

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

NARA ROSILEI CORRÊA DE OLIVEIRA

**OS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS
METABÓLICOS E MOLECULARES EM MÚSCULO
QUADRÍCEPS DE RATOS ADULTOS VELHOS OCORREM DE
MANEIRA DEPENDENTE DA INTENSIDADE**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor(a) em Ciências da Saúde.
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Teodoro
de Souza.

**CRICIÚMA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

O48e Oliveira, Nara Rosilei Corrêa de.

Os efeitos do exercício físico sobre parâmetros metabólicos e moleculares em músculo quadríceps de ratos adultos velhos ocorrem de maneira dependente da intensidade / Nara Rosilei Corrêa de Oliveira; orientador: Cláudio Teodoro de Souza. – Criciúma, SC: Ed. do Autor, 2014.
66 p : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2014.

1. Envelhecimento. 2. Peroxissoma. 3. Sirtuína 1. 4. Proteína quinase. 5. Exercício físico de resistência. 6. Metabolismo. 7. Biogênese mitocondrial. I. Título.

CDD. 22^a ed. 612.67



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

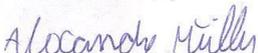
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

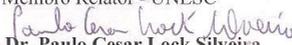
PARECER

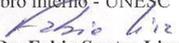
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Nara Rosilei Corrêa de Oliveira** sob o título “**Os efeitos do exercício físico sobre parâmetros metabólicos e moleculares em músculo quadríceps de ratos de meia-idade ocorrem de maneira dependente da intensidade**” para obtenção do grau de DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese, com conceito B.

Criciúma, SC, 04 de julho de 2014.


Prof. Dr. Alexandre Pastoris Müller
Membro Relator - UNESC


Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira
Membro interno - UNESC


Prof. Dr. Fabio Santos Lira
Membro externo - UNESP


Prof. Dr. Daniel Paulino Venâncio
Membro externo – Faculdade de Medicina ABC


Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza
Orientador


Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício.

Dedico esta tese ao meu filho
Lucas, pela compreensão em todos
os momentos em que estive
ausente.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Ao meu filho Lucas e ao meu esposo Eliseu, pelo apoio e compreensão dos momentos em que estive ausente para que esse sonho se tornasse realidade;

Ao Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza, pela maneira que conduziu minha orientação mostrando muita paciência, incentivo e apoio em todos os momentos que precisei, por tudo que aprendi com ele durante essa trajetória do doutorado, e que além da sua amizade ele sempre será um grande mestre e exemplo para mim;

A todos os integrantes do grupo LAFIBE, em especial a Schérolin, Thaís, Bruno e a Daniela pelo carinho, pela amizade e companheirismo nos momentos em que precisei e também pelo auxílio na realização dos experimentos;

Aos meus pais que sempre me apoiaram nos estudos;

E a todas as pessoas que participaram de alguma forma para esta conquista;

Muito obrigada!

“A verdadeira coragem é ir atrás de
seus sonhos mesmo quando todos
dizem que ele é impossível.”

Cora Carolina

RESUMO

O envelhecimento está associado ao declínio da função mitocondrial, que é controlada principalmente através do coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PGC-1 α), sirtuína 1 (SIRT-1) e proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Por outro lado, o exercício é conhecido por controlar os níveis de SIRT-1 e PGC-1 α e a fosforilação da AMPK, porém os efeitos da intensidade do exercício sobre estas moléculas não foi totalmente investigado. O presente estudo objetivou investigar o efeito da corrida a 0,8 e 1,2 km/h nos níveis proteicos da SIRT-1 e PGC-1 α e na fosforilação da AMPK em músculo esquelético de ratos adultos velhos. Para tal, ratos Wistar machos jovens com dois meses de idade e adultos velhos com dezoito meses de idade, pesando 218 \pm 10 e 526 \pm 12 g, respectivamente, foram divididos nos grupos (n=6): não exercitado (NE); exercitado em 0,8 km/h (0,8 km/h) e exercitado em 1,2 km/h (1,2 km/h). Os animais dos grupos exercício foram submetidos à corrida em velocidade constante de 0,8 km/h ou 1,2 km/h sem inclinação, 50 minutos/dia, 5 dias/semana, por 8 semanas. Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício físico, os animais foram anestesiados e realizou-se a extração do quadríceps para as análises de proteínas pela técnica de imunoblot e atividades enzimáticas. Os resultados mostraram que o envelhecimento reduz os níveis de SIRT-1 (45%), PGC-1 α (39%) e a fosforilação da AMPK (40%), quando comparados com ratos jovens. Por outro lado, o grupo exercitado a 0,8 km/h aumentou os níveis proteicos e a fosforilação destas moléculas, quando comparados com ratos NE, mas este aumento foi maior em ratos jovens. Ratos exercitados a 1,2 km/h mostraram aumento dos níveis de SIRT-1, PGC-1 α e fosforilação da AMPK, quando comparado aos animais exercitados a 0,8 km/h, mas não houve diferença estatística quando comparado os ratos jovens e adultos velhos. Os declínios relacionados à idade nas moléculas AMPK, SIRT-1 e PGC-1 α podem ser melhorados pelo exercício físico. No entanto, os dados demonstraram que, para atingir mudanças na SIRT-1, PGC-1 α e AMPK que são comparáveis em magnitude com os ratos jovens, maiores intensidades de exercícios são necessárias para os ratos adultos velhos.

Palavras Chaves: AMPK; PGC-1 α ; SIRT-1; envelhecimento; exercício físico.

ABSTRACT

Aging is associated with a decline in mitochondrial function, which is controlled mainly through peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 α), sirtuin 1 (SIRT-1) and AMP-activated protein kinase (AMPK). On the other hand, exercise is known to monitor the levels of SIRT-1 and PGC-1 α protein and AMPK phosphorylation, but the effects of exercise intensity of these molecules has not been fully investigated. The present study aimed to investigate the potential effect of race at 1.2 and 0.8 km/h in protein levels of SIRT-1 and PGC-1 α and AMPK phosphorylation in skeletal muscle of old adult rats. To this, young Wistar rats two months of age and older adults with eighteen months of age, weighing 218 ± 10 and 526 ± 12 g, respectively, before the exercise protocol, were divided into the following groups (n = 6): non-exercised (NE); exercised at 0.8 km/h (0.8 km/h) and exercised at 1.2 km/h (1.2 km/h). The rats of the exercise groups were subjected to running at a constant speed of 0.8 km/h and 1.2 km/h without inclination, 50 minutes per day, 5 days per week for 8 weeks. Forty-eight hours after the last session of physical exercise, the animals were anesthetized and underwent extraction of the quadriceps for the analysis of intracellular proteins by immunoblot technique and enzyme activities. Our results showed that aging reduces levels of SIRT-1 proteins (45%), PGC-1 α (39%) and AMPK (40%) phosphorylation when compared with young rats. On the other hand, the group that exercised to 0.8 km/h increased protein levels and phosphorylation of these molecules, when compared with NE rats, but this increase was higher in young rats. Rats that exercised at 1.2 km/h showed increased levels of SIRT-1, PGC-1 α and AMPK phosphorylation, when compared to animals trained to 0.8 km/h, but there was no statistical difference when compared rats young and old adults. It was observed that age-related declines in AMPK, SIRT-1 and PGC-1 α molecules can be largely ameliorated by exercise. However, the data demonstrated that, to achieve changes in SIRT-1, PGC-1 α and AMPK that are comparable in magnitude with in young rats, higher intensities of exercise are necessary for older adults rats.

Key-words: AMPK; PGC-1 α ; SIRT-1; aging; physical exercise.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACC – Acetil-coa Carboxilase, do inglês *Acetyl CoA Carboxylase*.
- ADP - Adenosina Difosfato, do inglês *Adenosine Diphosphate*.
- AGL - Ácidos graxos livres.
- AMP - Adenosina Monofosfato, do inglês *Adenosine Monophosphate*.
- AMPK- Proteína Quinase Ativada por Níveis de AMP, do inglês *AMP-activated Protein Kinase*.
- ATP - Adenosina Trifosfato, do inglês *Adenosine Triphosphate*.
- CPT-1 - Carnitina Palmitoil Transferase 1, do inglês *Carnitine Palmitoyl Transferase 1*.
- COX – Cicloxigenase, do inglês *Cyclooxygenase*.
- Cyt-C - Citocromo C, do inglês *Cytochrome C*.
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*.
- ERR - Receptores Relacionados a Estrógenos, do inglês *Estrogen-related Receptor*.
- GAPDH - Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase, do inglês *Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase*.
- HAT - Histona Aciltransferase, do inglês *Histone Acetyltransferase*.
- HDAC - Deacetilases de Histonas, do inglês *Histone Deacetylases*.
- HNF4 α - Fator Nuclear do Hepatócito 4 Alfa, do inglês *Hepatocyte Nuclear Factors 4 Alpha*.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*.
- NRF - Fator Respiratório Nuclear, do inglês *Nuclear Respiratory Factor*.
- OMS - Organização Mundial da Saúde.
- PFK – Fosfofrutoquinase, do inglês *Phosphofructokinase*.
- PGC-1 α - Coativador 1 Alfa do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma Gama, do inglês *Peroxisome Proliferator-activated Receptor-gamma Coactivator 1 Alpha*.
- PPAR α - Receptor Alfa Ativado por Proliferador de Peroxissoma, do inglês *Peroxisome Proliferator-activated Receptor Alpha*.
- PPAR γ - Receptor Gama Ativado por Proliferador de Peroxissoma, do inglês *Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma*.
- PRC – PGC1 Coativador Relacionado, do inglês *PGC-1-rel Coactivator*.

RNA - Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*.

SDH - Succinato Desidrogenase, do inglês *Succinate Dehydrogenase*.

siRNA – Pequeno RNA de Interferência, do inglês *Small Interfering RNA*.

SIRT-1 - Regulador Silenciador de Informação Homólogo 1, do inglês *Silent Mating Type Information Regulator 2 homolog 1*.

SUS - Sistema Único de Saúde.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	28
2.1 O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO.....	28
2.2 METABOLISMO MUSCULAR E ENVELHECIMENTO.....	30
2.3 BIOGÊNESE MITOCONDRIAL E ENVELHECIMENTO.....	32
2.4 EXERCÍCIO FÍSICO E ENVELHECIMENTO.....	34
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS.....	38
4.2 PROGRAMA DE EXERCÍCIO FÍSICO.....	38
4.3 EUTANÁSIA E EXTRAÇÃO DO MÚSCULO QUADRÍCEPS.....	38
4.4 IMUNOBLOTTING.....	39
4.5 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE.....	40
4.6 ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE.....	40
4.7 ATIVIDADE DO COMPLEXO I.....	40
4.8 ATIVIDADE DO COMPLEXO II.....	41
4.9 ATIVIDADE DO COMPLEXO II-III.....	41
4.10 ATIVIDADE DO COMPLEXO IV.....	41
4.11 QUESTÕES ÉTICAS.....	41
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 NÍVEIS PROTEICOS DA PGC-1 α , SIRT-1 E FOSFORILAÇÃO DA AMPK E ACC NO QUADRÍCEPS DE RATOS JOVENS E ADULTOS VELHOS APÓS TREINAMENTO DE INTENSIDADE 0,8 E 1,2 Km/H.....	43
5.2 NÍVEIS PROTEICOS DA CPT-1, CyT-C E SDH E ATIVIDADE DA SDH E CITRATO SINTASE NO QUADRÍCEPS DE RATOS JOVENS E ADULTOS VELHOS APÓS TREINAMENTO DE INTENSIDADE 0,8 E 1,2 KM/H.....	45
5.3 ATIVIDADE DOS COMPLEXOS MITOCONDRIAIS NO QUADRÍCEPS DE RATOS JOVENS E ADULTOS VELHOS APÓS TREINAMENTOS DE INTENSIDADE 0,8 E 1,2 Km/h.....	48
6 DISCUSSÃO.....	50

7 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Estudos demográficos apontam que em 2020 o número de idosos em todo o mundo será de 1,2 bilhões (IBGE, 2011). No Brasil, o aumento da população idosa segue a tendência mundial. Projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística apontam que a expectativa para a população idosa alcançará 11% até o ano de 2020 (IBGE, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre 1950 e 2025, a população de idosos no país crescerá 16 vezes, enquanto que é esperado um aumento de 5 vezes da população total; isso colocará o Brasil, em termos absolutos, como a sexta população de idosos do mundo, isto é, com mais de 32 milhões de pessoas com 60 anos ou mais (IBGE, 2011). Com o aumento elevado do número de idosos, o surgimento de doenças crônico-degenerativas, como hipertensão, doença coronariana, diabetes mellitus tipo 2 e osteoporose, aumentam (Chaimowics, 1998).

A adoção de um estilo de vida mais saudável, como a inclusão de exercício físico, minimiza o declínio das alterações biológicas relacionadas ao envelhecimento, bem como as doenças associadas (Barros Neto, 2007). A prática diária de exercício físico leva a uma diminuição da pressão arterial (Black et al., 2008), dos níveis de triglicérides (Short et al., 2003; Carvalho et al., 2010), da gordura corporal (Thompson et al., 2010), melhora da sensibilidade à insulina (Short et al., 2003), da força muscular e das atividades motoras de indivíduos idosos (Frontera et al., 1991).

O envelhecimento está associado a várias alterações biológicas tanto metabólicas quanto moleculares. A prevalência da incapacidade e dependência funcional em idosos parece estar associada à diminuição da massa muscular (Fried et al., 1997). Esse argumento é baseado em estudos que demonstraram que a partir dos 40 anos de idade a perda de massa muscular chega a ser de 15% a cada década, com declínio mais rápido após os 65 anos, principalmente nos membros inferiores (Fleg et al., 1988; Janssen et al., 2000). Durante o processo de envelhecimento, observa-se redução da função mitocondrial (Lesnefsky e Hoppel, 2006). Estudos demonstram que no envelhecimento as mitocôndrias se tornam maiores e menos numerosas, acumulando vacúolos e anormalidades em suas funções (Cottrell e Turnbull, 2000). Tais estudos observaram alterações significantes, incluindo: redução na capacidade de gerar ATP (Drew et al., 2003), diminuição da atividade da cadeia respiratória

(Chabi et al., 2008) e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Muller et al., 2007).

O declínio da função mitocondrial relacionado ao envelhecimento pode estar relacionado, dentre outros fatores, a três importantes moléculas; a proteína quinase ativada por níveis de AMP (AMPK), regulador silenciador da informação homólogo 1 (SIRT-1) e o coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PGC-1 α) (Koltai et al., 2012). A redução da atividade da AMPK pode contribuir para o declínio da função mitocondrial relacionada à idade (Reznick et al., 2007). Alteração na produção de ATP em indivíduos idosos pode estar relacionada à diminuição no conteúdo mitocondrial do músculo esquelético envelhecido (Corsetti et al., 2008). Estímulos como o exercício físico, hipóxia ou jejum prolongado resultam em aumento da razão intracelular de AMP/ATP e podem ativar a AMPK. Uma vez ativada, a função da AMPK é restaurar o estado energético da célula, ou seja, estimular a captação de glicose, a oxidação de gordura (Merrill et al., 1997) e simultaneamente inibir a síntese de proteínas (Bolster et al., 2002). Quando ativada cronicamente, AMPK promove biogênese mitocondrial, principalmente por fosforilar a PGC-1 α (Suwa et al., 2008) e também as sirtuínas, como a SIRT-1 (Cantó et al., 2010).

As sirtuínas são reguladoras importantes do envelhecimento (Michishita et al., 2005; Ota et al., 2006; Lavu et al., 2008; Cantó et al., 2010). Estas enzimas estão envolvidas em processos celulares relacionados ao envelhecimento e ao balanço energético celular (Kelly, 2010). Fazem parte de um grande grupo de enzimas que compõem a família das deacetilases de histonas (HDAC) e dessa forma, modulam diretamente a estrutura dos nucleossomos e, conseqüentemente, a transcrição gênica (Kelly, 2010). Além da deacetilação das histonas, a SIRT-1 tem como importante alvo o coativador de transcrição PGC-1 α (Cantó et al., 2010).

A PGC-1 α tem sido reconhecida como o principal cofator de transcrição na biogênese mitocondrial melhorando a capacidade oxidativa do músculo esquelético (Wang et al., 2001). Kang e Li Ji (2012), observaram que os níveis de RNA mensageiro de PGC-1 α foram diminuídos em 35% no músculo sóleo de ratos idosos, mas foi restaurado pelo treinamento físico. Neste mesmo estudo, o conteúdo da proteína PGC-1 α foi diminuído em 80% nos ratos velhos comparados aos ratos jovens, ao passo que, 12 semanas de treinamento físico

resultou em um aumento de 2 vezes mais no conteúdo de PGC-1 α nos ratos velhos.

Avanços significativos na compreensão do papel da mitocôndria no envelhecimento têm sido feitos. Apesar de inúmeras evidências em favor da disfunção mitocondrial no envelhecimento, isso carece de maiores investigações. Dessa forma, este estudo foi desenvolvido para testar a hipótese de que o processo de envelhecimento reduz a atividade da AMPK, PGC-1 α e SIRT-1 e que o exercício físico de elevada intensidade é mais recomendado por aumentar a fosforilação e níveis proteicos dessas moléculas, pelo menos a níveis comparáveis aos jovens.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO

Segundo a política nacional e o estatuto do idoso, vinte milhões quinhentos e noventa mil e quinhentos e noventa e nove (20.590.599) brasileiros são idosos (pessoa com idade igual ou superior a 60 anos), ou seja, aproximadamente 10,8% da população total. Desse total, 55,5% (11.434.487) são mulheres e 44,5% (9.156.112) são homens (Brasil, 2010). A população idosa apresenta alta taxa de crescimento desde 1940. Na década de 50, essa taxa atingiu valores superiores a 3% ao ano, chegando a 3,4%, entre 1991 e 2000 (Inouye et al., 2008). Em um intervalo de 25 anos (1980 a 2005), o crescimento da população idosa foi de 126,3% enquanto que, o crescimento da população total foi de apenas 55,3%. Nesse mesmo intervalo de tempo, o número de pessoas com 80 anos ou mais foi maior em relação à população idosa total, com um crescimento de 246,0% (Inouye et al., 2008). Hoje, o número de pessoas com 80 anos ou mais é de 2.935.585 (IBGE, 2011), representando 14% da população idosa brasileira. Caso esse crescimento se mantenha, a partir de 2030, o número de pessoas idosas ultrapassará o número de pessoas jovens entre 15 e 29 anos (Brasil, 2010).

O envelhecimento é entendido como um processo inerente a todos os seres vivos e que se caracteriza tanto por alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas, quanto por modificações psicológicas (Carvalho et al., 2006). Sabendo-se que é um processo inevitável e irreversível, a questão é amenizar os declínios orgânicos associados (Mazo, 2008). Uma de suas consequências é a diminuição gradual da capacidade funcional, o que para o idoso pode significar dificuldades na manutenção da capacidade de realizar atividades da vida diária, necessárias para uma vida independente e autônoma (Oliveira et al., 2011). Nesta fase da vida, o sistema neuromuscular tem um maior impacto negativo na mobilidade e capacidade funcional do idoso (Matsudo et al., 2001). Com isso, a prática de exercício físico deve ser estimulada nos idosos, buscando manter e prolongar a independência, autonomia e um bom desempenho motor, fundamental para manter a qualidade de vida e lidar com as atividades cotidianas (Carvalho et al., 2004).

A perda da força e da massa muscular leva a uma limitação funcional dos idosos (Carter et al., 2001). A força muscular máxima é

alcançada por volta dos 30 anos; por outro lado, essa força máxima entra em declínio a partir dos 50 anos de maneira aproximada a 15% por década (Rogers e Evans, 1993), apresentando-se mais acentuada nos membros inferiores que nos membros superiores (Hughes et al., 2001). A redução da força ocorre devido à perda de massa muscular quer seja pela atrofia ou pela redução do número de fibras musculares (Lexell et al., 1988; Frontera et al., 1991). Dados mostram que a atrofia muscular é observada principalmente nas fibras tipo II (anaeróbias, de contração rápida) com uma redução média de 26% entre os 20 e 80 anos (Lexell et al., 1988). Estudo realizado com amostras do músculo vasto lateral de cadáveres mostrou uma redução de 50% do número de fibras musculares na nona década de vida quando comparado a jovens de 20 anos de idade (Lexell et al., 1988). As unidades motoras são preservadas pelo menos até a sétima década e, após essa idade, ocorre declínio dessas unidades e perda de motoneurônios alfa (Doherty et al., 2002). Alguns trabalhos mostram que, com o avançar da idade, reduções da capacidade de recrutamento neural podem contribuir para as alterações funcionais observadas nos idosos (Hakkinen et al., 1996; Urbanek et al., 2001).

Pesquisa realizada com idosos (idade média de 75 anos) que apresentavam uma diminuição da força dos músculos extensores do joelho mostrou uma maior fatigabilidade e também uma maior dependência na realização de atividades de vida diária (Avlund et al., 1994). Baixos índices de força estão relacionados com uma maior susceptibilidade a quedas e consequentes fraturas facilitadas pela desmineralização óssea (Carter et al., 2001).

As mitocôndrias estão intimamente ligadas ao bom funcionamento do músculo esquelético. Estudos mostram que uma diminuição na capacidade oxidativa do músculo esquelético está associada à diminuição da função mitocondrial, como a redução da atividade da cadeia de transporte de elétrons (Conley et al., 2000; Hagen et al., 2004), redução da síntese de ATP (Drew et al., 2003) e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Muller et al., 2007). Estudo em ratos *Fisher 344 Brown-Norway F1*, um modelo de roedor que mais mimetiza o envelhecimento dos seres humanos (Lexell et al., 1988), demonstrou declínios de massa muscular de 15 a 20% entre ratos adultos velhos (28 meses), mas essa queda é mais drástica ainda (de 30 a 60%) em ratos mais idosos (36 meses) (Hagen et al., 2004). Sendo assim, ao passo que a população envelhece, fica mais evidente a

necessidade de estudar os fatores relacionados aos declínios da função muscular.

2.2 METABOLISMO MUSCULAR E ENVELHECIMENTO

Como discutido anteriormente, a perda da massa muscular e consequentemente da força muscular é o mecanismo responsável pela deterioração na mobilidade e na capacidade funcional do indivíduo idoso. Por essa razão, pesquisas investigam quais são as causas e os mecanismos envolvidos na perda da força muscular, buscando estratégias para manter ou melhorar a qualidade de vida, minimizando os efeitos deletérios nessa etapa da vida (Matsudo et al., 2000). A redução do tamanho e do número de fibras musculares é o resultado da combinação da atrofia de cada fibra muscular, influenciando diretamente na diminuição da massa muscular (Dirks et al., 2005). Lexell et al. (1988), publicaram um dos primeiros estudos na tentativa de explicar a causa da atrofia muscular causada pelo envelhecimento. Analisando o músculo vasto lateral de cadáveres entre 15 e 83 anos de idade, evidenciaram vários fatores que apontavam informações relevantes como diminuição na área de secção transversa das fibras musculares dos indivíduos maiores de 70 anos, alterações na forma das fibras, diminuição de 40% da área muscular, diminuição de 39% no número total de fibras musculares e diminuição seletiva de 26% no tamanho das fibras muscular do tipo II. Embora o estudo seja de natureza transversal e a análise seja de um único tipo de músculo do corpo, os dados mostram claramente que a atrofia muscular do idoso é causada tanto pela perda do número de fibras, como pela diminuição no tamanho das fibras musculares, especialmente as do tipo II (Lexell et al., 1988).

O aumento da idade está associado à redução da capacidade muscular oxidativa, do fluxo sanguíneo (Rogers e Evans, 1993), diminuição na atividade da ATPase miofibrilar, diminuição das enzimas glicolíticas e oxidativas, diminuição dos estoques de ATP, creatina fosfato, glicogênio e proteínas mitocondriais (Cartee, 1994). As enzimas da glicogenólise (fosforilase) e da glicólise (hexoquinase e lactato desidrogenase) são marcadamente reduzidas em músculos envelhecidos (Pastoris et al., 2000). Similarmente, a atividade da enzima gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH) também está diminuída com a idade (Lowe et al., 2000).

A função da cadeia de transporte de elétrons diminui consideravelmente em idosos, e pode estar relacionada à deficiência da citocromo c oxidase (complexo IV) (Boffoli et al., 1994). O envelhecimento mitocondrial baseia-se na somática acumulação de mutações do DNA mitocondrial (Wang et al., 2001). Essas mutações interferem na produção de ATP, podem causar interferências na cadeia respiratória e disfunção muscular (Wang et al., 2001). Para determinar o impacto funcional da deleção do DNA mitocondrial, um número de cópias dos níveis transcritos das subunidades I e III da COX (cicloxigenase) mitocondrial foi mensurada. De fato, a atividade de COX foi encontrada em declínio com o aumento da idade (Barazzoni et al., 2000). Similarmente, em outro estudo com músculo de idosos, foi relatado uma redução na atividade de COX1 (complexo IV) (Wanagat et al., 2001). A fosforilação oxidativa ocorre na membrana interna das mitocôndrias e necessita de substratos energéticos e também do oxigênio para atuar como acceptor final de elétrons e de íons hidrogênio para formar energia e uma molécula de água. A energia liberada pelo transporte de elétrons é utilizada para bombear íons hidrogênio da matriz interna da mitocôndria para a externa, gerando um potencial elétrico que determina o fluxo de íons hidrogênio para o interior da matriz através de uma enzima denominada ATPase. A energia derivada deste fluxo de hidrogênio é então utilizada pela ATPase para converter a molécula de adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP) (Lanza e Nair, 2010).

Alterações no sistema neuromuscular exercem impacto negativo na qualidade de vida do idoso. À medida que o envelhecimento ocorre, o desempenho máximo tanto nos treinos de resistência quanto nos de força diminuem aproximadamente 1% a 2% ao ano, iniciando entre os 20 e 35 anos (Drinkwater et al., 1975). Essas alterações são minimizadas em idosos que praticam exercício físico, o que indicaria que a inatividade pode ter um papel importante no processo de envelhecimento (Cress et al., 1995).

2.3 BIOGÊNESE MITOCONDRIAL E ENVELHECIMENTO

Entre os fenômenos biológicos afetados pelo envelhecimento, a redução da biogênese mitocondrial exerce efeitos cruciais no processo de perda da função muscular associada à idade (Lanza e Nair, 2010). Entre os reguladores da biogênese mitocondrial, a atividade da AMPK parece estar associada a alterações metabólicas observadas em células envelhecidas (Reznick et al., 2007). A AMPK é uma molécula heterotrimérica que contém uma subunidade catalítica (α), com duas isoformas ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), e duas subunidades regulatórias (β e γ), com as isoformas $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$. Sua ativação ocorre através da fosforilação do resíduo de treonina 172, localizado no sítio de ativação do domínio catalítico da subunidade α (Carling, 2004).

A ativação da AMPK é causada pelo decréscimo do estado energético celular. AMPK é extremamente sensível à alteração da razão Adenosina monofosfato/Adenosina trifosfato (AMP/ATP), que atua como um sensor metabólico em diversos tipos celulares, uma vez que é responsável pela manutenção da homeostasia energética (Carling, 2004). Uma vez fosforilada, AMPK ativa vias que geram o aumento de ATP, tais como a oxidação de ácidos graxos ao mesmo tempo em que desativa as vias anabólicas que consomem o ATP, como a síntese de ácidos graxos (Ropelle et al., 2005). É a principal enzima com função sensora da energia celular e, estímulos como o exercício físico, hipóxia ou jejum prolongado ativam a AMPK (Long e Zierath, 2006). Sua função principal é de restaurar o estado energético da célula através de sinalização para muitos alvos, ou seja, a ativação aguda de AMPK aumenta a captação de glicose e oxidação de gordura (Merrill et al., 1997), enquanto inibe a síntese de proteínas (Bolster et al., 2002). Já quando ativada cronicamente, promove biogênese mitocondrial, principalmente por ativar SIRT-1 (Cantó et al., 2010). As sirtuínas podem estar envolvidas ou mesmo determinar a longevidade; evidências indicam uma diminuição da função da SIRT-1 em células senescentes (Michishita et al., 2005). Em adição, pesquisas apontam que o uso de RNA de interferência (siRNA) para SIRT-1 em células humanas normais, leva à senescência dessas células (Ota et al., 2006).

Em mamíferos foram identificadas sete isoformas das sirtuínas (SIRT-1 a SIRT-7) e destas a SIRT-1 e a SIRT-2 são as mais estudadas (Kelly, 2010), por participarem na regulação da longevidade e processos metabólicos (Yamamoto et al., 1992), desde o reparo do DNA e

estabilidade do genoma, até homeostase da glicose e dos lipídios (Michan et al., 2007). As sirtuínas pertencem à família das deacetilases de histonas (HDAC), sendo assim, regulam a acetilação das histonas modulando diretamente a estrutura dos nucleossomos e a transcrição gênica (Kelly, 2010). A SIRT-1 é um membro da família das sirtuínas dependentes da ativação por nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e responde tanto ao exercício quanto a sinais nutricionais (Kelly, 2010). Em mamíferos, as SIRT-1 e 2 estão presentes no citoplasma e núcleo e estão relacionadas ao controle do ciclo celular, enquanto que, as SIRT-1, 2, 6 e 7 encontram-se no núcleo e estão envolvidas com a estabilidade do genoma e proliferação celular. Já as SIRT-3, 4 e 5 estão localizadas nas mitocôndrias e estão associadas ao metabolismo energético e ao estresse oxidativo (Michishita et al., 2005; Tennen et al., 2010). A SIRT-1 tem sido proposta como um regulador central na biogênese mitocondrial no músculo esquelético induzida por exercício, por regular a atividade de PGC-1 (Cantó et al., 2009; Cantó et al., 2010).

A PGC-1 é uma proteína de 798 aminoácidos, inicialmente descrita em tecido adiposo marrom, através de um sistema híbrido em levedura (Puigserver et al., 1998). A família PGC-1 é composta por três membros, PGC-1 α , PGC-1 β e o PGC-1 coativador relacionado (PRC), que interagem com fatores de transcrição e receptores nucleares para exercer as suas funções biológicas (Handschin e Spiegelman, 2006). Essa molécula não se liga ao DNA, mas age através de sua interação (proteína-proteína) com os fatores transcricionais do DNA regulando a expressão gênica. A superexpressão de PGC-1 α pode induzir funções ligadas à biogênese mitocondrial (Lavu et al., 2008). Essa proteína coativa vários receptores nucleares, incluindo o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR), fator nuclear do hepatócito (HNF4 α), receptores relacionados a estrógenos (ERR), além do fator respiratório nuclear 1 (NRF-1), entre outros (Handschin e Spiegelman, 2006).

A PGC-1 α também controla a expressão de diversos genes envolvidos na homeostase energética celular (Puigserver et al., 1998). Está presente em tecidos com alto metabolismo oxidativo e pode aumentar a biogênese mitocondrial e a oxidação de ácidos graxos em resposta a estímulos como o jejum e o exercício (Baar et al., 2002). A PGC-1 α desempenha funções metabólicas ativando vários fatores de transcrição que levam ao aumento da expressão de genes envolvidos na

função respiratória, aumento da capacidade enzimática para beta-oxidação de ácidos graxos, ciclo de krebs e fosforilação oxidativa (Cantó et al., 2010). O aumento da expressão de PGC-1 α ocorre em situações onde há uma necessidade energética maior, por exemplo, durante o exercício físico. A redução da expressão de PGC-1 α tem sido associada ao declínio da biogênese mitocondrial associada ao envelhecimento (Cantó et al., 2010). Por outro lado, o aumento da expressão da PGC-1 α é capaz de melhorar a disfunção mitocondrial (Hepple et al., 2006).

Sendo assim, a AMPK, a SIRT-1 e a PGC-1 α desempenham papéis importantes nas adaptações metabólicas em diferentes tecidos (Lagouge et al., 2006). A AMPK ativa a PGC-1 α através de sua fosforilação (Jager et al., 2007); em adição, PGC-1 α pode aumentar a transcrição gênica tanto de SIRT-1 quanto de AMPK (Cantó et al., 2009). Porém, o aumento na atividade da AMPK resulta tanto em fosforilação da PGC-1 α quanto em aumento nos níveis de NAD⁺; níveis aumentados de NAD⁺ ativam SIRT-1 que deacetila a PGC-1 α , ativando-a (Cantó et al., 2010).

2.4 EXERCÍCIO FÍSICO E ENVELHECIMENTO

Os efeitos do exercício físico na idade biológica, capacidade funcional e saúde do idoso foram demonstrados (Andrews, 2001). O declínio físico e funcional associado ao envelhecimento pode ser revertido ou, pelo menos, minimizado através do exercício físico (Buchner et al., 1997; Adams et al., 2001). Além disso, a prática de exercícios físicos está associada à redução da incidência de doenças cardiovasculares (Kell et al., 2001), diabetes tipo II (Castaneda et al., 2003) e redução da ansiedade e depressão (Singh et al., 1997). Ainda, a prática regular de exercícios físicos promove aumento do conteúdo mineral ósseo e conseqüente redução do risco de fraturas em idosos (Kerr et al., 2001). Desta forma, um adequado programa de treinamento físico pode prevenir essas doenças comuns do envelhecimento.

Pesquisa realizada com idosos (72 a 98 anos) mostrou uma melhora na velocidade da marcha e velocidade de subir/descer degraus após 10 semanas de treinamento de força de alta intensidade (Fiatarone et al., 1994). Buchner et al. (1997) descreveram uma diminuição das quedas em idosos submetidos ao treinamento combinado de força, resistência e flexibilidade. Os programas de treinamento de força

melhoram a coordenação neuromuscular e a potência, sendo assim, um pequeno estímulo é suficiente para reduzir a fragilidade muscular provocada pelo envelhecimento (Adams et al., 2001). Alterações bioquímicas, na biomecânica do tecido muscular e conjuntivo, na ativação do sistema nervoso central e na coordenação motora, explicam os ganhos de força com o treinamento intenso, ou seja, os músculos dos idosos respondem a uma plasticidade semelhante à encontrada nos jovens (Rogers e Evans, 1993). Em estudo realizado com ratos submetidos à corrida em esteira, durante 5 dias por semana, por 8 semanas, houve uma melhora da função mitocondrial do músculo esquelético conforme evidenciado pelo aumento na atividade das enzimas mitocondriais (citrato sintase, β - hidroxiaxil Coenzima A desidrogenase, citocromo c oxidase) e aumento das taxas de síntese de ATP mitocondrial (Chow et al., 2007). Análises de *microarray* revelaram que estas adaptações ao treinamento foram acompanhadas por um aumento na transcrição de genes correspondentes às proteínas mitocondriais. Estas mudanças induzidas pelo exercício ocorreram em conjunto com o aumento do DNA mitocondrial e a expressão de PGC-1 α (Lanza e Nair, 2010).

O exercício de resistência promove a biogênese mitocondrial através da ativação de PGC-1 α por duas maneiras distintas: um rápido aumento na atividade da PGC-1 α seguido por um aumento mais crônico na expressão de PGC-1 α (Wright et al., 2007). A fase rápida inicial de adaptação foi abordada pela primeira vez a partir de três principais observações feitas por Wright et al. (2007); primeiro, a transcrição de genes e expressão de determinadas proteínas mitocondriais aumentou semelhantemente ou mais rapidamente comparado com a expressão da PGC-1 α em resposta ao exercício; segundo, NRF1 e NRF2 foram ligados aos seus respectivos promotores antes de qualquer aumento na expressão de PGC-1 α ; terceiro, a maioria da PGC-1 α é encontrada dentro do citoplasma no músculo em repouso, mas transloca para o núcleo em resposta ao exercício. Os autores propõem que antes de quaisquer mudanças na expressão da PGC-1 α , o exercício inicia rapidamente o processo da biogênese mitocondrial através da sua ativação (Wright et al., 2007). Estudo realizado em músculo sóleo de ratos que foram submetidos a 45 minutos de corrida à 20m/min com 18,5% de inclinação, durante 14 dias, mostrou um aumento na expressão da proteína PGC-1 α 18 horas após o exercício; acompanhado por aumento na proteína SIRT-1, 2 horas após o exercício (Suwa et al.,

2008). Estes resultados sugerem que o exercício de resistência aumenta a expressão das proteínas SIRT-1 e PGC-1 α melhorando a biogênese mitocondrial do músculo (Suwa et al., 2008). Em outro estudo, ratos submetidos a 6 horas de natação apresentaram aumento na expressão de PGC-1 α nos músculos dos membros anteriores (Baar et al., 2002).

O exercício físico é um potente ativador da biogênese mitocondrial; essa ativação pode minimizar os declínios musculares associados ao envelhecimento, possivelmente através de moléculas, tais como AMPK, SIRT-1 e PGC-1 α (Koltai et al., 2012). O exercício físico aumenta AMPK e SIRT-1, aumentando também a atividade de PGC-1 α , tanto por fosforilação direta (papel da AMPK), quanto por sua deacetilação (papel da SIRT-1). Dessa forma, o exercício físico pode ativar a biogênese mitocondrial através da deacetilação do resíduo de lisina de PGC-1 α mediada por SIRT-1 (Lavu et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se os efeitos do exercício físico sobre os níveis proteicos de SIRT-1 e PGC-1 α e fosforilação da AMPK em músculo quadríceps de ratos adultos velhos ocorre de maneira dependente da intensidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do envelhecimento sobre os níveis proteicos de SIRT-1, PGC-1 α , AMPK, CPT1, Cit-C, SDH e citrato sintase;

Avaliar os efeitos de diferentes intensidades de exercício físico sobre os níveis proteicos de SIRT-1, PGC-1 α , AMPK, CPT1, Cit-C, SDH e citrato sintase em ratos adultos velhos;

Avaliar os efeitos do envelhecimento sobre as atividades da SDH, citrato sintase e complexos mitocondriais;

Avaliar os efeitos de diferentes intensidades de exercício sobre as atividades da SDH, citrato sintase e complexos mitocondriais em ratos adultos velhos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos com dois meses de vida, classificados como jovens; e ratos com 18 meses de vida, classificados como adultos velhos; animais estes provenientes do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os ratos foram distribuídos em seis grupos ($n = 6$): jovens não exercitados (Joven NE), adultos velhos não exercitados (Adulto velho NE), jovens exercitados em esteira com velocidade de 0,8 km/h (Jovem 0,8km/h), adultos velhos exercitados em esteira com velocidade de 0,8 km/h (Adulto velho 0,8km/h), jovens exercitados em esteira com velocidade de 1,2 km/h (Jovem 1,2km/h) e adultos velhos exercitados em esteira com velocidade de 1,2 km/h (Adulto velho 1,2km/h). Os animais receberam água e alimento *ad libitum* e foram expostos a ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, com temperatura controlada entre 20°C e 22°C.

4.2 PROGRAMA DE EXERCÍCIO FÍSICO

Os ratos inicialmente foram adaptados ao exercício de corrida em esteira (velocidade de 0,6 km/h e sem inclinação) por dez minutos no primeiro dia; vinte minutos no segundo dia; e assim sucessivamente até completar 50 minutos no quinto e último dia de adaptação. Após a semana de adaptação, os animais realizaram corrida de 50 minutos, 5 dias por semana com velocidade de 0,8 ou 1,2 km/h, por oito semanas, sem inclinação. Pesquisa realizada por Leandro et al. (2007) demonstrou que a velocidade de execução correspondeu a cerca de 50% e 75% do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), respectivamente. Os animais não receberam estímulos elétricos, porém foi realizado estímulo manual. Os ratos não exercitados foram colocados sobre a esteira desligada durante 50 minutos diários, pelo mesmo período de 8 semanas.

4.3 EUTANÁSIA E EXTRAÇÃO DO MÚSCULO QUADRÍCEPS

Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício todos os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal com ketamina (50 mg/kg de peso corporal) e xilazina (20 mg/kg de peso corporal) e a perda dos reflexos podal e corneano foram usados como

controle da anestesia. Com os animais anestesiados foi realizada a extração do quadríceps para análises de proteínas intracelulares pela técnica de imunoblot e atividades enzimáticas. Após, os animais foram eutanasiados por guilhotina.

4.4 IMUNOBLOTTING

Os tecidos foram homogeneizados em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado a 11000 rpm por 30 minutos. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). As proteínas foram ressuspensas e conservadas em tampão Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT (Laemmli, 1970) e realizou-se a determinação do *imunoblotting* com anticorpos específicos. Para isso, alíquotas contendo 250µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em cuba Mini-PROTEAN® Tetra electrophoresis system (Bio-Rad, Hércules, Estados Unidos da América), com solução tampão para eletroforese. As proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hércules, Estados Unidos da América). As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora albumina por 2 horas, à temperatura ambiente, para diminuir as ligações proteicas inespecíficas. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos diluídos em albumina 5%: anti-fosfo AMPK^{Thr172}, anti-fosfo ACC^{Ser79}, anti-AMPK, anti-ACC (Cell Signaling Technology, Beverly, Estados Unidos da América), anti-SIRT-1, anti-PGC-1 α , anti-CPT-1, anti-SDH, anti-citrato sintase, anti-Cit-C e anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Estados Unidos da América), sob agitação constante e *overnight* à 4°C. A seguir, as membranas foram incubadas em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após, as membranas foram incubadas por dois minutos em substrato enzimático e expostas ao filme de RX em cassete de revelação

autoradiográfica. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP G2710) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, Estados Unidos da América).

4.5 ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE

A atividade da citrato sintase foi determinada de acordo com o método descrito por Shepherd e Garland (1969). Foi utilizada uma mistura de reação contendo 100 mM Tris (pH 8,0), 100 mM de acetil-CoA, 100 mM de 5,5-Dithiobis-(Ácido 2-Nitronbenzóico), 0,1% de Triton X-100 e 2-4 µg de proteína sobrenadante. A reação foi iniciada com 100 uM de oxaloacetato e monitorada a 412 nm, durante 3 min a 25°C.

4.6 ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE

A atividade da succinato desidrogenase (SDH) foi determinada de acordo com o método de Fischer et al. (1985), medido pela diminuição na absorbância em função da redução de 2,6-di-cloro-indofenol (2,6-DCIP) em 600 nm com 700 nm como comprimento de onda de referência ($\epsilon = 19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na presença de metassulfato de fenazina (PMS). A mistura de reação consiste em 40 mM de fosfato de potássio (pH 7,4), 16 mM de succinato e 8 µM de 2,6-DCIP, que foram pré-incubados com 40-80 µg de proteína homogeneizada a 30°C durante 20 min. Na sequência foram adicionados 4 mM de azida sódica, 7 uM de rotenona e 40 mM de 2,6-DCIP. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de PMS e foi monitorizada durante 5 minutos.

4.7 ATIVIDADE DO COMPLEXO I

A atividade da NADH desidrogenase foi avaliada pelo método descrito por Cassina e Radi (1996), pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm a 25°C. As amostras foram pré-incubadas com tampão fosfato de potássio de 100 mM, ferrocianeto de 10 mM, NADH de 14 mM, rotenona 1,0 mM.

4.8 ATIVIDADE DO COMPLEXO II

A atividade enzimática da succinato-coenzima Q redutase (complexo II) foi medida pelo método descrito por Fischer et al. (1985), onde a redução da absorbância do 2,6-DCIP em 600 nm é usada para o cálculo da atividade do complexo II a 30°C. As amostras foram pré-incubadas em tampão fosfato de potássio de 62,4 mM, succinato de sódio de 250 mM, DCIP de 0,5 mM, azida sódica de 100 mM, rotenona 1 mM.

4.9 ATIVIDADE DO COMPLEXO II-III

A atividade da citocromo *c* oxiredutase (complexo II–III) foi determinada de acordo com a técnica descrita por Fischer et al. (1985), onde foi medida através da redução do citocromo *c* para succinato. Finalizando com a preparação da amostra, a mesma utilizada para citrato sintase a 25°C. As amostras foram pré-incubadas em tampão fosfato de potássio de 62,4 mM, succinato de sódio de 250 mM, azida sódica de 100 mM, rotenona 0,5 mM, citocromo 0,5%.

4.10 ATIVIDADE DO COMPLEXO IV

A atividade da citocromo *c* oxidase (complexo IV) foi determinada de acordo com Rustin et al. (1994), e é calculada pela redução da absorbância causada pela oxidação do citocromo *c* reduzido, medido em 550 nm. A atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram expressos como nmol/min⁻¹/mg de proteína a 25°C. As amostras foram pré-incubadas em tampão fosfato de potássio de 10 mM, lauril maltosídeo de 42 mM, citocromo 1%.

4.11 QUESTÕES ÉTICAS

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios e os procedimentos descritos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocolo n°92/2009).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), seguida do teste Bonferroni *post hoc*. Adotou-se nível de significância $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada através do software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 para *Microsoft Windows*.

5 RESULTADOS

5.1 NÍVEIS PROTEICOS DA PGC-1 α , SIRT-1 E FOSFORILAÇÃO DA AMPK E ACC NO QUADRÍCEPS DE RATOS JOVENS E ADULTOS VELHOS APÓS TREINAMENTO DE INTENSIDADE 0,8 e 1,2 Km/h

No presente estudo avaliou-se algumas moléculas cruciais envolvidas na biogênese mitocondrial, assim como enzimas e proteínas relacionadas ao metabolismo oxidativo. Enquanto a fosforilação da AMPK apresentou-se diminuída no quadríceps de adultos velhos não exercitados quando comparados aos ratos jovens não exercitados (Fig. 1A), não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos para a fosforilação da acetil CoA carboxilase (ACC) (Fig. 1B). Nos grupos jovem treinado a 0,8 Km/h e adulto velho treinado a 0,8 Km/h observou-se um aumento na fosforilação da AMPK e ACC em relação aos seus respectivos grupos não treinados; porém, os ratos adultos velhos exercitados a 0,8 Km/h apresentaram menor fosforilação da AMPK e ACC em comparação com os ratos jovens na intensidade de treinamento 0,8 Km/h (Fig. 1A e 1B, respectivamente). Além disso, em ambos os grupos treinados a 1,2 Km/h observou-se aumento na fosforilação da AMPK e ACC em comparação aos seus respectivos grupos na intensidade de 0,8 Km/h, porém não foram observadas diferenças entre ratos jovens e adultos velhos submetidos ao exercício na intensidade de 1,2 Km/h (Fig. 1A e 1B, respectivamente). Os níveis de proteína total da AMPK e ACC não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Fig. 1A e 1B, painéis inferiores).

Os níveis proteicos da SIRT-1 e PGC-1 α foram diminuídos no quadríceps de ratos adultos velhos não exercitados em comparação aos jovens não exercitados (Fig. 1C e 1D, respectivamente). Os ratos jovens e adultos velhos treinados a 0,8 Km/h apresentaram aumento nos níveis proteicos da SIRT-1 e PGC-1 α , em relação aos ratos jovens e adultos velhos não exercitados, respectivamente; porém, adultos velhos treinados a 0,8 Km/h apresentaram menores níveis da SIRT-1 e PGC-1 α em relação aos ratos jovens treinados com a intensidade de 0,8 Km/h. Além disso, os grupos jovem e adulto velho treinados a 1,2 Km/h aumentaram os níveis da SIRT-1 e PGC-1 α , quando comparados aos seus respectivos grupos exercitados a 0,8 Km/h. No entanto, não foram

observadas diferenças entre ratos jovens e adultos velhos para a intensidade de 1,2 Km/h (Fig. 1C e 1D).

Figura 1

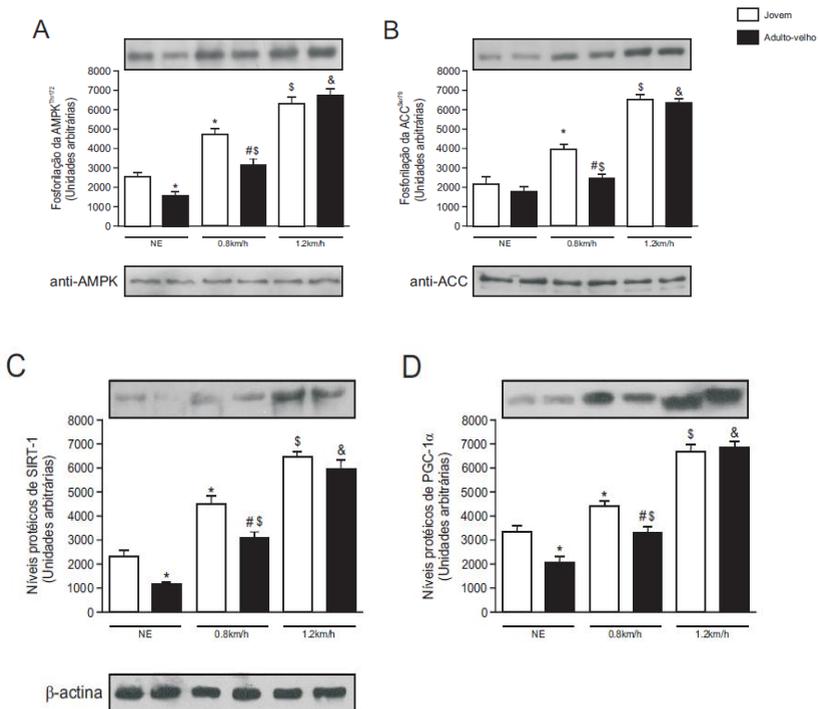


Fig. 1. Efeitos de diferentes intensidades de exercícios sobre a fosforilação da AMPK e ACC e os níveis proteicos de SIRT-1 e PGC-1 α no quadríceps de ratos jovens e adultos velhos. Fosforilação da AMPK (A) e ACC (B), níveis proteicos da SIRT-1 (C) e PGC-1 α (D). Os painéis acima mostram blots representativos dessas proteínas. Os painéis abaixo mostram blots representativos dos níveis de proteína total da AMPK (A) e ACC (B). Resultados são expressos como unidades arbitrárias. Barras representam média \pm EPM de seis animais. * $p < 0,05$ versus ratos jovens NE, # $p < 0,05$ versus ratos adultos velhos NE, \$ $p < 0,05$ versus ratos jovens a 0.8 Km/h, e & $p < 0,05$ versus ratos adultos velhos a 0.8 Km/h.

5.2 NÍVEIS PROTEICOS DA CPT-1, Cyt-C E SDH, E ATIVIDADE DA SDH E CITRATO SINTASE NO QUADRÍCEPS DE RATOS JOVENS E ADULTOS VELHOS APÓS TREINAMENTO DE INTENSIDADE 0,8 E 1,2 Km/h

Posteriormente, determinaram-se os níveis e atividades de importantes enzimas metabólicas. No quadríceps de ratos adultos velhos não exercitados foram observados menores níveis das proteínas carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), e citocromo C (Cyt-C), em comparação aos jovens não exercitados. Ambos os grupos, jovens e adultos velhos treinados a 0,8 Km/h apresentaram maiores níveis proteicos de CPT1 e Cyt-C, quando comparados aos seus respectivos grupos não exercitados. Entretanto, em adultos velhos exercitados a 0,8 Km/h observaram-se menores níveis da CPT1 e Cyt-C em relação aos jovens exercitados à mesma intensidade. Nos grupos jovem e adulto velho treinados a 1,2 Km/h houve aumento nos níveis proteicos de CPT1 e Cyt-C, quando comparados aos seus respectivos grupos (jovem exercitado a 0,8 Km/h e adulto velho exercitado a 0,8 Km/h). Contudo, não se observou diferenças significativas entre os ratos jovens e adultos velhos com a intensidade de treinamento de 1,2 Km/h (Fig. 2A e 2B).

Os níveis proteicos da SDH não apresentaram diferenças significativas entre os ratos jovens e adultos velhos para todas as situações experimentais avaliadas: NE, 0,8Km/h e 1,2 km/h (Fig. 2C). Entretanto, a atividade da SDH foi semelhante entre os grupos jovem e adulto velho não exercitados e entre os grupos jovem e adulto velho exercitados a intensidade de 1,2 Km/h. Por outro lado, nos ratos jovens treinados a 0,8 Km/h foi observado um aumento da atividade da SDH em relação aos jovens não treinados; o que não foi observado entre os grupos adulto velho não exercitado e adulto velho exercitado a 0,8 Km/h (Fig. 2D). A atividade da SDH foi menor nos ratos adultos velhos em comparação aos ratos jovens, na intensidade de treinamento de 0,8 Km/h. Contudo, o treinamento a 1,2 Km/h aumentou a atividade da SDH nos ratos adultos velhos em relação a seu respectivo grupo treinado a 0,8 Km/h (Fig. 2D).

Os níveis proteicos e a atividade da citrato sintase apresentam-se diminuídos no quadríceps de ratos adultos velhos não exercitados em relação aos ratos jovens não exercitados (Fig. 2E e 2F, respectivamente). Nos grupos jovem e adulto velho treinados na intensidade de 0,8 Km/h os níveis proteicos da citrato sintase estão aumentados em relação aos

seus respectivos grupos não exercitados; entretanto, ratos adultos velhos treinados a 0,8 Km/h possuem menores níveis proteicos e atividade da citrato sintase quando comparados com ratos jovens treinados com mesma intensidade. Quanto ao treinamento a 1,2 Km/h, tanto o grupo jovem quanto o grupo adulto velho apresentaram maiores níveis proteicos e atividade da citrato sintase em relação a seus respectivos grupos exercitados na intensidade de 0,8 Km/h. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os animais jovens e os animais adultos velhos na intensidade de treinamento 1,2 Km/h (Fig. 2E e 2F).

Figura 2

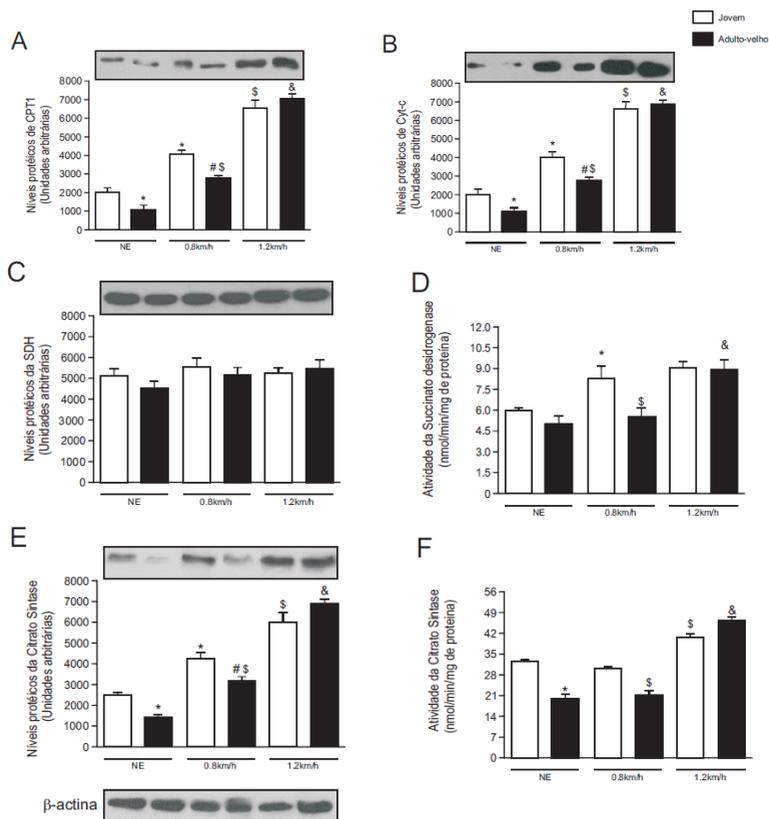


Fig. 2. Efeitos de diferentes intensidades de exercícios sobre os níveis proteicos da CPT-1, Cyt-C, citrato sintase, SDH e sobre a atividade da citrato sintase e SDH no quadríceps de ratos jovens e adultos velhos. Níveis proteicos da CPT-1 (A), Cyt-C (B), SDH (C) e citrato sintase (E). Painéis acima mostram blots representativos destas proteínas. Resultados são expressos como unidades arbitrárias. Atividade da succinato desidrogenase (D) e citrato sintase (F). Resultados são expressos em nmol/min/mg de proteína. Barras representam média ± EPM de seis animais. *p < 0,05 versus ratos jovens NE, # p < 0,05 versus ratos adultos velhos NE, \$ p < 0,05 versus ratos jovens a 0.8 Km/h, e & p < 0,05 versus ratos adultos velhos a 0.8 Km/h.

5.3 ATIVIDADE DOS COMPLEXOS MITOCONDRIAIS NO QUADRÍCEPS DE RATOS JOVENS E ADULTOS VELHOS APÓS TREINAMENTO DE INTENSIDADE 0,8 E 1,2 Km/h

Animais jovens e adultos velhos não exercitados não apresentaram alterações significativas na atividade dos complexos mitocondriais I, II e II - III, quando comparados entre si (Fig. 3A, 3B e 3C, respectivamente). De maneira similar, não foi observada diferença estatística entre jovens e adultos velhos exercitados a 0,8 Km/h na atividade dos complexos I e II - III (Fig. 3A e 3C, respectivamente). Por outro lado, animais adultos velhos não exercitados possuem menor atividade do complexo IV do que animais jovens não exercitados (Fig. 3D), e adultos velhos exercitados a 0,8 Km/h possuem menor atividade nos complexos II e IV que jovens exercitados com mesma intensidade (Fig. 3A e 3D, respectivamente). Nos animais jovens exercitados a 0,8 Km/h, somente o complexo mitocondrial IV apresentou-se maior em relação aos animais jovens não exercitados (Fig. 3D). No entanto, a atividade dos complexos I, II, II-III e IV foi maior nos animais jovens exercitados na intensidade de 1,2 Km/h que nos animais jovens exercitados na intensidade de 0,8 Km/h. Da mesma forma, adultos velhos treinados a 1,2 Km/h apresentaram aumento na atividade dos complexos I, II, II -III e IV em relação ao grupo adulto velho treinado na intensidade de 0,8 Km/h. Contudo, não houve diferença significativa na atividade dos complexos mitocondriais avaliados entre os grupos jovem e adulto velho exercitados com intensidade 1,2 Km/h. (Fig. 3A, 3B, 3C e 3D, respectivamente).

Figura 3

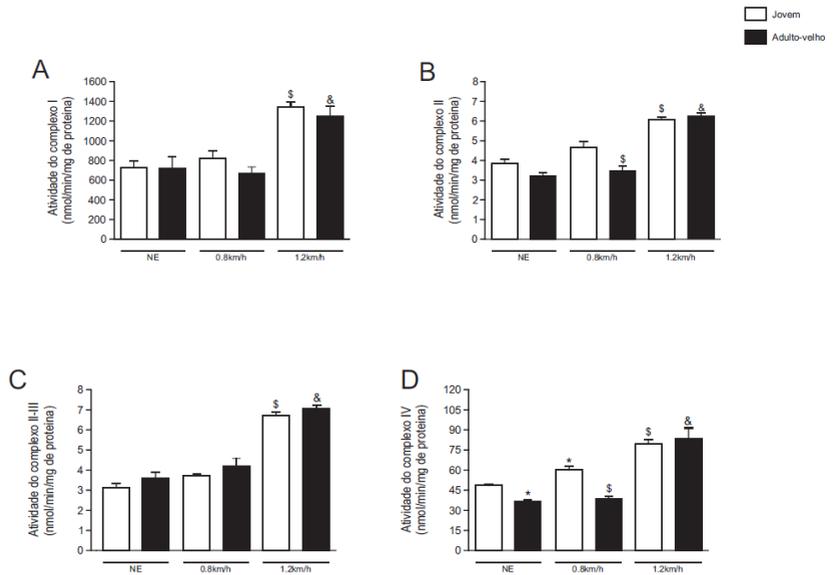


Fig. 3. Efeitos de diferentes intensidades de exercícios sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV no quadríceps de ratos jovens e adultos velhos. Atividade do complexo I (A), II (B), II-III (C), e IV (D). Resultados expressos em nmol/min/mg de proteína. * $p < 0,05$ versus ratos jovens NE, # $p < 0,05$ versus ratos adultos velhos NE, ^s $p < 0,05$ versus ratos jovens a 0.8 Km/h, e [&] $p < 0,05$ versus ratos adultos velhos a 0.8 Km/h.

6 DISCUSSÃO

O envelhecimento, em especial o que acontece de forma sedentária, resulta em diminuição progressiva da capacidade funcional e declínio na qualidade de vida, condição associada à diminuição da função muscular (Bua et al., 2006; Lanza e Nair, 2010). Ainda, os idosos apresentam um declínio fisiológico acompanhado principalmente por doenças crônico-degenerativas não transmissíveis, tais como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (Kalache e Gray, 1985). O envelhecimento é associado a alterações na função e força muscular, entretanto, o mecanismo pelo qual o envelhecimento reduz tanto a função quanto a força muscular não está totalmente elucidado. Investigações apontam que a função mitocondrial diminui com a idade e que pode estar relacionada a uma diminuição do metabolismo e da força muscular decorrente do envelhecimento (Short et al., 2005; Lanza et al., 2008). Em adição, estudos demonstram que as moléculas AMPK, PGC-1 α e SIRT-1 podem estar envolvidas neste processo (Jager et al., 2007; Cantó et al., 2009). Estudo realizado por Sasaki et al. (2006) mostrou que os níveis da proteína SIRT-1 estão diminuídos em fibroblastos embrionários de camundongos que apresentam senescência prematura. O papel da SIRT-1 no músculo esquelético é atribuído, principalmente, à sua capacidade em deacetilar e ativar PGC-1 α (Wu et al., 1999; Lavu et al., 2008), que permite a adaptação das células musculares esqueléticas para atender às demandas energéticas. Wu et al. (1999) demonstraram que a expressão da PGC-1 α em miotubos aumenta a expressão de Cyt-C e promove biogênese mitocondrial. Além disso, a inibição da AMPK impede a deacetilação de PGC-1 α através da SIRT-1 em células do músculo esquelético, diminuindo a atividade do complexo mitocondrial e prejudicando o metabolismo oxidativo dos ácidos graxos (Cantó et al., 2009; Cantó et al., 2010). Uma vez ativada, a função geral da AMPK é restaurar o estado energético da célula, através da sinalização de muitos alvos; por exemplo, a AMPK estimula a captação de glicose e a oxidação de gordura, enquanto inibe a síntese de proteínas. Parece que menor ativação de AMPK em idosos poderia explicar a redução do metabolismo nesses indivíduos (Dagon et al., 2005).

Em contrapartida, a participação em um programa de exercício regular e uma modalidade de intervenção efetiva podem prevenir os declínios funcionais associados ao envelhecimento (Buchner et al.,

1997; Adams et al., 2001). Estudos têm demonstrado que o exercício físico marcadamente altera os níveis de PGC-1 α (Wright et al. 2007; Suwa et al., 2008; Koltai et al., 2012), SIRT-1 (Suwa et al., 2008; Koltai et al., 2012) e AMPK (Koltai et al., 2012). Porém, a intensidade exata na qual o exercício físico é capaz de modular estas moléculas permanece pouco investigada. Assim, no presente estudo, foi avaliado se de fato o envelhecimento reduz os níveis proteicos de SIRT-1, PGC-1 α , a fosforilação de AMPK e enzimas metabólicas relacionadas que estão diminuídas com o envelhecimento, bem como os efeitos de diferentes intensidades de exercício físico sobre essas moléculas.

Os resultados mostram que tanto AMPK, quanto SIRT-1 e PGC-1 α apresentam-se aumentadas nos animais jovens e adultos velhos exercitados a 0,8 Km/h em relação a seus respectivos grupos sedentários, e nos animais jovens e adultos velhos exercitados a 1,2 Km/h em comparação com seus respectivos grupos exercitados a 0,8 Km/h. Além disto, estas moléculas apresentam-se mais elevadas na intensidade de 0,8 Km/h em ratos jovens do que nos ratos adultos velhos, porém não houve diferença entre jovens e adultos velhos na intensidade de 1,2 Km/h. Estes resultados sugerem que animais adultos velhos apresentam as mesmas adaptações moleculares que os animais jovens quando são submetidos a exercício de intensidade mais elevada. De acordo com Koltai et al. (2012), o treinamento em esteira é capaz de reverter os efeitos negativos do envelhecimento sobre moléculas cruciais que estão associadas ao controle mitocondrial do músculo esquelético de ratos. De acordo com estes autores, o treinamento em esteira aumentou a atividade da SIRT-1 tanto em ratos jovens quanto em idosos (26 meses de idade). Bayod et al. (2012) observaram que o treinamento em esteira durante 36 semanas aumentou o conteúdo proteico e a atividade da SIRT-1, e a expressão da proteína PGC-1 α no coração, músculo e fígado de ratos idosos. No entanto, não foram encontradas mudanças na atividade da AMPK e na biogênese mitocondrial. Cantó et al. (2009) mostraram que a ativação da AMPK precede e determina as mudanças na atividade da SIRT-1 em situações de estresse energético. A regulação dos níveis de acetilação de reguladores transcricionais através do eixo AMPK/SIRT-1 fornece um mecanismo através do qual os genes mitocondriais e a oxidação de lipídios podem ser rápida e seletivamente controlados em resposta aos níveis de energia (Feige et al., 2008; Cantó et al., 2010). Segundo Tobina et al. (2011), AMPK é ativada pela diminuição da relação

ATP/AMP, fosfocreatina, e níveis de glicogênio. Por outro lado, fosfocreatina e a depleção de glicogênio são dependentes da intensidade do exercício (Jensen e Richter, 2012). Apesar destes parâmetros não terem sido medidos no presente estudo, é possível supor que a intensidade de treinamento mais elevada levou a uma maior depleção destes substratos e foi responsável pelo aumento na ativação da AMPK.

Os resultados na fosforilação da AMPK foram acompanhados por igual modulação nos níveis de fosforilação da ACC. AMPK inativa a ACC, o que resulta em menores níveis de malonil-CoA. Menores níveis de malonil-CoA possibilitam maior entrada de ácidos graxos na mitocôndria (Rutter et al., 2003). Os resultados do presente estudo sugerem que a via lipogênica está reduzida durante o exercício, como também sugere menores níveis de maloni-CoA. Menores níveis de malonil-CoA podem resultar em maior atividade e expressão de CPT1 (Rutter et al., 2003). No presente estudo, os níveis protéicos de CPT1 acompanham a fosforilação da AMPK e ACC.

O processo de envelhecimento pode prejudicar a capacidade oxidativa do músculo esquelético (Bua et al., 2006). A PGC-1 α não é apenas um coativador chave na transcrição, mas também um regulador importante do metabolismo energético. A superexpressão de PGC-1 α no músculo esquelético aumenta a respiração mitocondrial e eleva os níveis de enzimas do ciclo de krebs e da cadeia de transporte de elétrons, tais com a SDH e a Cyt-C (Jager et al., 2007). Em contraste, camundongos deficientes de PGC-1 α têm mitocôndrias e capacidade respiratória diminuídas no músculo esquelético (Wu et al., 1999). Em adição, níveis proteicos da PGC-1 α estão diminuídos no músculo esquelético de ratos idosos (Feige et al., 2006). Consistente com seu papel como regulador crucial da biogênese mitocondrial, a PGC-1 α está intimamente associada com o conteúdo mitocondrial e é induzida pelo exercício físico, jejum e outras condições que aumentam a função mitocondrial (Baar et al., 2002). A interação entre as moléculas AMPK, SIRT-1 e PGC-1 α modula a função mitocondrial e as enzimas do metabolismo lipídico, como a CPT1, Cyt-C e SDH (Feige et al., 2008). Uma vez maiores os níveis dessas proteínas, maior a ativação do ciclo de krebs, com maior produção de NADH e FADH₂ e consequente produção de ATP através da fosforilação oxidativa (Jager et al., 2007). Os resultados mostram que Cyt-C tem níveis proteicos reduzidos com o envelhecimento, e que esta enzima é aumentada com o exercício a 0,8 Km/h e 1,2 Km/h tanto em jovens quanto em adultos velhos. Contudo,

não há diferenças significativas entre ratos jovens e adultos velhos com a intensidade de treinamento de 1,2 Km/h. Os níveis proteicos da SDH parecem não ser modulados pelo exercício físico ou envelhecimento; entretanto, é observado um aumento em sua atividade nos ratos jovens treinados a 0,8 Km/h e nos animais adultos velhos treinados a 1,2 Km/h.

A cadeia respiratória mitocondrial é composta por quatro complexos respiratórios (complexos I-IV), e cada um é capaz de catalisar a transferência de elétrons de uma reação parcial da cadeia respiratória. Sabe-se que a atividade da citrato sintase e da succinato desidrogenase pode ser utilizada para estimar o conteúdo mitocondrial (Rasmussen et al., 2003), e os complexos mitocondriais podem refletir a capacidade oxidativa mitocondrial. Assim, como os resultados da fosforilação da AMPK, e os níveis proteicos da SIRT-1 e PGC-1 α ; os níveis proteicos e a atividade da citrato sintase; e a atividade dos complexos mitocondriais I, II, II-III, e IV, também aumentaram nos grupos jovens e adultos velhos na intensidade de treinamento de 1,2 Km/h. Estudando camundongos *knockout* da AMPK, Jorgensen et al. (2005) relataram reduções significativas na atividade da citrato sintase e conteúdo proteico de um ou mais complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Por outro lado, Cantó et al. (2009) relataram que SIRT-1 possui papel crucial na capacidade da AMPK aumentar a respiração mitocondrial. Além disso, os autores também observaram diminuição na oxidação lipídica e aumento na oxidação de substratos energéticos. Portanto, AMPK e SIRT-1 possuem efeitos similares sobre o envelhecimento e o metabolismo. Assim como a SIRT-1, AMPK é considerada uma das várias moléculas envolvidas na regulação da longevidade em mamíferos (McCarty, 2004).

7 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que o processo de envelhecimento está relacionado à redução da fosforilação da AMPK, dos níveis proteicos de SIRT-1 e PGC-1 α e atividade de enzimas metabólicas relacionadas à função mitocondrial. Por outro lado, o exercício físico pode reverter essa redução, de maneira dependente da intensidade. Os resultados também apontam que o declínio dessas moléculas pode ser revertido em jovens e adultos velhos de magnitudes similares, somente quando os animais são submetidos a intensidades mais elevadas de exercício físico.

REFERÊNCIAS

- Adams K, Swank AM, Berning JM, Sevene-Adams PG, Barnard KL, Shimp-Bowerman J. Progressive strength training in sedentary older African American women. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33(9):1567-76.
- Andrews GR. Promoting health and function in an ageing population. *BMJ.* 2001; 322(7288):728-9.
- Avlund K, Schroll M, Davidsen M, Lovborg B, Rantanen T. Maximal isometric muscle strength and functional ability in daily activities among 75-year-old men and women. *Scand J Med Sci Sports.* 1994; 4(1):32-40.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.* 2002; 16(14):1879-86.
- Barazzoni R, Short KR, Nair KS. Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver and heart. *J Biol Chem.* 2000; 275(5):3343-7.
- Barros Neto TL. Exercício, saúde e desempenho físico. São Paulo: Atheneu; 2007.
- Bayod S, Del Valle J, Lanza JF, Sanchez-Roige S, de Luxán-Delgado B, Coto Montes A, Canudas AM, Camins A, Escorihuela RM, Pallàs M. Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues. *Exp gerontol.* 2012; 47(12):925-35.
- Black MA, Green DJ, Cable NT. Exercise prevents age-related decline in nitric-oxide-mediated vasodilator function in cutaneous microvessels. *J Physiol.* 2008; 586(14):3511-24.
- Boffoli D, Scacco SC, Vergari R, Persio MT, Solarino G, Laforgia R, Papa S. Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1226(1):73-82.

Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem.* 2002; 277(27):23977-80.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72(1):248-54.

Brasil. Secretaria especial de políticas para as mulheres. Com todas as mulheres por todos os seus direitos. Brasília: SPM; 2010.

Bua E, Johnson J, Herbst A, DeLong B, McKenzie D, Salamat S, Aiken JM. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet.* 2006; 79(3):469-80.

Buchner DM, Cress ME, deLauteur BJ, Esselman PC, Margherita AJ, Price R, Wagner EH. The effect of strength and endurance training on gait, balance, fall risk and health services used in community-living older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1997; 52(4):M218-24.

Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature.* 2009; 458(7241):1056-60.

Cantó C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakı C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR, Auwerx J. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab.* 2010; 11(3):213-9.

Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29(1):18-24.

Cartee GD. Influence of age on skeletal muscle glucose transport and glycogen metabolism. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1994; 26(5):577-85.

Carter ND, Kannus P, Khan KM. Exercise in prevention of falls in older people. A systematic literature review examining the rationale and evidence. *Sports Med.* 2001; 31(6):427-38.

Carvalho Filho ET, Papaléo Netto M. *Geriatrics: fundamentos, clínica e terapêutica.* 2^a ed. São Paulo: Atheneu; 2006.

Carvalho J, Marques E, Ascensao A, Magalhaes J, Marques F, Mota J. Multicomponent exercise program improves blood lipid profile and antioxidant capacity in older women. *Arch Gerontol Geriatr.* 2010; 51(1):1-5.

Carvalho J, Soares JMC. Envelhecimento e força muscular - breve revisão. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto.* 2004; 4(3): 79–93.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory Action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 328(2):309-16.

Castaneda C. Diabetes control with physical activity and exercise. *Nutr Clin Care.* 2003; 6(2):89-96.

Chabi B, Ljubicic V, Menzies KJ, Huang JH, Saleem A, Hood DA. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell.* 2008; 7(1):2-12.

Chaimowics F. *Os Idosos Brasileiros no Século XXI: demografia, saúde e sociedade.* Belo Horizonte: Postgraduate; 1998.

Chow LS, Greenlund LJ, Asmann YW, Short KR, McCrady SK, Levine JA, Nair KS. Impact of endurance training on murine spontaneous activity, muscle mitochondrial DNA abundance, gene transcripts, and function. *J Appl Physiol (1985).* 2007; 102(3):1078-89.

Conley KE, Jubrias SA, Esselman PC. Oxidative capacity and ageing in human muscle *J Physiol.* 2000; 526(Pt 1):203-10.

Corsetti G, Pasini E, D'Antona G, Nisoli E, Flati V, Assanelli D, Dioguardi FS, Bianchi R. Morphometric changes induced by amino acid

supplementation in skeletal and cardiac muscles of old mice. *Am J Cardiol.* 2008; 101(11A):26E-34E.

Cottrell DA, Turnbull DM. Mitochondria and ageing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2000; 3(6):473-8.

Cress ME, Schechtman KB, Mulrow CD, Fiatarone MA, Gerety MB, Buchner DM. Relationship between physical performance and self-perceived physical function. *J Am Geriatr Soc.* 1995; 43(2):93-101.

Dagon Y, Avraham Y, Magen I, Gertler A, Ben-Hur T, Berry EM. Nutritional status, cognition, and survival: a new role for leptin and AMP kinase. *J Biol Chem.* 2005; 280(51):42142-8.

Dirks AJ, Leeuwenburgh C. The Role of Apoptosis in Age-Related Skeletal Muscle Atrophy. *Sports Med.* 2005; 35(6):473-83.

Doherty TJ, Brown WF. Motor unit number estimation: methods and applications. In: *Neuromuscular Function and Disease: Basic, Clinical, and Electrodiagnostic Aspects.* Brown WF, Bolton CF, Aminoff MJ, editores. Philadelphia: Saunders; 2002. p.274-290.

Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, Barja G, Leeuwenburgh C. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284(2):R474-80.

Drinkwater BL, Horvath SM, Wells CL. Aerobic power of females, ages 10 to 68. *J Gerontol.* 1975; 30(4):385-94.

Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res.* 2006; 45(2):120-59.

Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Matakis C, Elliott PJ, Auwerx J. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab.* 2008; 8(5):347-58.

Fiatarone MA, O'Neill EF, Ryan ND, Clements KM, Solares GR, Nelson ME, Roberts SB, Kehayias JJ, Lipsitz LA, Evans WJ. Exercise training and supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med*. 1994; 330(25):1769-75.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985; 153(1):23-36.

Fleg JL, Lakatta EG. Role of muscle loss in the age associated reduction in VO₂ max. *J Appl Physiol* (1985). 1988; 65(3):1147-51.

Fried LP, Guralnik JM. Disability in older adults: evidence regarding significance, etiology, and risk. *J Am Geriatr Soc*. 1997; 45(1):92-100.

Frontera WR, Hughes VA, Lutz KJ, Evans WJ. A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45- to 78-yr-old men and women. *J Appl Physiol* (1985). 1991; 71(2):644-50.

Hagen JL, Krause DJ, Baker DJ, Fu MH, Tarnopolsky MA, Hepple RT. Skeletal muscle aging in F344BN F1-hybrid rats. I. Mitochondrial dysfunction contributes to the age-associated reduction in VO₂max. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004; 59(11):1099-110.

Hakkinen K, Kraemer WJ, Kallinen M, Linnamo V, Pastinen UM, Newton RU. Bilateral and unilateral neuromuscular function and muscle cross-sectional area in middle-aged and elderly men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1996; 51(1):B21-9.

Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis. *Endocr Rev*. 2006; 27(7):728-35.

Hepple RT, Baker DJ, McConkey M, Muryinka T, Norris R. Caloric restriction protects mitochondrial function with aging in skeletal and cardiac muscles. *Rejuvenation Res*. 2006; 9(2):219-22.

Hughes VA, Frontera WR, Wood M, Evans WJ, Dallal GE, Roubenoff R, Fiatarone Singh MA. Longitudinal muscle strength changes in older adults: influence of muscle mass, physical activity and health. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001; 56(5):B209-17.

Inouye K, Pedrazzani ES, Pavarini SCI. “Octogenários e cuidadores: perfil sócio-demográfico e correlação da variável qualidade de vida”. *Texto Contexto Enferm*. 2008; 17(2): 350-7.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Sinopse do Senso Demográfico de 2010. Rio de Janeiro; 2011.

Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(29):12017-22.

Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM, Ross R. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol* (1985). 2000; 89(1):81-8.

Jensen TE, Richter EA. Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *J Physiol*. 2012; 590(Pt 5):1069-76.

Jorgensen SB, Wojtaszewski JF, Viollet B, Andreelli F, Birk JB, Hellsten Y, Schjerling P, Vaulont S, Neufer PD, Richter EA. Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J*. 2005; 19(9):1146-8.

Kalache A, Gray JAM. Health problems of older people in the developing world. In: Pathy MSJ, editor. *Principles and practice of geriatric medicine*. Chichester, John Wiley & Sons; 1985. p.1279-87.

Kang C, Li Ji L. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1271:110-7.

Kell RT, Bell G, Quinney A. Musculoskeletal fitness, health outcomes and quality of life. *Sports Med*. 2001; 31(12):863-73.

Kelly GS. A Review of the Sirtuin System, its Clinical Implications, and the Potential Role of Dietary Activators like Resveratrol: Part 1. *Altern Med Rev*. 2010; 15(3):245-63.

Kerr D, Ackland T, Maslen B, Morton A, Prince R. Resistance training over 2 years increases bone mass in calcium-replete postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2001; 16(1):175-81.

Koltai E, Hart N, Taylor AW, Goto S, Ngo JK, Davies KJ, Radak Z. Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012; 303(2):R127-34.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-5.

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 alpha. *Cell*. 2006; 127(6):1109-22.

Lanza IR, Short DK, Short KR, Raghavakaimal S, Basu R, Joyner MJ, McConnell JP, Nair KS. Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes*. 2008; 57(11):2933-42.

Lanza IR; Nair KS. Regulation of skeletal muscle mitochondrial function: genes to proteins. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010; 199(4):529-47.

Lavu S, Boss O, Elliott PJ, Lambert PD. Sirtuins-novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7(10):841-53.

Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhães-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R, Pithon-Curi TC. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res*. 2007; 21(3):751-6.

Lesnefsky EJ, Hoppel CL. Oxidative phosphorylation and aging. *Ageing Res Rev*. 2006; 5(4):402-33.

Lexell J, Taylor C, Sjöström M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studies in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci.* 1988; 84(2-3):275-94.

Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest.* 2006; 116(7):1776-83.

Lowe DA, Degenes H, Chen KD, Always SE. Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase varies with age in glycolytic muscles of rats. *Gerontol. J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2000; 55(3):B160-4.

Matsudo SM, Matsudo VK, Neto TLB. Impacto do envelhecimento nas variáveis antropométricas, neuromotoras e metabólicas da aptidão física. *Revista Brasileira de Ciências e Movimento.* 2000. 8(4):21-32.

Matsudo SM, Matsudo VK. Efeitos benéficos da atividade física na aptidão física e saúde mental durante o processo de envelhecimento. *Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde.* 2001; 5(2):60-76.

Mazo GZ. Atividade física, qualidade de vida e envelhecimento. Porto Alegre: Sulina; 2008.

McCarty MF. Chronic activation of AMP-activated kinase as a strategy for slowing aging. *Med Hypotheses.* 2004; 63(2):334-9.

Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol.* 1997; 273(6 Pt 1):E1107-12.

Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 2007; 404(1):1-13.

Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell.* 2005; 16(10):4623-35.

Muller FL, Song W, Jang YC, Liu Y, Sabia M, Richardson A, Van Remmen H. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293(3):R1159-68.

Oliveira LPBA, Menezes MP. Representações de fragilidade para idosos no contexto da estratégia saúde da família. *Texto Contexto Enferm.* 2011; 20(2):301-9.

Ota H, Tokunaga E, Chang K, Hikasa M, Iijima K, Eto M, Kozaki K, Akishita M, Ouchi Y, Kaneki M. SIRT1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene.* 2006; 25(2):176-85.

Pastoris O, Boschi F, Verri M, Baiardi P, Felzani G, Vecchiet J, Dossena M, Catapano M. The effect of aging on enzyme activities and metabolite concentrations in skeletal muscle from sedentary male and female subjects. *Exp Gerontol.* 2000; 35(1):95-104.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998; 92(6):829-39.

Rasmussen UF, Krstrup P, Kjaer M, Rasmussen HN. Experimental evidence against the mitochondrial theory of aging. A study of isolated human skeletal muscle mitochondria. *Exp Gerontol.* 2003; 38(8):877-86.

Reznick RM, Zong H, Li J, Morino K, Moore IK, Yu HJ, Liu ZX, Dong J, Mustard KJ, Hawley SA, Befroy D, Pypaert M, Hardie DG, Young LH, Shulman GI. Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metab.* 2007; 5(2):151-6.

Rogers MA, Evans WJ. Changes in skeletal muscle with aging: effects of exercise training. In *Exercise and Sport Science Reviews.* *Exerc Sport Sci Rev.* 1993; 21:65-102.

Ropelle ER, Pauli JR, Carnevalheira JC. Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica. *Motriz*. 2005; 11(1):49-55.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994; 228(1):35-51.

Rutter GA, Silva XG, Leclerc I. Roles of 5'-AMPactivated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J*. 2003; 375(Pt 1):1-16.

Sasaki T, Maier B, Bartke A, Scoble H. Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal. *Aging Cell*. 2006; 5(5):413-22.

Shepherd D, Garland PB. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J*. 1969; 114(3):597-610.

Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, Nair KS. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(15):5618-23.

Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, Rizza RA, Coenen-Schimke JM, Nair KS. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes*. 2003; 52(8):1888-96.

Singh NA, Clements KM, Fiatarone MA. A randomized controlled trial of progressive resistance training in depressed elders. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1997; 52(1):M27-35.

Siqueira FV, Facchini LA, Piccini RX, Tomasi E, Thumé E, Silveira DS, Vieira V, Hallal PC. Prevalence of falls and associated factors in the elderly. *Rev Saude Publica*. 2007; 41(5):749-56.

Suwa M, Nakano H, Radak Z, Kumagai S. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. *Metabolism*. 2008; 57(7):986-98.

Tennen RI, Berber E, Chua KF. Functional dissection of SIRT6: identification of domains that regulate histone deacetylase activity and chromatin localization. *Mech Ageing Dev.* 2010; 131(3):185-92.

Thompson D, Markovitch D, Betts JA, Mazzatti D, Turner J, Tyrrell RM. Time course of changes in inflammatory markers during a 6-mo exercise intervention in sedentary middle-aged men: a randomized-controlled trial. *J Appl Physiol* (1985). 2010; 108(4):769-79.

Tobina T, Yoshioka K, Hirata A, Mori S, Kiyonaga A, Tanaka H. Peroxisomal proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha gene expression increases above the lactate threshold in human skeletal muscle. *J Sports Med Phys Fitness.* 2011; 51(4):683-8.

Urbanek MG, Picken EB, Kalliainen LK, Kuzon Jr. WM. Specific force deficit in skeletal muscles of old rats is partially explained by the existence of denervated muscle fibers. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001; 56(5):B191-7.

Wanagat J, Cao Z, Pathare P, Aiken JM. Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J.* 2001; 15(2):322-32.

Wang Y, Michikawa Y, Millidis C, Bai Y, Bigelow DJ, Schoneich C. Muscle specific mutation accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(7):4022-7.

Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem.* 2007; 282(1):194-9.

Wu Z, Puigserver P, Anderson U, Zhang C, Aldemant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 1999; 98(1):115-24.

Yamamoto K, Chappell MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats: Part 2. Hypertension. 1992; 19(6 Pt 2):692-6.