e hipertrofia muscular e nós não tivemos como objetivo a avaliação funcional dos animais, como força muscular e volume de oxigênio. Além disso, análise de proteínas por Western Blotting. Futuros estudos podem considerar a análise de proteínas musculares para correlacionar com os genes avaliados. Além disso, como comparação entre modelos de exercício ou treinamento concorrente, exercícios aeróbios poderiam ser utilizados.

Nós também avaliamos a expressão de RPLP0 que variou de acordo com os músculos e procedimentos experimentais. Assim, pode-se sugerir que RPLP0 pode não ser um bom gene normalizador para os músculos gastrocnêmios e sóleo em modelo de envelhecimento e TF em ratos.

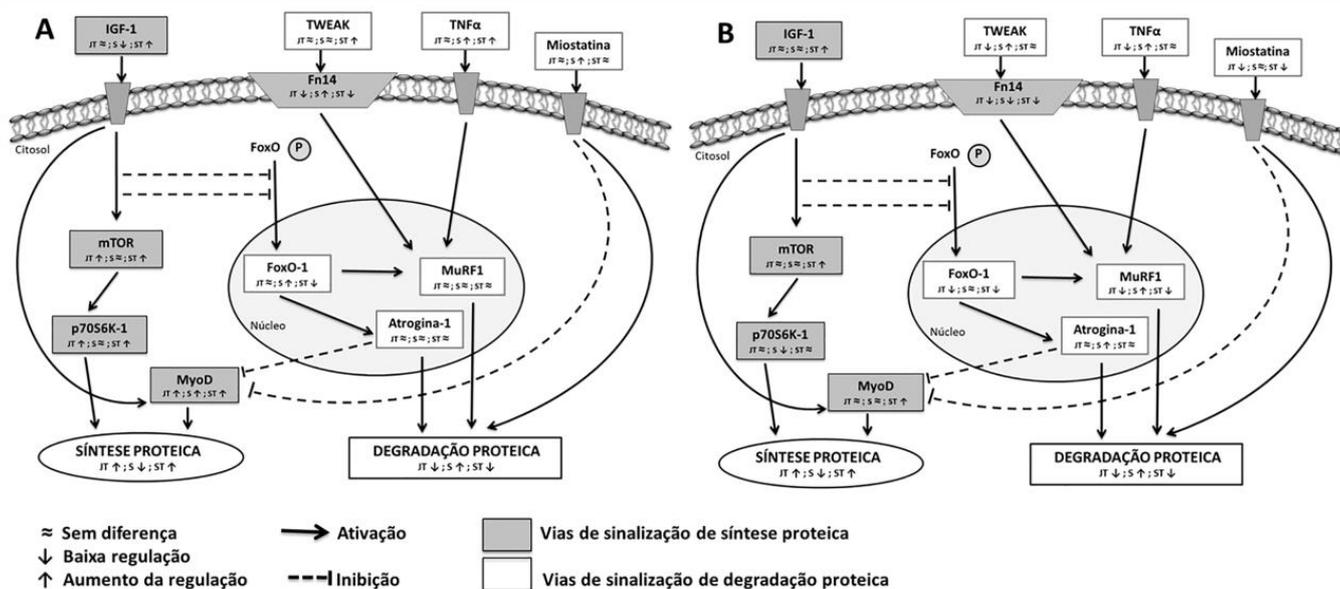


Figura 5. Envolvimento das principais vias que controlam o equilíbrio entre síntese e degradação de proteínas musculares, reguladas pelo envelhecimento e TF. A. Gatrocnemius, B. Soleus: ≈ não houve diferença na expressão dos marcadores de síntese e degradação de mioproteínas; ↑ houve aumento na expressão; ↓ diminuição na expressão. Os genes alvo são representados pelas siglas: TNF α (fator de necrose tumoral- α); TWEAK (fator de necrose tumoral indutor de apoptose); Fn14 (fator de crescimento de fibroblastos receptor indutível-14); FoxO1 (fator de transcrição em forquilha); Atrogina-1 (ubiquitina ligases); MuRF1 (muscle ring finger1); Miostatina (fator de crescimento e diferenciação); IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina-1); mTOR (alvo de rapamicina em mamíferos); p70S6K-1 (p70 S6 quinase-1); MyoD (fator de crescimento miogênico 1).

8. CONCLUSÃO

O TF minimizou a redução da AST por meio do aumento dos níveis de mRNA relacionados a fatores de síntese proteica, redução de atrogenes e citocinas nos músculos gastrocnêmio e sóleo em ratos idosos. As alterações no tamanho das fibras musculares, a modulação das vias de síntese e degradação nos músculos estudados, demonstraram a importância do TF como estratégia para reduzir os efeitos deletérios inerentes ao envelhecimento biológico.

9. REFERÊNCIAS

1. Aagaard P, Suetta C, Caserotti P, Magnusson SP, Kjaer M. Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 2010;20:49–64.
2. Andersen JL, Aagaard P. Myosin heavy chain IIX overshoot in human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2000;23:1095–1104.
3. Bhartnagar S, Kumar A. O Tweak-FN14 Sistema: Breaking the Silence of induzida por citocinas Músculo Esquelético Wasting. *Curr Med Mol.* 2012;12: 3-13.
4. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001; 3(11):1014–9.
5. Bonaldo, P, Sandri, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms.* 2013. 6:25-39.
6. Bowser, M., Herberg, S., Arounleut, P., Shi, X., Fulzele, S., Hill, W.D., Isales, C.M., Hamrick, M.W. Effects of the activin A–myostatin–follistatin system on aging bone and muscle progenitor cells. *Exp. Gerontol.* 2013;48, 290–297.
7. Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat.* 2003; 202:59–68,.
8. Buckingham M, Rigby PWJ. Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. *Developmental Cell.* 2014;28:225-238.
9. Cadore EL, Pinto, R.S, Bottaro, M, Izquierdo, M. Strenght and Endurance Training prescription in Healthy and Frail Elderly. *Aging and disease.* 2014;5(3): 183-185.
10. Calvani R, Joseph A, Adihetty P, Miccheli A, Maurizio B, Leeuwenburgh, C, Bernabei R, Marzetti E. Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biol Chem.* 2013;394(3):393–414.
11. Candow DG, Chilibeck PD. Differences in size, strength, and power of upper and lower body muscle groups in young and older men. *Journals of Gerontology Series A: Biological Science Medical Science.* 2005;60(2):148–156.
12. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1999; 277: 601-606.
13. Carlson ME, Hsu M, Conboy IM. Imbalance between Smad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature.* 2008;454: 528-532.

14. Churchward-Venne TA, Michael T, Lex BV, Marika L, Marlou LD, Lisette CPGM, de Groot, Luc JC, Van Loon. 2015. There Are No Nonresponders to Resistance-Type Exercise Training in Older Men and Women. *JAMDA*. 2015;16: 400-411.
15. Clafin DR, Larkin LM, Cederna PS, Horowitz JF, Alexander NB, Cole NM, Galecki AT, Chen S, Nyquist LV, Carlson BM, Faulkner JA, Ashton-Miller JA. Effects of high- and low-velocity resistance training on the contractile properties of skeletal muscle fibers from young and older humans. *J. Appl. Physiol.* 2011; 111(4):1021–1030.
16. Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med.* 2007;37(9):737-63.
17. Coggan A.R; Spina Rj, King D.S, Rogers MA; Brown M, Nemeth PM, Holloszy OJ. Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60- to 70-yr-old men and women. *J Apply Physiol.* 1992; 72: 1780-1786.
18. Combaret LD, Dardevet D, Bechet D, Taillandier, L. Mosoni D, Attaix, Skeletal muscle proteolysis in aging, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2009; 37-42.
19. Dalbo VJ, Roberts MD, Sunderland KL, Poole CN, Stout JR, Beck TW, Bemben M; Kerksick, C.M. Acute Loading and Aging Effects on Myostatin Pathway Biomarkers in Human Skeletal Muscle After Three Sequential Bouts of Resistance Exercise. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011;66(8):855–865.
20. De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol.* 2006;80(3):219–227.
21. Della Gatta AP, Garnham JM, Peake, DCS. Effect of exercise training on skeletal muscle cytokine expression in the elderly. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2014;39: 80–86.
22. Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J. Appl. Physiol.* 1996; 80: 261–270.
23. DeRuisseau KC, Kavazis AN, Powers SK. Selective downregulation of ubiquitin conjugation cascade mRNA occurs in the senescent rat soleus muscle. *Exp Gerontol.* 2005; 40:526–531.
24. Dickinson JM, Volpi E, Rasmussen BB. Exercise and nutrition to target protein synthesis impairments in aging skeletal muscle. *Exerc. Sport Sci.* 2013; 41:216–223.
25. Dogra C, Changotra H, Wedhas N, Qin X, Wergedal JE, Kumar A. TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB J.* 2007;21(8):1857–69.

26. Dogra C, Hall SL, Wedhas N, Linkhart TA, Kumar A. Fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes. Evidence for TWEAK-independent functions of Fn14 during myogenesis. *JBiol Chem* 2007;282: 15000-15010.
27. Doria E, et al. Relationship between Human Aging Muscle and Oxidative System Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012; 212: 1-13.
28. Durham WJ, Dillon EL, Sheffield-Moore M. Inflammatory burden and amino acid metabolism in cancer cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009;12(1):72–7.
29. Eddinger T, Moss R, Cassens R. Fiber number and type composition in extensor digitorum longus, soleus and diaphragm muscles with aging in Fischer 344 rats. *J. Histochem. Cytochem*. 1985; 33: 1033-1041.
30. Edström E, Altun M, Bergman E, Johnson H, Kullberg S, Ramírez-León V, Ulfhake B. Factors contributing to neuromuscular impairment and sarcopenia during aging. *Physiology & Behavior*. 2007;92:129–135.
31. Eisenberg BR, Kuda AM, Peter JB. Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. *Journal Cell Biology*. 1974; 60: 732-754.
32. Eng CM, Smallwood LH, Rainiero MP, Lahey M, Ward SR; Lieber RL. Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. *Experimental Biology*. 2008;211:2336-2345..
33. Evans W. Functional and metabolic consequences of sarcopenia. *J Nutr*, 1997;127: 998S-1003S.
34. Faulkner JA, Larkin LM, Claflin DR, Brooks SV. Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:1091–1096
35. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De LM, Ottaviani E, De Benedictis G: Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann NY Acad Sci*. 2000;908:244–254.
36. Freemont AJ, Hoyland JA. Morphology, mechanisms and pathology of musculoskeletal ageing. *J Pathol*. 2007; 211: 252-259.
37. Freiburger E, Sieber C, Pfeifer K. Physical activity, exercise, and sarcopenia – future challenges. *Wien Med Wochenschr*. 2011; 161: 416-425.
38. Frontera WR, Meredith CN, O'Reilly KP, Knuttgen HG, Evans WJ. Strength conditioning in older men: skeletal muscle hypertrophy and improved function. *J Appl Physiol*, 1988;64: 1038-1044.

39. Frontera WR, Suh D, Krivickas LS, Hughes VA, Goldstein R, Roubenoff R. Skeletal muscle fibre quality in older men and women. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279(3): C611-618.
40. Fry CS, Drummond MJ, Glynn EL, Dickinson JM, Gundersen DM, Timmerman KL, Walker DK, Dhanani S, Volpi E, Rasmussen BB. Aging impairs contraction-induced human skeletal muscle mTORC1 signaling and protein synthesis. *Skelet. Muscle.* 2011; 1(1):11.
41. Gallo M, MacLean I, Tyreman N, Martins KJ, Syrotuik D, Gordon T, Putman CT. Adaptive responses to creatine loading and exercise in fast-twitch rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 294: 1319-1328.
42. Giovannini S, Marzetti E, Borst SE, Leeuwenburgh C. Modulation of GH/IGF-1 axis: potential strategies to counteract sarcopenia in older adults. *Mech Ageing Dev.* 2008;129:593–601.
43. Glass D, Roubenoff R. Recent advances in the biology and therapy of muscle wasting. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010;1211:25–36.
44. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:14440-14445.
45. Goodpaster BH, Carlson CL, Visser M, Kelley DE, Scherzinger A, Harris TB, Stamm E, Newman AB. Attenuation of skeletal muscle and strength in the elderly: The Health ABC Study. *J Appl Physiol.* 2001; 90: 2157-2165.
46. Gosker HR, Lencer NH, Franssen FM, van der Vusse GJ, Wouters, EF, Schols AM. Striking similarities in systemic factors contributing to decreased exercise capacity in patients with severe chronic heart failure or COPD. *Chest.* 2003; 123: 1416–1424.
47. Gosselin LE, Adams C, Cotter TA, McCormick RJ, D. Thomas P. Effect of exercise training on passive stiffness in locomotor skeletal muscle: role of extracellular matrix. *J Appl Physiol.* 1998; 85: 1011-1016.
48. Grimby G, Saltin B. The aging muscle. *Clin. Physiol.* 1983; 3: 209-218.
49. Gumucio JP, Mendias CL. Atrogin-1, MuRF-1 and sarcopenia. *Endocrine.* 2013; 43(1): 12–21.
50. Han J, Xiong J, Wang D, Fu XD. Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus. *Trends in Cell Biology.* 2011;21(6): 336-343.
51. Hebert SL, Daniel ML, McLoon LK. The role of Pitx2 in maintaining the phenotype of myogenic precursor cells in the extraocular muscles. *PLoS ONE* 2013; 8 (3): 1-13.

52. Hill M, Goldspink G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J Physiol* 2003, 549.2, :409–418.
53. Hitachi, Keisuke and Tsuchida, Kunihiro. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Frontiers in Physiology*. 2014; 4: 1-7;
54. Hornberger TA, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*. 2004; 29(1): 16-31.
55. Ibebunjo C, et al. Genomic and Proteomic Profiling Reveals Reduced Mitochondrial Function and Disruption of the Neuromuscular Junction Driving Rat Sarcopenia. *Molecular and Cellular Biology*. 2013; 33: 194-212.
56. Jang YC, Remmen HV. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Experimental Gerontology*. 2010;4:1-6.
57. Kalinkovich A. Livshits G. Sarcopenia – The search for emerging biomarkers. *Ageing Research Reviews*. 2015; 58–71.
58. Koopman R, van Loon LJ,. Aging, exercise, and muscle protein metabolism. *J. Appl. Physiol*. 2009;106: 2040–2048.
59. Kovanen V, Suominen H. Effects of age and life-time physical training of fibre composition of slow and fast skeletal muscle in rats. *Pflugers Arch*. 1987; 408: 543-551.
60. Kovanen V. Intramuscular Extracellular Matrix: Complex Environment of Muscle Cells. *Exerc Sport Sci Ver*.2002; 30: 20-25.
61. Kragstrup TW, Kjaer M, Mackey AL. Structural, biochemical, cellular, and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with aging. *Scand J Med Sci Sports*, 2011;21(6):749-57.
62. Kryger AI, Andersen JL. Resistance training in the oldest old: consequences for muscle strength, fiber types, fiber size, and MHC isoforms. *Scand J Med Sci Sports*. 2007; 17: 422–430.
63. Landin D, Thompson M, Reid M. Knee and Ankle Joint Angles Influence the Plantarflexion Torque of the Gastrocnemius. *J Clin Med Res*. 2015;7(8):602-606.
64. Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, et al. et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt/ mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J. Biol. Chem*. 2005; 280: 2737-2744.

65. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB*. 2004; 18:39-51.
66. Lee CE, McArdle A, Griffiths RD. The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. *Clin. Nutr.* 2007;26: 524–534.
67. Léger B, Derave W, De Bock K, Hespel P, Russell AP. Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of Akt phosphorylation. *Rejuven. Res.* 2008;11:163–175B.
68. Lenk K, Schuler G, Adams V.. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J. Cachex Sarcopenia Muscle*.2010; 1:9 –21.
69. Lexell J, Taylor CC, Sjöström M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J. Neurol. Sci.* 1988;84, 275–294.
70. Lochynski D, Krutki P, Celichowski J. Effect of ageing on the regulation of motor unit force in rat medial gastrocnemius muscle. *Experimental Gerontology*. 2008; 43: 218-228.
71. Lokireddy S, Wijesoma WI, Sze SK, McFarlane C, Kambadur R, Sharma M. Identification of atrogen-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;303: C512–C529,.
72. Luo L, Lu A, Wang Y, Hong A, Chen Y, Hu J, Li X, Qin Z. Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. *Experimental Gerontology*. 2013;48:427–436.
73. Marzetti E, Calvani R, Cesari M, Buford T, Lorenzi M, Behnke B, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: From signaling pathways to clinical trials. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*.2013;45:2288– 2301.
74. Mayer F, Scharhag-Rosenberger F, Carlsohn A, Cassel M, Müller S, Scharhag, J. The Intensity and Effects of Strength Training in the Elderly. *Dtsch Arztebl Int.* 2011; 108: 359-364.
75. Melton LJ, Khosla CS, Crowson WM, O’Fallon, B L, Riggs, Epidemiology of sarcopenia. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2000;48(6):625–630.
76. Merritt EK, Stec MJ, Thalacker-Mercer A, Windham ST, Cross JM, Shelley DP, Craig Tuggle S, Kosek DJ, Kim JS, Bamman MM. Heightened muscle inflammation susceptibility may impair regenerative capacity in aging humans. *J Appl Physiol* . 2013;115(6):937-48.

77. Mitchell CJ, Churchward-Venne TA, Bellamy L, Parise G, Baker S, Phillips SM. Muscular and Systemic Correlates of Resistance Training-Induced Muscle Hypertrophy. *PLOS ONE*. 2013; 8:1-10.

78. Mittal A, Bhatnagar S, Kumar A, Lach-Trifilieff E, Wauters S, Li H, Makonchuk DY, Glass DJ. The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J Cell Biol*.2010;188: 833-849.

79. Moriscot, AS, Baptista IL, Bogomolovas J, Witt C, Hirner S, Granzier H, Labej S. MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance. *Journal of Structural Biology*.2010;170: 344–353.

80. Morley JE, Anker SD. Prevalence, incidence, and clinical impact of sarcopenia: facts, numbers, and epidemiology—update. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*.2014; 5:253–259.

81. Narici MV, Maffulli N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. *British Medical Bulletin*. 2010; 95: 139-159.

82. Nass R. Growth hormone axis and aging. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am*. 2013; 42(2):187-99.

83. National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC. National Academy Press, 1996.

84. Ogura Y, Mishra V, Hindi MS, Kuang S, Kumar A. Proinflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) suppresses satellite cell self-renewal through inversely modulatinng Notch and NF- κ B Signaling Pathways. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2013;288(49):35159–35169.

85. Pattison JS, Folk LC, Madsen RW, Childs TE, Booth FW. Transcriptional profiling identifies extensive downregulation of extracelular matrix gene expression in sarcopenic rat soleus muscle. *Physiol Genomics*. 2003;15:34–43.

86. Pette D, Staron RS. Myosin Isoforms, Muscle Fiber Types, and Transitions. *Res. Tech*. 2000; 50: 500-509.

87. Phillips BE, Williams JP, Gustafsson T, Bouchard C, Rankinen T, Knudsen S, Smith K, Timmons JA, Atherton PJ. Molecular networks of human muscle adaptation to exercise and age. *PLoS Genet*. 2013;9(3):1-15.

88. Radak Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F, Goto S,. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*. 2002;445: 273–278.

89. Raikova R, Aladjov H, Celichowski J, Krutki P. An Approach for Simulation of the Muscle Force Modeling It by Summation of Motor Unit Contraction Forces. *Computational and Mathematical Methods in Medicine.V.* 2013;2013:1-10.
90. Ratamess NA, et al. Progression Models in Resistance Training for Healthy Adults. *Med Sci Sports Exercise.* 2009; 41: 687-708.
91. Raue U, Slivka D, Jemiolo B, Hollon C, Trappe S. Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women. *J. Appl. Physiol.* 2006. 101(1):53-9.
92. Raue U, Trappe TA, Estrem ST, Qian HR, Helvering LM, Smith RC, Trappe S. Transcriptome signature of resistance exercise adaptations: mixed muscle and fiber type specific profiles in young and old adults. *J Appl Physiol.* 2012;112:1625-1636.
93. Raue U, Jemiolo B, Yang Y, Trappe, S. TWEAK-Fn14 Pathway 1 Activation After Exercise in Human Skeletal Muscle: Insights from Two Exercise Modes and a Time Course Investigation. *J Appl Physiol.* 2014; 118(5):30-42.
94. Reid KF, Fielding RA. Skeletal muscle power: a critical determinant of physical functioning in older adults. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2012;40:4–12.
95. Reid MB, Lannergren J, Westerblad H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor- α : involvement of muscle myofilaments. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(4):479-84.
96. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* 2001; 3(11):1009–13.
97. Rowe R. The effect of senility on skeletal muscles in the mouse. *Exp. Gerontol.* 1969; 4: 119-126.
98. Zampieri S, Pietrangelo L, Loeffler S, et al. Lifelong Physical Exercise Delays Age-Associated Skeletal Muscle Decline. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015;70(2):163–173.
99. Satchek JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH, Goldberg AL. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J.* 2007;21:140–155.
100. Sakuma K, Yamaguchi A. Molecular mechanisms in aging and current strategies to counteract sarcopenia. *Curr Aging Sci.* 2010;3:90-101.
101. Saladin KS *Anatomy Physiology: The Unity of Form and Function.* Third Edition. New York: The McGraw-Hill Companies. 2003: 1120.

102. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004;117(3):399–412.
103. Sato S, Ogura Y, Kumar A, 2014. TWEAK/Fn14 signaling axis mediates skeletal muscle atrophy and metabolic dysfunction. *Frontiers in Immunology*. January. 2014;5:1-10.
104. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscle. *Physiol Rev*. 2011;91:1447-1531.
105. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*. 2013;280:4294–4314.
106. Shin J, Tajrishi MM, Ogura Y, Kumar A. Wasting mechanisms in muscular dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45:2266–79.
107. Slivka D, Raue U, Hollon C, Minchev K, Trappe S. Single muscle fiber adaptations to resistance training in old (>80 yr) men: evidence for limited skeletal muscle plasticity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:273–280.
108. Snijders T, Verdijk LB, Van Loon JC. The impact of Sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. *Ageing Research Reviews*. 2009;8:328-338.
109. Spate U, Schulze PC. Proinflammatory cytokines and skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004;7(3):265–9.
110. Stewart VH, Saunders, DH, Greig, CA. Responsiveness of muscle size and strength to physical training in very elderly people: a systematic review. *Scand J Med Sci Sports*. 2014;24(1):e1-10.
111. Tajrishi MM, Zheng TS, Burkly LC, Kumar A. The TWEAK/Fn14 pathway: A potent regulator of skeletal muscle biology in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25:215-225.
112. Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports*. 2000;10:321-325.
113. Tauchi H, Yoshioka T, Kobayashi H. Age change of skeletal muscle of rats. *Gerontologia*. 1971;17:219-227.
114. Taylor AH, Cable NT, Faulkner G, Hillsdon M, Narici M, Van Der Bij AK. Physical activity and older adults: a review of health benefits and the effectiveness of interventions. *J Sports Sci*. 2004;22:703-725.
115. Tidball JG. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *J Appl Physiol*. 2005;98:1900-1908.

116. Trappe S, Godard M, Gallagher P, Carroll C, Rowden G, Porter D. Resistance training improves single muscle fiber contractile function in older women. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001;281(2):C398–C406.
117. Trappe S, Williamson D, Godard M, Porter D, Rowden G, Costill D. Effect of resistance training on single muscle fiber contractile function in older men. *J. Appl. Physiol.* 2000;89(1):143–152.
118. Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Listi F, Nuzzo D, Lio D, Caruso C. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev.* 2007;128(1):83–91.
119. Verdijk LB, et al. Skeletal Muscle Hypertrophy Following Resistance Training Is Accompanied by a Fiber Type – Specific Increase in Satellite Cell Content in Elderly Men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2009;64:332-339.
120. Williams GN, Higgins MJ, Lewek MD. Aging Skeletal Muscle: Physiologic Changes and the Effects of Training. *Phys Ther.* 2002;82:62-68.
121. Williamson DL, Raue U, Slivka DR, Trappe S. Resistance exercise, skeletal muscle FOXO3A, and 85-year-old women. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2010;65(4):335–343.
122. Yarasheski KE. Exercise, aging, and muscle protein metabolism. *J Gerontol A: Biol Sci Med Sci.* 2003;58(10):M918-922.
123. Yarasheski KE, Bhasin S, Sinha-Hikim I, Pak-Loduca J, Gonzalez-Cadavid NF. Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60–92 year old women and men with muscle wasting. *J. Nutr. Health Aging.* 2002;6:343–348.
124. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite Cells And The Muscle Stem Cell Niche. *Physiol Ver.* 2013;93:23–67.
125. Zatsiorsky VM, Kraemer WJ. *Science and Practice of Strength Training.* 2nd. ed. Human Kinetics. United State of American, 2006.
126. Zhang D, Liu M, Ding F, et al. Expression of myostatin RNA transcript and protein in gastrocnemius muscle of rats after sciatic nerve resection. *J Muscle Res Cell Motil.* 2006;27(1):37-44.
127. Ziaaldini MM, Koltai E, Csende Z, Goto S, Boldogh I, Taylor AW, Radak Z. Exercise training increases anabolic and attenuates catabolic and apoptotic processes in aged skeletal muscle of male rats. *Exp Gerontol.* 2015;67:9-14.

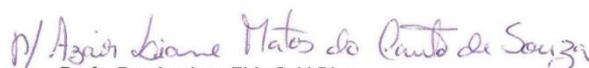
ANEXOS**ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Protocolo nº. 056/2010

A Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos – CEUA/UFSCar analisou e **APROVOU** "ad referendum" o pedido formulado pelo (a) pesquisador (a) *Rita de Cassia Marqueti* referente ao projeto "*Matriz extracelular no envelhecimento e suas adaptações ao treinamento de força no tendão calcâneo de ratos: abordagem molecular, celular e biomecânica.*".

São Carlos, 1 de março de 2011.


Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais