

**CAMILA BAUMER TROMM**

**RESPOSTA AGUDA E ADAPTATIVA DO EXERCÍCIO FÍSICO  
SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E DO  
METABOLISMO DO CÁLCIO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO  
DE RATOS VELHOS**

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Ricardo  
Aurino de Pinho

**CRICIÚMA, JANEIRO DE 2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

T849r Tromm, Camila Baumer.

Resposta aguda e adaptativa do exercício físico sobre parâmetros de estresse oxidativo e do metabolismo do cálcio em músculo esquelético de ratos velhos / Camila Baumer Tromm; orientador : Ricardo Aurino de Pinho. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

87 p. : il.; 21 cm.

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

1. Envelhecimento. 2. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos. 3. Estresse oxidativo. 4. Músculos esqueléticos.  
I. Título.

CDD. 22ª ed. 613.70446

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



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

#### ATA DA 206ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata da Defesa Pública de Dissertação do Mestrado de Camila Baumer Tromm. Aos trinta dias do mês de janeiro do ano de dois mil e quatorze às 14h00, na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, reuniram-se os membros da Banca Examinadora, composta pelos senhores professores: **Dr. JOSIANE BUDNI** (Membro - UNESC), **Dr. JONI MARCIO DE FARIAS** (Membro - UNESC) e **Dr. FABRIZIO CAPUTO** (Membro – UDESC) e designados pelo Colegiado de Coordenação, a fim de argüirem a dissertação de Mestrado de **Camila Baumer Tromm** ao título: “**Resposta aguda e adaptativa do exercício físico sobre parâmetros de estresse oxidativo e do metabolismo do cálcio em músculo esquelético de ratos velhos**”. Aberta a sessão pelo Presidente da mesma, coube à candidata, de forma regimental, expor o tema de sua dissertação, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionado pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se faziam necessárias. Após esse procedimento, a Banca Examinadora reuniu-se individualmente, para a avaliação final da candidata. Retornando à sessão, o Presidente, lendo o Termo de Apresentação de Dissertação, declarou, **Camila Baumer Tromm** aprovada com conceito A.

#### ALTERAÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA EXAMINADORA:

Alterações nas cópias da dissertação

Prof. Dr. **CLAUDIO TEODORO DE SOUZA** (Presidente do Colegiado de Coordenação)

Prof. Dr. **CLAUDIO TEODORO DE SOUZA** (Representante do Orientador)

#### BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. **JOSIANE BUDNI** (Membro - UNESC)

Prof. Dr. **JONI MARCIO DE FARIAS** (Membro – UNESC)

Prof. Dr. **FABRIZIO CAPUTO** (Membro - UDESC)

CANDIDATA: Camila Baumer Tromm

**Camila Baumer Tromm**

Criciúma, SC, 30 de janeiro de 2014:

## **FOLHA INFORMATIVA**

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

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. **Ao Lafibe:** Talita, Paulo, Professor Claudio, Bruna, Priscila, Carla, Giulia, Tamara, Nathaly, Schérolin, Thaís, Bruno, Daniela, Fernanda e Mari. “Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas” **Aos amigos e familiares:** Mãe, Pai, Bruna, Carol, Débora, André, Evandro. “Se as raízes estão bem, todo resto está bem.” **Aos funcionários da Unesc** (também amigos): Laboratório de Química - Laboratório de Microbiologia – Coordenação dos Laboratórios da Saúde – Biotério - Setor de Manutenção e de Informática Médica – Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (Jésica, Edson, Priscila, Luana, Sara, Carlos, Grazi, Claudia, Felipe, Altemir, Laênio). Que nunca mediram esforços para me auxiliar. **Em especial:** ao meu professor orientador Ricardo e ao professor Luciano. Um professor é a personificada consciência do aluno; confirma-o nas suas dúvidas; explica-lhes o motivo de sua insatisfação e lhe estimula a vontade de melhorar.

"A ausência de evidência não  
significa evidência da ausência."

**Carl Sagan**

## RESUMO

O envelhecimento populacional é um fenômeno mundial e até o ano de 2025 o Brasil terá a sexta população em idosos no mundo. Uma das ocorrências naturais do processo de envelhecimento é a sarcopenia, uma perda funcional dos músculos esqueléticos. Embora os consensos nacionais e internacionais apontem a importância da prática do exercício físico para a promoção da saúde do indivíduo idoso, ainda existem muitas lacunas a serem investigadas, em particular, sobre os mecanismos bioquímicos e moleculares promovidos pelo exercício no processo de sarcopenia. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi realizar um estudo com animais com diferentes idades de caráter experimental para analisar o efeito do exercício sobre o envelhecimento muscular. Para isso foram utilizados 42 ratos Wistar com 3, 18 e 24 meses de idade, divididos randomicamente e expostos a sessões agudas e crônicas de exercício físico em esteira. Após as realizações dos programas de exercício os animais sofreram eutanásia e o tecido muscular (gastrocnêmio e quadríceps) foi cirurgicamente removido e processado para análises dos parâmetros metabólicos (lactato, glicogênio, SDH, Cit-c, NRF2 e SIRT1), de estresse oxidativo (superóxido, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, carbonilação de proteínas e enzimas antioxidantes) e do metabolismo intracelular do cálcio (receptor de rianodina, fosfolamban e trocador de sódio e cálcio). Os dados obtidos nesse estudo demonstraram que o exercício agudo com a mesma intensidade relativa causou dano oxidativo no mesmo nível em ratos jovens e mais velhos, e que o treinamento contínuo parece atenuar de forma mais efetiva o dano oxidativo e as proteínas envolvidas no transporte intracelular do cálcio. Portanto, com base nesses resultados concluímos que somente o metabolismo oxidativo de ratos mais velhos foi mais suscetível à intensidade do exercício em relação aos ratos jovens. E que o treinamento contínuo e moderado modula positivamente as proteínas que translocam o  $\text{Ca}^{2+}$ , podendo regular o mecanismo de contração muscular de ratos velhos, possivelmente através da regulação do estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** envelhecimento; exercício físico; estresse oxidativo; músculo esquelético; cálcio, metabolismo.

## ABSTRACT

Population aging is a global phenomenon and by the year 2025, Brazil will have the sixth in the elderly population in the world. One of the natural occurrences of aging is sarcopenia, a loss of function of skeletal muscles. Although national and international consensus point to the importance of physical exercise for health promotion of the elderly, there are still many gaps to be investigated, in particular, on the biochemical and molecular mechanisms promoted by exercise in the sarcopenia process. In this context, the aim was to conduct a study with animals of different ages on an experimental basis to analyze the effect of exercise on muscle aging. For this 42 Wistar rats were used with 3, 18 and 24 months of age, randomly divided and exposed to acute and chronic physical exercise sessions on the treadmill. After the achievements of exercise programs the animals were euthanized and the muscle tissue (gastrocnemius and quadriceps) was surgically removed and processed for analysis of metabolic parameters (lactate, glycogen, SDH, Cyt-c, NRF2 and SIRT1), oxidative stress (superoxide, thiobarbituric acid reactive substances, protein carbonyls and antioxidant enzymes) and intracellular calcium metabolism (ryanodine receptor, phospholamban and sodium calcium exchanger). The data obtained in this study demonstrated that acute exercise at the same relative intensity caused oxidative damage at the same level in young and older mice, and that continuous training seems more effectively attenuate oxidative damage and proteins involved in intracellular transport calcium. Therefore, based on these results we concluded that only the oxidative metabolism of older mice were more susceptible to the exercise intensity compared to young rats. And that continuous moderate training positively modulates proteins that translocate  $\text{Ca}^{2+}$ , may regulate the mechanism of muscle contraction in older rats, possibly through the regulation of oxidative stress.

**Key-words:** aging; exercise; oxidative stress; skeletal muscle; calcium metabolism.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP –Difostato de Adenosina (do inglês *Adenosine Diphosphate*)

AMP –Monofosfato de Adenosina (do inglês *Adenosine Monophosphate*)

AMPK – Proteína Quinase Ativada por AMP (do inglês *AMP-Activated Protein Mitogen Kinase*)

AP-1 – Ativador Protéico 1 (do inglês *Activating Protein 1*)

ATP – Trifosfato de Adenosina (do inglês *Adenosine Triphosphate*)

CAT – Catalase

CiT-C - Citocromo-c oxidase

CTE – Cadeia Transportadora de Elétrons

DHPR - Receptores Diidropiridínicos (do inglês *dihydropyridine Receptor*)

DNA – Ácido Desoxirribonucléico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazina (do inglês *2,4-Dinitrophenylhydrazine*)

DTNB – Ácido Ditionitrobenzóico (do inglês *Dithionitrobenzoic Acid*)

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GPx – Glutationa Peroxidase

HIP - Fator de Transcrição de Choque Térmico 1 (do inglês *Hsp70-interacting Protein 1*)

HSP – Proteínas de Choque Térmico (do inglês *Heat Shock Proteins*)

IKK – IκB Cinase (do inglês *I Kappa Beta Kinase*)

MDA - Malondealdeído

MnSOD – Superóxido Dismutase dependente de Manganês

mTOR - Proteína alvo de Rapamicina em Mamíferos (do inglês *Mammalian target of rapamycin*)

mRNA – RNA mensageiro (do inglês *Messenger RNA*)

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reduzida (do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced*)

NADP - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NCX – Trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (do inglês  *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger*)

NFκB – Fator Nuclear Kappa B (do ingles *Nuclear Factor Kappa Beta*)

nm - Nanômetros

NO - Óxido Nítrico (do inglês *Nitric Oxide*)

NRF2 - Fator Nuclear Eritróide 2 relacionado ao fator 2 (do inglês *Nuclear Factor erythroid-derived 2*)

PLB – Fosfolambam (do inglês *Phospholamban*)

PKA – Proteína Quinase A (do inglês *Protein Kinase A*)

RL – Radical Livre

RYR – Receptor de Rianodina (do inglês *Ryanodine Receptor*)

SDH – Succinato Desidrogenase

SERCA - ATPase de Cálcio do Retículo Sarcoplasmático (do inglês *Sarco/endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase*)

SIRT1 –Sirtuína tipo 1 (do inglês *Sir two 1*)

SH – Sulfidrilas

SOD – Superóxido Dismutase

TBARS – Espécies Reativas ao Aquecimento do Ácido Tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

VO<sub>2</sub>máx – Consumo Máximo de Oxigênio

XDH – Xantina Desidrogenase

XO – Xantina Oxidase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivos Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos .....	28
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 Animais .....	29
3.2 Experimento I: Efeito agudo do exercício físico .....	29
3.3 Experimento II: Efeito adaptativo do exercício físico .....	30
3.4 Eutanásia, coleta e preparação de tecidos.....	30
3.5 Marcadores metabólicos.....	31
3.6 Parâmetros de estresse oxidativo .....	32
3.7 Enzimas antioxidantes .....	33
3.8. Análise proteica por imunoblotting .....	33
3.9 Conteúdo de proteínas .....	34
3.10 Análise estatística .....	34
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
<b>8 ANEXO .....</b>	<b>89</b>



# 1 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é um tecido pós-mitótico composto por fibras musculares, tipicamente oxidativas e glicolíticas, que compõe aproximadamente 40% da massa corporal. Ele é continuamente submetido a estresse mecânico e metabólico levando a diferentes mecanismos de adaptação envolvendo transcrição genética e remodelamento estrutural com contínua produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON). A produção excessiva na produção de ERO associada a uma diminuição concomitante dos sistemas de defesa antioxidante desencadeiam um processo de estresse oxidativo, um fenômeno que pode provocar danos irreversíveis na célula muscular, particularmente, sobre a atividade contrátil no envelhecimento muscular (Palomero & Jackson, 2010). Entretanto, inúmeras evidências demonstraram que ERO atuam como mediadores em diversas vias de sinalização celular que controlam processos celulares fisiológicos (Palomero & Jackson, 2010). Da mesma forma, a presença e eficiência dos vários sistemas redutores ou antioxidantes do organismo são fundamentais para a integridade celular por destruir intermediários reativos em excesso e prevenir ou reparar o dano resultante do estresse oxidativo (Klandorf & Dyke, 2012). Contudo, ainda existe uma necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre o papel da geração dessas moléculas reativas na regulação redox no músculo esquelético em processo de envelhecimento durante e após a atividade contrátil.

Dessa forma, acredita-se que o treinamento aeróbio seja eficaz, em partes, para amenizar o processo de envelhecimento, através do aumento da resistência ao estresse oxidativo e remodelamento de algumas proteínas que translocam o  $\text{Ca}^{2+}$  no músculo esquelético de ratos velhos. Para isso, buscamos inicialmente verificar o efeito agudo de uma sessão de corrida em ratos jovens e mais. E posteriormente, verificar os efeitos do treinamento físico de corrida, contínuo e fracionado, sobre o músculo esquelético envelhecido.

## 1.1 Biologia celular das espécies reativas de oxigênio

Os elétrons de um átomo estão distribuídos em camadas eletrônicas (ou níveis de energia) específicas ao redor do núcleo designadas pelas letras K, L, M e N, O, P, Q com suas respectivas

subcamadas ou sub-níveis designados como s, p, d, f (Ferreira & Matsubara, 1997). O termo Radical Livre (RL) refere-se ao átomo ou molécula altamente reativo, que contém elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica (Halliwell & Gutteridge, 2007). Na mitocôndria, no retículo sarcomplasmático (RS), na membrana plasmática e no citosol da fibra muscular são gerados ânion superóxido e óxido nítrico (NO) como espécies principais, que modulam, em parte, algumas respostas adaptativas no músculo esquelético após atividade contrátil (Jackson et al., 2007). Estas moléculas também conduzem à formação de vários ERON secundários não radicalares, como o peróxido de hidrogênio e peroxinitrito (Halliwell & Gutteridge, 2007).

## 1.2 Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante

Antioxidantes são estruturas ou substâncias que através de mecanismos retardam, impedem ou removem as modificações oxidativas de uma molécula-alvo (Halliwell & Gutteridge, 2007). Os antioxidantes podem ser moléculas complexas, tais como as enzimas: superóxidos dismutases, tioredoxinas redutase e peroxiredoxinas, ou moléculas mais simples, como vitaminas, tióis não proteicos, polifenóis, ubiquinona e outros. Eles também podem ser globalmente classificados de acordo com a sua função em: (1) sequestradores de radicais livres (ácido ascórbico, alfa-tocoferol), (2) sequestradores de espécies reativas não radicalares (catalases e peroxidases) e (3) agentes que inibem geração de espécies reativas (quelantes de metais) (Nikolaids et al., 2012). Dentro desse conjunto de antioxidantes, as enzimas antioxidantes no músculo esquelético incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), são as mais amplamente estudadas por serem as primeiras linhas de defesa contra a produção de ERON.

Para manter e executar funções vitais, as células precisam de um balanço refinado entre a geração de ERON e sua respectiva remoção (estado redox), qualquer disfunção do sistema antioxidante pode levar a alterações no estado redox e prejudicar a função celular (Powers & Jackson, 2008). Desta forma, um aumento na geração ou diminuição da capacidade do sistema de defesa pode levar ao aumento global dos níveis intracelulares de ERO que pode romper a homeostase redox. Este

fenômeno é conhecido como estresse oxidativo, caracterizado de acordo Jones (2006) como uma “interrupção na sinalização e controle redox”.

As ERO podem atacar algumas estruturas como lipídeos, proteínas, e DNA, provocando mudanças irreversíveis que comprometem a integridade das células e suas funções (Halliwell & Gutteridge, 2007). Particularmente no músculo, pode levar a perdas de função contrátil, redução na eficiência contrátil e proteólise (Prochniewicz et al., 2008). Em condições fisiológicas, ERO interagem com inúmeras moléculas, induzindo modificações em suas estruturas e desencadeando direta (modificações pos-traducionais seguidas por translocação da proteína) ou indiretamente (reduzindo ou oxidando o ambiente citosólico, o núcleo ou matriz mitocondrial) diversos processos celulares que transformam o microambiente celular (núcleo, citosol e matriz mitocondrial) (Palomero & Jackson, 2010). Dependendo do estado redox dos compartimentos celulares, algumas reações moleculares podem ser aprimoradas ou bloqueadas (Forman et al., 2008; Powers & Jackson, 2008).

### 1.3 Produção de ERO no músculo durante a atividade contrátil

Inúmeros estudos demonstraram que a contração muscular acarreta o aumento da produção de ERO (Reid et al., 1992; O’Neill et al., 1996; Pattwell et al., 2004; Vasilaki et al., 2006a). As primeiras evidências surgiram na década de 80 com Davies e colaboradores (1982), que demonstraram aumento de duas a três vezes na concentração de RL após exercício exaustivo. Em 1992 foi reportado a liberação de superóxido pela contração diafragmática (Reid et al., 1992). Em 1994, surgiu a primeira evidência da produção de NO no músculo esquelético durante uma contração *in vitro* (Balon & Nadler, 1994). Em 1996 detectaram a produção de radical hidroxila durante atividade contrátil no músculo esquelético (O’Neill et al., 1996). Em 2004, dados mostraram aumento da produção de superóxido e NO após estímulo elétrico em diferentes frequências (Pattwell et al., 2004). Em 2006, resultados confirmaram aumento da lipoperoxidação mediada por ERO após contração isométrica em músculos envelhecidos (Vasilaki et al., 2006a).

Devido à alta demanda energética (~100 vezes maior que em repouso) (Gaitanos et al., 1993), o músculo esquelético é a maior fonte de ERO durante a atividade contrátil (Powers & Jackson, 2008).

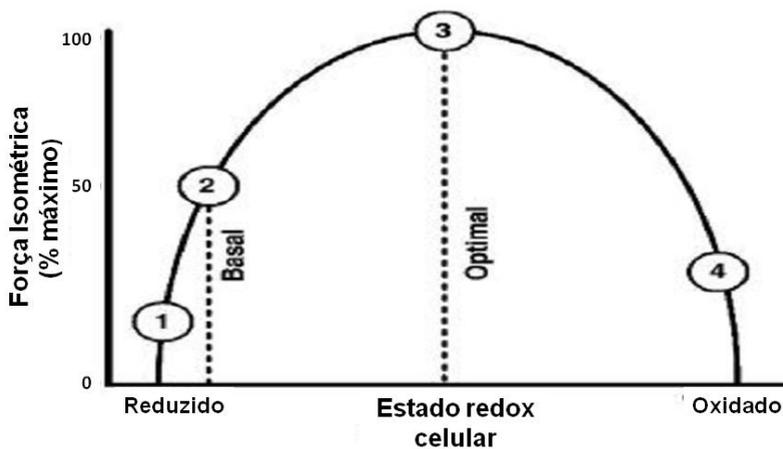
Superóxidos podem ser gerados em vários locais subcelulares no músculo esquelético, aumentando a produção durante as contrações musculares. As mitocôndrias são a principal fonte de produção de superóxido intracelular predominantemente no complexo I e III da cadeia de transporte de elétrons (CTE) durante a respiração mitocondrial (Powers & Jackson, 2008). Tem sido relatado que, entre 2 e 5% do total de oxigênio consumido pela mitocôndria pode sofrer redução parcial e formar superóxido (Boveris & Chance, 1973). Durante a atividade contrátil, há aumento no consumo de ATP devido à sua utilização pelo processo de acoplamento das proteínas musculares. Esta situação faz com que demanda intracelular de ATP estimule as mitocôndrias a aumentar a taxa de fosforilação oxidativa para sintetizar mais ATP (Palomero & Jackson, 2010). O aumento da fosforilação oxidativa envolve um aumento no consumo de oxigênio intramuscular (>30 vezes) com concomitante aumento de ~70 a 100 vezes no fluxo do Ciclo de Krebs (Gibala et al., 1998) e aumento consequente da produção de superóxido. Contudo, alguns autores sugerem (Jackson et al., 2007; Sachdev & Davies, 2007) que mitocôndrias podem não ser a fonte dominante de ERO<sub>N</sub> durante a atividade contrátil no músculo esquelético.

Alguns estudos (Xia et al., 2003; Hidalgo et al., 2006) indicam que há enzimas NADPH oxidase associadas ao retículo sarcoplasmático e ao sarcolema do músculo esquelético. Estas enzimas são responsáveis pela geração de superóxido, a qual parece modular a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático através oxidação do receptor rianodina (Cherednichenko et al., 2004). Nos túbulos transversos do músculo esquelético também contêm NADPH oxidase que produz superóxido para o citosol das células do músculo esquelético (Espinosa et al., 2006). Após microinflamação induzida pelo exercício macrófagos e neutrófilos ativam a NADPH oxidase que em sua reação oxida NADPH a NADP, utilizando neste processo o oxigênio como aceptor de elétrons, formando consequentemente Superóxido que em contato com NO, forma o peroxinitrito. Tem sido relatado que o aumento da atividade da fosfolipase A<sub>2</sub>, decorrente do processo inflamatório, estimula a produção de ERO<sub>N</sub> nos espaços intra (Nethery et al., 2000) e extracelular (Zuo et al., 2004). A forma cálcio-independente da fosfolipase A<sub>2</sub> parece estar envolvida principalmente na geração de ERO<sub>N</sub> em condições basais, enquanto a forma cálcio-dependente

estimula a produção de ERON em taxas supranormais durante as contrações ou por processos inflamatórios que elevam o cálcio intracelular após o exercício (Gong et al., 2006).

Alguns estudos (Apple et al., 1991; Jackson, 2011) relataram o papel da xantina oxidase (XO) na geração de superóxido no músculo esquelético. Músculos esqueléticos de ratos contêm níveis significativos de XO. Esta enzima situa-se nas células endoteliais capilares e vasos menores no músculo esquelético (Apple et al., 1991). O exercício intenso pode causar isquemia fazendo com que o ATP seja convertido em ADP, AMP, inosina e hipoxantina (rota das purinas). Sob tais condições a enzima xantina desidrogenase intracelular (XDH) é convertida em XO, que utiliza o  $O_2$  como acceptor de elétrons, gerando diretamente superóxido e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), principalmente quando o  $O_2$  é reperfundido.

Para o desenvolvimento da atividade contrátil, baixos níveis de ERON são requeridos para produção normal de força, enquanto depleção de ERON em músculos não fadigados resulta em diminuição da força (figura 1, Reid et al., 1993). Por outro lado, uma pequena quantidade de ERON nas fibras musculares promove melhora na força, enquanto altas concentrações de ERON a produção de força é reduzida de maneira dependente da quantidade de ERON (Powers & Jackson, 2008). Vasilaki e colaboradores (2006b) demonstraram que a concentração de  $H_2O_2$  no músculo esquelético em repouso se mantém em torno de 10-15  $\mu M$ , enquanto mudanças adaptativas no músculo (induzidas pelo exercício) requerem 100  $\mu M$ . Estes estudos também reportam que células musculares perdem funcionalidade quando expostas a  $>1$  mM de  $H_2O_2$  (Mcardle et al., 2004). Em contraste, Prochniewicz e colaboradores (2008) reportaram que concentrações de até 50 mM induzem aos efeitos observados após contrações dos componentes musculares.



**Figura 1:** Envolvimento de ERO em na geração de força. O ponto 1 representa a produção de força pelo músculo não fadigado exposto a antioxidantes ou um agente redutor. O ponto 2 ilustra a força gerada pelo músculo em seu estado basal. O ponto 3 ilustra a força produzida pelo músculo não fadigado exposto a níveis baixos de oxidantes, o que representa o melhor estado redox para a produção de força. O ponto 4 ilustra os efeitos deletérios do excesso de ERO na força muscular. (Adaptado de Reid et al., 1993).

#### 1.4 Ativação de mecanismos de adaptação celular induzidos pela atividade contrátil no músculo esquelético

Estudos demonstram que a atividade das enzimas antioxidantes em músculo esquelético é modificada por exercícios crônicos e agudos (Ji et al., 1992; Ji, 1993; Pinho et al., 2006; Scheffer et al., 2012; Tromm et al., 2012; Farias et al., 2013; Silva et al., 2013). Além disso, a produção de ERO durante as contrações musculares provocam o início dos processos adaptativos decorrentes do exercício (McArdle et al., 2001). No músculos esquelético estes efeitos ocorrem devido à alteração do balanço redox intracelular, influenciando múltiplas vias de sinalização e ativação de fatores de transcrição como proteína ativadora 1 (AP-1), fator nuclear kappaB (NF-kB), e fator de transcrição de choque térmico 1 (HSP) e como Fator Nuclear Eritróide 2 relacionado ao

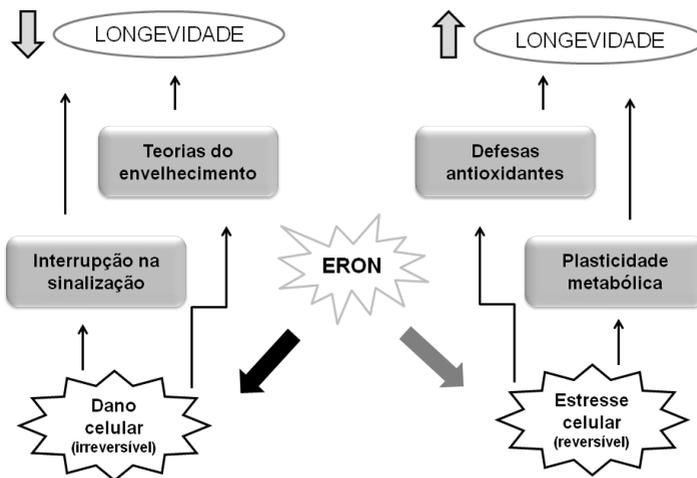
fator 2 (NRF2), que modulam a expressão dos genes antioxidantes. (Vasilaki et al., 2006b). Estes estão envolvidos na expressão de enzimas antioxidantes e de proteínas protetoras (Proteínas de Choque Térmico - HSP e HIP).

Alguns estudos demonstraram que uma única sessão de corrida em esteira aumenta a fosforilação do complexo I $\kappa$ B Cinase (IKK), aumentando a atividade do NF $\kappa$ B no músculo esquelético de ratos (Ji et al., 2004; Ho et al., 2005). O treinamento físico também pode alterar a composição e atividade do NF $\kappa$ B. Doze semanas de corrida resultou em fosforilação aumentada de IKK, sugerindo que a ativação do NF $\kappa$ B foi elevada após o treinamento (Kramer & Goodyear, 2007). Diferenças na atividade de NF $\kappa$ B após o treinamento podem refletir a natureza (intensidade, duração e frequência) do exercício realizado ou a recuperação entre as séries do exercício. Hollander e colaboradores (2001) relataram que a proteína ativadora 1 aumentou no músculo esquelético de ratos após realização de uma sessão de exercício de longa duração (corrida). O aumento de AP-1 ocorreu simultaneamente ao aumento na expressão de mRNA MnSOD.

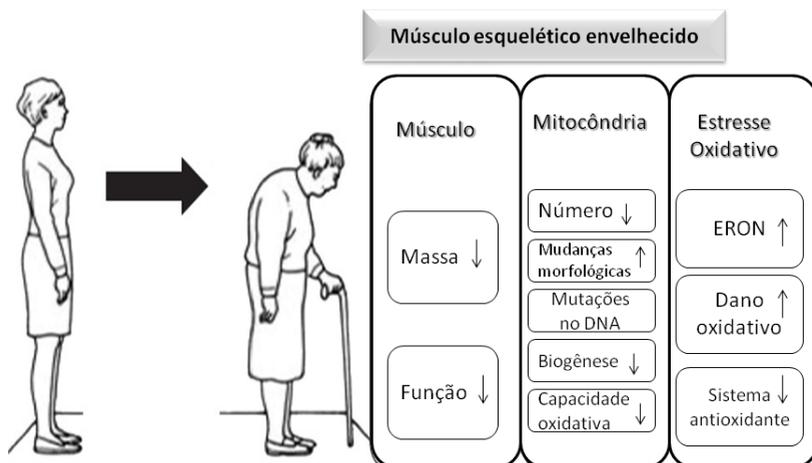
### 1.5 Regulação redox do músculo esquelético durante o envelhecimento

Durante o envelhecimento, os músculos tornam-se menores e mais fracos de tal forma que até a idade de 70 anos a área transversal muscular é reduzida de 25 a 30% e a força muscular é reduzida em 30 a 40% (Haehling et al., 2010). As mudanças estruturais e funcionais que ocorrem nos músculos durante o envelhecimento tem sido caracterizadas, e a redução da força do músculo é atribuída a uma grande redução no número total de fibras musculares e uma atrofia do restante das fibras (Brooks & Faulkner, 1988). As causas da perda de massa e função muscular não são totalmente compreendidas, mas existe considerável evidencia sobre o papel de ERON na mediação do processo de envelhecimento. Em condições normais, as ERON atuam como mediadoras em respostas adaptativas do músculo (processo de acoplamento contrátil e regulação da força), mas durante o envelhecimento essas respostas são severamente comprometidas (McArdle et al., 2001). Esta incapacidade para se adaptar às contrações é papel chave da disfunção muscular relacionada ao envelhecimento (McArdle et al., 2004; Vasilaki et al., 2006b).

Segundo Harmam (1956) a teoria do envelhecimento propõe que ERON produzidos a partir do metabolismo mitocondrial normal, causam um dano progressivo a biomoléculas celulares (lipídeos, proteínas e DNA), resultando em uma diminuição de sua função (figura 2, Viña et al., 2013). Os processos subjacentes à perda de massa e função muscular relacionada à idade (também conhecida como sarcopenia) são pouco elucidados. Estudos têm relatado alterações em marcadores de produção de ERON em músculo esquelético durante o envelhecimento (Lass et al., 1998; Vasilaki et al., 2006a) e indicam que as mitocôndrias podem ser a principal fonte na geração de ERON (Sanz et al., 2006). No entanto, existem outras fontes subcelulares da geração de ERON, como por exemplo, o retículo sarcoplasmático e o sarcolema, que não têm sido estudadas em músculo esquelético durante o envelhecimento. Muller e colaboradores (2007) utilizaram ratos knockout para SOD e demonstraram mudanças relacionadas ao envelhecimento acelerado da perda da massa muscular e da função esquelética. Esse estudo forneceu evidência direta de que o aumento do superóxido intracelular pode causar envelhecimento da musculatura esquelética. Músculos envelhecidos apresentam menor número de mitocôndrias, mutações no DNA, capacidade oxidativa e biogênese reduzidas (figura 3, Peterson et al., 2012), já o sarcolema apresenta rompimento aumentando a permeabilidade da fibra muscular levando ao influxo de cálcio. Adicionalmente, com aumento do estresse oxidativo, o RS reduz sua função prejudicando também o homeostase do cálcio (Aracena-Parks et al., 2006).



**Figura 2:** Teoria do Envelhecimento. ERO em excesso provocam efeitos deletérios sobre as biomoléculas (alterações irreversíveis). Ao passo que quando a exposição é moderada, a tensão provocada pode ter efeitos de sinalização benéficos sobre o envelhecimento (adaptado de Viña et al., 2013).



**Figura 3:** Mudanças no músculo esquelético decorrentes do envelhecimento. Tanto a massa como a função do músculo esquelético são reduzidas em idosos. Além disso, ao nível mitocondrial, o número de mitocôndrias, a biogênese e a capacidade oxidativa são reduzidos. Finalmente, o estresse oxidativo é elevado nos músculos envelhecidos em associação com danos em lipídios e proteínas celulares, e concomitante redução antioxidante (adaptado de Peterson et al., 2012).

### 1.6 Comprometimento dos mecanismos adaptativos celulares em músculos envelhecidos

Um processo de adaptação comprometido decorrente do exercício no músculo esquelético pode contribuir para a disfunção do músculo durante o envelhecimento devido possivelmente a uma falha nos processos de sinalização redox (McArdle et al., 2004). Adicionalmente, uma maior oxidação de todos os componentes da célula ou uma oxidação de tióis nucleares podem impedir essas respostas adaptativas (Palomero & Jackson, 2010). Alguns dados indicam que o envelhecimento está associado com a diminuição do potencial antioxidante da glutathione (Jones, 2006). E ainda, dados na literatura suportam a possibilidade de que os núcleos do músculo de roedores e humanos idosos são relativamente oxidados porque existe aumento da oxidação do DNA nuclear (Sanz et al., 2006). Músculos de

camundongos velhos são mais susceptíveis a oxidação em comparação a músculos de camundongos jovens, pois tem menor defesa antioxidante e qualquer mínima exposição oxidante desencadeia em danos oxidativos. Além disso, este excesso de oxidação pode bloquear a ativação de fatores de transcrição e conduzir a um subsequente comprometimento da expressão gênica de proteínas associadas a mecanismos de defesa e adaptação celular (Palomero et al., 2012) comprometendo assim a função contrátil e capacidade adaptativa do músculo.

A perda relacionada à idade de massa muscular é caracterizada por uma diminuição no tamanho e número da fibra muscular com predominante perda de fibras do tipo II (Carmeli et al., 2002). Devido à capacidade prejudicada do músculo esquelético para se regenerar, a perda de miofibrilas pode ser substituída por infiltração de tecido adiposo seguido por inflamação (Haehling et al., 2010). Estes mecanismos propostos para a perda de massa muscular contribuem para a patogênese da sarcopenia (Haehling et al., 2010). Adicionalmente, estudos têm mostrado que há uma diminuição no número de receptores diidropiridínicos (DHPR) resultando no aumento na quantidade de receptores de rianodina (RYR1) desacoplados a eles (DHPR) durante o envelhecimento (Aracena-Parks et al., 2006). Consequentemente ocorre perda de força devido ao comprometimento nos mecanismos que liberam  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático. Além disso, o aumento do estresse oxidativo causa nitrosilação e oxidação do complexo RYR, resultando na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provocando rompimento na estrutura e função da mitocôndria (Xia et al., 2003).

### 1.7 Influência de ERON sobre a regulação do cálcio muscular

O receptor de rianodina 1, é um canal formado por subunidades e cada uma delas contém grupos sulfidrilas que são sensíveis à modulação redox (Oba et al., 2000; Sun et al., 2001), ativado por ERON ou por mudanças no ambiente redox de proteínas chave como a glutatona (Zima & Blatter, 2006). O RYR1 é um canal que libera cálcio do retículo sarcoplasmático e parece estar associado a atividade da NADPH oxidase, que gera superóxido localmente, capaz de influenciar este canal (Xia et al., 2003). Altos níveis de ERON aumentam a probabilidade de abertura de canal RYR1, resultando num aumento da

liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (Anzai et al., 2000; Fabisiak et al., 2000). Altos níveis de ERON também inibem a atividade da ATPase de Cálcio do Retículo Sarcoplasmático (SERCA). A SERCA é localizada na membrana do retículo sarcoplasmático e utiliza o ATP para transportar  $\text{Ca}^{2+}$  do sarcoplasma para o lúmen do retículo sarcoplasmático (Gutierrez-Martin et al., 2004) e é regulada pela fosforilação da enzima Fosfolamban (PLB), que em sua forma desfosforilada a inibe (Periasamy & Kalyanasundaram, 2007). A redução nos níveis de ERON também inibe sua função por reduzir os grupos sulfidrilas que são requeridos para hidrólise de ATP, no seu sítio ativo de ligação ATP (Daiho & Kanazawa, 1994). Esses mecanismos ocorrem devido aos resíduos tióis que essas proteínas possuem, pois são influenciados pelo status redox.

Outro mecanismo de extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  é o Trocador de Sódio/Cálcio (NCX), localizado no sarcolema (NCX3) e nas cristas mitocondriais, ele catalisa a troca de 3 íons de  $\text{Na}^+$  por 1 íon de  $\text{Ca}^{2+}$  através do sarcolema. Dependendo do gradiente eletroquímico ele pode atuar no modo reverso, promovendo entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . (Huschenbett et al., 1998; Fraysse et al., 2001). Recentemente foi demonstrado que o NCX pode ser estimulado por ERON (Eigel et al., 2004), mas inibido quando são encontrados níveis maiores de ERON (Wagner et al., 2013). Adicionalmente, estimulação do NCX por ERO quando sódio é elevado, promove modo reverso e leva a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zima & Blatter, 2006). Essa sobrecarga pode tornar o  $\text{Ca}^{2+}$  efetor para alteração de um estado fisiológico comprometendo a função muscular.

Ademais, está bem estabelecido a redução da capacidade homeostática do  $\text{Ca}^{2+}$  em músculos envelhecidos. Alguns estudos recentes demonstraram redução da SERCA (Russ et al., 2011) e RYR1 (Andersson et al., 2011) e alterações no NCX (Mace et al., 2003) em músculos envelhecidos, e indicam que estas alterações contribuem para a perda de função muscular decorrente do envelhecimento.

## 1.8 Exercício como intervenção

As respostas metabólicas e moleculares para as diferentes tipos de exercício são distintas, embora os exercícios, independente de sua natureza podem promover individualmente benefícios para a saúde

(Ozbay & Dulger, 2002; Palomero et al., 2008; Kang et al., 2009; Seene & Kaasik, 2012).

O exercício aeróbio modifica efetivamente fatores de risco cardiovascular. Sendo o mais potente indutor fisiológico da biogênese mitocondrial no músculo esquelético e também tem efeitos sobre o metabolismo em diversos outros tecidos, incluindo coração, cérebro, tecido adiposo e fígado (Seene & Kaasik, 2012). Em 2012, nosso grupo (Tromm et al., 2012) mostrou que 2 sessões de exercício por semana não foram suficientes para promover redução do dano oxidativo em ratos wistar. Em contrapartida o treinamento realizado com 3 sessões semanais (8 semanas-3x por semana-13m/min-45min/dia) aumentou as defesas antioxidantes (SOD e GPX) resultando na redução do dano oxidativo. Ainda em 2012, demonstramos os efeitos do exercício aeróbio sobre a doença de Parkinson, os dados indicaram a possibilidade do exercício modular o estado neuroquímico do estriado de ratos levando a redução dos danos oxidativos (Tuon et al., 2012). Em 2013, nosso grupo demonstrou que o treinamento aeróbio excêntrico (corrida em declive) não é prejudicial para a função mitocondrial e melhora a capacidade oxidativa do músculo (succinato desidrogenase, complexos I e II) semelhante ao treinamento aeróbio convencional (Silva et al., 2013).

Existem evidências de que a presença contínua de pequenos estímulos, que provocam elevações mínimas nas concentrações de ERON, são capazes para induzir a expressão de enzimas antioxidantes e outros mecanismos de defesa (Ji, 2008). A base deste fenômeno pode ser explicada pelo conceito de hormese, onde a adaptação ao exercício aeróbio ocorre por meio de estímulos que expõem a célula a baixas doses de oxidantes, mas sendo inibida por altas doses do mesmo (Zoppi, 2005; Ji et al., 2006). Neste contexto, ERON podem ser benéficas, atuando como sinalizadoras para aumentar as defesas antioxidantes do organismo, levando ao menor dano oxidativo e retardando o processo de envelhecimento (Calabrese & Baldwin, 2003; Ji et al., 2006). Adicionalmente Short e colaboradores (2005) demonstraram aumento da síntese proteica após 16 semanas de treinamento aeróbio e este efeito não foi dependente de idade em humanos. O tipo do exercício, intensidade e duração provavelmente são fatores cruciais para a regulação da síntese proteica. Algumas evidências sugerem que o aumento da síntese proteica ocorre no período de recuperação após o

exercício aeróbio, através do aumento da fosforilação da proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) (Mascher et al., 2007, Mascher et al., 2011). Outras evidências também afirmam os efeitos positivos do treinamento aeróbio sobre as proteínas que transportam o  $\text{Ca}^{2+}$  em músculos esqueléticos com diferentes tipos de fibras (Ferreira et al., 2010).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a resposta aguda e adaptativa do exercício físico sobre os parâmetros de estresse oxidativo, metabolismo energético e do metabolismo do cálcio em músculo esquelético de ratos com diferentes idades.

### 2.2 Específicos:

a) Avaliar a resposta aguda e adaptativa, em dois diferentes modelos de exercício físico, sobre a concentração de lactato e do conteúdo de glicogênio, e níveis proteicos de succinato desidrogenase e citocromo-c oxidase em músculo esquelético de ratos jovens e mais velhos.

b) Avaliar a resposta aguda e adaptativa, em dois diferentes modelos de exercício físico, sobre os níveis de lipoperoxidação, carbonilação de proteínas, conteúdo total de tióis, produção de superóxido e níveis proteicos e atividade de enzimas antioxidantes em músculo esquelético de ratos jovens e mais velhos.

c) Avaliar a resposta adaptativa de dois diferentes modelos de exercício físico sobre os níveis proteicos do fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2, sirtuína 1, receptor de rianodina, fosfolambam e trocador de sódio e cálcio, no músculo esquelético de ratos velhos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais

O estudo foi conduzido utilizando 42 ratos machos Wistar (3 e 18 e 24 meses de idade – pesando  $325\pm 18$ ,  $418\pm 11$   $485\pm 24$ g), provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram agrupados 5 a 5 em gaiolas com acesso livre a água e comida (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Brasil), em temperatura ambiente de 23°C graus e ciclo de claro e escuro de 12h (as luzes eram acesas as 07h00min). Todos os procedimentos foram realizados conforme as Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e Uso de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA (DOU 27/5/13, MCTI, p.7) e aprovados pelo Comitê de Ética local (protocolo 016/2013 em anexo).

### 3.2 Experimento I: Efeito agudo do exercício físico

Para atender o objetivo de verificar os efeitos de diferentes intensidades de exercício sobre parâmetros de estresse oxidativo e do metabolismo energético sobre o músculo esquelético de ratos jovens comparados aos ratos mais velhos, os animais foram divididos em dois grupos: 12 ratos jovens (3 meses) e 12 ratos velhos (18 meses), que foram randomicamente distribuídos em 4 subgrupos (n=6): controle jovem (CJ), jovem exercitado (JE), controle velho (CI), velho exercitado (IE).

#### 3.2.1 Protocolo de exercício

Todos os animais foram adaptados em esteira ergométrica por uma semana (10m/min, 0.6km/h, sem inclinação, durante 10 min/dia) todos os dias da semana, para reduzir o estresse ao novo ambiente. Os animais não receberam nenhum estímulo para correr. Vinte e quatro horas após o período de adaptação os animais foram submetidos a uma sessão de exercício em esteira. Os animais jovens exercitados correram a 1.2km/h e os animais mais velhos a 0.8km/h. De acordo com Koltai e colaboradores (2012) ambas velocidades correspondem aproximadamente a 60% do Consumo Máximo de Oxigênio ( $VO_{2max}$ ).

### 3.3 Experimento II: Efeito adaptativo do exercício físico

Para atender o objetivo de verificar os efeitos de diferentes tipos de treinamento físico sobre os marcadores de metabolismo energético, estresse oxidativo e proteínas que translocam o cálcio no músculo esquelético de ratos, 18 ratos velhos (24 meses) foram randomicamente distribuídos em três grupos (n=6): controle, treinamento contínuo, treinamento fracionado.

#### 3.3.1 Protocolo de exercício

Todos os animais foram adaptados em esteira ergométrica por uma semana (10m/min, 0.6km/h, sem inclinação, durante 10 min/dia) todos os dias da semana, para reduzir o estresse ao novo ambiente. Os animais não receberam nenhum estímulo para correr. Vinte e quatro horas após o período de adaptação os animais foram submetidos ao treinamento físico. Os animais realizaram um programa de corrida em esteira ergométrica motorizada com intensidade de 0.8km/h, 5 dias consecutivos (exceto fins de semana), por seis semanas, por um período total de 42 dias. Cada sessão foi realizada por 45min contínuos ou três sessões diárias de exercício de 15 minutos: 07h00min – 12h00min – 18h00min (horário arbitrário). A intensidade do exercício foi cautelosamente aplicada para corresponder a 60% do consumo máximo de oxigênio, conforme previamente descrito por Kotai e colaboradores (2012). Os animais do grupo Controle foram colocados sobre a esteira desligada simultaneamente aos grupos exercitados.

#### 3.4 Eutanásia, coleta e preparação de tecidos

Imediatamente após a sessão do exercício no experimento I e 48 horas após a última sessão de exercício do experimento II todos os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de Cetamina (80mg/kg) e Xilazina (12mg/kg) e posteriormente submetidos à eutanásia, o sangue foi coletado da veia caudal, o gastrocnêmico (experimento I) e o quadríceps (experimento II) foram cirurgicamente removidos. Uma alíquota foi processada para determinação do glicogênio muscular e outra alíquota de amostra foi homogeneizada em tampão específico e usada para análises de proteínas intracelulares por

imunoblotting. O tecido foi homogeneizado em tampão 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 40 minutos para remover materiais insolúveis. Com o sobrenadante foi determinado a concentração de proteína utilizando o método de Bradford et al. (1976) e posteriormente foi realizada a determinação do extrato total com anticorpo específico. O restante da amostra foi alíquotada e imediatamente armazenada em freezer -70°C para análises posteriores.

O descarte dos animais foi realizado com acondicionamento dos mesmos em saco branco leitoso e armazenado em freezer -40 para posterior tratamento e deposição final em aterro sanitário, conforme procedimentos estabelecidos pela Vigilância Sanitária (RDC 306/2004).

### 3.5 Marcadores metabólicos

O conteúdo de glicogênio muscular e os níveis de lactato foram usados como parâmetros metabólicos musculares. Os níveis de lactato no sangue foram realizados em repouso e, imediatamente após a última sessão de exercício, o sangue foi coletado da veia caudal, utilizando um kit comercial de acordo com as instruções do fabricante e, em seguida, analisados por um medidor de lactato por fotometria de reflexão (Roche Diagnostics, BW Mannheim, Alemanha). Os níveis de lactato foram expressos em nmol/lactato/L de sangue. O conteúdo de glicogênio foi quantificado por meio da reação com iodeto de potássio (KI), mais iodo (I<sub>2</sub>) (Krisman, 1962). Resumidamente, 300 mg de tecido muscular foi fervida durante 20 minutos em 30% de hidróxido de potássio (KOH), após o glicogênio muscular foi precipitado pela adição de etanol a 60%. A solução foi aquecida durante 10min a 70°C, seguido por 15min de incubação em gelo e centrifugação durante 9min a 600g. Em seguida, o pellet foi suspenso em 500µl de água destilada, e uma alíquota de 100mL foi misturada com uma solução de KI-I<sub>2</sub> (iodeto de potássio mais iodo) em solução saturada de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) e quantificado por espectrofotometria a 460nm. O conteúdo de glicogênio foi expresso em mg/de glicogênio/mg de músculo.

### 3.6 Parâmetros de Estresse Oxidativo

3.6.1 Ânion superóxido: Os níveis de anion superóxido foram mensurados conforme previamente descrito por Poderoso e colaboradores (1996). Partículas submitocondriais (PSM) do quadríceps foram isoladas por diferentes centrifugações, e o nível de superóxido foi determinado pela taxa de oxidação da adrenalina em um tampão contendo as PSM, succinato (como iniciador da cadeia transportadora de elétrons) e catalase. A cor desenvolvida pela reação foi lida em espectrofotômetro a 780nm e expressa em nmol/min/mg de proteína.

3.6.2 Lipoperoxidação: Como índice de peroxidação de lipídeos foi verificado a formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Draper & Hadley (1990). Primeiramente as amostras do músculo foram misturadas com 1ml de ácido tricloroacético (10%) e 1ml de ácido tiobarbitúrico (0,67%), seguido por aquecimento em banho-maria (60°C) por 30 minutos. Os níveis de TBARS foram mensurados espectrofotometricamente a 532nm e expressos como equivalentes de TBARS (nmol/mg proteína).

3.6.3 Carbonilação de proteínas: Os danos oxidativos em proteínas foram determinados de acordo com Levine e colaboradores (1990). O conteúdo de proteínas carbonilas foi mensurado pela formação de proteínas derivadas da hidrazona, usando 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Estes derivados foram sequencialmente extraídos com ácido tricloroacético a 20%, seguido por tratamento com etanol e etil acetato, e reextração com ácido tricloroacético a 10%. Após a reação as amostras foram redissolvidas em uréia 8M. Absorbância observada espectrofotometricamente da reação de grupos carbonilas com DNPH foi utilizada para determinar a concentração (nmol) de proteínas oxidadas por mg/ de proteína. Os resultados foram mostrados para cada amostra lida 370nm em espectrofotômetro.

3.6.4 Grupos Sulfidrilas: o conteúdo total de tióis foi determinado usando o método 5-5'-dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) (Sigma, St. Louis, MO). A reação foi iniciada por adição de 30µL de 10mM de DTNB ao tampão fosfato. As amostras controle não incluíam DNTB. Após 30 minutos de incubação em temperatura

ambiente, a absorvância em 412nm foi mensurada, e a quantia de 5-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico), ou TNB, formada foi calculada (equivalente a quantidade de grupos tióis), usando a técnica desenvolvida por Aksenov & Markesbery (2001).

### 3.7 Enzimas antioxidantes

3.7.1 Atividade da SOD: a atividade da SOD foi determinada de acordo com método de Mccord & Fridovich (1969). A atividade enzimática foi determinada pela inibição da auto oxidação da adrenalina. Foi utilizado 10, 30 e 50 $\mu$ L da amostra (homogeneizado em tampão glicina) e adicionado 10 $\mu$ L de catalase (0,0024g/ml de água destilada), 970 $\mu$ L de tampão glicina (0,75g em 200mL de água destilada – 32°C), 17 $\mu$ L de adrenalina (60 mM em água destilada + 15 $\mu$ L/ml de HCl fumegante). A leitura foi realizada em 180 segundos com intervalo de 10 segundos medida espectrofotometricamente a 480nm e os valores foram expressos em U/mg de proteína.

3.7.2 Atividade da CAT: a atividade da Catalase foi determinada conforme previamente descrito por Aebi (1984). O músculo foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (50 mM) pH 7,0, seguido por centrifugação a 3000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi usado para o ensaio. A atividade da CAT foi mensurada utilizando a taxa de decaimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240nm, expressos em U/mg de proteína.

3.7.3 Atividade da GPx: a atividade da GPx foi determinada conforme descrito por Flohé & Gunzler (1984), monitorando a oxidação de NADPH a 340nm na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade enzimática foi expressa em mM/min/mg de proteína.

### 3.8 Análise proteica por Imunoblotting

As proteínas foram desnaturadas em aquecimento (Laemmli, 1970) com tampão contendo 100mM DTT. Após isto, 0.2 mg do extrato de proteína obtido de cada tecido foi separado por SDS-PAGE, transferido para uma membrana de nitrocelulose, no bloqueado com anti-citocromo c oxidase, CíT-C (sc-13560); anti-succinato desidrogenase, SDH (sc-25851); bloqueado com anti-fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2, NFR2 (sc-365949); anti-sirtuína 1, (sc-

15404); anti-receptor de rianodina, RyR (sc-13942); anti-fosfolamban, PLB (sc-20511) e anti-trocador de sódio de cálcio, NCX (sc-32881), da Santa Cruz (Santa Cruz Biotecnologias, CA, USA) . A detecção quimioluminescente foi realizada com anticorpos secundários conjugados a peroxidases. Visualização das proteínas foi realizada pelo exposição das membranas ao raio-x (Kodak XAR, Rochester, NY). Após transferidas, as membranas foram coradas e quantificadas pelo anticorpo primário, para controle da transferência. A intensidade da banda foi determinada por radiografias de leitura desenvolvido pela densitometria óptica usando um scanner (HP 3400) e da Scion software de imagem (Scion Corporation). O anticorpo da  $\beta$ -actina (Abcam) foi utilizado como controle para as análises de Imunoblotting.

### 3.9 Conteúdo de proteínas

O conteúdo de proteínas musculares dos ensaios bioquímicos foi analisado usando albumina bovina como padrão, de acordo com Lowry e colaboradores (1951). O reagente Folin de fenol (fosfomolibdico-fosfotúngstico) foi adicionado para ligar o reagente à proteína. O reagente foi lentamente reduzido, passando de amarelo para azul. A absorbância foi lida a 750 nm em espectrofotômetro.

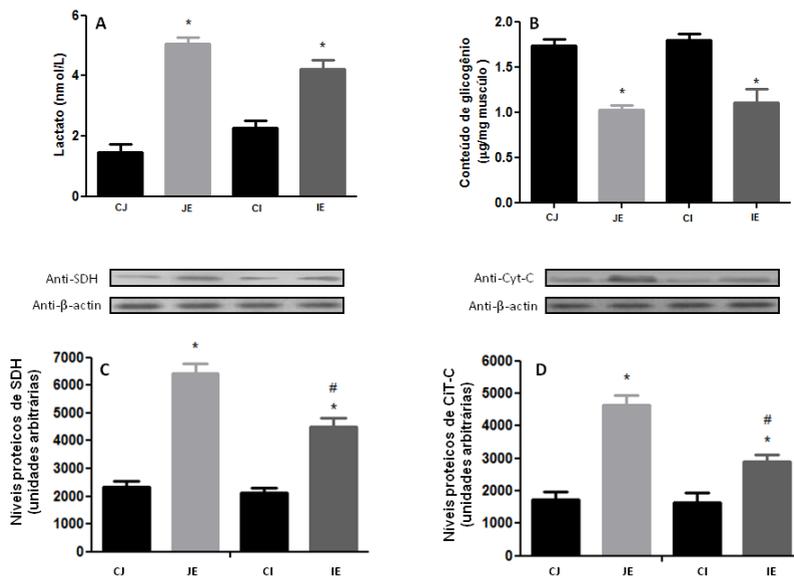
### 3.10 Análise estatística

Os dados foram apresentados em média e erro padrão médio (média $\pm$ EPM). A diferença entre os grupos foi determinada por análise de variância ANOVA (one-way), seguido pelo teste post-hoc de Tukey's, quando ANOVA foi significativa; o valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente diferente. O software utilizado para análise dos dados foi o Pacote Estatístico para Ciências Sociais (SPSS), versão 18.0 para Microsoft Windows.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Marcadores metabólicos

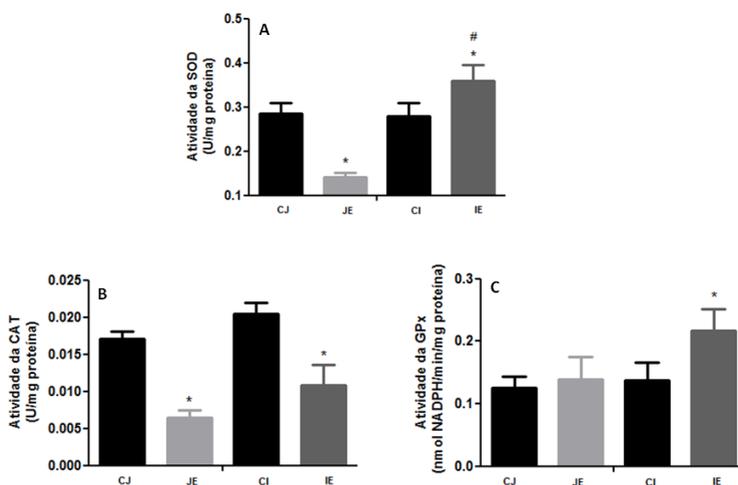
No experimento I os resultados mostraram (figura 4) que o grupo JE aumentou a concentração de lactato (A) ( $5,05 \pm 0,13$  nmol/L), níveis proteicos de SDH (C) ( $6428 \pm 365$  unidades arbitrárias), e de Citocromo-C (D) ( $4638 \pm 302$  unidades arbitrárias) comparado com Controle Jovem ( $1,45 \pm 0,18$  nmol/L;  $2345 \pm 187$  unidades arbitrárias; e  $1717 \pm 239$  unidades arbitrárias, respectivamente) e reduziu o conteúdo de glicogênio (B) ( $1,0 \pm 0,07$  µg/mg músculo) comparado com Controle Jovem ( $1,7 \pm 0,1$  µg/mg músculo). O grupo IE aumentou a concentração de lactato ( $4,22 \pm 0,18$  nmol/L), SDH ( $4501 \pm 311$  unidades arbitrárias), e Cit-C ( $2913 \pm 211$  unidades arbitrárias) comparado com Controle Velho ( $2,2 \pm 0,20$  nmol/L;  $2109 \pm 194$  unidades arbitrárias; e  $1631 \pm 295$  unidades arbitrárias, respectivamente) e reduziu o conteúdo de glicogênio ( $1,1 \pm 0,2$  µg/mg músculo) comparado com CI ( $1,8 \pm 0,1$  µg/mg músculo). Adicionalmente, o grupo IE diminuiu os níveis de SDH e Cit-C comparado com JE ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4:** Efeitos agudos do exercício em ratos jovens e mais velhos sobre o lactato sanguíneo (A), conteúdo de glicogênio (B), níveis proteicos de SDH (C) e de Cit-C (D) no músculo esquelético. Os dados foram expressos com média e erro padrão. \*  $p \leq 0.05$  comparado com animais Controle, <sup>#</sup>  $p \leq 0.05$  comparado com Jovens exercitados (ANOVA, Tukey's post hoc test). CJ: controle jovem; JE: jovem exercitado; CI: controle velho; IE: velho exercitado.

## 4.2 Enzimas antioxidantes

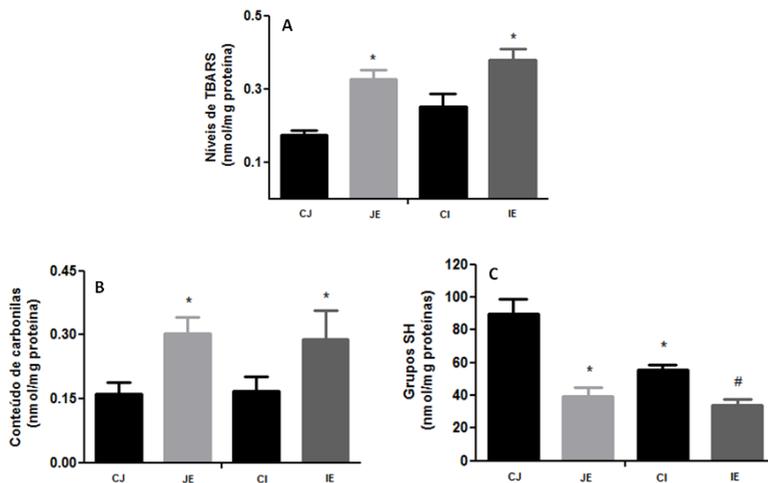
No experimento I, a figura 5 mostra uma redução na atividade da SOD (A) e CAT (B) no grupo JE ( $0,14 \pm 0,04$  U/mg proteína e  $0,006 \pm 0,001$  U/mg proteína, respectivamente) comparado com CJ ( $0,28 \pm 0,02$  U/mg proteína e  $0,017 \pm 0,0009$  U/mg proteína, respectivamente). O grupo IE ( $0,01 \pm 0,002$  U/mg proteína) também exibiu redução em CAT comparado com CI ( $0,02 \pm 0,001$  U/mg proteína), um aumento em SOD ( $0,35 \pm 0,03$  U/mg proteína) comparado com CI ( $0,28 \pm 0,02$  U/mg proteína) e JE, e aumentou a GPX (C) ( $0,21 \pm 0,03$  nmol NADPH/min/mg proteína) comparado com os outros grupos, CI ( $0,13 \pm 0,02$  nmol NADPH/min/mg proteína), JE ( $0,13 \pm 0,03$  nmol NADPH/min/mg proteína), e CJ ( $0,12 \pm 0,01$  nmol NADPH/min/mg proteína), ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5:** Efeitos agudos do exercício em ratos jovens e mais velhos sobre a atividade da SOD (A), CAT (B) e GPX (C) no músculo esquelético. Os dados foram expressos com média e erro padrão. \*  $p \leq 0,05$  comparado com animais Controle, #  $p \leq 0,05$  comparado com Controle velho (ANOVA, Tukey's post hoc test). CJ: controle jovem; JE: jovem exercitado; CI: controle velho; IE: velho exercitado.

### 4.3 Marcadores de dano oxidativo

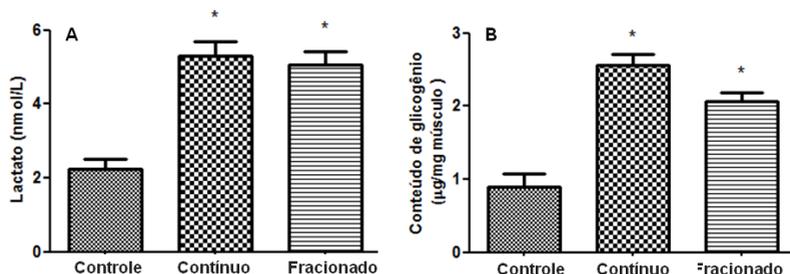
No experimento I (figura 6), os dados demonstraram aumento na lipoperoxidação no grupo JE ( $0,32 \pm 0,02$  nmol/mg proteína) quando comparado com CJ ( $0,17 \pm 0,01$  nmol/mg proteína) e o grupo IE aumentou ( $0,37 \pm 0,03$  nmol/mg proteína) quando comparado com CI ( $0,25 \pm 0,03$  nmol/mg proteína) ( $p < 0,01$ ). Conteúdo de carbonila aumentou no grupo JE ( $0,30 \pm 0,03$  nmol/mg proteína) comparado com o grupo CJ ( $0,16 \pm 0,02$  nmol/mg proteína) e o grupo IE aumentou ( $0,28 \pm 0,07$  nmol/mg proteína) quando comparado com CI ( $0,16 \pm 0,03$  nmol/mg proteína). Os grupos JE ( $39,4 \pm 5,2$  TNB/mg proteína) e CI ( $55,6 \pm 2,9$  TNB/mg proteína) exibiram diminuição no conteúdo de tióis totais (figura 6C) comparado com CJ ( $89,9 \pm 8,8$  TNB/mg proteína). Adicionalmente, IE ( $33,7 \pm 3,8$  TNB/mg proteína) demonstrou uma redução neste marcador comparado com o grupo CI ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6:** Efeitos agudos do exercício em ratos jovens e mais velhos sobre os níveis de TBARS (A), conteúdo de carbonil (B) e tióis totais (C) no músculo esquelético. \*  $p \leq 0,05$  comparado com animais Controle, #  $p \leq 0,05$  comparado com Controle velho (ANOVA, Tukey's post hoc test). CJ: controle jovem; JE: jovem exercitado; CI: controle velho; IE: velho exercitado.

#### 4.4 Marcadores metabólicos

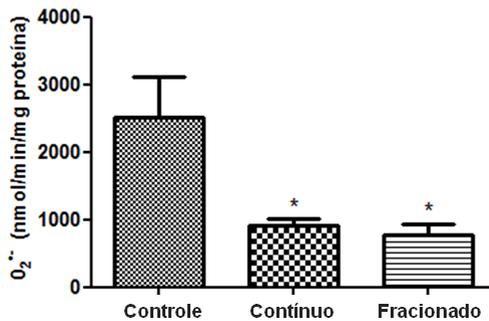
No experimento II os resultados mostraram (figura 7) que a concentração de lactato (A) se manteve acima dos níveis de repouso em ambos os grupos, Contínuo ( $5,3 \pm 0,4$  nmol/L) e Fracionado ( $5,0 \pm 0,42$  nmol/L), após a última sessão de treinamento em relação aos níveis de repouso ( $2,4 \pm 0,1$ ;  $2,2 \pm 0,3$  nmol/L respectivamente). O conteúdo de glicogênio demonstrou (B) elevação nos grupos Contínuo ( $2,5 \pm 0,3$   $\mu$ g/mg de músculo) e Fracionado ( $2,0 \pm 0,2$   $\mu$ g/mg de músculo) em relação ao grupo Controle ( $0,8 \pm 0,3$   $\mu$ g/mg de músculo) após o término do treinamento.



**Figura 7:** Resposta do treinamento Contínuo e Fracionado sobre os níveis de lactato (imediatamente após) (A) e conteúdo de glicogênio (B) em músculo de ratos velhos. Os dados foram expressos com média e erro padrão. \*  $p \leq 0,05$  comparado com animais Controle (ANOVA, Tukey's post hoc test).

#### 4.5 Níveis de anion superóxido

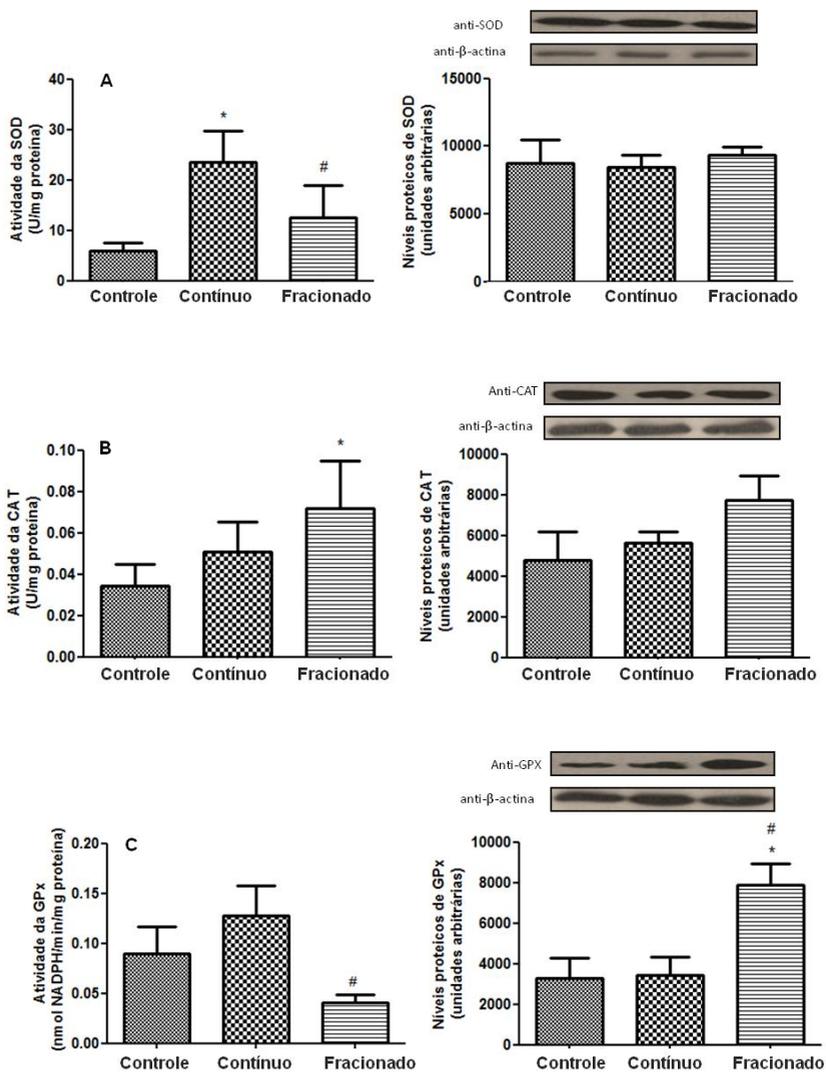
No experimento II (figura 8), houve uma redução significativa na produção oxidante após o treinamento Contínuo ( $913 \pm 131$  nmol/min/mg proteína) e Fracionado ( $774 \pm 223$  nmol/min/mg proteína) quando comparado com o grupo Controle ( $2521 \pm 891$  nmol/min/mg proteína).



**Figura 8:** Resposta do treinamento Contínuo e Fracionado sobre a produção de anion superóxido. Os dados foram expressos com média e erro padrão. \*  $p \leq 0.05$  comparado com animais Controle (ANOVA, Tukey's post hoc test).

#### 4.6 Enzimas antioxidantes

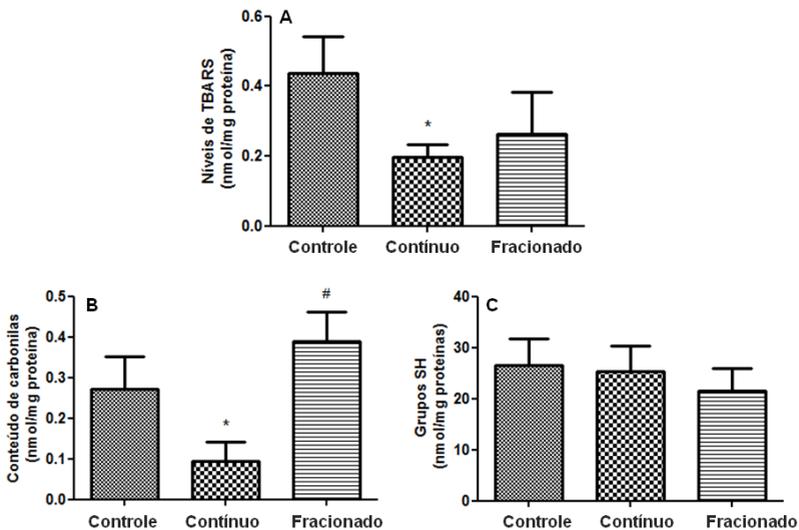
No experimento II (figura 9), não houve alteração entre os grupos Controle, Contínuo e Intervalado, nos níveis proteicos de SOD (A) ( $8736 \pm 2248$ ;  $8457 \pm 1213$ ;  $9357 \pm 758$  unidades arbitrárias, respectivamente) e CAT (B) ( $4781 \pm 2236$ ;  $5626 \pm 720$ ;  $7725 \pm 1541$  unidades arbitrárias, respectivamente). Contudo, o grupo Contínuo aumentou a atividade da SOD ( $23,5 \pm 4,4$ U/mg proteína) em relação ao grupo Controle ( $5,9 \pm 1,1$ U/mg proteína) e ao grupo Fracionado ( $12,5 \pm 3,9$ U/mg proteína), que por sua vez aumentou a atividade de CAT ( $0,07 \pm 0,01$ U/mg proteína) em relação ao Controle ( $0,03 \pm 0,007$ U/mg proteína). Por outro lado, os níveis proteicos da GPx (C) aumentaram após treinamento Fracionado ( $7858 \pm 1339$  unidades arbitrárias) em relação ao Controle ( $3266 \pm 1352$  unidades arbitrárias) e grupo Contínuo ( $3446 \pm 1138$  unidades arbitrárias). Ao mesmo tempo, houve redução da atividade da GPx neste mesmo grupo (Fracionado) ( $0,04 \pm 0,01$ nmol NADPH/min/mg proteína) comparado com os animais do grupo Contínuo ( $0,12 \pm 0,04$ nmol NADPH/min/mg proteína).



**Figura 9:** Resposta do treinamento Contínuo e Fracionado sobre a atividade e níveis proteicos das enzimas antioxidantes, SOD (A), CAT (B) e GPx (C). \*  $p \leq 0.05$  comparado com animais Controle, #  $p \leq 0.05$  comparado com o grupo Contínuo (ANOVA, Tukey's post hoc test).

#### 4.7 Marcadores de dano oxidativo

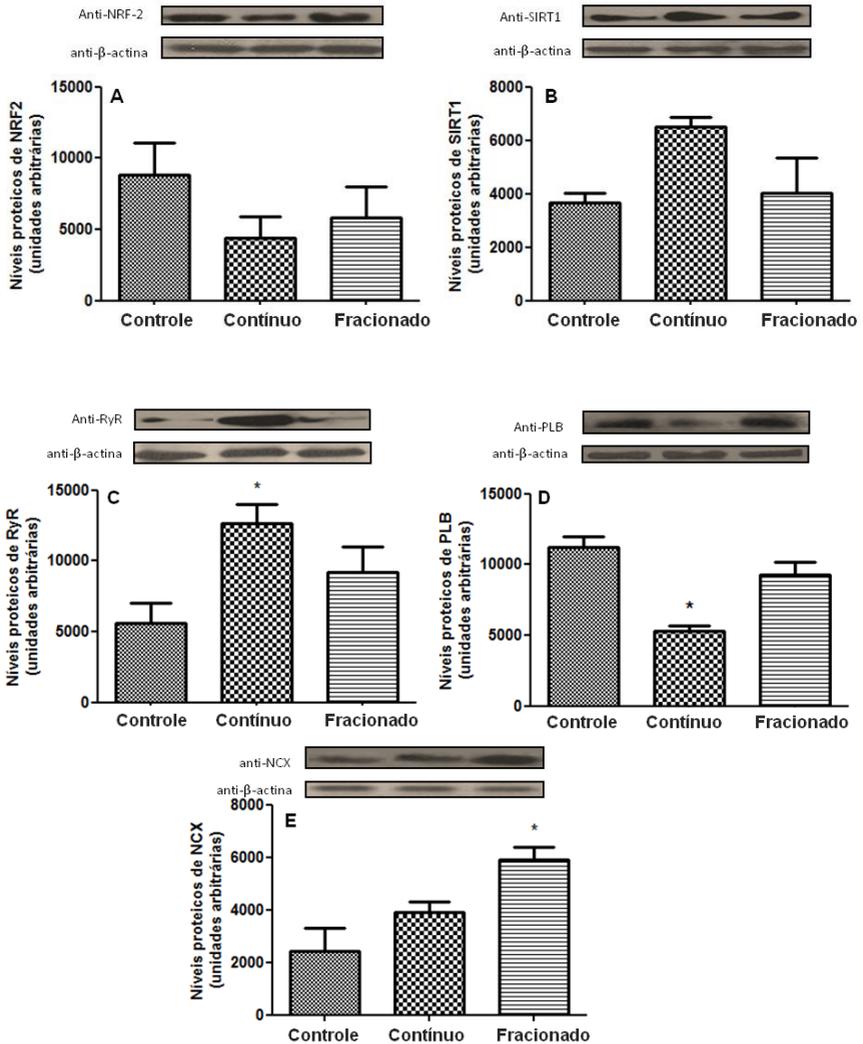
No experimento II (figura 10), os resultados apontaram que somente o treinamento Contínuo reduziu os níveis de lipoperoxidação (A) ( $0,19 \pm 0,02$ nmol/mg proteína) e carbonilação de proteínas (B) ( $0,09 \pm 0,03$ nmol/mg proteína) quando comparado com o Controle ( $0,43 \pm 0,07$ nmol/mg proteína;  $0,27 \pm 0,05$ nmol/mg proteína, respectivamente). Este mesmo grupo apresentou menor conteúdo de carbonilas em relação ao grupo Fracionado ( $0,38 \pm 0,05$ nmol/mg proteína). Ademais, o conteúdo de grupos SH (C) não demonstrou alterações significativas após os diferentes modelos de treinamento (Controle  $26 \pm 9$ ; Contínuo  $25 \pm 7$ ; Fracionado  $21 \pm 8$ nmol/mg de proteína).



**Figura 10:** Resposta do treinamento Contínuo e Fracionado sobre os níveis de TBARS (A), conteúdo de carbonilas (B) e grupos SH (C). \*  $p \leq 0,05$  comparado com animais Controle, #  $p \leq 0,05$  comparado com o grupo Contínuo (ANOVA, Tukey's post hoc test).

#### 4.8 Níveis proteicos de fatores de transcrição mitocondriais e de proteínas que translocam o $\text{Ca}^{2+}$ muscular

No experimento II (figura 11), não houve diferença significativa nos níveis proteicos de NRF2 (A) (Controle  $8830 \pm 2986$ ; Contínuo  $4398 \pm 1920$ ; Fracionado  $5848 \pm 2845$  unidades arbitrárias) e SIRT1 (B) (Controle  $6364 \pm 495$ ; Contínuo  $6521 \pm 447$ ; Fracionado  $4034 \pm 1698$  unidades arbitrárias) entre os dois modelos de treinamento propostos. Os resultados da figura 11 (C) apontaram que o treinamento Contínuo foi capaz de aumentar os níveis de RyR ( $12667 \pm 1971$  unidades arbitrárias) e reduzir os níveis de PLB (D) ( $5284 \pm 405$  unidades arbitrárias) comparado com o Controle ( $5596 \pm 2014$ ;  $11204 \pm 766$  unidades arbitrárias, respectivamente). Por outro lado, somente o treinamento Fracionado elevou (E) ( $5900 \pm 635$  unidades arbitrárias) os níveis proteicos de NCX em relação ao Controle ( $2439 \pm 1129$  unidades arbitrárias).



**Figura 11:** Resposta do treinamento Contínuo e Fracionado sobre os níveis proteicos de fatores de transcrição mitocondriais e de proteínas que translocam o  $\text{Ca}^{2+}$ . NRF2 (A), SIRT1 (B), RyR (C), PLB (D) e NCX (E). \*  $p \leq 0.05$  comparado com animais Controle (ANOVA, Tukey's post hoc test).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Experimento I

A presente investigação examinou os efeitos de parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo no gastrocnêmio de ratos jovens e mais velhos expostos a uma única sessão de exercício com carga similar. As evidências mostraram que as mudanças no metabolismo glicolítico (lactato aumentado e glicogênio reduzido) são similares nos dois grupos exercitados, sugerindo que o exercício agudo afeta o músculo independente da idade.

Uma das alterações chave no exercício agudo são as mudanças nas enzimas glicolíticas e oxidativas dos músculos envolvidos no exercício. Diversos estudos reportaram que o envelhecimento amplia (Gunduz et al., 2004), atenua (Dimauro et al., 2012; Hatao et al., 2006), ou não afeta (Radak et al., 2011; Vasilak et al., 2006a) as alterações na homeostase redox induzidas pelo exercício. Similarmente, a capacidade adaptativa de organismos envelhecidos em responder a estímulos oxidantes repetidos pode sofrer redução (Bailey et al., 2010; Rousseau et al., 2006) ou não ser afetada (Lynch et al., 2008; Sacheck et al., 2006) em relação a organismos jovens.

As mudanças que ocorrem no estado redox são dependentes da tensão imposta sobre as vias metabólicas, como o tipo de metabolismo e a taxa metabólica a ser usada (Pinho et al., 2012). Níveis de lactato são utilizados como indicadores da intensidade do exercício e do metabolismo glicolítico. Os resultados da figura 4 mostraram um aumento nos marcadores metabólicos após uma única sessão de exercício, sugerindo que alterações no metabolismo energético podem representar a manutenção de um mecanismo oxidativo de produção de ATP na célula nos músculos de animais jovens e envelhecidos. Isto é justificado porque o modelo de intensidade usado neste estudo aumentou duas vezes (pós-exercício) a concentração de lactato em relação ao grupo controle e também a depleção de glicogênio; então, o aumento nas enzimas oxidativas de produção de energia que foram observadas, sugerem um componente aeróbio de intensidade moderada.

A alteração no metabolismo oxidativo é importante no balanço entre produção oxidante e sistema de defesa antioxidante. Nossos resultados estão de acordo com outros dados que mostraram aumento

dos níveis de SDH e CiT-C em ratos jovens e envelhecidos (Hammeren et al., 1992; Koltaj et al., 2012). Isto sugere que sob estas intensidades o papel do metabolismo oxidativo começa a ser predominante, em parte, ao protocolo experimental adotado. Contudo, o grupo envelhecido exibiu menores níveis de SDH e CiT-C comparado com o grupo jovem. Mudanças relacionadas a idade na biossíntese mitocondrial podem estar relacionadas ao processo de sarcopenia. Taxas menores de síntese de proteínas mitocondriais, distúrbios nas atividades de enzimas mitocondriais e menor capacidade oxidativa de produzir ATP têm sido reportadas em tecidos envelhecidos (Short et al., 2005; Igbal et al., 2013). Alguns estudos indicam que ratos envelhecidos tem níveis proteicos de citocromo-c significativamente menores quando comparado a ratos jovens (Haak et al., 2009; Kang et al., 2009).

Com o envelhecimento, níveis de estresse oxidativo são elevados em função da capacidade antioxidante prejudicada em músculo esqueléticos (Cakatay et al., 2003; Fulle et al., 2004; Siu et al., 2008). É razoável supor que o envelhecimento pode alterar os eventos redox e aumentar a susceptibilidade de músculos a lesão oxidativa durante o exercício. Bejma & Ji (1999) mostraram que o exercício agudo com programa similar (15 m/min para ratos envelhecidos e 25 m/min para ratos jovens por ~60 minutos) eleva a produção oxidante no músculo de ratos envelhecidos em relação a ratos jovens. Contudo, existe um debate atual na literatura sobre os efeitos do status redox no envelhecimento. Os estudos publicados nos últimos 10 anos consideram a influência do exercício sobre o dano muscular, que pode aumentar (Lynch et al., 2008; Choi et al., 2012), diminuir (Gorianovas et al., 2013; Lavender & Nosaka, 2006) ou não afetar animais mais velhos (Lavender & Nosaka, 2008; Thalacker-Mercer et al., 2010), e isto pode estar relacionado a duração e intensidade do exercício.

Mudanças agudas na redução da atividade de enzimas antioxidantes, tais como SOD (figura 5A) e CAT (figura 5B), com o exercício agudo podem sugerir menor proteção contra exposição à ERO induzida pelo exercício. Contudo, ambas as idades exibiram menor atividade de CAT após o exercício. Muitos estudos conflitantes existem em relação às mudanças relacionadas à idade no sistema de defesa antioxidantes em vários órgãos (fígado, coração, músculo esquelético) (Hatao et al., 2006; Vasilak et al., 2006a; Vasilak et al., 2006b). Tais mudanças também diferem pelo tipo de fibra muscular, sugerindo que

fibras rápidas parecem ser mais susceptíveis que fibras lentas, ao estresse oxidativo relacionado a idade (Jackson et al., 2007). Nossos resultados mostraram que a atividade da GPx aumentou (figura 5C) nos ratos mais velhos exercitados mais que nos ratos controle e jovens. Este resultado pode ocorrer por um mecanismo compensatório em função da redução da CAT no mesmo grupo. É possível que um aumento encontrado no sistema de defesa enzimático ocorra devido a alta exposição às ERO após exercício inabitual em ratos velhos.

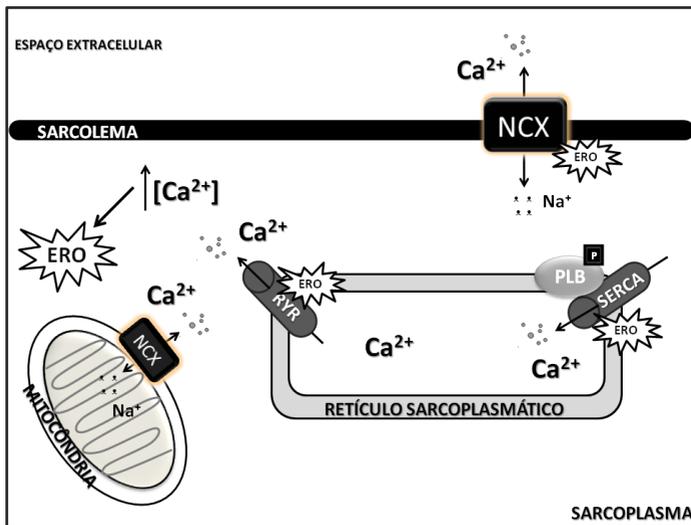
Sob condições normais, há um equilíbrio entre degradação contínua e resíntese de proteínas musculares. Diversos estudos têm mostrado uma redução dependente da idade nos níveis totais de tióis, que tem um papel importante não somente nas reações antioxidantes, mas também nas reações de catalise, regulação e transporte de elétrons e alguns preservam as estruturas corretas das proteínas (Hernanz et al., 2000; Thomas & Mallis, 2001). Iciek e colaboradores (2004) mostraram que a eficiência da S-tiolação (conjugação de proteínas tióis com proteínas não tióis) como um mecanismo de defesa antioxidante é reduzido com a idade, leva ao aumento do risco de oxidação irreversível das proteínas. É possível que nos resultados observados no músculo de ratos jovens e mais velhos, os grupos sulfidrilas (tióis totais) atuaram como antioxidantes devido ao aumento de ERO durante o exercício, independente dos níveis basais entre os dois grupos (figura 6C). A alta lipoperoxidação (figura 6A) e alto conteúdo de carbonilação proteica (figura 6B) no gastrocnêmio indicam que os níveis de estresse oxidativo apareceram após o exercício em ambos os grupos exercitados. O aumento observado na oxidação de proteínas pode ter resultado de um aumento na produção de grupos carbonilas ou redução na remoção de proteínas musculares oxidadas. Diferente de outros estudos (Bailey et al., 2010; Bejma & Ji, 1999; Ozbay & Dulger, 2002), que demonstraram maior lipoperoxidação e carbonilação em velhos em relação a jovens, nós demonstramos um aumento no mesmo nível para ambos os grupos após sessão de corrida. Nikolaidis e colaboradores (2013) demonstraram maior oxidação de proteínas em animais jovens e velhos após sessão de corrida excêntrica, com lipoperoxidação somente na população idosa. Em contrapartida, Bejma & Ji (1999) demonstraram que níveis de malondealdeído (MDA) e conteúdo de carbonilas não são afetadas pela idade ou exercício. A razão para nossos resultados pode estar relacionada à intensidade do exercício. Durante uma corrida a 60% do

$VO_{2max}$  o esforço pode não ter sido suficiente para estimular o dano oxidativo em diferentes níveis em ratos com 3 vs. 18 meses de idade.

Em conclusão, os resultados reportados neste experimento demonstraram que o aumento nos marcadores de estresse oxidativo e do metabolismo glicolítico no gastrocnêmio ocorre em ambas as idades, e isso pode estar relacionado à intensidade do exercício. Contudo, os marcadores metabólicos oxidativos mostraram maior susceptibilidade à intensidade do exercício em músculos mais velhos.

## 5.2 Experimento II

O treinamento físico leva a adaptações na musculatura esquelética que dependem do tipo de trabalho que o músculo realiza. Assim, no presente estudo nós comparamos os efeitos de dois protocolos de exercício sobre marcadores de estresse oxidativo e proteínas que translocam o  $Ca^{2+}$  muscular em ratos velhos. Os resultados mostraram que as proteínas que translocam o  $Ca^{2+}$  podem ser moduladas pelo treinamento com diferentes estímulos (contínuo ou fracionado) através da regulação de ERO (figura 12), uma vez que altas concentrações de  $Ca^{2+}$  podem elevar os níveis de ERO, levando a oxidação dos translocadores de  $Ca^{2+}$  em músculos envelhecidos (Capel et al., 2005). Está bem estabelecido que a otimização do desempenho muscular está relacionada com uma melhor contratilidade de miócitos e isto depende da sinalização redox e da homeostase intracelular do  $Ca^{2+}$  (Ferreira et al., 2010). No mesmo sentido, a modulação do estresse oxidativo pelo treinamento contínuo pode ter um papel importante nos mecanismos de contração muscular.



**Figura 12:** A rede de sinalização intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  é regulada por ERO. Podendo ser modulada por diferentes programas de treinamento. Uma vez que altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  podem elevar os níveis de ERO, levando a oxidação dos translocadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , ou níveis moderados de ERO podem sinalizar para regulação otimizada do mecanismo contrátil em músculos envelhecidos.

Os resultados iniciais do presente estudo mostraram que alterações significantes ocorreram no metabolismo muscular (figura 7), por exemplo, um significativo aumento no conteúdo de glicogênio muscular e níveis de lactato que podem representar adaptações metabólicas e transição do mecanismo de produção de ATP celular (Pinho et al., 2012). Estes resultados são importantes, pois sugerem que ambos os modelos de exercício foram suficientes para promover mudanças adaptativas no músculo dos animais exercitados. Adicionalmente, ambos os grupos (comparados ao controle) apresentaram elevado conteúdo de glicogênio, que afeta diretamente a habilidade de realizar exercícios, pois conteúdos menores de glicogênio depletam a taxa de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático, que contribui para a fadiga muscular (Gejl et al., 2013).

ERO são geradas durante o exercício e são importantes moduladoras de proteínas responsáveis pelo transporte do  $\text{Ca}^{2+}$  e pelo

desenvolvimento de fadiga durante o exercício (Dutka et al., 2012). Os resultados mostraram redução na produção de superóxido (figura 8) em ambos os modelos de exercício com concomitante aumento da atividade da SOD (figura 9A). Está bem estabelecido na literatura uma redução associada à idade nas enzimas antioxidantes com concomitante aumento no superóxido, que levam ao dano oxidativo, e ao longo do tempo, a perdas eventuais da massa muscular, pois animais deficientes em enzimas antioxidantes apresentam menor expectativa de vida (Muller et al., 2007). Contudo, enzimas antioxidantes aumentam em células de animais jovens e velhos após exercício contínuo (Hatao et al., 2006). As atividades reduzidas de SOD e GPx (figura 9 A,C) observadas no grupo com treinamento fracionado podem estar relacionados com um processo de adaptação mais lento que o treinamento contínuo, insuficiente para ativar estas enzimas, desencadeando dano oxidativo às proteínas neste mesmo grupo (figura 10 B). Contudo, o estímulo fracionado foi mais efetivo para a atividade de CAT (figura 9B), mas sem resultar em melhora na proteção contra o dano oxidativo. De acordo com Jenkins e Goldfarb (1993) a atividade da CAT tem um papel importante quando as concentrações de  $H_2O_2$  são baixas. Adicionalmente, a GPx tem melhor capacidade antioxidante no músculo que a CAT, bem como melhor adaptação ao treinamento contínuo (Pinho et al., 2006). Não houve diferença nos níveis proteicos das principais enzimas antioxidantes. Deve-se considerar também, que as enzimas antioxidantes no músculo esquelético podem ser moduladas por padrões de atividade, como intensidade, duração e tipo de exercício, justificando a variabilidade nos efeitos antioxidantes (Powers & Jackson, 2008).

Estresse oxidativo induzido pelo envelhecimento causa dano celular, uma parte importante dos quais é a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados e resíduos de aminoácidos de proteínas, que formam produtos finais, como o malonaldeído (MDA) e grupos carbonilas (Chevion et al., 2000). Somente o treinamento contínuo reduziu os níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas (figura 10 A,B). Estes resultados estão de acordo com conclusões reportadas por Shing e colaboradores (2007), que demonstraram que sessões contínuas de exercício melhoram a capacidade antioxidante em repouso, reduzem o aumento nas concentrações de MDA e conteúdo de carbonilas em células envelhecidas (Simar et al., 2012). Tem sido também reportado que quanto menor a experiência com o treinamento, maior nível de

estresse é obtido (Powers & Hamilton, 1999), então sessões com menor duração ao longo do dia mostrou menor adaptação redox que sessões contínuas. Ademais, embora não alterados por ambos exercícios (figura 10C), os grupos SH de resíduos de cisteína, são alvos potenciais para modificações redox de proteínas (Grant et al., 1999; Fabisiak et al., 2000). Alteração no estado redox de grupos SH de dois resíduos de cisteína vizinhos podem levar a formação ou quebra de pontes disulfeto. Esta modificação redox das pontes disulfeto afeta a estrutura e função de proteínas, incluindo canais, bombas e translocadores de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fabisiak et al., 2000; Hertelendi et al., 2008).

O NRF2 é um regulador positivo da resposta antioxidante celular, responsável por regular genes relacionados com enzimas antioxidantes, como aquele envolvidos na síntese de glutatona e outros (Wild et al., 1999). Seus níveis parecem reduzir com a idade, levando a desregulação das respostas oxidativas (Tomobe et al., 2011). Sirtuína tipo 1 (SIRT1) também pode influenciar no processo de envelhecimento, incluindo transtornos metabólicos como diabetes ou doenças neurodegenerativas. SIRT1 é alvo de um grande número de fatores de transcrição que estão envolvidos na biogênese mitocondrial e diferenciação do músculo esquelético. Os efeitos do exercício sobre NRF2 e SIRT1 parecem ser complexos (Radak et al., 2008). A atividade de SIRT1 é dependente de NAD, então se esperava que SIRT1 estivesse alterada em condições de esforço físico. Também parece provável que a taxa de NAD/NADH pode ser suscetível às alterações sob condições mais exaustivas de atividade contrátil, no qual o estado redox do músculo é alterado para uma taxa metabólica elevada (Suwa et al., 2008). Mas, nenhum dos modelos propostos induziu aumento nos níveis proteicos de NRF2 e SIRT1 (figura 11A,B). O não aumento desses níveis em animais velhos, apesar do aumento no dano oxidativo associado ao treinamento fracionado e a redução em pró oxidantes em ambos os grupos, sugere que a produção de superóxido não foi capaz de ativar em tempo suficiente estes fatores de transcrição, uma vez que NRF2 e SIRT1 são “sensíveis ao estresse oxidativo” (Itoh et al., 1999). Adicionalmente, é possível que o músculo envelhecido necessite de um exercício prolongado com intensidade específica (mais que seis semanas) para estabilizar a sinalização antioxidante para estes fatores de transcrição (Gounder et al., 2012). Isto pode explicar, em parte, a manutenção nos níveis proteicos das enzimas antioxidantes nos

diferentes grupos, uma vez a ativação de NRF2 (Hybertson et al., 2012) e SIRT1 (Alcendor et al., 2007) modulam a expressão de centenas de genes que afetam o estresse oxidativo ( como SOD, CAT e GPX).

Os principais mecanismos bioquímicos que determinam a força e as taxas de contração e relaxamento muscular são as proteínas que transportam o  $\text{Ca}^{2+}$  (Berchtold et al., 2000), responsáveis pelo processo de contração e relaxamento. Diversas proteínas estão envolvidas na manutenção da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  e da função contrátil, entre essas encontram-se, a SERCA, o RYR e o NCX, que são responsáveis pelo equilíbrio entre captação, liberação e extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo sarcolema, respectivamente (Bers, 2002; Mace et al., 2003). A captação do  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA é regulada por uma proteína fosforilada, a PLB, que em sua forma desfosforilada inibe a atividade de SERCA. Uma falha em proteínas envolvidas no transporte intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  contribui para a perda de função muscular associada à idade (Weisleder et al., 2006). Os resultados mostraram altos níveis de RYR e baixos níveis de PLB após estímulo contínuo, enquanto os níveis de NCX foram maiores após estímulo fracionado. O aumento na densidade do RYR (figura 11C), como observado após nosso treinamento contínuo, tem sido correlacionado com aumento da velocidade de encurtamento e força em músculos isolados (Antilla et al., 2008; James et al., 2011). A redução nos níveis proteicos de PLB (figura 11D) após treinamento contínuo pode contribuir para este cenário. Durante o exercício, a atividade do nervo simpático é aumentada levando a ativação da proteína cinase A (PKA) e fosforilação da PLB no sítio Ser16 (Sayadi & Feig, 2013). A PLB constitutivamente inibe a SERCA na presença de níveis submáximos de  $\text{Ca}^{2+}$ , mas a fosforilação de PLB substitui esta inibição (Sayadi & Feig, 2013), e então a atividade de SERCA aumenta durante o exercício. O mesmo grupo não alterou os níveis de NCX (figura 11E) e pode-se cogitar que o treinamento contínuo favorece a recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático, prevenindo sua extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo sarcolema. O aumento nos níveis de NCX (figura 11E) em repouso após treinamento fracionado sugere que frações diárias de exercício estimulam o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através do NCX, que pode contribuir para melhor atividade contrátil em músculos envelhecidos, onde o NCX provavelmente trabalha no modo reverso, transportando  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro do sarcoplasma do músculo esquelético (Ferreira et al., 2010)

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que as proteínas que translocam o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular podem ser moduladas pelo treinamento com diferentes estímulos (contínuo ou fracionado), e a atenuação do estresse oxidativo pelo treinamento contínuo e moderado pode ter um papel regulatório importante no mecanismo de contração muscular de ratos velhos.

### 5.3 Considerações finais

O presente estudo demonstrou alterações nos parâmetros metabólicos e oxidativos em ratos velhos submetidos a uma única sessão de exercício com carga de 60% do  $\text{VO}_{2\text{max}}$  (experimento I). Já está estabelecido que músculos envelhecidos são mais suscetíveis às ERO do que músculos de animais jovens (Carmeli et al., 2002; Haak et al., 2009). O exercício agudo aumenta a geração de ERO e conseqüentemente causa estresse oxidativo (Pinho et al., 2006), ao mesmo tempo, o sistema de defesa antioxidante de músculos envelhecidos se adapta com menor eficiência aos estímulos de ERO. Contudo, diferentes modelos e intensidades de exercício provocam diferentes respostas nos níveis de estresse oxidativo, e os mecanismos de proteção podem ser diferenciados. Este estudo demonstrou que a intensidade de corrida aplicada foi suficiente para induzir danos oxidativos em animais jovens e velhos, os marcadores metabólicos (envolvidos com a capacidade de realizar o exercício) sofreram maior alteração nos ratos velhos, devido à demanda metabólica exigida durante o exercício. Portanto, esta intensidade foi suficiente para induzir esforço físico e nível de estresse oxidativo moderado para os animais velhos.

A partir desta informação, na segunda parte deste trabalho (experimento II) utilizou-se a intensidade de 60% do  $\text{VO}_{2\text{max}}$  em corridas contínuas e fracionadas, com o propósito de induzir adaptações redox musculares capazes de interferir nos mecanismos contráteis de ratos velhos. Foi demonstrado que o treinamento contínuo ou fracionado modula diferentemente as proteínas que translocam o  $\text{Ca}^{2+}$  intramuscular, e que somente o treinamento contínuo e moderado atenuou o estresse oxidativo, podendo ter um papel regulatório nos mecanismos envolvidos na contração muscular induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . O estresse oxidativo e a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  estão intimamente relacionados e podem afetar o processo de envelhecimento muscular

(Capel et al., 2005). O  $\text{Ca}^{2+}$  entra na célula através de vários canais, bombas e translocadores, contudo, sob condições de estresse, como o estresse oxidativo, as proteínas que transportam o  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser inibidas ou mesmo danificadas. Parece que estas proteínas podem ser inibidas por oxidação dos grupos SH dos seus resíduos de cisteína ou diretamente por ataque oxidante durante o envelhecimento (Matsunaga et al., 2003; Andersson et al., 2011). Em contrapartida, o exercício físico contínuo foi hábil para reduzir o dano oxidativo em ratos velhos.

Finalmente, é possível que a carga imposta aos animais (60% do  $\text{VO}_{2\text{max}}$ ) tenha gerado níveis de estresse oxidativo de grau *moderado*, pois o dano ocorrido foi semelhante em animais jovens e velhos, apesar da maior demanda energética para os velhos (experimento I). E posteriormente (no experimento II), esta exposição contínua (6 semanas) aos níveis de estresse oxidativo *moderado*, possivelmente desencadeou um *efeito hormético* no músculo esquelético dos animais velhos, promovendo maior resistência tecidual e preservação da célula. Com a observação dos dados analisados no presente estudo, pode-se concluir que diferentes programas de exercício com a mesma intensidade provocam respostas, em partes distintas, que por sua vez podem afetar a atividade contrátil em músculos de ratos velhos. Todavia, são necessários estudos mais profundos sobre o real efeito hormético induzido pelo exercício, uma vez que este efeito é dependente das especificidades do treinamento físico (intensidade, duração e tipo de exercício).

No presente estudo, tomamos cuidado especial quanto à prescrição do protocolo de treinamento. Entretanto observamos algumas limitações quanto ao protocolo de treinamento contínuo e fracionado com cargas constantes durante as seis semanas. Sendo assim, este estudo serve como base inicial para que novos estudos sejam realizados com programas de treinamento com carga incremental e teste de capacidade aeróbia, além disso, comparando os dois modelos de treinamento com intensidades distintas.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados reportados neste experimento demonstraram que o aumento nos marcadores de estresse oxidativo no gastrocnêmio ocorre em ambas às idades, e isso pode estar relacionado à intensidade do exercício. Contudo, os marcadores metabólicos oxidativos mostraram maior susceptibilidade à intensidade do exercício em músculos envelhecidos. Ademais, os resultados do presente estudo sugerem que as proteínas que translocam o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular podem ser moduladas pelo treinamento com diferentes estímulos (contínuo ou fracionado), e a atenuação do estresse oxidativo pelo treinamento contínuo e moderado pode ter um papel regulatório importante no mecanismo de contração muscular de ratos velhos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol.* 1984; 105:121–126.

Aksenov MY, and Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; 302:141–145.

Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res.* 2007; 100(10):1512-21.

Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, Meli AC, Umanskaya A, Xie W, Shiomi T, Zalk R, Lacampagne A, Marks AR. Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab.* 2011; 14(2):196-207.

Anttila K, Järvilehto M, Mänttari S. The swimming performance of brown trout and whitefish: the effects of exercise on Ca<sup>2+</sup> handling and

oxidative capacity of swimming muscles. *J Comp Physiol B*. 2008; 178(4):465-75.

Anzai K, Ogawa K, Ozawa T, Yamamoto H. Oxidative modification of ion channel activity of ryanodine receptor. *Antioxid Redox Signal*. 2000; 2(1): 35-40.

Apple FS, Hyde JE, Ingersoll-Stroubos AM, Theologides A. Geographic distribution of xanthine oxidase, free radical scavengers, creatine kinase, and lactate dehydrogenase enzyme systems in rat heart and skeletal muscle. *Am J Anat*. 1991; 192: 319–323.

Aracena-Parks P, Goonasekera SA, Gilman CP, Dirksen RT, Hidalgo C, Hamilton SL. Identification of cysteines involved in S-nitrosylation, S-glutathionylation, and oxidation to disulfides in ryanodine receptor type 1. *J Biol Chem*. 2006; 281:40354–40368.

Bailey DM, Mc Eneny J, Mathieu-Costello O, Henry RR, James PE, McCord JM, Pietri S, Young IS, Richardson RS. Sedentary aging

increases resting and exercise-induced intramuscular free radical formation. *J Appl Physiol*. 2010; 109: 449–456.

Balon TW, Nadler JL. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol* 1994; 77: 2519–2521.

Bejma J, & Ji LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1999; 87(1): 465–470.

Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: it's crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev*. 2000; 80(3):1215-65.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002; 415(6868):198-20.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973;134: 707–716.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem.* 1976; 72:248–254.

Brooks SV, Faulkner JA. Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice. *J Physiol.* 1988; 404: 71–82.

Cakatay U, Telci A, Kayali R, Tekeli F, Akcay T, Sivas A. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin Biochem.* 2003; 36: 51–55.

Calabrese EJ, Baldwin LA. Hormesis: the dose–response revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43: 175–197.

Capel F, Demaison L, Maskouri F, Diot A, Buffiere C, Patureau Mirand P, Mosoni L. Calcium overload increases oxidative stress in old rat gastrocnemius muscle. *J Physiol Pharmacol.* 2005; 56(3): 369-80.

Carmeli E, Coleman R, Reznick AZ. The biochemistry of aging muscle. *Exp Gerontol.* 2002; 37(4):477–489.

Cherednichenko G, Zima AV, Feng W, Schaefer S, Blatter LA, Pessah IN. NADH oxidase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum regulates calcium-induced calcium release. *Circ Res.* 2004; 94: 478–486.

Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* 2000; 33:S 99-108.

Choi SJ, Lim JY, Nibaldi EG, Phillips EM, Frontera WR, Fielding RA, Widrick JJ. Eccentric contraction-induced injury to type I, IIa, and IIa/IIx muscle fibers of elderly adults. *Age (Dordr.)*. 2012; 34: 215–226.

Daiho T, Kanazawa T. Reduction of disulfide bonds in sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by dithiothreitol causes inhibition of phosphoenzyme isomerization in catalytic cycle. This reduction requires binding of both purine nucleotide and  $\text{Ca}^{2+}$  to enzyme. *J Biol Chem.* 1994; 269(15): 11060-4.

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; 107: 1198–1205.

Dimauro I, Pearson T, Caporossi D, Jackson MJ. In vitro susceptibility of thioredoxins and glutathione to redox modification and aging-related changes in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53: 2017–2027.

Draper HH, and Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 1990; 186:421–31.

Dutka TL, Verburg E, Larkins N, Hortemo KH, Lunde PK, Sejersted OM, Lamb GD. ROS-mediated decline in maximum Ca<sup>2+</sup>-activated force in rat skeletal muscle fibers following in vitro and in vivo stimulation. *PLoS One.* 2012;7(5): e35226.

Eigel BN, Gursahani H, Hadley RW. ROS are required for rapid reactivation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in hypoxic reoxygenated guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286(3): H955-6.

Espinosa A, Leiva A, Peña M, Müller M, Debandi A, Hidalgo C, Carrasco MA, Jaimovich E. Myotube depolarization generates reactive oxygen species through NAD(P)H oxidase; ROS-elicited  $\text{Ca}^{2+}$  stimulates ERK, CREB, early genes. *J Cell Physiol.* 2006; 209: 379–388.

Fabisiak JP, Ritov VB, Kagan VE. Reversible thiol-dependent activation of ryanodine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release channel by etoposide (VP-16) phenoxyl radical. *Antioxid Redox Signal.* 2000; 2(1): 73-82.

Farias JM, Bom KF, Tromm CB, Luciano TF, Marques SO, Tuon T, Silva LA, Lira FS, Souza CT, Pinho RA. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. *Horm Metab Res* 2013; 45(3):190-6.

Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev Assoc Med Bras.* 1997;43(1):61-8.

Ferreira JC, Bacurau AV, Bueno CR Jr, Cunha TC, Tanaka LY, Jardim MA, Ramires PR, Brum PC. Aerobic exercise training improves  $\text{Ca}^{2+}$  handling and redox status of skeletal muscle in mice. *Exp Biol Med.* 2010; 235(4): 497-505.

Flohé L, and Gunzler W. Assays of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 1984; 105:114–121.

Forman HJ, Fukuto JM, Miller T, Zhang H, Rinna A, Levy S. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 477:183–195.

Fraysse B, Rouaud T, Millour M, Fontaine-Perus J, Gardahaut MF, Levitsky DO. Expression of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280 :C146 –54.

Fulle S, Protasi F, Di Tano G, Pietrangelo T, Beltramin A, Boncompagni S, Vecchiet L, Fanò G. The contribution of reactive

oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp Gerontol.* 2004; 39:17–24.

Gaitanos GC, Williams C, Boobis LH, Brooks S. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *J Appl Physiol.* 1993; 75(2): 712-9.

Gejl K, Hvid LG, Frandsen U, Jensen K, Sahlin K, Ortenblad N. Muscle Glycogen Content Modifies SR Ca<sup>2+</sup> Release Rate in Elite Endurance Athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2013.

Gibala MJ, MacLean DA, Graham TE, Saltin B. Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size and estimated cycle flux in human muscle during exercise. *Am J Physiol.* 1998; 275: E235-42.

Gong MC, Arbogast S, Guo Z, Mathenia J, Su W, Reid MB. Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. *J Appl Physiol.* 2006; 100: 399–405.

Gorianovas G, Skurvydas A, Streckis V, Brazaitis M, Kamandulis S, McHugh MP. Repeated bout effect was more expressed in young adult males than in elderly males and boys. *BioMed Res Int.* 2013; 218970.

Gounder SS, Kannan S, Devadoss D, Miller CJ, Whitehead KS, Odelberg SJ, Firpo MA, Paine R 3rd, Hoidal JR, Abel ED, Rajasekaran NS. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. *PLoS One.* 2012;7(9):e45697.

Grant C, Quinn KA, Dawes IW. Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 2650–2656.

Gunduz F, Senturk UK, Kuru O, Aktekin B, Aktekin MR. The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol Res.* 2004; 53: 171–176.

Gutiérrez-Martín Y, Martín-Romero FJ, Iñesta-Vaquera FA, Gutiérrez-Merino C, Henao F. Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-

ATPase by chronic and acute exposure to peroxynitrite. *Eur J Biochem.* 2004; 271(13): 2647-57.

Haak JL, Buettner GR, Spitz DR, Kregel KC. Aging augments mitochondrial susceptibility to heat stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 296(3): R812-20.

Haehling S, Morley JE, Anker SD. An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2010; 1(2): 129-133.

Halliwell B, Gutteridge MC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: Oxford University Press; 2007. 888 p.

Hammeren J, Powers S, Lawler J, Criswell D, Martin D, Lowenthal D, Pollock M. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle oxidative and antioxidant enzyme activity in senescent rats. 1992; 13(5): 412-416.

Hatao H, Oh-ishi S, Itoh M, Leeuwenburgh C, Ohno H, Ookawara T, Kishi K, Yagy H, Nakamura H, Matsuoka T. Effects of acute exercise

on lung antioxidant enzymes in young and old rats. *Mech Ageing Dev.* 2006; 127(4): 384–390.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956; 11: 298-300.

Hernanz A, Fernández-Vivancos E, Salazar RM, Arnalich F. Homocysteine and other thiol compounds in ageing. *Biofactors.* 2000; 11(1-2): 47–49.

Hertelendi Z, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, van der Velden J, Stienen GJ, Edes I, Papp Z. Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca<sup>2+</sup> sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(7): 1175-84.

Hidalgo C, Sánchez G, Barrientos G, Aracena-Parks P. A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S<sup>-</sup>-glutathionylation. *J Biol Chem.* 2006; 8;281(36):26473-82.

Ho RC, Hirshman MF, Li Y, Cai D, Farmer JR, Aschenbach WG, Witzak CA, Shoelson SE, Goodyear LJ. Regulation of I $\kappa$ B kinase and NF $\kappa$ B in contracting adult rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 289: C794–C801.

Hollander J, Fiebig R, Gore M, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise. *Pflug Arch (Eur J. Physiol)*. 2001; 442: 426–434.

Huschenbett J, Zaidi A, Michaelis ML. Sensitivity of the synaptic membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and the expressed NCX1 isoform to reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1374(1-2): 34-46.

Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med*. 2011; 32(4-6):234-46.

Iciek M, Chwatko G, Lorenc-Koci E, Bald E, Włodek L. Plasma levels of total, free and protein bound thiols as well as sulfane sulfur in different age groups of rats. *Acta Biochim Pol.* 2004; 51(3): 815–824.

Iqbal, S Ostojic O, Hood DA. Expression of mitochondrial fission and fusion regulatory proteins in skeletal muscle during chronic use and disuse. *Muscle Nerve.* 2013; 48(6): 963-70.

Itoh K, Ishii T, Wakabayashi N, Yamamoto M. Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic Res.* 1999; 31(4):319-24.

Jackson MJ. Control of reactive oxygen species production in contracting skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15(9):2477-86.

Jackson MJ, Pye D, Palomero J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2007; 102(4): 1664–1670.

James RS, Walter I, Seebacher F. Variation in expression of calcium-handling proteins is associated with inter-individual differences in mechanical performance of rat (*Rattus norvegicus*) skeletal muscle. *J Exp Biol.* 2011; 214: 3542-8.

Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1993; 25(2):210-2.

Ji LL. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc.* 1993; 25:225–231.

Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(2): 142-52.

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N, Vina J. Acute exercise activates nuclear factor NF kappa B signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J.* 2004; 18:1499–1506.

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1067: 425-35.

Ji LL, Fu R, Mitchell EW. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: Effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol.* 1992; 73:1854–1859.

Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(9-10): 1865-79.

Kang C, Chung E, Diffie G, Ji LL. Exercise training attenuates aging-associated reduction in mitochondrial biogenesis in rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exer.* 2009; 41(5): S44.

Klandorf H, van Dyke K. Oxidative and nitrosative stresses: their role in health and disease in man and birds. In: Lushchak V. *Oxidative Stress. Molecular Mechanisms and Biological Effects.* Rijeka, Croatia; 2012.

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–R134.

Kramer HF, Goodyear LJ. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2007; 103: 388–395.

Krisman CR. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal Biochem.* 1962;4:17–23.

Lass A, Sohal BH, Weindruch R, Forster MJ, Sohal RS. Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25: 1089–1097.

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680–685.

Lavender AP, Nosaka K. Comparison between old and young men for changes in makers of muscle damage following voluntary eccentric exercise of the elbow flexors. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2006; 31: 218–225.

Lavender AP, Nosaka K. Changes in markers of muscle damage of middle-aged and young men following eccentric exercise of the elbow flexors. *J Sci Med Sport.* 2008; 11: 124–131.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1990; 186:464–478.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265–267.

Lynch GS, Faulkner JA, Brooks SV. Force deficits and breakage rates after single lengthening contractions of single fast fibers from unconditioned and conditioned muscles of young and old rats. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295: C249–C256.

Mace LC, Palmer BM, Brown DA, Jew KN, Lynch JM, Glunt JM, Parsons TA, Cheung JY, Moore RL. Influence of age and run training on cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *J Appl Physiol.* 2003; 95: 1994–2003.

Mascher H, Andersson H, Nilsson PA, Ekblom B, Blomstrand E. Changes in signalling pathways regulating protein synthesis in human muscle in the recovery period after endurance exercise. *Acta Physiol.* 2007; 191(1): 67-75.

Mascher H, Ekblom B, Rooyackers O, Blomstrand E. Enhanced rates of muscle protein synthesis and elevated mTOR signalling following endurance exercise in human subjects. *Acta Physiol.* 2011; 202(2): 175-84.

Matsunaga S, Inashima S, Yamada T, Watanabe H, Hazama T, Wada M. Oxidation of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}(2^+)$ -ATPase induced by high-intensity exercise. *Pflugers Arch.* 2003;446(3): 394-9.

McArdle A, Faulkner JA, Jackson MJ. Free radical generation by skeletal muscle of adult and old mice: effect of contractile activity. *Aging Cell*. 2006a; 5(2): 109–117.

McArdle A, Pattwell D, Vasilaki A, Griffiths RD, Jackson MJ. Contractile activity-induced oxidative stress: Cellular origin and adaptive responses. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280:C621–C627.

McArdle F, Spiers S, Aldemir H, Vasilaki A, Beaver A, Iwanejko L, McArdle A, Jackson MJ. Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice. *J Physiol*. 2004; 561:233-44.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 244(22):6049-55.

Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43: 477–503.

Nethery D, Callahan LA, Stofan D, Mattera R, DiMarco A, Supinski G. PLA2 dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Appl Physiol.* 2000; 89: 72–80.

Nikolaidis MG, Kyparos A, Spanou C, Paschalis V, Theodorou AA, Panayiotou G, Grivas GV, Zafeiridis A, Dipla K, Vrabas IS. Aging is not a barrier to muscle and redox adaptations: applying the repeated eccentric exercise model. *Exp Gerontol.* 2013; 48(8): 734–743.

Nikolaidis MG, Kyparos A, Spanou C, Paschalis V, Theodorou AA, Vrabas IS. Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues. *J Exp Biol.* 2012; 15(215): 1615-25.

Oba T, Ishikawa T, Murayama T, Ogawa Y, Yamaguchi M. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethanol act synergistically to gate ryanodine receptor/calcium release channel. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 279: 1366–1374.

O'Neill CA, Stebbins CL, Bonigut S, Halliwell B, Longhurst JC. Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J Appl Physiol.* 1996; 81: 1197–1206.

Ozbay B, Dulger H. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *Tohoku J Exp Med.* 2002; 197(2): 119–124.

Palomero J, Broome CS, Rasmussen P, Mohr M, Nielsen B, Nybo L, McArdle A, Drust B. Heat shock factor activation in human muscles following a demanding intermittent exercise protocol is attenuated with hyperthermia. *Acta Physiol.* 2008; 193:79–88.

Palomero J, Jackson MJ. Redox regulation in skeletal muscle during contractile activity and aging. *J Anim Sci.* 2010; 88(4): 1307-13.

Palomero J, Pye D, Kabayo T, Jackson MJ Effect of passive stretch on intracellular nitric oxide and superoxide activities in single skeletal muscle fibres: influence of ageing. *Free Radic Res.* 2012; 46(1):30-40.

Pattwell DM, McArdle A, Morgan JE, Patridge TA, Jackson MJ. Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 1064–1072.

Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve.* 2007; 35(4): 430-42.

Peterson CM, Johannsen DL, Ravussin E. Skeletal muscle mitochondria and aging: a review. *J Aging Res.* 2012; 194821.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, Dal-Pizzol F, Moreira JC. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int.* 2006; 30: 848-53.

Pinho RA, Silva LD, Pinho CA, Daufenbach JF, Rezin GT, da Silva LA, Streck EL, Souza CT. Alterations in muscular oxidative metabolism parameters in incremental treadmill exercise test in untrained rats. *Eur J Appl Physiol.* 2012;112(1): 387–396.

Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 328(1):85-92.

Powers SK, Hamilton K. Antioxidants and exercise. *Clin Sports Med.* 1999; 18(3):525-36.

Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008; 88(4): 1243-76.

Prochniewicz E, Lowe DA, Spakowicz DJ, Higgins L, O'Connor K, Thompson LV, Ferrington DA, Thomas DD. Functional, structural, and chemical changes in myosin associated with hydrogen peroxide treatment of skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 294(2): C613-26.

Radak Z, Bori Z, Koltai E, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Douroudos II, Terzis G, Nikolaidis MG, Chatzinikolaou A, Sovatzidis A, Kumagai S,

Naito H, Boldogh I. Age-dependent changes in 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity are modulated by adaptive responses to physical exercise in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 417–423.

Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(2):153-9.

Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol.* 1992; 73:1797–1804.

Reid MB, Khawli FA, Moody MR. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *J Appl Physiol.* 1993; 75: 1081–1087.

Russ DW, Grandy JS, Toma K, Ward CW. Ageing, but not yet senescent, rats exhibit reduced muscle quality and sarcoplasmic reticulum function. *Acta Physiol.* 2011; 201(3): 391-403.

Sachdev S, Davies KJ. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med.* 2007;44: 215-223.

Sacheck JM, Cannon JG, Hamada K, Vannier E, Blumberg JB, Roubenoff R. Age-related loss of associations between acute exercise-induced IL-6 and oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 291: E340–E349.

Sanz A, Pamplona R, Barja G. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8: 582–599.

Sayadi M, Feig M. Role of conformational sampling of Ser16 and Thr17-phosphorylated phospholamban in interactions with SERCA. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1828(2):577-85.

Scheffer DL, Silva LA, Tromm CB, Rosa GL, Silveira PC, Souza CT, Latini A, Pinho RA. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2012; 37(6):1239–1246.

Seene T, Kaasik P. Role of exercise therapy in prevention of decline in aging muscle function: glucocorticoid myopathy and unloading. *J Aging Res.* 2012; 172492.

Shing CM, Peake JM, Ahern SM, Strobel NA, Wilson G, Jenkins DG, Coombes JS. The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007; 32(4):677-85.

Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, Nair KS. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(15): 5618–5623.

Silva LA, Bom KF, Tromm CB, Rosa GL, Mariano I, Pozzi BG, Tuon T, Stresck EL, Souza CT, Pinho RA. Effect of eccentric training on mitochondrial function and oxidative stress in the skeletal muscle of rats. *Braz J Med Biol Res.* 2013; 46(1): 14-20.

Simar D, Malatesta D, Mas E, Delage M, Caillaud C. Effect of an 8-weeks aerobic training program in elderly on oxidative stress and HSP72 expression in leukocytes during antioxidant supplementation. *J Nutr Health Aging*. 2012; 16(2):155-61.

Siu PM, Pistilli EE, Always SE. Age-dependent increase in oxidative stress in gastrocnemius muscle with unloading. *J Appl Physiol*. 2008; 105: 1695–1705.

Sun J, Xu L, Eu JP, Stamler JS, Meissner G. Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem*. 2001; 276: 15625–15630.

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.

Thalacker-Mercer AE, Dell'Italia LJ, Cui X, Cross JM, Bamman MM. Differential genomic responses in old vs. young humans despite similar

levels of modest muscle damage after resistance loading. *Physiol Genomics*. 2010; 40: 141–149.

Thomas JA, Mallis RJ. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Exp Gerontol*. 2001; 36(9): 1519–1526.

Tomobe K, Shinozuka T, Kuroiwa M, Nomura Y. Age-related changes of Nrf2 and phosphorylated GSK-3 $\beta$  in a mouse model of accelerated aging (SAMP8). *Arch Gerontol Geriatr*. 2012; 54(2):e1-7.

Tromm CB, Rosa GL, Bom K, Mariano I, Pozzi B, Tuon T, Silva, LA, Pinho RA. Effect of different frequencies weekly training on parameters of oxidative stress. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum*. 2012; 14(1).

Tuon T, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Luciano T, Tromm CB, Silva LA, Quevedo J, Souza CT, Lira FS, Pinho RA. Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2012; 227: 305-12.

Vasilaki A, Mansouri A, Remmen H, Van der Meulen JH, Larkin L, Richardson AG, Rousseau AS, Margaritis I, Arnaud J, Faure H, Roussel AM. Physical activity alters antioxidant status in exercising elderly subjects. *J Nutr Biochem*. 2006; 17: 463–470.

Vasilaki A, McArdle F, Iwanejko LM, McArdle A. Adaptive responses of mouse skeletal muscle to contractile activity: the effect of age. *Mech Ageing Dev*. 2006b; 127(11): 830–839.

Viña J, Borras C, Abdelaziz KM, Garcia-Valles R, Gomez-Cabrera MC. The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19(8):779-87.

Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS. Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18(9): 1063-77.

Weisleder N, Brotto M, Komazaki S, Pan Z, Zhao X, Nosek T, Parness J, Takeshima H, Ma J. Muscle aging is associated with compromised

Ca<sup>2+</sup> spark signaling and segregated intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *J Cell Biol.* 2006; 174(5): 639-45.

Wild AC, Moinova HR, Mulcahy RT. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem.* 1999; 274(47):33627-36.

Xia R, Webb JA, Gnall LL, Cutler K, Abramson JJ. Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 285: 215–221.

Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res.* 2006; 71(2): 310-21.

Zuo L, Christofi FL, Wright VP, Bao S, Clanton TL. Lipoxygenase-dependent superoxide release in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2004; 97: 661–668.

Zoppi CC. Mecanismos moleculares sinalizadores da adaptação ao treinamento físico. *Rev Saúde Com.* 2005; 1: 60-70, 2005.

## 8 ANEXO – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### **Resolução**

*A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.*

**Protocolo:** 016/2013

**Professor Responsável:** Ricardo Aurino de Pinho

**Equipe:** Camila Baumer Tramm e Luciano Acordi da Silva.

**Título:** "Resposta do exercício agudo em diferentes intensidades e do treinamento sobre marcadores do metabolismo energético e estresse oxidativo em músculo esquelético de ratos idosos".

*Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização no total de 54 Ratos Wistar 325 a 575 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).*

*The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:*

**Protocol number:** 016/2013

**Principal Investigator:** Ricardo Aurino de Pinho

**Researchers:** Camila Baumer Tramm e Luciano Acordi da Silva.

**Project title:** "Response to exercise acute in different intensities and the training on markers of energy metabolism and oxidative stress in skeletal muscle of elderly rats."

*The project was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).*

Criciúma, 19 de março de 2013.

*Patricia Fernanda Schuck*  
 Patricia Fernanda Schuck  
 Coordenadora da CEUA