



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS
SOCIEDADE BRASILEIRA DE FISIOLOGIA - SBFis**

THIAGO MACÊDO LOPES CORREIA

**ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DOS EFEITOS DO
TREINAMENTO FÍSICO SOBRE ALTERAÇÕES
MUSCULARES DECORRENTES DA ASSOCIAÇÃO ENTRE
OBESIDADE E ENVELHECIMENTO**

Vitória da Conquista, BA
2023

THIAGO MACÊDO LOPES CORREIA

**ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DOS EFEITOS DO
TREINAMENTO FÍSICO SOBRE ALTERAÇÕES
MUSCULARES DECORRENTES DA ASSOCIAÇÃO ENTRE
OBESIDADE E ENVELHECIMENTO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Coorientadora: Prof^a Dr^a Daiana Silva Lopes
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA
2023

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

C824

Correia, Thiago Macêdo Lopes.

Estudos *in vivo e in vitro* dos efeitos do treinamento físico sobre alterações musculares decorrentes da associação entre obesidade e envelhecimento / Thiago Macêdo Lopes Correia. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2023.

154 f. ; il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão.

Coorientadora: Prof.^a Dr^a Daiana Silva Lopes

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2023.

1. Exercício físico. 2. Envelhecimento. 3. Obesidade. 4. Sarcopenia. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Gusmão, Amélia Cristina Mendes de Magalhães. III. Lopes, Daiana Silva
Título.

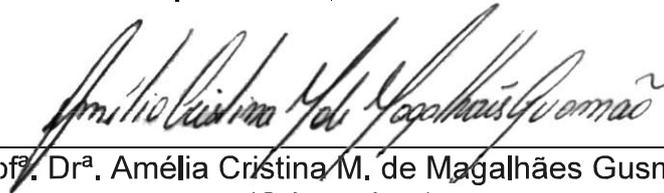
CDU: 613.72:612.67(043.2)

THIAGO MACÊDO LOPES CORREIA

**“ESTUDOS IN VIVO E VITRO DOS EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE
ALTERAÇÕES MUSCULARES DECORRENTES DA ASSOCIAÇÃO ENTRE
OBESIDADE E ENVELHECIMENTO”**

Esta tese foi julgada adequada à obtenção do grau de doutor em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia.

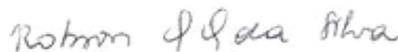
Vitória da Conquista – BA, 08 de dezembro de 2023.



Prof.ª Dr.ª Amélia Cristina M. de Magalhães Gusmão
(Orientadora)
Universidade Federal da Bahia-UFBA



Prof.ª Dr.ª Andrea Pires dos Santos
(Examinadora Externa)
Purdue University – USA



Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva (Examinador Interno PPGMCF)
Universidade Federal da Bahia-UFBA



Prof. Dr. Lucas Miranda Marques (Examinador Interno PPGMCF)
Universidade Federal da Bahia-UFBA



Prof. Dr. Leandro Martins de Freitas (Examinador Externo)
Universidade Federal da Bahia-UFBA

AGRADECIMENTOS

A Deus, ao meu único Senhor e Salvador, Jesus Cristo, por seu amor infinito e misericórdias sem medidas.

À Universidade Federal da Bahia, à Sociedade Brasileira de Fisiologia e ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de realização do doutorado.

À Purdue University, College of Veterinary Medicine pelo apoio a esta pesquisa e minha formação acadêmica.

À Universidade de São Paulo, pelo apoio a esta pesquisa e minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e de recursos para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), em especial ao programa de internacionalização CAPES PrInt, pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a realização de parte deste doutorado na modalidade sanduíche.

À toda minha família, meus avós, tios e tias, primos e primas (e meus cachorros Luke e Vitória). Em especial ao meu pai Valdemir Lopes Correia, por ser meu exemplo de retidão e temência a Deus, e por tanto amor e cuidado. À minha mãe Cristiane Macêdo Lopes, que me ensinou a ler e escrever, minha maior incentivadora, que me inspira diariamente com tanto amor, e que é meu primeiro e mais importante modelo do que é ser um Professor. Ao meu irmão Lucas Macêdo Lopes Correia, o meu melhor amigo e que está sempre comigo, não importa qual seja a circunstância. Obrigado pelo incentivo constante, amor, cuidado e por sempre acreditarem em mim mesmo quando parecesse impossível que eu mesmo o fizesse.

À Professora Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão, pela orientação desde a iniciação científica, por me mostrar os caminhos da ciência com tamanha responsabilidade, humildade, carinho, paciência e atenção. Obrigado por sempre apoiar minhas empreitadas, por ser meu socorro presente para todos os momentos. Ser seu aluno é uma honra, uma oportunidade inestimável. Trilhar minha formação pessoal e profissional sob os seus cuidados, seu empenho e amor pela pesquisa e docência solidificaram meu desejo em seguir o mesmo caminho. Obrigado por cada palavra de incentivo, cada correção, cada momento de ensinamento e pela convivência ao longo desses 10 anos.

À Professora Daiana Silva Lopes, por aceitar a coorientação e por me ensinar, desde os primeiros passos, o manejo de culturas de células. Obrigado por todos os ensinamentos, pela orientação, atenção e cuidado, e por acreditar na proposta.

Ao Professor Raildo, pela idealização do projeto, por me ensinar e acompanhar nos primeiros passos da iniciação científica, por todos os ensinamentos e rigor estatístico, e principalmente pela amizade ao longo de toda minha jornada acadêmica.

Ao Professor Rafael, pela idealização do trabalho, e contribuições para realização, discussões enriquecedoras, cuidado, amizade e atenção.

À Professora Andrea Pires dos Santos, pelos ensinamentos e pela oportunidade de realizar parte de meu doutorado na Purdue University, em seu laboratório. Obrigado por todo apoio e incentivo a minha pesquisa, pela paciência e orientação responsável, pelo rigor metodológico, mas acima de tudo pelo cuidado e atenção, que fizeram dos meus meses nos Estados Unidos a melhor experiência que já tive na vida. Agradeço também a todos que tive a oportunidade de conhecer durante meu período na Purdue, em especial à Naíla, Kerstin, Laura, Camila, Nelly, Hamideh, Jasmine, Professor Luís dos Santos, Samuel, Wellington, Karina e Katiene, os quais tenho orgulho de ter aprendido tanto e de poder chamar de meus amigos.

Ao Professor José Donato Junior e grupo de pesquisa por permitir a realização do estágio em seu laboratório na USP, em especial à Aninha, Andressa, Mayara, Willian, Gabriel, Mariana, Vanielle, Ligia e Maria, pelos ensinamentos e por me mostrarem um novo mundo de possibilidades na pesquisa, antes nem imaginado por mim. Obrigado pelos meses de convivência, pela amizade e cuidado.

Ao Professor Lucas Miranda Marques, por todas as contribuições no trabalho e na minha formação acadêmica e pessoal, pelo incentivo e atenção, pela indicação ao doutorado sanduíche, por permitir que eu colaborasse em suas pesquisas, e por contribuir com o meu fascínio pela biologia molecular.

À Professora Telma de Jesus Soares, meu exemplo de fisiologista, por todos os ensinamentos, contribuições e incentivo desde a minha iniciação científica. Muito obrigado por estar sempre presente na minha formação. Às colegas e amigas da pós-graduação que fazem parte do grupo de pesquisa da Professora Telma, em especial Fernanda, Beatriz, Marina, Gabi e Suzy, pela amizade e companheirismo.

Ao Professor Robson e grupo de pesquisa, pelas contribuições para realização deste trabalho, ensinamentos e atenção ao longo desses anos que estive na UFBA.

À Professora Danila, pelas palavras de incentivo e por me receber várias vezes para conversar os assuntos mais diversos. Sua amizade é muito importante para mim, meu cara.

À Professora Samira, pelo apoio, incentivo e amizade. Pelos conselhos e presença, e por ser um exemplo de determinação. Você é incrível, e eu me espelho muito em você.

À Professora Lilianny, por todo apoio e incentivo ao longo desses anos de doutorado. Por abrir as portas do seu grupo de pesquisa para que eu colaborasse, e pelas inúmeras contribuições a este trabalho e minha formação acadêmica e pessoal. Ao grupo de pesquisa da Professora Lilianny, em especial a Aline, Érika, Fernanda, Carol e Lara.

Aos professores e professoras que contribuíram de sobremaneira para realização desse trabalho e minha formação acadêmica e pessoal, em especial aos Professores(as) Robson, Regiane, Fabrício, Raphael, Julita, Gilvanéia, Guilherme, Silvana, Patrícia e Cláudia.

Aos funcionários da Universidade Federal da Bahia, em especial à Lina pela atenção e cuidado no manejo de diferentes demandas na secretaria da pós-graduação, e a Janeide, Lucimara, Carla, Robson, Cláudio, Sérgio e Flávio pela presteza, ajuda e amizade sempre presente nos laboratórios. Muito obrigado pela paciência e ensinamentos ao longo desses anos.

Ao Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Fisiologia (BqFis) coordenado pela Professora Amélia e constituído por Luciano, Grazielle, Amanda, Maiara, Júlia, Regiane, Larissa, André, Pedro, Samuel, Douglas, Alice, Bianca, Ingra, Karine, Laura, Suzana, Everton e Taylan. Em especial, agradeço aos alunos de iniciação científica que durante meu tempo como aluno de doutorado tive a oportunidade de atuar como tutor em seus processos de aprendizagem na condução dos planos de trabalho. Também aos amigos do grupo de pesquisa de quando eu ainda era aluno de iniciação científica, Everaldo, Mirlana, Deisiane, Isabel, Aline, Luís Alberto, Ingrid, Margarete, Amanda e Grazi, obrigado por tudo ao longo desse processo.

A Bruna Carolina, pela amizade, pelos ensinamentos, por sempre me lembrar em ações como um pesquisador de excelência deve se portar. Obrigado por me apresentar ao mundo das proteínas recombinantes, por vislumbrar uma ciência que de tão bonita, chega ser mágica (apesar de muitas vezes tirar nossa paz). Agradeço a Deus por ter tido a oportunidade de tê-la como colega, amiga e pela nossa convivência. Você me inspira a ser sempre melhor.

A Lorena e Talita, pelo companheirismo e amizade, por sempre estarem dispostas a me socorrer, fosse com animais de laboratório ou simplesmente em me ouvir e gastarmos tempo nos corredores e laboratórios.

A Luísa e Vinícius, por me ensinaram com paciência e cuidado a amar a experimentação em culturas celulares. Jamais esquecerei nossos dias de coleta de macrófagos primários, orando para que eles não contaminassem, cortando cascas de ovos para fazer experimentos de angiogênese, calculando diluições de amostras, contando células no microscópio, e fazendo tudo isso de novo umas 4 a 5 vezes para garantir que fizemos certo. Obrigado pela amizade e companheirismo.

A Amanda, Maiara e Júlia, pelas incontáveis risadas, pelo melhor ambiente de trabalho que um laboratório poderia ter. Pelos momentos de correria e desespero, pelas forças tarefas para finalizar experimentos, pelos encontros de tabulação de dados onde fazíamos tudo menos tabular dados. Obrigado por dividirem comigo suas alegrias, suas ansiedades, suas rotinas e suas surpresas. Me orgulho em poder dizer que tive a oportunidade de conviver com a doçura e didática de Amanda, a animação e eficiência de Maiara e a resolutividade e rigor crítico e metodológico de Júlia (com a qual também divido o neurônio de humor maluco). Vocês fizeram meus dias como estudante de doutorado 113,4% mais leves. Muito obrigado por tudo.

A Camila Talavera, amiga com quem dividi meses incríveis nos Estados Unidos durante os experimentos. Obrigado pelos ensinamentos, pelas idas e vindas do Hospital Veterinário da Purdue, pelas risadas e crises, por me ouvir, por correr por nossas vidas comigo voltando para casa a noite quando nos assustávamos por qualquer motivo (I mean, you know. Reasons), por me fazer sentir em casa quando eu estava literalmente do outro lado do mundo. Nós tínhamos que nos encontrar. Obrigado por tudo.

Aos amigos que a pós-graduação me deu, Claudinha, Nívea, Danielba, Leonardo, Luís Felipe, Tássia, Jadye, Laura, Rafaela, Deborah, Camila, Fernanda, Anne Karoline, Carol, Hellen, Nathan, Caroline, Manuela, Israel, Igor, Poliana, Mahala, Lorena, Maiara, Rafael, Manu e Sarah.

Aos amigos de longa data, que estão comigo desde que me conheço por gente, Lorena, Patrick, Annie e Carol. Obrigado pela amizade e apoio.

A Rubens Fernando de Melo, técnico do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, pela realização das marcações com tricrômio de Masson para avaliação da fibrose intersticial no músculo.

A todos os membros da banca examinadora deste trabalho, pelas contribuições e correções.

Aos animais utilizados nesta pesquisa, os quais foram tratados com ética e respeito.

Aos experimentos falhos, todos os $P > 0,05$, intercorrências e imprevistos, por sempre me lembrarem que o fazer em ciência é desafiador, inquietante, demanda tempo, dedicação e estudo, mas que também é muito gratificante.

Meu muito obrigado.

CORREIA, Thiago Macêdo Lopes. *Estudos in vivo e in vitro dos efeitos do treinamento físico sobre alterações musculares decorrentes da associação entre obesidade e envelhecimento*. 2023. Tese (Doutorado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2023.

RESUMO

A sarcopenia é um dos desfechos principais desfechos da perigosa associação entre envelhecimento e obesidade, e se trata de uma síndrome caracterizada pelo prejuízo funcional e morfológico do músculo esquelético. Dentre as repercussões da sarcopenia, destacam-se a desestabilidade, fragilidade e alterações metabólicas sistêmicas que afetam diretamente a qualidade de vida. Por outro lado, o treinamento físico mostra-se como ferramenta eficaz contra os efeitos do envelhecimento e obesidade ao contribuir para redução da adiposidade e proteger a massa muscular esquelética. No entanto, não foram encontrados estudos que avaliaram os efeitos do treinamento aeróbico quando realizado ao longo da vida ou de maneira terapêutica sobre as alterações causadas pela obesidade nos estágios iniciais do envelhecimento.

Objetivo: Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbico realizado terapêuticamente ou ao longo da vida sobre alterações histológicas, no balanço redox, inflamação, e metabolismo no músculo esquelético e ventrículo cardíaco provocadas pela associação entre envelhecimento e obesidade *in vivo* e *in vitro*.

Métodos: O experimento foi dividido em estudo piloto e estudo principal. O estudo piloto buscou identificar a idade em que as alterações musculares e de performance física se iniciam em resposta ao envelhecimento natural. Dessa forma, 41 ratos Wistar machos com 4 meses de idade foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos definidos pela idade à eutanásia. Ao longo do protocolo experimental, os animais foram pesados semanalmente, e a performance física avaliada mensalmente através do teste de corrida máximo em esteira motorizada para ratos. Após a definição da idade na qual o declínio muscular se iniciou (14 meses), foi avaliada a influência do treinamento físico sobre as alterações observadas. Para tal, 32 ratos Wistar machos com 4 meses de idade foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo sedentário (n = 16) e grupo treinado (n = 16). Ao completarem 8 meses de idade, 8 animais de cada grupo foram eutanasiados, formando os grupos jovens sedentário e treinado. Os demais animais seguiram até completarem 14 meses de idade, e constituíram os grupos envelhecidos sedentário e treinado. O treinamento foi realizado em esteira motorizada para ratos, a moderada intensidade, em dias alternados e duração de 1h por sessão. Os animais foram eutanasiados 24h após a última sessão de treinamento. Foram coletadas amostras de sangue, tecidos adiposos e músculos, que foram devidamente mensurados e armazenados em ultra freezer -80 °C, ou fixados. As amostras congeladas foram utilizadas para quantificação dos perfis inflamatório e oxidativo, e as amostras fixadas para estudos histológicos. O estudo principal constitui-se de um estudo *in vivo* e outro *in vitro*. O protocolo *in vivo* foi realizado com 32 ratos Wistar machos que foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n = 8/grupo): grupo envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapêuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Após 24h da última sessão de treinamento físico, todos os animais foram eutanasiados e em seguida foram coletados o músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco para estudos histológicos,

imuno-histoquímicos, do balanço redox, inflamação e metabolismo. O músculo gastrocnêmio foi utilizado para análise da expressão de mRNA e microRNA por qPCR. Os depósitos de tecidos adiposos abdominais foram coletados e pesados para determinação da composição corporal. Para os estudos *in vitro*, foram utilizados macrófagos primários obtidos do exsudato peritoneal de 6 camundongos BALB/c machos com 4 meses de idade, elicitados através da administração de tioglicolato (3% via IP), e mioblastos primários isolados do músculo gastrocnêmio de um rato Wistar macho com 4 meses de idade. As culturas de macrófagos e mioblastos foram expostas ao soro dos animais do estudo *in vivo* durante 24h. As culturas foram usadas para análise da viabilidade celular por MTT, dosagem de nitritos totais e peróxido de hidrogênio e análise da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória e metabolismo muscular. Todas as variáveis de interesse deste estudo foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. As comparações entre grupos do teste piloto foram feitas com o teste ANOVA para medidas repetidas (análise temporal) e ANOVA one-way, seguida pelo pós-teste de Tukey. Para as análises entre grupos jovens e envelhecidos, sedentários e treinados, foi adotado delineamento fatorial (2x2) utilizando o teste ANOVA two-way. As análises dos estudos *in vivo* e *in vitro* foram feitas através dos testes T de Student e ANOVA one-way.

Resultados: Os resultados do estudo piloto indicam que o declínio da função muscular se inicia aos 14 meses de idade, evidenciado pela redução da performance física, peso da massa magra e do músculo gastrocnêmio e capacidade antioxidante do músculo. Por outro lado, a rotina de treinamento físico até os 14 meses melhorou a composição corporal, perfil inflamatório, status redox e protegeu o músculo contra redução da área seccional das fibras. Os resultados do estudo *in vivo* evidenciaram um desfecho desfavorável em resposta à associação entre envelhecimento e obesidade induzida por dieta sobre os parâmetros musculares e cardíacos morfologia, fibrose, inflamação, estresse oxidativo e metabolismo. Além disso, foi observado no músculo gastrocnêmio o aumento da expressão do miRNA-21 e genes envolvidos na resposta pró-inflamatória e catabólica, e redução da expressão de genes envolvidos na resposta anti-inflamatória, antioxidante e anabólica. O treinamento físico, em especial o protocolo de treinamento ao longo da vida, atenuou os achados decorrentes da associação entre envelhecimento e obesidade sobre os parâmetros musculares e cardíacos, reduziu a expressão do miR-21 e aumentou a expressão do miR-486. Nos estudos *in vitro*, os macrófagos e mioblastos expostos ao soro dos animais envelhecidos e obesos apresentaram aumento do perfil pró-inflamatório e catabólico, respectivamente, ao passo que o soro dos animais treinados, especialmente aqueles que realizaram o treinamento ao longo da vida, determinou redução do perfil pró-inflamatório e catabólico das culturas celulares.

Conclusão: No modelo animal estudado, a associação entre sedentarismo, envelhecimento e obesidade induzida por dieta hiperlipídica determinou prejuízos musculares especialmente nos perfis inflamatório, oxidativo e metabólico. Em contrapartida, a prática regular de exercício físico, especialmente ao longo de toda a vida, atenuou as alterações provocadas pela associação entre envelhecimento e obesidade em todos os parâmetros estudados, *in vivo* e *in vitro*. Nossos achados reforçam a superioridade do protocolo de treinamento ao longo da vida como ferramenta eficaz contra os efeitos da idade, mesmo quando associado à hábitos alimentares não saudáveis.

Palavras-chave: Exercício físico. Envelhecimento. Obesidade. Balanço redox. Inflamação.

CORREIA, Thiago Macêdo Lopes. *In vivo and in vitro studies of the effects of physical training on muscle changes resulting from the association between obesity and aging*. 2023. Thesis (Doctorate) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2023.

ABSTRACT

Sarcopenia is one of the main outcomes of the dangerous association between aging and obesity, and is a syndrome characterized by functional and morphological impairment of skeletal muscle. Among the repercussions of sarcopenia, destabilization, fragility and systemic metabolic changes that directly affect quality of life stand out. On the other hand, physical training appears to be an effective tool against the effects of aging and obesity by contributing to reducing adiposity and protecting skeletal muscle mass. However, no studies were found that evaluated the effects of aerobic training when carried out throughout life or therapeutically on the changes caused by obesity in the early stages of aging.

Objective: To investigate the effects of aerobic physical training performed therapeutically or throughout life on histological changes, redox balance, inflammation, and metabolism in skeletal muscle and cardiac ventricle caused by the association between aging and obesity *in vivo* and *in vitro*.

Methods: The experiment was divided into a pilot study and a main study. The pilot study aimed to identify the age at which changes in muscle and physical performance begin in response to natural aging. Thus, 41 male Wistar rats aged 4 months were randomly distributed into 6 groups defined by age at eutanásia. Throughout the experimental protocol, the animals were weighed weekly, and physical performance was assessed monthly using the maximal running test on a motorized treadmill for rats. After defining the age at which muscle decline began (14 months), the influence of physical training on the changes observed was evaluated. To this end, 32 4-month-old male Wistar rats were randomly distributed into two groups: sedentary group (n = 16) and trained group (n = 16). Upon reaching 8 months of age, 8 animals from each group were euthanized, forming the young sedentary and trained groups. The remaining animals continued until they reached 14 months of age, and constituted the sedentary and trained aged groups. Training was carried out on a motorized treadmill for rats, at moderate intensity, on alternate days and lasting 1 hour per session. The animals were euthanized 24 hours after the last training session. Blood, adipose tissue and muscle samples were collected, duly measured and stored in an ultra-freezer -80 °C, or fixed. The frozen samples were used to quantify the inflammatory and oxidative profiles, and the samples were fixed for histological studies. The main study consisted of an *in vivo* and an *in vitro* study. The *in vivo* protocol was carried out with 32 male Wistar rats that were randomly distributed into four groups (n = 8/group): aged sedentary group (ESed), aging sedentary group fed a high-fat diet (HFD) (ASed+HFD), aging trained therapeutically and fed with HFD (ATT+HFD) and aging lifelong trained and fed with HFD (ALT+DHL). 24 hours after the last physical training session, all animals were euthanized and then the gastrocnemius muscle and cardiac ventricle were collected for histological, immunohistochemical, redox balance, inflammation and metabolism studies. The gastrocnemius muscle was used to analyze mRNA and microRNA expression by qPCR. Abdominal adipose tissue deposits were collected and weighed to determine body composition. For *in vitro* studies, primary macrophages obtained from the peritoneal exudate of 6 4-month-old male BALB/c mice, elicited through the

administration of thioglycolate (3%), and primary myoblasts isolated from the gastrocnemius muscle of a 4 month old male rat were used. Cultures of macrophages and myoblasts were exposed to serum from the animals from the in vivo study for 24h. The cultures were used to analyze cell viability by MTT, total nitrites and hydrogen peroxide and to analyze the expression of genes involved in the inflammatory response and muscle metabolism. All variables of interest in this study were subjected to the Shapiro-Wilk normality test. Comparisons between pilot test groups were made using the ANOVA test for repeated measures (temporal analysis) and one-way ANOVA, followed by the Tukey post-test. For analyzes between young and aged, sedentary and trained groups, a factorial design (2x2) was adopted using the two-way ANOVA test. Analyzes of in vivo and in vitro studies were performed using Student's T test and one-way ANOVA test.

Results: The results of the pilot study indicate that the decline in muscle function begins at 14 months of age, evidenced by the reduction in physical performance, lean mass and gastrocnemius muscle weight and antioxidant capacity of the muscle. On the other hand, the physical training routine up to 14 months improved body composition, inflammatory profile, redox status and protected the muscle against reduction in the cross-sectional area of the fibers. The in vivo study showed an unfavorable outcome in response to the association between aging and diet-induced obesity on muscle and cardiac parameters, morphology, fibrosis, inflammation, oxidative stress and metabolism. Furthermore, an increase in the expression of miRNA-21 and genes involved in the pro-inflammatory and catabolic response, and a reduction in the expression of genes involved in the antioxidant and anabolic response were observed in the gastrocnemius muscle. Physical training, especially the lifelong training protocol, attenuated the findings resulting from the association between aging and obesity on muscular and cardiac parameters, reduced the expression of miR-21 and increased the expression of miR-486. In in vitro studies, macrophages and myoblasts exposed to serum from aging and obese animals showed an increase in the pro-inflammatory and catabolic profile, respectively, while serum from trained animals, especially those that had undergone lifelong training, determined reduction of the pro-inflammatory and catabolic profile of cell cultures.

Conclusion: In the animal model studied, the association between sedentary lifestyle, aging and obesity induced by a high-fat diet determined muscle damage, especially in the inflammatory, oxidative and metabolic profiles. On the other hand, regular physical exercise, especially throughout life, attenuated the changes caused by the association between aging and obesity in all parameters studied, in vivo and in vitro. Our findings reinforce the importance of adopting exercise routines throughout life as an effective tool against the effects of age, especially when associated with unhealthy eating habits.

Keywords: Physical exercise. Aging. Obesity. Redox balance. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resumo dos eventos deletérios associados ao envelhecimento e obesidade sobre a estrutura e função muscular.....	6
Figura 2	Fluxograma experimental do estudo piloto para avaliação temporal da performance física dos 4 aos 20 meses de idade dos ratos Wistar machos.....	19
Figura 3	Fluxograma experimental do estudo piloto para avaliação dos efeitos do treinamento físico sobre as alterações musculares nos estágios iniciais do envelhecimento.....	20
Figura 4	Fluxograma experimental do estudo principal para avaliação dos efeitos do treinamento físico realizado terapeuticamente ou ao longo da vida sobre as alterações musculares em um modelo animal de envelhecimento e obesidade.....	21
Figura 5	Acompanhamento do peso corporal dos animais ao longo de 20 meses (n=8). A análise entre os valores de cada tempo foi feita através do teste ANOVA de medidas repetidas, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média. *Diferente dos demais tempos avaliados; #Diferente dos tempos 16, 18 e 20; †Diferente do tempo 20.....	41
Figura 6	Avaliação da performance física dos animais ao longo de 20 meses (n=8), através do teste máximo de corrida em esteira motorizada para ratos. A análise entre os valores de cada tempo foi feita através do teste ANOVA de medidas repetidas, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média. *Diferente dos demais tempos avaliados; #Diferente dos tempos 14, 16, 18 e 20.....	42
Figura 7	Peso dos depósitos de tecido adiposo subcutâneo (TASC), epididimal (TAE), retroperitoneal (TAR) e mesentérico (TAME) dos animais aos 4, 8, 12, 14, 18 e 20 meses. O tecido adiposo visceral (TAV) constitui a soma dos depósitos viscerais coletados (TAE,	43

TAR e TAME). A análise entre os valores de cada tempo para cada tecido foi feita através do teste ANOVA de medidas repetidas, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferente dos demais tempos avaliados; #Diferente do tempo 18 meses; †Diferente do tempo 20 meses.....

- Figura 8 Peso da massa magra (A) e peso médio do músculo gastrocnêmio (B) dos animais aos 4, 8, 12, 14, 18 e 20 meses. A análise entre os valores de cada tempo para cada tecido foi feita através do teste ANOVA de medidas repetidas, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferente do tempo 4 meses; #Diferente do tempo 12 meses..... 43
- Figura 9 Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (A) e proteínas carboniladas (B) no músculo gastrocnêmio dos animais aos 4, 8, 12 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos..... 44
- Figura 10 Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) catalase (B) e GPx (C) no músculo gastrocnêmio dos animais aos 4, 8, 12 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos..... 45
- Figura 11 Massa corporal (A), peso do tecido adiposo visceral – TAV (B) e peso do músculo gastrocnêmio (C) dos animais sedentários e treinados aos 8 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferença entre grupos na mesma 46

condição de sedentarismo/treinamento (8 meses vs 14 meses);
#Diferença entre grupos de mesma idade (sedentário vs treinado)..

- Figura 12 Análise histológica do músculo gastrocnêmio feita através da quantificação do número de fibras por campo (A) e área seccional da fibra - ASF (B) dos animais sedentários e treinados aos 8 e 14 meses. Fotomicrografias representativas da análise histológica feita pela coloração hematoxilina e eosina (C) obtidas com câmera acoplada em microscópio nos aumentos de 200x. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferença entre grupos na mesma condição de sedentarismo/treinamento (8 meses vs 14 meses); #Diferença entre grupos de mesma idade (sedentário vs treinado)..... 47
- Figura 13 Quantificação por ELISA das citocinas envolvidas no processo inflamatório TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) no homogenato do músculo gastrocnêmio dos animais sedentários e treinados aos 8 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferença entre grupos na mesma condição de sedentarismo/treinamento (8 meses vs 14 meses); #Diferença entre grupos de mesma idade (sedentário vs treinado)..... 48
- Figura 14 Dosagem dos marcadores de lesão oxidativa TBARS (A) e proteínas carboniladas (B) no homogenato do músculo gastrocnêmio dos animais sedentários e treinados aos 8 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferença entre grupos na mesma condição de sedentarismo/treinamento (8 meses vs 14 meses); #Diferença entre grupos de mesma idade (sedentário vs treinado)..... 49

- Figura 15 Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) catalase (B) e GPx (C) no músculo gastrocnêmio dos animais sedentários e treinados aos 8 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferença entre grupos na mesma condição de sedentarismo/treinamento (8 meses vs 14 meses); #Diferença entre grupos de mesma idade (sedentário vs treinado)..... 49
- Figura 16 Peso do tecido adiposo visceral – TAV (A) e do músculo gastrocnêmio (B) dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapêuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$)..... 50
- Figura 17 Análise histológica do músculo gastrocnêmio feita através da quantificação do número de fibras por campo (C), área seccional da fibra - ASF (D), espaço intersticial (E) e área marcada por Tricrômio de Masson (F) dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapêuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Fotomicrografias representativas da análise histológica feita pelas colorações especiais hematoxilina e eosina (A) e Tricrômio de Masson (B) obtidas com câmera acoplada em microscópio nos aumentos de 100x e 200x, respectivamente. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da 52

média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (*p<0.05). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos (p<0.05).....

Figura 18 Avaliação de marcadores inflamatórios no músculo gastrocnêmio através da análise da imunomarcação de NF-kB p65 representadas pelas fotomicrografias (200x) (A) e quantificação da área marcada por NF-kB no tecido muscular (B), Quantificação por ELISA dos níveis de TNF- α (C), IL-6 (D) e IL-10 (E) no homogenato do músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (*p<0.05). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos (p<0.05)..... 53

Figura 19 Avaliação do metabolismo muscular pela dosagem da atividade da enzima citrato sintase (A), e conteúdo de triglicérides (B) e glicogênio no músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (*p<0.05). 54

As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).....

Figura 20 Avaliação da capacidade antioxidante no músculo gastrocnêmio através da análise da imunomarcção de glutathione peroxidase (GPx-1) representadas pelas fotomicrografias (200x) (A) e quantificação da área marcada por GPx-1 no tecido muscular (B), e atividade da GPx (C), catalase (D) e superóxido dismutase (SOD) (E) no homogenato do músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student ($*p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$)..... 56

Figura 21 Quantificação dos marcadores de estresse oxidativo nitrotirosina (A e C), 8-OHdG (B e D), proteínas carboniladas (E) e TBARS (F) no músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Fotomicrografias representativas das imunomarcções para nitrotirosina (A) e 8-hidroxi-2'deoxiguanosina - 8-OHdG (B), através da técnica de imunohistoquímica obtidas com câmara acoplada em microscópio no aumento de 100x. Os resultados foram expressos como média \pm 57

desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).....

Figura 22 Quantificação por qPCR da expressão dos mRNAs que codificam as proteínas da resposta inflamatória (A), capacidade antioxidante (B) e metabolismo (C) no músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$)..... 59

Figura 23 Quantificação por qPCR da expressão dos microRNAs miRNA-486 (A) e miRNA-21 (B) no músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$). 61

Análise de predição funcional dos microRNAs miR-21 e miR-486 realizada pela plataforma online DIANA-miRPath v.4 (C).....

- Figura 24 Análise de correlações múltiplas entre os parâmetros de composição corporal, estrutura muscular e expressão dos microRNAs miR-486 e miR-21 dos grupos envelhecido sedentário (ESed) (A), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL) (B), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) (C) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL) (D). Correlações positivas estão indicadas em azul, e negativas em vermelho. Tons escuros de cada cor indicam maiores valores de r. Os valores de p foram obtidos através do teste de correlações de Spearman. As correlações significativas estão destacadas pelo quadrado de bordas mais grossas ($p < 0.05$). As análises foram feitas utilizando o pacote corrplot do R..... 62
- Figura 25 Fotomicrografias representativas da análise histológica do ventrículo esquerdo dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Corte transversal total dos ventrículos cardíacos evidenciando as paredes ventriculares (4x) (A), área seccional das fibras (200x) (B). A marcação em azul evidencia as áreas de fibrose intersticial pela coloração de Tricrômio de Masson (200x) (C). As fotos foram obtidas com câmera acoplada ao microscópio nos respectivos aumentos..... 64
- Figura 26 Avaliação de marcadores inflamatórios no ventrículo cardíaco através da imuno-marcação de NF- κ B no ventrículo cardíaco representada pelas fotomicrografias (200x) (A), e quantificação da área marcada por NF- κ B (B); Quantificação por ELISA dos níveis de TNF- α (C), IL-6 (D) e IL-10 (E) no homogenato do ventrículo cardíaco dos grupos experimentais envelhecido sedentário 65

(ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).....

Figura 27 Avaliação da capacidade antioxidante no ventrículo cardíaco através da análise da imunomarcacão de GPx-1 representadas pelas fotomicrografias (200x) (A) e quantificacão da área marcada por GPx-1 no tecido muscular (B), e atividade da GPx (C), catalase (D) e SOD (E) no homogenato do ventrículo dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$). SOD, superóxido dismutase; GPx, glutathiona peroxidase..... 67

Figura 28 Quantificacão dos marcadores de estresse oxidativo nitrotirosina (A e C), 8-OHdG (B e D), proteínas carboniladas (E) e TBARS (F) no ventrículo cardíaco dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado 68

terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Fotomicrografias representativas das imunomarcações para nitrotirosina (A) e 8-hidroxi-2'deoxiguanosina - 8-OHdG (B), através da técnica de imunohistoquímica obtidas com câmara acoplada em microscópio no aumento de 100x. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).....

Figura 29 Avaliação da função mitocondrial pela dosagem da atividade da enzima citrato sintase no ventrículo cardíaco dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapêuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$)..... 69

Figura 30 Viabilidade celular de macrófagos primários frente à exposição com os soros dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapêuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL), pelo ensaio de MTT (A). Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais 73

(B). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As análises foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos. SFB, soro fetal bovino.....

- Figura 31 Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio – H₂O₂ (A) e nitritos (B) no sobrenadante das culturas primárias dos macrófagos expostos aos soros dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As análises foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos. SFB, soro fetal bovino..... 74
- Figura 32 Quantificação por qPCR da expressão dos genes das citocinas envolvidas na resposta inflamatória MCP-1 (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-1 β (D), IL-10 (E) e TGF- β (F) dos macrófagos expostos aos soros dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média da expressão relativa considerando o controle soro fetal bovino (Fold change). As análises foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos. SFB, soro fetal bovino..... 75
- Figura 33 Quantificação por qPCR da expressão dos genes das proteínas envolvidas na proteólise MURF-1 (A) e Atrogin-1 (B) dos 76

mioblastos expostos aos soros dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As análises foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos. SFB, soro fetal bovino.....

Figura 34 Resumo dos possíveis mecanismos associados aos efeitos da associação entre envelhecimento e obesidade sobre o músculo esquelético, e modulação do treinamento aeróbico. ROS, *reactive oxygen species*; TGs, triglicerídeos. A associação entre envelhecimento e obesidade estaria relacionada a ativação de mecanismos relacionados ao aumento da proteólise a partir da convergência de diferentes vias, como a inflamação e estresse oxidativo, que resultam na redução da massa e função muscular esquelético. Por outro lado, o treinamento físico aeróbico atuou como inibidor da inflamação e estresse oxidativo, ao passo que estimulou a transcrição de genes relacionados ao aumento da síntese proteica, levando à proteção morfofuncional muscular. Imagem criada com BioRender.com..... 82

Figura 35 Efeitos do treinamento físico sobre o músculo esquelético e cardíaco de ratos Wistar envelhecidos e obesos observados no presente trabalho. Nossos achados apontam para o efeito principal do treinamento físico aeróbico, especialmente o treinamento ao longo da vida, em melhorar a capacidade mitocondrial e resposta antioxidante, ao passo que reduz o estresse oxidativo e inflamação tecidual. Como resultado, o músculo esquelético apresentou proteção contra a atrofia das fibras musculares esqueléticas e contra a fibrose intersticial do ventrículo cardíaco. Imagem criada com BioRender.com..... 93

Figura 36 Resumo dos achados nos experimentos *in vitro* com macrófagos primários. A exposição dos macrófagos ao soro dos animais treinados determinou mudança do perfil inflamatório expresso pela menor produção de marcadores oxidativos peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e nitritos, além da menor expressão gênica das citocinas de resposta pró-inflamatória, somado a regulação positiva da expressão de IL-10. Imagem criada com BioRender.com..... 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição bromatológica das dietas experimentais.....	17
Tabela 2	Protocolo de ajuste progressivo da intensidade e duração do treinamento.....	22
Tabela 3	Sequência de primers utilizados nos ensaios de qPCR.....	34
Tabela 4	Sequência de primers utilizados nos ensaios de qPCR.....	39
Tabela 5	Peso do ventrículo e parâmetros histológicos e morfométricos do ventrículo esquerdo dos grupos experimentais.....	63
Tabela 6	Resumo dos resultados obtidos no estudo principal <i>in vivo</i> estratificados pelos efeitos da dieta hiperlipídica (DHL), treinamento terapêutico (TT) e treinamento ao longo da vida (TL) sobre os parâmetros avaliados.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	Beta-Actina
ANOVA	Análise de Variância
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA Complementar
Ct	<i>Cycle Treshold</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas De Oxigênio
ESed	Envelhecido sedentário
ESed + DHL	Envelhecido, sedentário + dieta hiperlipídica
ETL + DHL	Envelhecido treinado ao longo da vida + dieta hiperlipídica
ETT + DHL	Envelhecido treinado terapeiticamente + dieta hiperlipídica
GH	Hormônio do crescimento
GPx	Glutaciona Peroxidase
GSH	Glutaciona Reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HO-1	Heme-Oxigenase 1
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos
miRNA	microRNA
MURF-1	Muscle Ring Finger-1
NADPH	Dinucleotídeo De Nicotinamida-Adenina-Fosfato
NCBI	<i>National Center For Biotechnology Information</i>
qPCR	Reação em Cadeia Da Polimerase em Tempo Real
RNA	Ácido Ribonucleico
TAE	Tecido adiposo epididimal
TAME	Tecido adiposo mesentérico
TAR	Tecido adiposo retroperitoneal
TASC	Tecido adiposo subcutâneo
TAV	Tecido adiposo visceral

TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VA	Volume De Amostra
VR	Volume De Reação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 ENVELHECIMENTO E ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS MUSCULARES.....	3
2.2 OBESIDADE E ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS MUSCULARES....	7
2.3 MicroRNAs NA OBESIDADE SARCOPÊNICA.....	8
2.4 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ESTRUTURA E FUNÇÃO MUSCULAR.....	10
3 JUSTIFICATIVA.....	14
4 OBJETIVOS.....	15
4.1 OBJETIVO GERAL.....	15
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4.2.1 Estudos <i>in vivo</i>.....	15
4.2.2 Estudos <i>in vitro</i>.....	16
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
5.1 ANIMAIS.....	17
5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – ESTUDO PILOTO.....	18
5.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – ESTUDO PRINCIPAL.....	20
5.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO.....	21
5.4.1 Aclimação e ambientação ao aparato de treinamento.....	21
5.4.2 Avaliação da capacidade aeróbica.....	22
5.4.3 Protocolo de treinamento aeróbico de moderada intensidade.....	22
5.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	23
5.6 ESTUDOS HISTOLÓGICOS.....	24
5.6.1 Determinação do número de fibras por campo e análise morfométrica do gastrocnêmio e ventrículo cardíaco.....	24
5.7 ESTUDOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS.....	25
5.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	26
5.9 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO MUSCULAR E FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	26
5.9.1 Dosagem de triglicerídeos totais.....	26

5.9.2 Dosagem de glicogênio total.....	27
5.9.3 Atividade da enzima citrato sintase.....	27
5.10 AVALIAÇÃO DO BALANÇO REDOX.....	28
5.10.1 Peroxidação lipídica.....	28
5.10.2 Proteínas carboniladas.....	29
5.10.3 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	30
5.10.4 Atividade da enzima catalase.....	30
5.10.5 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx).....	31
5.11 DOSAGEM DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	32
5.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NAS AMOSTRAS CONGELADAS.	32
5.12.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA).....	32
5.12.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) e ensaios de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	33
5.13 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MICRORNAS NAS AMOSTRAS FIXADAS.....	35
5.13.1 Extração e purificação do RNA.....	35
5.13.2 Síntese do cDNA e ensaios de qPCR para os microRNAs alvo.....	35
5.14 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	36
5.14.1 Isolamento de macrófagos primários.....	36
5.14.2 Isolamento de mioblastos primários.....	37
5.14.3 Viabilidade celular.....	37
5.14.4 Dosagem de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).....	38
5.14.5 Análise da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória e metabolismo proteico.....	39
5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 ESTUDO PILOTO – MODELO PARA AVALIAÇÃO DOS EVENTOS INICIAIS DO ENVELHECIMENTO SOBRE A FUNÇÃO MUSCULAR.....	41
6.1.1 Evolução do peso corporal.....	41
6.1.2 Performance física.....	42
6.1.3 Composição corporal.....	42
6.1.4 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante enzimática.....	44

6.2 ESTUDO PILOTO – EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS ESTRUTURAIS, REDOX E INFLAMATÓRIOS MUSCULARES EM ANIMAIS ENVELHECIDOS ATÉ OS 14 MESES.....	45
6.2.1 Composição corporal.....	45
6.2.2 Análise histológica muscular.....	46
6.2.3 Perfil inflamatório muscular.....	47
6.2.4 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante enzimática.....	48
6.3 ESTUDO PRINCIPAL <i>IN VIVO</i> - EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO TERAPÊUTICO OU AO LONGO DA VIDA SOBRE ALTERAÇÕES MUSCULARES NOS ESTÁGIOS INICIAIS DO ENVELHECIMENTO ASSOCIADO À OBESIDADE.....	50
6.3.1 Composição corporal.....	50
6.3.2 Análise histológica muscular.....	51
6.3.3 Perfil inflamatório muscular.....	51
6.3.4 Metabolismo energético muscular.....	54
6.3.5 Capacidade antioxidante enzimática muscular.....	55
6.3.6 Marcadores de estresse oxidativo tecidual.....	55
6.3.7 Expressão gênica de mRNAs envolvidos no metabolismo muscular	58
6.3.8 Expressão de microRNAs envolvidos no metabolismo muscular.....	60
6.3.9 Análise de correlações múltiplas entre os parâmetros de composição corporal, estrutura muscular e expressão de microRNAs.....	60
6.4 ESTUDO PRINCIPAL <i>IN VIVO</i> - EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO TERAPÊUTICO OU AO LONGO DA VIDA SOBRE ALTERAÇÕES NO VENTRÍCULO CARDÍACO NOS ESTÁGIOS INICIAIS DO ENVELHECIMENTO ASSOCIADO À OBESIDADE.....	63
6.4.1 Análise histológica do ventrículo cardíaco.....	63
6.4.2 Perfil inflamatório no ventrículo cardíaco.....	64
6.4.3 Capacidade antioxidante enzimática no ventrículo cardíaco.....	66
6.4.4 Marcadores de estresse oxidativo no ventrículo cardíaco.....	66
6.4.5 Função mitocondrial no ventrículo cardíaco.....	69
6.4.6 Resumo dos achados do estudo principal in vivo.....	70
6.5 ESTUDO PRINCIPAL <i>IN VITRO</i> – ANÁLISE DOS EFEITOS SISTÊMICOS DO TREINAMENTO FÍSICO, ENVELHECIMENTO E OBESIDADE -	73

EXPOSIÇÃO DE CULTURAS CELULARES DE MACRÓFAGOS E MIOBLASTOS AO SORO DOS GRUPOS DO ESTUDO <i>IN VIVO</i>	
6.5.1 Avaliação da viabilidade celular frente a exposição com os soros.....	73
6.5.2 Produção de H₂O₂ e nitritos pelos macrófagos primários.....	74
6.5.3 Expressão de genes envolvidos na inflamação.....	74
6.5.4 Expressão de genes envolvidos no catabolismo proteico muscular.	76
7 DISCUSSÃO.....	77
7.1 ESTUDO PILOTO.....	77
7.2 ESTUDO PRINCIPAL.....	81
8 CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXO I.....	123

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento animal se caracteriza por um conjunto de alterações morfofuncionais que progressivamente culminam no declínio das funções fisiológicas. Tais modificações são inerentes aos organismos vivos, entretanto podem ser agravadas quando a senescência é associada a comportamentos que representam risco à saúde, como o sedentarismo, hábitos alimentares não saudáveis e o sobrepeso (LEE et al., 2015).

Dentre as alterações provocadas pelo envelhecimento, a sarcopenia se destaca ao influenciar diretamente a capacidade de locomoção, qualidade de vida e ser fator preditivo de outros agravos. A combinação entre envelhecimento e inatividade física altera o *turnover* proteico, resultando em aumento da proteólise que pode ser acompanhada da redução da síntese de proteínas, agravando os eventos fisiopatológicos da sarcopenia. Além disso, a inatividade contribui para o aumento na gordura corporal total e modificação da sua distribuição, com tendência ao acúmulo na região abdominal e visceral. (KOB et al., 2015; LEE et al., 2015).

A obesidade por si só representa risco para o surgimento e desenvolvimento de diversas doenças, e pode ser definida como uma desordem metabólica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal que acarreta prejuízos à saúde de humanos e outros animais, como doenças cardiovasculares, metabólicas e comprometimentos da estrutura e função muscular (HUTCHINSON et al., 2012; BAEKI et al., 2018; CHOOI et al., 2019). O desbalanço energético provocado por hábitos alimentares inadequados e a diminuição do nível de atividade física são os principais fatores causais do surgimento de complicações relacionadas ao aumento da adiposidade corporal e os desarranjos metabólicos que caracterizam a obesidade (BAEKI et al., 2018).

Tanto o envelhecimento quanto a obesidade exercem papel central no desenvolvimento da sarcopenia. Ambas as condições estão associadas ao estabelecimento de um estado pró-oxidativo e pró-inflamatório crônicos que contribuem para ativação de vias catabólicas, supressão do anabolismo proteico e prejuízos funcionais na musculatura esquelética de maneira geral (LEE et al., 2015). Nesse mesmo contexto, a modulação de vias fisiopatológicas pelos microRNAs tem sido objeto de estudo. Alguns microRNAs estão relacionados com a regulação do

crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético, sendo inclusive identificados como microRNAs musculares (*myomiRs*) por apresentarem alta especificidade. Os microRNAs como miR-1 e miR-486 estão envolvidos na regulação negativa das vias catabólicas regidas pelas proteínas MAFbx e MURF-1, enquanto os microRNAs miR-21 e miR-206 podem acelerar a perda muscular no envelhecimento (GAO et al., 2021).

Há evidências consistentes da efetividade do exercício na prevenção primária e secundária de diversas doenças crônicas (PEDERSEN; SALTIN, 2015; THORNTON et al., 2016; COQUEIRO et al., 2019). Sabe-se que o exercício agudo eleva a produção de espécies reativas oxidantes devido ao aumento do metabolismo energético (HYATT et al., 2016), por outro lado, a prática regular de exercícios parece estimular vias de defesa antioxidante mediante o estresse produzido, mecanismo que compensa o efeito deletério do exercício e torna as defesas antioxidantes do organismo mais eficazes frente ao desbalanço redox de um novo estresse oriundo de outras causas (NAVARRO et al., 2004; HYATT et al., 2016).

Estudos já demonstraram que a prática regular de exercício físico está associada à produção e liberação de diversas exercinas (microRNAs, mRNAs, proteínas e intermediários de vias metabólicas), substâncias produzidas e liberadas através de microvesículas pelo músculo exercitado que atuam no próprio músculo, músculos próximos e distantes, e demais órgãos. Sendo assim, esses eventos fundamentam a base endócrina dos efeitos sistêmicos promovidos pelo exercício físico. Uma vez na circulação, essas exercinas seriam capazes de modular o metabolismo e expressão gênica de diferentes órgãos (SAFDAR et al., 2016; WHITHAM et al., 2018).

Nessa perspectiva, o objeto de investigação sustenta-se na hipótese de que a melhora do estado redox, inflamatório e metabólico causada pelo treinamento pode estar diretamente relacionada à atenuação de diversos efeitos associados a comportamentos e fatores de risco, cujos processos fisiopatológicos envolvam o aumento crônico do estresse oxidativo e inflamação. Sendo assim, o presente projeto se propôs a investigar os possíveis efeitos do treinamento físico realizado ao longo da vida ou terapêuticamente sobre as alterações oxidativas, inflamatórias, metabólicas e estruturais no músculo esquelético e cardíaco induzidas pela associação entre envelhecimento e obesidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENVELHECIMENTO E ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS MUSCULARES

O envelhecimento é um processo natural, multifatorial e inerente a todos os animais. Trata-se do conjunto de consequências relacionadas à passagem do tempo, determinantes genéticos e comportamentos que culminam em profundas alterações da composição corporal (PALMER; KIRKLAND, 2016). Todos os sistemas fisiológicos são afetados em resultado a fatores agressores internos e externos que contribuem para o declínio de suas funções e menor capacidade adaptativa, aumentando a suscetibilidade e vulnerabilidade às doenças (CONSTANTINO et al., 2016; GAROFALO et al., 2017).

A perda de massa muscular esquelética é um dos processos mais difundidos, deletérios e insidiosos no envelhecimento humano que apesar de variar em magnitude, atinge todos os indivíduos levando a algum nível de atrofia muscular (CARTEE et al., 2016). Alterações na quantidade e qualidade muscular têm ambas importantes implicações para performance funcional. Nesse contexto, o prejuízo estrutural e funcional muscular é referido comumente como sarcopenia, termo utilizado pela primeira vez por Irwin H. Rosenberg (ROSENBERG, 1997).

A sarcopenia é uma síndrome relacionada a idade caracterizada pela progressiva e generalizada redução da massa e força muscular esquelética, fatores de risco para desfechos adversos como desestabilidade física, piora da qualidade de vida e até mesmo a morte (NASCIMENTO et al., 2019). A redução da facilidade de locomoção, gasto energético em repouso e atividade física diária não estruturada (não associada ao treinamento físico) contribuem para o aumento da adiposidade corporal e desenvolvimento da obesidade (HUNTER et al., 2019). É importante destacar que esse aumento da massa gorda é caracterizado por um padrão de distribuição concentrado na adiposidade visceral (HUGHES et al., 2004; PALMER; KIRKLAND, 2016), frequentemente associada ao maior risco de desenvolvimento de doenças cardiometabólicas (TCHERNOF; DESPRÉS, 2013; BASTIEN et al., 2014).

Diversos fatores causais estão envolvidos na etiologia da sarcopenia associada ao envelhecimento. Tais mecanismos envolvem a redução da síntese proteica

(DICKINSON et al., 2013), declínio da função neural (MOSOLE et al., 2014), déficits hormonais (MICHALAKIS et al., 2013), senescência das células satélites (BARAIBAR et al., 2016), estresse oxidativo (AGUILAR-ALONSO et al., 2018) e inflamação crônica (MAVROS et al., 2014).

O balanço entre a síntese e degradação de proteínas modula o chamado *turnover* proteico, o principal determinante da estrutura e massa muscular. A síntese proteica deve-se em sua maior parte à atividade das vias das proteínas kinase B (Akt) e rampamicina (mTOR), que respondem aos sinais anabólicos. No que diz respeito à degradação de proteínas, o sistema ubiquitina-proteassoma desempenha papel central como via que necessita que as proteínas alvo sejam previamente ubiquitinadas pelas E3 ubiquitina ligases. Conhecidamente, a inflamação e o estresse oxidativo interferem em ambas as vias de anabolismo e catabolismo proteico, concentrando o balanço proteico nas vias de degradação (KRÜGER et al., 2015; KRÜGER et al., 2018).

Quanto ao declínio da função neural, estudos histológicos do músculo esquelético já demonstraram que a denervação está entre os numerosos mecanismos que contribuem para a atrofia e degeneração durante a senescência (AAGAARD et al., 2010; MOSOLE et al., 2014). No envelhecimento, observa-se progressiva redução das unidades motoras funcionais fortemente relacionadas ao desequilíbrio redox, especialmente pelo aumento do estresse oxidativo nos motoneurônios e inervações compensatórias das fibras denervadas (PIASECKI et al., 2016; HUNTER et al., 2019).

Diversos hormônios apresentam impacto sobre a massa e função muscular, e dentre eles, o hormônio do crescimento (*growth hormone* - GH) tem sido um dos mais estudados, visto que os níveis de GH estão normalmente menores em indivíduos envelhecidos, e a amplitude e frequência da liberação pulsátil do GH também está significativamente reduzida (BRIOCHE et al., 2013; MICHALAKIS et al., 2013). Em estudo com ratos envelhecidos, a terapia de reposição do GH resultou em aumento da síntese proteica muscular, biogênese mitocondrial, aumento da massa magra, redução de danos oxidativos e melhora da atividade de enzimas antioxidantes no músculo esquelético, paralelamente à redução da via de proteólise e de fatores de inibição da regeneração muscular (BRIOCHE et al., 2013). Entretanto, é importante destacar que o uso da reposição hormonal do GH pode também acarretar efeitos colaterais visto, a exemplo da resistência à insulina devido seus efeito diabetogênico (KIM et al., 2017)

As células satélites são células progenitoras das fibras musculares que, em resposta a estímulos de fatores regulatórios miogênicos, se proliferam e se diferenciam. Em contrapartida, na presença de fatores inibitórios, como a miostatina, as células satélites se mantêm inativas. A senescência das células satélites, que parece ocorrer no envelhecimento, reduz a habilidade dessas células de se proliferarem, conseqüentemente reduzindo a capacidade de reparar o músculo esquelético (BARAIBAR et al., 2016). Ao mesmo tempo, células mesenquimais também senescentes contribuem para deposição de tecido fibrótico e adiposo no músculo. Os mecanismos precisos pelos quais esses eventos ocorrem ainda necessitam ser elucidados, mas evidências sugerem que o estresse redox desempenha papel central no declínio do potencial de reparo muscular (SUGIHARA et al., 2018).

Classicamente, o processo de envelhecimento é associado à progressiva redução da capacidade antioxidante dos tecidos, fator que contribui para interação das espécies reativas de oxigênio (ERO) com as diferentes moléculas celulares. A redução da enzima citocromo C oxidase e dano peroxidativo da membrana mitocondrial culminam em disfunção mitocondrial e excessiva geração de ERO, criando um ciclo vicioso de dano oxidativo. Sinergicamente, a redução da síntese de proteínas limita os mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante. O estresse redox generalizado atinge macromoléculas incluindo lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos que se acumulam e determinam alterações morfofuncionais deletérias com o passar do tempo (MAROSI et al., 2012; SALLAM; LAHER, 2016; AGUILAR-ALONSO et al., 2018).

As ERO, que compreendem todas as espécies oxidantes e radicalares, são encontradas em todos os sistemas biológicos como derivados do metabolismo do oxigênio molecular (O_2) (STORZ, 2011, MALAVIYA et al., 2014). A produção dessas espécies reativas é parte integrante do metabolismo e está presente notadamente nos processos bioenergéticos. Além disso, concentrações controladas de ERO são fundamentais para o estímulo ao crescimento e diferenciação celular, fagocitose, sinalizações intracelulares, síntese de substâncias e mecanismos de defesa na resposta inflamatória frente a presença de patógenos (HEKIMI et al., 2011; RAHAL et al., 2014; MARGARITELIS et al., 2016). Em contrapartida, o estado de estresse redox pode ser definido como o aumento relativo de ERO superior à capacidade antioxidante, e que pode culminar em alterações de vias de sinalização até danos

celulares irreversíveis (JONES, 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; BIRBEN et al., 2012).

O estresse redox e inflamação compartilham vias de sinalização. Ao danificar macromoléculas, ERO podem iniciar a inflamação, ao passo que também são produto de processos inflamatórios (DALLE; ROSSMEISLOVA; KOPPO, 2017). O envelhecimento é acompanhado por um estado de inflamação crônica que é principalmente atribuída à adiposidade. O aumento do infiltrado de células inflamatórias no tecido muscular contribui para liberação de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β , e ERO produzidas via lipoxigenase, NADPH oxidase, xantina oxidase e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). O aumento da adiposidade, comumente observada no envelhecimento associado ao sedentarismo, induz a liberação de adipocinas pró-inflamatórias, contribuindo para manutenção da inflamação (SALLAM; LAHER, 2016; DARBAND et al., 2019). Nesse sentido, citocinas como TNF- α e IL-1 β podem induzir E3 ubiquitina ligases músculo-específicas, incluindo atrogina-1 e MuRF-1, contribuindo para ativação das vias de degradação proteica, e conseqüentemente, maior atrofia muscular (TANG; WAGNER; BREEN, 2010).

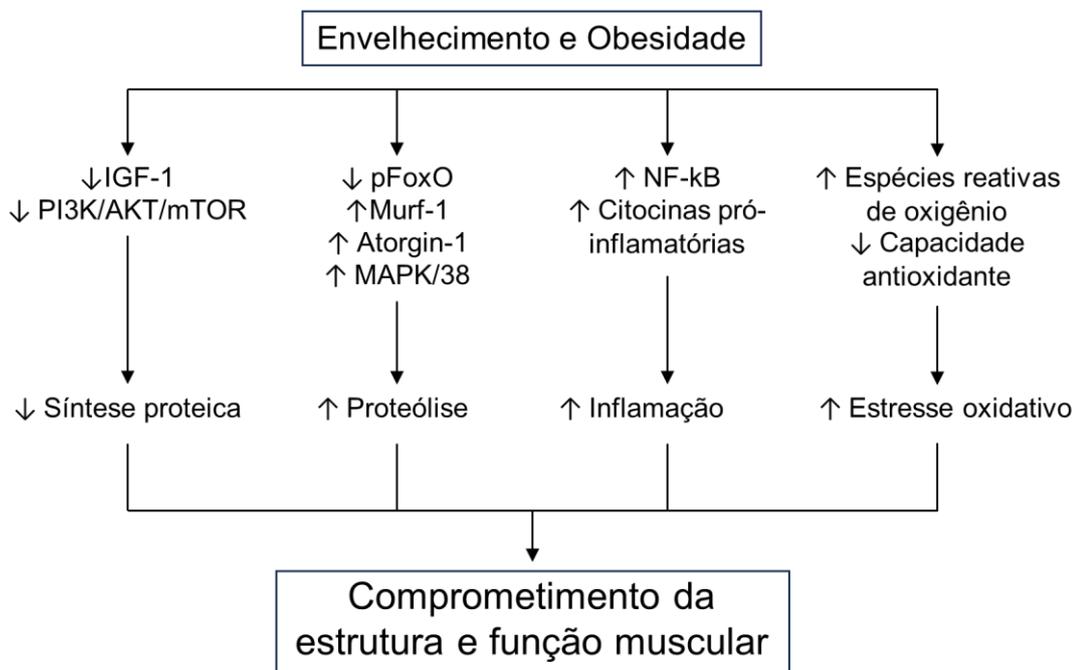


Figura 1. Resumo dos eventos deletérios associados ao envelhecimento e obesidade sobre a estrutura e função muscular.

2.2 OBESIDADE E ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS MUSCULARES

A prevalência da obesidade atinge aproximadamente um terço da população mundial pode ser classificada em sobrepeso ou obesa (MOKDAD et al., 2018). A obesidade é um distúrbio metabólico que, fisiologicamente, afeta todas as funções corporais e se caracteriza como importante ameaça à saúde pública, fortemente associada ao risco de surgimento e desenvolvimento de doenças cardiovasculares, metabólicas, cânceres e uma série de distúrbios osteomusculares (CHOOI et al., 2019); além disso, repercute negativamente sobre a saúde mental, qualidade de vida e produtividade (KIM et al., 2016; PARK et al., 2018; CHOOI et al., 2019). A principal causa da obesidade é o desbalanço energético promovido pelo maior ganho calórico em detrimento do gasto, frequentemente devido ao consumo de dietas hipercalóricas (BAEK et al., 2018).

A influência da ocidentalização e redução no nível de atividade física leva a gradativa alteração da composição corporal, de modo que o peso corporal, gordura visceral e deposição de gordura nos músculos esqueléticos aumentam progressivamente (LIU et al., 2019). O músculo esquelético é um dos principais órgãos envolvidos no metabolismo de glicose e lipídios, e achados em modelos animais já demonstraram que a utilização de uma dieta hiperlipídica leva ao comprometimento da expressão de genes envolvidos na via de captação de glicose dependente de insulina (COQUEIRO et al., 2019), redução do conteúdo e função de mitocôndrias musculares (CHEN et al., 2018; LEDUC-GAUDET et al., 2018), além de induzir à atrofia muscular (ROSENO et al., 2015; ABRIGO et al., 2016).

A exposição continuada à dieta hiperlipídica pode contribuir para significativa redução da força contrátil devido aos prejuízos da capacidade antioxidante e promoção de um estado inflamatório crônico (PINHO et al., 2017; HEO et al., 2018; ANDRICH et al., 2019). Os mecanismos de degradação e disfunção muscular na obesidade induzida por dieta hiperlipídica estão positivamente correlacionados com inúmeros fatores de risco e vias de sinalização, incluindo riscos cardiometabólicos (MA et al., 2016), pró-inflamatórios e de desbalanço redox (ABRIGO et al., 2016), autofagia (CHOI et al., 2017), além da ativação de vias catabólicas ubiquitina-proteassoma (CHO et al., 2017) e supressão do eixo anabólico IGF/PI3K/Akt/mTOR (FERRETTI et al., 2018), resultando em atrofia e apoptose de fibras musculares.

O acúmulo de lipídios intramusculares pode também induzir à disfunção mitocondrial caracterizada pelo prejuízo da capacidade na β -oxidação e aumento na formação de ERO, estabelecendo um ambiente lipotóxico que, além de causar danos diretos às macromoléculas celulares, estimula a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias que reforçam a via de estresse oxidativo e ativam vias de proteólise e apoptose (SISHI et al., 2011; RUBIO-RUIZ et al., 2019). Adicionalmente, ERO funcionam como segundo mensageiros para TNF- α no músculo esquelético, e podem ativar direta e indiretamente o fator nuclear kappa B (NF- κ B), que por sua vez atua como fator de transcrição de várias citocinas pró-inflamatórias (MARTINEZ et al., 2016; RUBIO-RUIZ et al., 2019).

A inflamação no contexto da obesidade é frequentemente caracterizada como um quadro inflamatório sistêmico de baixo grau, subclínico e persistente. Em adição às funções de estoque de reservas energéticas, o tecido adiposo desempenha ativamente funções endócrinas ao produzir moléculas que incluem citocinas pró-inflamatórias (CASTRO et al., 2017). A produção dessas adipocinas, associada à marcada presença de macrófagos de fenótipo pró-inflamatório (M1) no tecido adiposo, contribui para a manutenção da inflamação sistêmica. As citocinas produzidas e liberadas pelos adipócitos e macrófagos incluem IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , TGF- β e MCP-1, marcadores pró-inflamatórios envolvidos na predição de doenças cardiovasculares (LOWE et al., 2014; CASTRO et al., 2017) e que participam ativamente na progressão do dano estrutural e funcional muscular esquelético (ABRIGO et al., 2016).

2.3 MICRORNAS NA OBESIDADE SARCOPÊNICA

Pouco mais de 20 anos após o reconhecimento dos microRNAs como uma extensa classe de RNAs pequenos em eucariotos (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; SHANG et al., 2023), os mecanismos regulatórios exercidos pelos microRNAs permanecem como um campo fértil de investigações, onde inúmeras lacunas ainda existem. MicroRNAs são RNAs não codificantes com aproximadamente 22 nucleotídeos em comprimento, e sua via de biogênese canônica conservada entre vertebrados consiste na formação de transcritos de microRNA primários (pri-miRNA)

a partir da atividade da RNA polimerase II. Em seguida, o pri-miRNA é clivado ainda dentro do núcleo pela nuclease Drosha, e o microRNA precursor (pre-miRNA) resultante é reconhecido pelo receptor transportador nuclear Exportin 5, que exporta o pre-miRNA para o citoplasma. Já no citoplasma, o pre-miRNA é novamente clivado pela nuclease Dicer, que retira o *loop* terminal que caracteriza a forma de grampo do pre-miRNA, dando origem a um miRNA de fita dupla imaturo, que é acoplado à proteína Argonaute (AGO). Após remoção da fita complementar pela AGO, o microRNA agora maduro servirá como guia do complexo efetor, conhecido como complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*), para silenciamento de RNA mensageiros alvos (SHANG et al., 2023).

Até o momento, mais de 2600 microRNAs já foram descobertos, aos quais é atribuída a regulação de dois terços do genoma humano (KOZOMARA et al., 2019; PLOTNIKOVA et al., 2019; DOWLING et al., 2022). Nessa perspectiva, a interrupção da maquinaria que caracteriza a função regulatória dos microRNAs tem impactos severos sobre a embriogênese em todos os animais estudados. No entanto, apesar de já estar claro que coletivamente os microRNAs são essenciais para o desenvolvimento e posterior manutenção dos mecanismos fisiológicos, o entendimento das funções individuais de cada microRNA é o maior desafio (DEXHEIMER, COCHELLA, 2020), principalmente quando levado em conta que o padrão de expressão de microRNAs é notavelmente diferente nas condições de saúde e doença (LI et al., 2021).

O componente genético e epigenético fazem parte da intrincada rede multicausal que caracteriza a etiologia da obesidade. Abordagens ômicas demonstram a correlação entre a expressão de diferentes microRNAs em diferentes tecidos, e a obesidade e síndrome metabólica (JIANG et al., 2009; DUMORTIER et al., 2013; LANDRIER et al., 2019). Dentre os microRNAs modulados na obesidade, evidências sugerem que algumas famílias de microRNAs estão mais desreguladas, como é o caso, dentre outros, da família miR-21/590-5p (PALMER et al., 2014; LANDRIER et al., 2019). Em indivíduos obesos, a expressão do miR-21 está aumentada no tecido adiposo em comparação ao grupo controle (KELLER et al., 2011), e o tratamento com (LNA)-miR-21 (do inglês *locked nucleic acid*) leva à perda de peso e redução do tamanho de adipócitos em camundongos db/db (SEEGER et al., 2014).

Em uma extensa revisão sistemática recente, os autores relataram um total de 351 miRNAs identificados na obesidade, e 157 na sarcopenia. Desses, 55 miRNAs apresentaram relação com ambas as condições (DOWLING et al., 2022). Ainda no estudo de revisão, foi observado que os microRNAs identificados possuem alvos em diferentes vias relacionadas à função e estrutura muscular, como a homeostase proteica, dinâmica mitocondrial, *switching* do tipo de fibras musculares, resistência à insulina além de adiposidade e adipogênese. Ademais, evidências indicam que a senescência altera o perfil de microRNAs no músculo esquelético, e que essa mudança exerce prejuízo da qualidade e quantidade muscular (DRUMMOND et al., 2011; SANNICANDRO et al., 2019).

Alguns microRNAs parecem estar relacionados especificamente com o músculo esquelético, contribuindo tanto para o crescimento e manutenção da massa muscular (e. g. miR-1, miR-126 e miR-486) ao regularem negativamente as vias de proteólise, ou por outro lado, acelerando a perda muscular (e. g. miR-21, miR-206 e miR-628), ao interferir nos eixos anabólicos clássicos, como IGF-1 e PI3k/AKT/mTOR (GAO et al., 2021). Nesse sentido, já foi demonstrado que em ratos envelhecidos, o treinamento de longo prazo em esteira causou aumento da expressão muscular do miR-486, um microRNA normalmente reduzido no envelhecimento (MARGOLIS et al., 2017), e que contribui para ativação da via PI3K/AKT/mTOR ao ter como alvo de silenciamento a proteína PTEN, um regulador negativo da via anabólica (GAO et al., 2021).

2.4 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ESTRUTURA E FUNÇÃO MUSCULARES

A prática regular de exercícios físicos está amplamente associada a alterações morfofuncionais que culminam na melhora dos mecanismos fisiológicos relacionados à capacidade do organismo em lidar ou se adaptar a fatores estressores extrínsecos (e.g., sedentarismo, dietas hipercalóricas e tabagismo) e intrínsecos (e.g., senescência) (BOOTH et al., 2012; FRANCESCATO et al., 2018; COQUEIRO et al., 2019). Há evidências sólidas da efetividade do exercício enquanto medida preventiva em indivíduos saudáveis, bem como escolha terapêutica para atenuação, e muitas

vezes reversão, de agravos associados a condições patológicas progressas (PEDERSEN; SALTIN, 2015; THORNTON et al., 2016; COQUEIRO et al., 2019).

Estudos em humanos e modelos animais já demonstraram que o exercício atua diretamente sobre a composição corporal ao aumentar a massa muscular e reduzir a adiposidade, além da melhora na sinalização insulínica muscular, homeostase glicêmica, níveis pressóricos arteriais e nos perfis inflamatório e oxidativo de maneira geral (XU et al., 2011; KHOO et al., 2015; COQUEIRO et al., 2019).

Do ponto de vista fisiológico é notória a elevação da taxa metabólica durante a realização do treinamento, podendo aumentar em muitas vezes a demanda energética em relação aos valores de repouso, com conseqüente elevação do metabolismo oxidativo e assim, ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio especialmente em nível mitocondrial (HOLLOSZY et al., 1967; COFFEY et al., 2006). Entretanto, estudos prévios já demonstraram que o exercício físico torna mais eficiente o sistema de defesa antioxidante e melhora a capacidade oxidativa dos sistemas orgânicos, estabelecendo mecanismo compensatório entre a relação dano-reparo, de modo que a produção de espécies reativas de oxigênio resultante do exercício induz cascata de eventos moleculares envolvidos na regulação positiva da transcrição de fatores antioxidantes (OGONOVSKY et al., 2005; AZIZBEIGI et al., 2014; ABREU et al., 2015).

Estudos anteriores já demonstraram a relevante participação do exercício enquanto mecanismo protetor, tecidual e sistêmico, da manutenção do equilíbrio redox e melhora do perfil inflamatório ao reduzir os efeitos deletérios decorrentes de condições patológicas envolvidas com o aumento do estresse oxidativo e atividade inflamatória (AZIZBEIGI et al., 2014; COQUEIRO et al., 2019). Tais evidências permitem postular que as rotinas de exercício podem ser úteis em prevenir agravos à saúde associados a diferentes riscos internos e ambientais, aos quais os indivíduos estão diariamente expostos e que promovem perturbações no balanço redox e parâmetros inflamatórios.

Os mecanismos pelos quais o exercício físico, por si só, reduz a atividade inflamatória sistêmica ainda necessitam ser esclarecidos. Entretanto, estudos já demonstraram efeitos benéficos sobre a regulação da produção de citocinas moduladoras da inflamação (e.g., IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α), além da redução da adiposidade total que está diretamente envolvida com recrutamento, produção e liberação de componentes celulares e solúveis inflamatórios, comumente observados

nos depósitos de tecido adiposo branco em condições de obesidade (PINTO et al., 2012; COQUEIRO et al., 2019).

Já foi descrito na literatura que o treinamento aeróbico de intensidade moderada em esteira foi capaz de atenuar a inflamação, em modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, tanto pela supressão do infiltrado de macrófagos, como por acelerar a conversão de macrófagos M1 em M2 (KAWANISHI et al., 2010). Macrófagos M1 produzem grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios como espécies oxidantes citotóxicas e quimiocinas que intensificam a lesão inflamatória inespecífica ao estimular o recrutamento de novos macrófagos e de outros leucócitos circulantes. Já macrófagos M2 possuem funções regulatórias, relacionadas ao fim da inflamação e início do reparo tecidual (JUNG; CHOI, 2014; CAO et al., 2015; KANG et al., 2016).

Os desfechos benéficos associados à prática regular de exercício físico estão amplamente descritos na literatura, entretanto, grande parte dos eventos moleculares envolvidos ainda necessitam ser esclarecidos. A noção do músculo esquelético enquanto órgão de pronunciada função endócrina é particularmente recente, sendo assim proposta por Steensberg et al. (2001) em estudo onde a realização de exercício físico levou à liberação da citocina IL-6 pelo músculo em resposta a contração. Atualmente já se sabe que essa relação endócrina não se restringe a apenas miocinas como as citocinas IL-6, IL-10, mas também à outras substâncias (PEDERSEN et al., 2012; SAFDAR et al., 2016) como a irisina, proteína responsável, dentre outras funções, pelo *crosstalk* entre o músculo esquelético e o tecido adiposo (LIU et al., 2015).

Notadamente, grande atenção tem sido voltada para a participação dos microRNA nos efeitos musculares e sistêmicos provocados pelo exercício físico. Um único microRNA pode ter como alvo centenas de genes diferentes, e a complexidade de suas ações aumenta uma vez que podem agir sobre outros microRNA. Em conjunto, peptídeos, metabólitos, demais ácidos nucleicos e microRNA constituem as chamadas “exercinas” que são produzidas pelos músculos frente ao estímulo contrátil do exercício físico, e liberadas sistemicamente através de microvesículas carreadoras (SAFDAR et al., 2016; WHITHAM et al., 2018).

Frente ao exposto, considerando o potencial da prática regular de exercício na redução do estresse oxidativo, perfil inflamatório e melhora da estrutura e função muscular, é plausível hipotetizar que as modalidades de treinamento realizadas de

maneira preventiva e terapêutica contribuam de modo a atenuar os danos morfofuncionais causados pela associação entre sedentarismo, envelhecimento e obesidade.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores já demonstraram os efeitos isolados do envelhecimento (JOSEPH et al., 2019), da obesidade (LIU et al., 2019), e da associação de ambos (KOB et al., 2015) sobre a musculatura esquelética de roedores. Além disso, diferentes pesquisadores já observaram que o treinamento físico é capaz de atenuar os efeitos do envelhecimento (LIAO et al., 2017) e obesidade (HEO et al., 2018) sobre os mais diversos parâmetros fisiológicos. Entretanto, são menos comuns os estudos que avaliaram os efeitos preventivo e terapêutico do treinamento físico aeróbico sobre as alterações funcionais do músculo esquelético em um modelo simultâneo de envelhecimento e obesidade induzida por dieta. Dentre os achados, há evidências de que a realização do treinamento é capaz de atenuar o prejuízo funcional muscular causado pela associação entre envelhecimento e obesidade sobre o metabolismo de glicose de animais (COQUEIRO et al., 2019). No entanto, não foram encontrados estudos que elucidaram o efeito protetor do treinamento físico sobre parâmetros morfofuncionais musculares quando realizado previamente e/ou após a indução da obesidade ao longo da vida.

Diversos mecanismos moleculares parecem estar envolvidos nos eventos musculares e sistêmicos evocados pela prática de exercício físico. Um corpo crescente de evidências aponta para a atividade endócrina dos músculos exercitados, que produzem e liberam vesículas que carregam diferentes moléculas (*e.g.*, citocinas e microRNAs) mediadoras dos efeitos benéficos do exercício (SAFDAR et al., 2016; WHITHAM et al., 2018). Estudos *in vitro* já demonstraram que o tratamento de culturas celulares com o soro de indivíduos treinados é capaz de aumentar a proliferação de mioblastos (NGUYEN et al., 2014) e até mesmo reduzir a viabilidade de células tumorais (OPOKU-ACHEAMPONG et al., 2019), mas pouco se sabe quanto aos efeitos desse tratamento sobre a expressão de genes envolvidos no *turnover* proteico em cultura de células musculares.

Nesse contexto, o presente estudo contribuirá com evidências dos efeitos do treinamento físico aeróbico quando realizado terapêuticamente ou ao longo da vida sobre a estrutura e função dos músculos esquelético e cardíaco em um modelo animal de envelhecimento e obesidade, além de elucidar alguns dos possíveis mecanismos moleculares em resposta ao exercício físico em estudos *in vitro*.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbico quando realizado terapeuticamente ou ao longo da vida sobre alterações na morfologia, metabolismo, balanço redox, inflamação nos músculos gastrocnêmio e ventrículo cardíaco provocadas pela associação entre envelhecimento e obesidade em ratos Wistar.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Estudos *in vivo*:

Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico quando realizado terapeuticamente ou ao longo da vida, em um modelo animal de envelhecimento e obesidade, sobre:

- A composição corporal;
- Parâmetros histológicos e morfométricos no músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco;
- O perfil inflamatório e oxidativo no músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco;
- O nível de estresse oxidativo e função mitocondrial no músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco;
- O metabolismo de lipídios e glicogênio no músculo gastrocnêmio;
- A expressão de genes associados ao balanço redox, inflamação e metabolismo proteico no músculo gastrocnêmio;
- A expressão de microRNAs envolvidos na regulação do metabolismo no músculo gastrocnêmio.

4.2.2 Estudos *in vitro*:

Avaliar os efeitos da exposição *in vitro* de macrófagos e mioblastos primários ao soro dos grupos experimentais do estudo *in vivo* sobre:

- A produção de peróxido de hidrogênio e nitritos totais em macrófagos primários;
- A expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória em macrófagos primários;
- A expressão de genes envolvidos no metabolismo proteico em mioblastos primários.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

O protocolo experimental foi dividido em estudo piloto e estudo principal, e foram utilizados um total de 78 ratos Wistar machos e 6 camundongos BALB/c machos, com 4 meses de idade, os quais foram mantidos no biotério da Universidade Federal da Bahia, *Campus* Vitória da Conquista, em ambiente com controle de luz (12 horas de luz, das 7 às 19h) e temperatura ($23 \pm 3^\circ\text{C}$). Os animais foram acomodados em três ou quatro por caixa de polipropileno e tiveram livre acesso à água e ração. A massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente por meio de balança digital (VL-3200H, Shimadzu, EUA). Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais do IMS/CAT-UFBA (protocolo: 079/2020 - Anexo I).

Ao longo do experimento os ratos Wistar foram treinados ou não, e alimentados com ração controle comercial (Presence, Brasil) ou hiperlipídica purificada à base de caseína (Pragsoluções Biociências, Brasil). As composições bromatológicas das dietas encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição bromatológica das dietas experimentais.

Conteúdo (%)	Dieta experimental	
	Dieta controle	Dieta hiperlipídica
Matéria seca	87,0	85,1
Cinzas	10,0	0,8
Proteína bruta	23,0	15,1
Extrato etéreo	4,0	30,5
Carboidratos totais	62,0	42,8
Energia metabolizável (Mcal/kg)	2,5	5,1

Como descrito no *Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols*, da Sociedade Americana de Fisiologia, ratos são amplamente utilizados em experimentos voltados ao estudo de diferentes protocolos de treinamento, e são capazes de realizar exercício em esteira e apresentam padrão consistente de

treinamento (AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY, 2006). Os protocolos de treinamento e indução à obesidade utilizados no presente projeto foram definidos segundo estudo anterior do nosso grupo de pesquisa com o mesmo modelo (COQUEIRO et al., 2019).

O planejamento estatístico/delineamento experimental para a definição do tamanho dos grupos experimentais de ratos Wistar treinados ou não considerou o caráter crônico do estudo e o risco de perda amostral e inaptidão física ao longo do protocolo de treinamento. O número de ratos Wistar necessários para o presente projeto (8 animais por grupo) foi estabelecido com base nos estudos prévios realizados com treinamento físico em esteira motorizada (CHO et al., 2017; ORGAN et al., 2018; COQUEIRO et al., 2018).

O número de camundongos BALB/c que foi utilizado nos estudos *in vitro* foi definido tendo em vista o rendimento de macrófagos isolados (0,5 a 1×10^7 células/camundongo) e a necessidade da reprodutibilidade dos experimentos e resultados. A maior parte dos estudos encontrados na literatura que lançam mão da técnica de isolamento de macrófagos peritoneais não apresenta o número total de camundongos utilizados (PAVLOU et al., 2017; MARINKOVIC et al., 2017; HERMIDA et al., 2017; RICHARD et al., 2019). Dentre os artigos foi encontrado um estudo no qual os autores descrevem que para o isolamento com tioglicolato, 5 camundongos foram utilizados (CECÍLIO et al., 2011). Sendo assim, considerando a necessidade de elevado rendimento celular tendo em vista que para cada experimento realizado são necessárias replicatas e experimentos independentes, decidiu-se por utilizar 6 camundongos BALB/c machos no total.

5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL - ESTUDO PILOTO

O estudo piloto foi conduzido com o intuito de identificar o momento em que alterações de performance física, estrutura e função muscular se iniciam em resposta ao envelhecimento natural, e os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre essas alterações. Sendo assim, inicialmente foram utilizados 41 ratos Wistar machos com idade inicial de 4 meses, que foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos

correspondentes à idade que foram acompanhados, como descrito a seguir e ilustrado na figura 2:

- Grupo 4 meses (n = 5);
- Grupo 8 meses (n = 5);
- Grupo 12 meses (n = 7);
- Grupo 14 meses (n = 8);
- Grupo 18 meses (n = 8);
- Grupo 20 meses (n = 8).

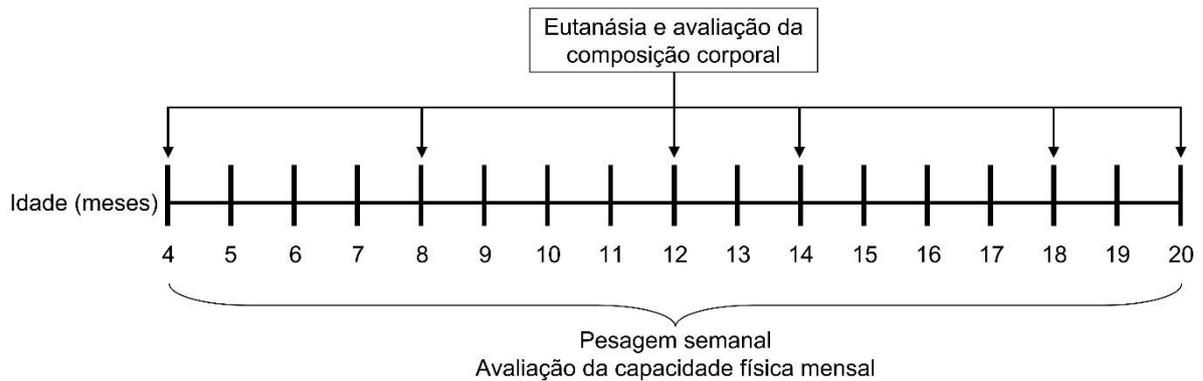


Figura 2. Fluxograma experimental do estudo piloto para avaliação temporal da performance física dos 4 aos 20 meses de idade dos ratos Wistar machos.

Para avaliação dos efeitos do treinamento físico aeróbico sobre as alterações musculares decorrentes dos estágios iniciais do envelhecimento, foram utilizados 26 ratos Wistar machos com idade inicial de 4 meses, que foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo mantido sedentário (n = 13) e grupo que iniciou o protocolo de treinamento aeróbico (n = 13). Ao completarem 8 meses de idade, 5 animais de cada grupo foram eutanasiados formando os grupos jovens, sedentário e treinado. Os demais animais seguiram no experimento até completarem 14 meses de idade, e constituíram os grupos envelhecidos sedentário e treinado. Assim, a primeira parte do estudo contará com 4 grupos experimentais, como especificado a seguir e ilustrado na figura 3:

- Grupo jovem sedentário (n = 5);
- Grupo jovem treinado (4 meses de treinamento) (n = 5);
- Grupo envelhecido sedentário (n = 8);
- Grupo envelhecido treinado (10 meses de treinamento) (n = 8).

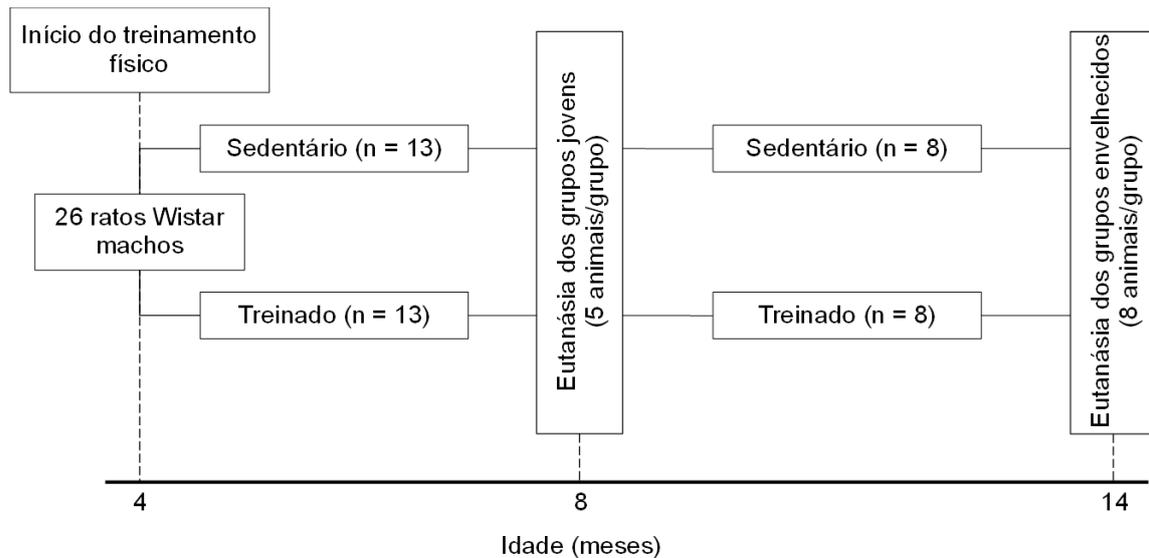


Figura 3. Fluxograma experimental do estudo piloto para avaliação dos efeitos do treinamento físico sobre as alterações musculares nos estágios iniciais do envelhecimento.

5.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL - ESTUDO PRINCIPAL

O estudo principal foi dividido em duas partes, estudo *in vivo* e estudo *in vitro*. Sendo assim, para o estudo *in vivo*, 32 ratos Wistar machos com 4 meses de idade foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo mantido sedentário (n = 24) e grupo que iniciou o protocolo treinamento físico ao longo da vida (*i. e.* 14 meses de treinamento) (n = 8). Aos 9 meses de idade, os animais sedentários foram subdivididos em dois novos grupos: grupo mantido na dieta controle (n = 8), e grupo que passou a receber a dieta hiperlipídica (*i. e.* 5 meses de dieta hiperlipídica) (n = 16). Nessa mesma idade, os animais treinados também passaram a receber a dieta hiperlipídica. Ao completarem 12 meses de idade, os animais sedentários submetidos à dieta hiperlipídica foram subdivididos em dois grupos: grupo sedentário (n = 8), e grupo que iniciou o protocolo de treinamento terapêutico (*i. e.* 2 meses de treinamento) (n = 8). Ao final dos 14 meses de protocolo experimental, o estudo *in vivo* contou com 4 grupos, como especificado a seguir e ilustrado na figura 4:

- Grupo envelhecido sedentário (ESed);
- Grupo envelhecido sedentário + dieta hiperlipídica (ESed+DHL);
- Grupo envelhecido treinado terapêuticamente + dieta hiperlipídica (ETT+DHL);
- Grupo envelhecido treinado ao longo da vida + dieta hiperlipídica (ETL+DHL).

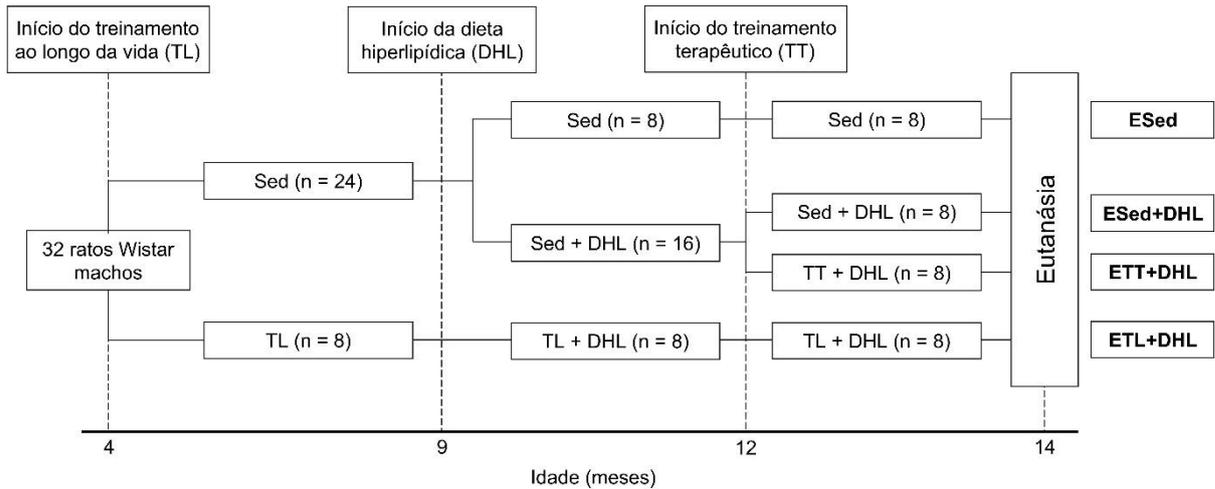


Figura 4. Fluxograma experimental do estudo para avaliação dos efeitos do treinamento físico realizado terapêuticamente ou ao longo da vida sobre as alterações musculares em um modelo animal de envelhecimento e obesidade.

5.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

5.4.1 Aclimação e ambientação ao aparato de treinamento físico

Antes de iniciar o protocolo de treinamento, todos os animais utilizados no presente estudo foram submetidos a um período de ambientação e aclimação à esteira motorizada, que consistiu em um período de sete dias de ambientação e aclimação ao aparato de treinamento. Os animais foram colocados durante dois dias consecutivos em esteira motorizada (AVS Projetos, Brasil) desligada por 5 minutos para ambientação. Durante os cinco dias consecutivos, a esteira foi ligada na velocidade de 10 m/min. Nesta velocidade, os animais correram por cinco minutos com 10% de inclinação. Ao final dos sete dias, os animais que não apresentaram um padrão consistente de corrida (corrida contínua sem interrupções e sem necessidade de estímulos constantes) foram considerados inaptos e excluídos do estudo (n=4).

5.4.2 Avaliação da capacidade aeróbica

Antes e ao longo de todo protocolo experimental, os grupos foram submetidos a testes máximos de capacidade aeróbica. A capacidade aeróbica máxima ($CA_{m\acute{a}x}$) foi avaliada por meio de um teste de corrida máximo em esteira elétrica (CUNHA et al., 2012), cuja velocidade inicial foi de 10m/min em inclinação de 10%, com incrementos de 5 m/min a cada três minutos. O teste foi realizado até a exaustão dos animais, e o critério de fadiga utilizado foi a incapacidade de manter o padrão de corrida.

Durante o período de treinamento, a capacidade aeróbica foi reavaliada a cada seis semanas nos grupos treinados para reajustar a intensidade do exercício. O teste de corrida máximo foi utilizado no estudo piloto para avaliação mensal da performance física dos animais ao longo dos 20 meses de acompanhamento para padronização do modelo de avaliação dos estágios iniciais do envelhecimento.

5.4.3 Protocolo de treinamento aeróbico de moderada intensidade

Os parâmetros de intensidade, frequência e duração para estabelecimento do protocolo de treinamento (Tabela 2) foram baseados em diretrizes internacionais para prescrição de exercício de *endurance* cardiorrespiratória (GARBER et al., 2011) e validados em estudo prévio do grupo (COQUEIRO et al., 2019), como se segue:

Modalidade: exercício aeróbico em esteira elétrica com 10% de inclinação;

Intensidade: 60% da $CA_{m\acute{a}x}$ (moderado);

Duração: 60 minutos contínuos;

Frequência: dias alternados.

Tabela 2. Protocolo de ajuste progressivo da intensidade e duração do treinamento.

Parâmetros	Dias de treinamento									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	≥ 10
% $CA_{m\acute{a}x}$	30	35	40	45	50	55	60	60	60	60
Duração (min)	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60

$CA_{m\acute{a}x}$, capacidade aeróbica máxima

Ademais, a escolha do protocolo de treinamento está em concordância com Wang et al. (2020), que demonstraram em extensa revisão sobre os efeitos de protocolos de treinamento em diferentes modelos experimentais em ratos, que protocolos de treinamento de longa duração (6 semanas ou mais), 60 minutos por dia, seriam o meio mais eficaz para o tratamento de doenças que envolvem os sistemas motor, metabólico e cardiovascular (WANG et al., 2020).

5.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Todos os animais foram eutanasiados por decapitação ao final de cada idade de acompanhamento no estudo piloto (4, 8, 12, 14, 18 e 20 meses) e após 24 horas da última sessão de treinamento no estudo principal. O sangue do tronco foi coletado em microtubos secos de 1,5mL e centrifugados (14.000 RPM a 4°C por 15 minutos) para separação do soro, que foi armazenado em ultra freezer à -70°C.

O músculo gastrocnêmio dos dois membros posteriores foram dissecados, pesados, identificados e armazenados. Após a toracotomia, o coração foi dissecado e o ventrículo cardíaco foi pesado, identificado e armazenado. Os músculos das patas direitas e parte do ventrículo cardíaco foram congelados em nitrogênio líquido e guardados em ultra freezer -70°C. Já os músculos esquerdos e a outra parte do ventrículo foram fixados para estudos histológicos e imuno-histoquímicos. Os depósitos de tecidos adiposos subcutâneo (TASC), epididimal (TAE), retroperitoneal (TAR) e mesentérico (TAME) foram coletados e pesados. A soma dos depósitos adiposos viscerais (TAE, TAR e TAME), foi utilizada para determinação do peso do tecido adiposo visceral (TAV). A massa magra dos animais de 4, 8, 12, 14, 18 e 20 meses foi quantificada pela pesagem da carcaça livre das vísceras, cabeça, gordura, patas e cauda.

5.6 ESTUDOS HISTOLÓGICOS

Logo após a coleta, as amostras de músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco foram fixados por 24h em solução Methacarn (v/v 60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial). Em seguida, a solução foi substituída por álcool etílico 70%, e mantida até o momento do processamento das amostras. Após seleção macroscópica, os cortes transversais foram desidratados (4 banhos de álcool etílico 100%, seguidos de 2 banhos de xilol PA, por 30 minutos cada, à 60°C) e parafinizados (2 banhos de parafina histológica, durante 1 hora, cada à 60°C). Após a parafinização, os tecidos foram submetidos à inclusão em parafina e cassetes histológicos. Os blocos de tecidos parafinizados foram cortados em secções de 4 µm de espessura em micrótomo, e montados em lâminas de vidro. As secções foram desparafinizadas em xilol 3 vezes, por 5 min cada, hidratadas em etanol 100, 95 e 75% por 5, 4 e 1 min, respectivamente, e coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou Tricrômio de Masson. Com o auxílio de uma câmera (Kontron Electronic KS-300, Eching, Germany) acoplada a um microscópio de luz (BX51, Olympus, Japão), 100 campos do tecido muscular (25 fotos de 4 quadrantes do músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco) foram fotografados no aumento de 200x.

5.6.1 Determinação do número de fibras por campo e análise morfométrica do gastrocnêmio e ventrículo cardíaco

A contagem do número de fibras musculares, medidas da área seccional das fibras (ASF) (total de 100 fibras por animal), área marcada por tricrômio de Masson e espessura da parede do ventrículo esquerdo (EPVE) foram feitas a partir das fotomicrografias histológicas com auxílio do programa Image J 1.44P (National Institutes of Health, EUA).

5.7 ESTUDOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Após desparafinização e hidratação das secções histológicas do músculo gastrocnêmio e ventrículo, os antígenos de interesse foram recuperados pelo tratamento com tampão citrato. Resumidamente, as secções imersas em tampão citrato (10 mM), pH 6,0, foram aquecidas em microondas na potência máxima (900 W) por 1 min. Em seguida, foram mantidas por mais 4 min sob potência média (450 W), e resfriadas em banho de gelo por 20 min. As peroxidases endógenas foram inibidas mediante a incubação das secções com azida sódica (0,1%) e H₂O₂ (0,3%) por 10 min. As lâminas foram lavadas duas vezes, 5 min cada, com PBST (PBS acrescido de Tween® 20 0,1%). Nos casos em que foram utilizados anticorpos primários policlonais, a ligação inespecífica de imunoglobulinas foi bloqueada pela incubação com solução de soro de cabra (20%) em cuba úmida por 30 min. As secções foram incubadas em cuba úmida *overnight* com os anticorpos anti-NF-κB/RelA (p65) (1:100, ab7970, Abcam, United Kingdom), anti-GPx1 (1:200, PA5-30593, Invitrogen, USA), anti-nitrotirosina (1:100, MCA4761, Bio-Rad, USA) e anti-8OHdG (1:300, bs-1278R, Bioss Antibodies, USA). Após incubação, o excesso de anticorpo primário foi removido em duas lavagens, 5 min cada, com PBST. As lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina de camundongo ou cabra, respeitando as especificidades dos anticorpos primários, por 1 h. Após duas lavagens, 5 min cada, com PBST, após a incubação por 30 min com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector laboratories, USA) o produto da reação foi detectado pela cor desenvolvida com Stable DAB (Invitrogen, reagente completo com 3,3-diaminobenzidina e H₂O₂) em aproximadamente 6 min. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 40 seg. Ao final, 30 campos aleatórios das secções foram fotografados com auxílio de uma câmera digital (Kontron Electronic KS-300, Eching, Germany) acoplada a um microscópio de luz (BX51, Olympus, Japão) sob aumento de 200x. A área de marcação foi mensurada em μm² com auxílio do programa ImageJ 1.44P (National Institutes of Health, EUA).

5.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

As concentrações de proteínas totais das amostras dos homogenatos do músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco foram determinadas pelo ensaio colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) a 595 nm conforme recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich, EUA). A albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizada para construção da curva de padrão de calibração (0 - 1,4 mg/mL).

5.9 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO MUSCULAR E FUNÇÃO MITOCONDRIAL

5.9.1 Dosagem de triglicerídeos totais

Os triglicerídeos totais foram extraídos do músculo gastrocnêmio conforme adaptações do método descrito por Folch, Less e Stanley (1957). Resumidamente, amostras congeladas do músculo (100 mg) foram pesadas e colocadas em tubos aos quais foi adicionado 1900 µL de solução clorofórmio:metanol (2:1) e homogeneizados e em seguida mantidos em agitação em vórtex por 3 minutos. Em seguida foram adicionados 400µL de metanol e os tubos foram centrifugados a 3.000rpm por 10 minutos (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para tubos falcon de peso conhecido, aos quais foram adicionados 800µL de clorofórmio e 640µL de solução de NaCl a 0,73%. A solução foi centrifugada novamente a 3.000 rpm por 10 minutos (80-2B, Daiki®, China), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado por 3 vezes com 600µL de solução Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl a 0,2%). A cada lavagem, realizou-se a centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, com descarte do sobrenadante. Após a última lavagem e descarte do sobrenadante, os tubos falcon foram levados à estufa (60°C) até a completa evaporação e, em seguida, pesados para quantificação dos lipídios extraídos. O extrato lipídico seco foi ressuscendido em 1mL de isopropanol, homogeneizado em vórtex e as concentrações triglicerídeos totais foram mensuradas por meio de kit comercial colorimétrico (Bioclin®, Brasil). As

leituras das absorvâncias foram realizadas por espectrofotometria (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil) no comprimento de onda de 492nm e as concentrações foram corrigidas pela quantidade de extrato lipídico seco presente nos tubos falcon e expressas em mg/g de tecido muscular.

5.9.2 Dosagem de glicogênio total

Para a dosagem do glicogênio no músculo gastrocnêmio, as amostras congeladas foram submetidas ao método de dosagem do glicogênio por hidrólise com ácido clorídrico (HCl) como descrito por Passonneau & Lauderdale (1974). As amostras de tecido muscular congeladas foram pesadas, digeridas com NaOH 1 mol/L à 80°C por 10 min, neutralizadas com HCl 1 mol/L, e em seguida misturadas com HCl 6 mol/L. A solução resultante foi incubada à 85°C por 2h e neutralizada com NaOH. A concentração de glicose hidrolisada foi medida através do ensaio de dosagem de glicose pela reação da glicose-6-fosfato hexoquinase do kit Glicose HK Liquiform (Labtest, Brasil), e o resultado foi expresso como mg/g de músculo (CAO et al., 2012).

5.9.3 Atividade da enzima citrato sintase

O método proposto por Spinazzi et al (2012) descreve a medida da atividade da enzima citrato sintase (CS) que é utilizada como marcador exclusivo da abundância de mitocôndrias presentes no tecido ou cultura celular de interesse. A CS é a enzima inicial do ciclo do ácido tricarboxílico, e catalisa a reação entre a acetil Coenzima A (acetil CoA) e oxalacetato para formar o ácido cítrico e CoA ligada a um grupo tiol (CoA-SH). O ensaio colorimétrico se baseia na reação entre o ácido 5',5'-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB) e CoA-SH para formar o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), de modo que o aumento progressivo da absorvância é proporcional à atividade da CS. Para realização do ensaio, o músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco foram homogeneizados na proporção de 100mg/mL em tampão Tris HCL 250 mM, pH 7,4 suplementado com sacarose (85,4 mg/mL), em seguida centrifugados a 600xg por 10

minutos à 4° C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha) e os sobrenadantes separados para o ensaio. Para cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 126 uL do mix reacional (100 uL de tampão Tris HCL 200 mM + Triton 100x 0,2%, 20 uL de DTNB 1 mM e 6 uL de Acetil CoA) e 64 uL da amostra. A reação foi iniciada ao adicionar 10 uL de oxalacetato 10 mM a cada poço, e o aumento da absorbância foi monitorado em espectrofotômetro de placa (Thermoplate, Tp-reader, EUA) a cada 10 segundos, durante 3 minutos. A atividade da CS foi calculada utilizando a fórmula descrita:

$$Atividade\ da\ CS = \frac{(\Delta A_{412}/min \times 1,000)}{[(13,6mM^{-1}cm^{-1} \times VA) \times (proteína\ total\ mg/ml)]}$$

Onde:

ΔA_{412} é a média do delta da absorbância por minuto;

13,6 é o coeficiente de extinção molar do DTNB em unidades de mM⁻¹ cm⁻¹;

VA é o volume de amostra em mL.

A atividade específica da CS foi expressa como nmol/min/mg de proteína.

5.10 AVALIAÇÃO DO BALANÇO REDOX

5.10.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica no homogenato do músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco foi estimada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances* - TBARS) (DRAPER et al., 1993). Com o auxílio do sistema TissueRuptor (Qiagen, EUA), os músculos (100 mg/mL) foram homogeneizados em tampão Tris HCl (50 mM), pH 8,0. Em seguida, o homogenato foi centrifugado (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha) a 1.600xg por 10 min a 4°C para coleta do sobrenadante. Posteriormente, o sobrenadante no volume final de 100 µL foi adicionado de 100 µL de ácido tricloroacético - TCA (10%) para precipitação das proteínas, e 800 µL de ácido tiobarbitúrico (0,53%, dissolvido em ácido acético a 20%) como reagente de cor da reação. A mistura reacional foi incubada por 1 h a 95

°C, e em seguida resfriada em gelo por 10 min a fim de cessar a reação. As amostras foram novamente centrifugadas a 1.600xg por 10 min a 4 °C, e a absorbância foi lida a 535 nm em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil). A concentração de TBARS foi calculada interpolando a absorbância das amostras à curva padrão feita com malondialdeído (0 - 50 µM), normalizada pela concentração de proteínas e expressa como µmol/mg de proteína.

5.10.2 Proteínas carboniladas

O nível de proteínas carboniladas nos homogenatos do músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco foi estimada pelo método descrito por Soglia et al. (2016) adaptado de Levine et al. (1990). Os músculos foram homogeneizados em solução gelada de KCl 0,15M (100mg/mL) e centrifugado (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha) a 1.600xg por 10 min a 4 °C para coleta do sobrenadante. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi misturado a 1 mL de TCA 10% e centrifugado a 5000xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e 400 uL de SDS a 5% foram adicionados ao pellet. A solução foi incubada em temperatura de fervura durante 10 min. As amostras foram então tratadas com DNPH 0,3% em HCl 3M, ou apenas com HCl 3M para o branco da reação específico para cada amostra. Após 30 min de incubação, 400 uL de TCA 40% foram adicionados para precipitação das proteínas, e as amostras foram centrifugadas a 5000xg por 5 min. Após a remoção do sobrenadante, o pellet foi lavado três vezes com 1 mL de etanol:acetado de etila (1:1), e cada lavagem foi seguida da centrifugação a 10.000xg por 5 min para isolamento e descarte do sobrenadante. Após a última lavagem, o pellet foi dissolvido em 1,5mL de hidrócloro de guanidina 6 M em NaH₂PO₄ 20 mM, pH 6,5. Após incubação overnight a 4°C, a absorbância das amostras foi lida nos comprimentos de onda de 280 nm e 370 nm em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil) para quantificação da concentração de proteínas e carbonilação, respectivamente. A concentração de proteínas carboniladas foi calculada pela fórmula descrita a seguir, e os resultados foram expressos como nmol/mg de proteína.

$$\text{Carbonilação} = \frac{|370| - |370|(\text{branco})}{22.000 \times [|280| - (|370| - |370|(\text{branco})) \times 0,43]} \times 10^6$$

5.10.3 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A técnica para medir a atividade da enzima SOD, baseia-se na sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol, de acordo com Marklund e Marklund (1974). Portanto, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor é a auto-oxidação do pirogalol. A SOD compete com o O_2^- formado pela auto-oxidação do pirogalol, que é responsável pela redução do MTT em cristais de formazana. No ensaio, 100 mg do músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato (50mM, pH 7,0) e em seguida, centrifugados por 10 minutos a 12.000xg a 4°C para coleta do sobrenadante. Em placa de 96 poços foram pipetados 30 μ L de amostra, 99 μ L de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0), 6 μ L de MTT(1,25mM) e 15 μ L de pirogalol (100 μ M). Para o branco foram pipetados 144 μ L de tampão fosfato (50 mM) e 6 μ L de MTT (1,25 mM), e para o padrão foram pipetados 129 μ L de tampão fosfato (pH 7, 50 mM), 6 μ L de MTT (1,25 mM) e 15 μ L de pirogalol (100 μ M). Em seguida, a placa foi incubada por 5 minutos em estufa a 37°C. Após a incubação, 150 μ L de DMSO foram adicionados a fim de parar a reação. As absorbâncias foram lidas (Thermoplate, Tp-reader, EUA) em um comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da oxidação do pirogalol.

5.10.4 Atividade da enzima catalase

A atividade da enzima catalase foi mensurada a partir da taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na absorbância de 240 nm (AEBI, 1984). Resumidamente, o músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,2) na proporção de 100 mg/mL, e em seguida centrifugados por 10 minutos a 10.000xg a 4 °C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha). O sobrenadante coletado (100 μ L) foi incubado com 900 μ L do mix reacional (25 mL de tampão fosfato para 40 μ L de H_2O_2 30%), e as absorbâncias imediatamente determinadas a cada 10 segundos, durante um minuto,

a 240 nm em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil). O tampão fosfato foi utilizado como branco para zerar o aparelho. A atividade da catalase foi determinada pela diminuição da absorvância em 240 nm causada pelo desaparecimento do H₂O₂, e calculada pela fórmula descrita:

$$\text{Atividade da catalase} = \frac{\Delta A_{240}/\text{min}}{39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \times \frac{VR}{VA}$$

Onde:

ΔA_{240} é o delta da absorvância por minuto;

39,4 é o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ em unidades de 39,4 M⁻¹ cm⁻¹

VR é o volume de reação em mL;

VA é o volume de amostra em mL.

Uma unidade da enzima é equivalente a decomposição de 1 µmol de H₂O₂ por minuto a 25° C. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína.

5.10.5 Atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx)

A medida da atividade da enzima GPx foi feita de acordo método proposto por Paglia e Valentine (1967). O método se baseia na oxidação da glutatona reduzida (GSH), catalisada pela GPx, acoplada à reciclagem da glutatona oxidada (GSSG) através da reação catalisada pela enzima glutatona redutase (GR) que utiliza o dinucleotídeo de nicotinamida-adenina-fosfato (NADPH) como cofator. O decréscimo na absorvância medida à 340 nm durante a oxidação do NADPH é indicativo da atividade da GPx. O músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco foram homogeneizados em tampão Tris HCL 50 mM, pH 7,0 (tampão de ensaio) na proporção de 100 mg/mL. Após centrifugação a 10.000xg por 15 minutos à 4° C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha), o sobrenadante foi coletado. Foram pipetados em cubeta 300 µL de tampão de ensaio, 250 µL de homogenato diluído em tampão de ensaio (1:10) e 400 µL do mix reacional (0,25 mM NADPH, 2,1 mM de GSH, 0,5 U/mL de GR e 1 mM de azida sódica). A azida sódica foi adicionada ao meio para inibir a catalase que também utiliza o peróxido de hidrogênio como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de H₂O₂ 0,2 mM, utilizado como substrato da reação. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BEL®

Photonics, Brasil) a 340 nm. Foram realizadas leituras consecutivas a cada 15 segundos durante 6 minutos e a atividade da GPx calculada utilizando a fórmula descrita:

$$\text{Atividade da GPx} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{6,22 \mu\text{mol}/\text{min}} \times \frac{VR}{VA}$$

Onde:

ΔA_{340} é média dos deltas da absorbância por minuto;

6,22 é o coeficiente de extinção molar do NADPH em unidades de $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$;

VR é o volume de reação em mL;

VA é o volume de amostra em mL.

Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima que causa a oxidação de 1 μmol de NADPH por minuto a 25° C. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína.

5.11 DOSAGEM DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Os níveis de TNF- α e IL-6 e IL-10 foram quantificados por ELISA nos homogenatos de gastrocnêmio utilizando kits comerciais (Thermo Fisher Scientific, EUA), segundo as orientações do fabricante. As leituras das reações foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas (Thermoplate, Tp-reader, EUA).

5.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NAS AMOSTRAS CONGELADAS

5.12.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA)

O RNA total do músculo gastrocnêmio congelado foi extraído utilizando o reagente de lise TRIzol™ (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, e o sistema TissueRuptor (Qiagen, EUA) foi usado para homogeneização dos tecidos.

Durante o processo de purificação, o RNA foi tratado com TURBO DNA-free™ (Invitrogen, EUA) para digestão de possíveis contaminações por ácido desoxirribonucléico (DNA), seguindo as orientações do fabricante. A concentração (ng/μL) e pureza ($A_{260}:A_{230}$ e $A_{260}:A_{280}$) do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific, EUA). O RNA isolado foi mantido em ultra freezer à -80°C até o momento da transcrição reversa.

5.12.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) e ensaios de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

O cDNA foi sintetizado com até 2 μg do RNA total por meio do kit de transcrição reversa High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Applied Biosystem, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Este material foi estocado em freezer à -80°C até o momento da realização da qPCR.

A expressão dos genes que codificam as proteínas TNF-α, IL-6, IL-10, Klotho, NRF2, SOD-1, Catalase, Gpx-1, HO-1, AKT, PI3K, MURF-1, Atrogin-1 e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram quantificadas por qPCR utilizando o sistema PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystem, EUA) a partir das amostras de cDNA na concentração de 100 ng/μL. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata, conduzidos de acordo com as instruções do fabricante, sendo que o termociclador StepOne Plus (Applied Biosystem, EUA) foi utilizado para realização dos ensaios.

As sequências específicas dos *primers* para os genes alvos estão descritas na tabela 3. Para atestar 100% de identidade das sequências de *primers*, os anelamentos foram realizados com auxílio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) da plataforma online *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A partir da obtenção dos resultados de Ct (*cycle threshold*) fornecidos pelo termociclador, foi calculado a expressão relativa (*fold-change*) por meio do método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), e o gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno para correção da amplificação de cada amostra.

Tabela 3. Sequência de primers utilizados nos ensaios de qPCR.

Primers usados nas amostras de rato (<i>Rattus norvegicus</i>)		
Alvo	Sequência dos nucleotídeos (5' - 3')	Referência
<i>Tnf-α</i>	<i>Forward:</i> TGTGCCTCAGCCTCTTCTCATTC <i>Reverse:</i> CATTGGGAACCTTCTCCTCCTTG	Fanaei et al., 2021
<i>Il-6</i>	<i>Forward:</i> GGTCTTCTGGAGTTCCGTTT <i>Reverse:</i> AGTTGGGGTAGGAAGGACTA	Fanaei et al., 2021
<i>Il-10</i>	<i>Forward:</i> GACGCTGTCATCGATTTCTCC <i>Reverse:</i> AGTAGATGCCGGGTGGTTCA	Ranjbaran et al., 2017
<i>Klotho</i>	<i>Forward:</i> CGTGAATGAGGCTCTGAAAGC <i>Reverse:</i> GAGCGGTCACTAAGCGAATACG	Eltablawy et al., 2018
<i>Nrf2</i>	<i>Forward:</i> CACAGTGCTCCTATGCGTGA <i>Reverse:</i> TTCTGGGCGGCGACTTTATT	Shen et al., 2017
<i>Sod-1</i>	<i>Forward:</i> ATGGGGACAATACACAAGGC <i>Reverse:</i> TCATCTTGTTTCTCGTGGAC	Almaghrabi et al., 2015
<i>Catalase</i>	<i>Forward:</i> GTCCGATTCTCCACAGTCGC <i>Reverse:</i> CGCTGAACAAGAAAGTAACCTG	Almaghrabi et al., 2015
<i>Gpx-1</i>	<i>Forward:</i> CACAGTCCACCGTGTATGCC <i>Reverse:</i> AAGTTGGGCTCGAACCCACC	Almaghrabi et al., 2015
<i>Ho-1</i>	<i>Forward:</i> TCAGCACTAGTTCATCCCAG <i>Reverse:</i> AAGCTTTCTTAGAGGCCCAA	Fanaei et al., 2021
<i>Akt</i>	<i>Forward:</i> GTGGCAAGATGTGTATGAG <i>Reverse:</i> CTGGCTGAGTAGGAGAAC	Xing et al., 2019
<i>Pi3k</i>	<i>Forward:</i> AACACAGAAGACCAATACTC <i>Reverse:</i> TTCGCCATCTACCACTAC	Xing et al., 2019
<i>Murf-1</i>	<i>Forward:</i> GCCAATTTGGTGCTTTTTGT <i>Reverse:</i> AAATTCAGTCCTCTCCCCGT	Mochalova et al., 2019
<i>Atrogin-1</i>	<i>Forward:</i> CTACGATGTTGCAGCCAAGA <i>Reverse:</i> GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC	Mochalova et al., 2019
<i>Gapdh</i>	<i>Forward:</i> ATGCTGGTGCTGAGTATGTC <i>Reverse:</i> AGTTGTCATATTTCTCGTGG	Li et al. 2020

5.13 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS microRNAs NAS AMOSTRAS FIXADAS

5.13.1 Extração e purificação do RNA

O RNA total do músculo gastrocnêmio fixado foi extraído utilizando o kit miRNeasy FFPE (QIAGEN, EUA) seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, foram feitos cortes de 15 µm de espessura de cada amostra parafinizada com auxílio de micrótomo, e imediatamente acondicionados em microtubos livres de nucleases. As amostras foram desparafinizadas com xilol, submetidas a digestão com proteinase K em aquecimento, e tratadas com DNase I para digestão de DNA contaminante. O RNA total, incluindo microRNA, foi então transferido para tubos com coluna de centrifugação RNeasy MinElute, lavado e finalmente eluído em 25 µl de água ultra-pura livre de RNase. A concentração (ng/µL) e pureza ($A_{260}:A_{230}$ e $A_{260}:A_{280}$) do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific, EUA). O RNA isolado foi mantido em ultra freezer à -80°C até o momento da transcrição reversa.

5.13.2 Síntese do cDNA e ensaios de qPCR para os microRNAs alvo

A síntese do cDNA foi feita através do kit miRCURY LNA RT (QIAGEN, USA), seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, 2 µL das amostras (5 ng/µL) foram adicionadas a microtubos de 200 µL contendo o mix para reação de transcrição reversa (2 µL de 5x miRCURY SYBR® Green RT Reaction Buffer, 4,5 µL de água livre de RNase, 1 µL de 10x miRCURY RT Enzyme Mix e 0,5 µL de UniSp6 RNA spike-in) e incubadas a 42°C durante 60 min, seguida de incubação a 95°C durante 5 min para inativação da enzima transcriptase reversa. As amostras foram imediatamente resfriadas em gelo e mantidas em ultra freezer à -80°C até o momento dos experimentos de qPCR.

Os experimentos de qPCR para amplificação dos microRNAs de interesse foram feitos com o kit miRCURY LNA SYBR® Green PCR (QIAGEN, EUA), seguindo

as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras de cDNA foram diluídas 60x e imediatamente utilizadas na reação. Os primers para o controle exógeno UniSp6 e para os microRNAs miR-486 (GeneGlobe ID: YP00204001) e miR-21 (GeneGlobe ID: YP00204230) foram obtidos da QIAGEN. Foram utilizados 3 µL das amostras de cDNA diluídas, adicionada de 5 µL de 2x miRCURY SYBR® Green Master Mix, 0,05 µL de ROX Reference Dye, 1 µL de cada *primer* ressuspendido e 0,95 µL de água livre de RNase. As reações de qPCR foram conduzidas no termociclador QuantStudio™ 3 System (Thermo Fisher Scientific, EUA). A partir da obtenção dos resultados de Ct (*cycle treshold*) fornecidos pelo termociclador, foi calculado a expressão relativa (*fold-change*) por meio do método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), e o UniSp6 foi utilizado como controle para correção da amplificação de cada amostra.

O estudo funcional de predição de vias dos microRNAs estudados foi feito utilizando a plataforma DIANA miRPath v4.0 (TASTSOGLU et al., 2023) disponível em <https://diana-lab.e-ce.uth.gr/app/miRPathv4>.

5.14 ESTUDOS *IN VITRO*

5.14.1 Isolamento de macrófagos primários

Foram utilizados 6 camundongos BALB/c machos, com 4 meses de idade aos quais foram injetados 2 mL de tioglicolato 3% por via intraperitoneal para o recrutamento de macrófagos (DOS SANTOS et al., 2023). Após 72h da administração do tioglicolato, os animais foram eutanasiados e os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal, isolados e cultivados em placas de 96 e 24 poços em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB) e incubados à 37°C na presença de CO₂ para estabelecimento da cultura. Após as 24h, o meio sobrenadante foi descartado e substituído por meio DMEM completo e suplementado com soro fetal bovino, e as células estavam prontas para serem utilizadas nos ensaios de exposição.

5.14.2 Isolamento mioblastos primários

Para o isolamento de mioblastos primários, foi utilizado um rato Wistar macho com 4 meses de idade, de acordo método descrito por Liu et al. (2012). Resumidamente, após eutanásia, o membro posterior do rato foi dissecado e o músculo gastrocnêmio foi coletado em condição estéril. O músculo foi então cortado em blocos de aproximadamente 3 mm³, lavados com PBS e posicionados estáticos por 1 min. Os debris e líquido flutuantes foram descartados, e os blocos foram posicionados em placas de 6 poços. Em seguida, foram adicionados 300 µL de DMEM completo contendo SFB 10%, 100 UI/mL de penicilina e 100 UI/mL de estreptomicina. Os blocos foram incubados por 4h em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Em seguida à incubação, foram adicionados 2 mL de DMEM em cada poço, e o meio foi trocado a cada 2 dias. Quando as células cresceram para além dos blocos e alcançaram 80% de confluência, os blocos de músculo foram descartados e as células foram coletadas com tripsina 0,25% e transferidas para garrafa previamente coberta por Poly-L-lisina (0,1 mg/mL). Após 2h de incubação, o sobrenadante contendo os mioblastos foi coletado e transferido para uma nova garrafa. A técnica se baseia no princípio de que fibroblastos e células endoteliais se aderem mais facilmente que as células musculares. Após 24h do estabelecimento da cultura, as células estavam prontas para seguirem para os protocolos de exposição.

5.14.3 Viabilidade celular

Para atestar que a exposição com o soro dos animais do estudo *in vivo* não causaria citotoxicidade nas culturas celulares, foi realizado teste de viabilidade celular com os macrófagos primários. Para avaliar a viabilidade, o ensaio de MTT foi realizado de acordo com Gimenes et al. (2017), onde os macrófagos foram semeados a 3x10⁴ células por poço em microplacas de 96 poços. As células foram expostas ao meio DMEM suplementado com SFB 10% ou suplementado com o soro dos animais do estudo *in vivo* a 10%. As células foram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade durante 24h. Ao final da incubação, a solução de MTT (MTT: 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo) (5mg/mL, 10 µL por poço) foi adicionada e após 3h em incubadora, 100µL/poço de PBS contendo 10% de SDS e 0,01M de HCl foi adicionado, mantendo a cultura a 37°C e 5% de CO₂ por 18h. A leitura da absorbância foi feita através do espectrofotômetro de placas no comprimento de onda de 570 nm. A atividade metabólica celular, definida aqui como viabilidade celular, foi calculada conforme a seguir:

$$\frac{\text{Absorbância da célula tratada}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

As células incubadas com SFB 10% foram consideradas como 100% viáveis. Triton 1% foi utilizado para a morte total das células.

5.14.4 Dosagem de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Os níveis de óxido nítrico no sobrenadante das culturas de macrófagos primários foram medidos por método indireto através da dosagem de nitritos totais pelo ensaio de Griess (Green et al., 1982). Resumidamente, em placa de 96 poços foram pipetados 50 µL do sobrenadante das culturas de macrófagos e 50 µL de naftilenodiamina 0,1% seguido da incubação da placa no escuro e temperatura ambiente por 10 min. Após incubação, foi adicionado aos poços 50 µL de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%, seguido de nova incubação durante 10 min. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de placas em 540 nm. Os valores de absorbância das amostras foram interpolados à equação da reta gerada pela curva padrão de nitrito de sódio (0 - 100 mM).

A produção de H₂O₂ pelos macrófagos foi medida no sobrenadante das culturas através do kit Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase (Invitrogen, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Na presença da peroxidase, o reagente Amplex® Red reage com o H₂O₂ produzindo um produto de oxidação vermelho fluorescente, a resorufina. Os valores de absorbância das amostras foram interpolados à equação da reta gerada pela curva padrão de H₂O₂ (0 - 5 µM).

5.14.5 Análise da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória e metabolismo proteico

As culturas primárias de macrófagos e mioblastos (5×10^5 células por poço, placa de 24 poços) expostas durante 24h ao soro dos animais do estudo *in vivo* foram coletadas, preservadas em *RNAlater* (Invitrogen, EUA) e mantidas em ultra freezer - 80°C. A extração do RNA total, síntese do cDNA e ensaios de qPCR foram realizadas de acordo descrito anteriormente (tópico 4.13). Nas culturas de macrófagos foram analisadas a expressão dos genes MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, e o gene ACTB (primers descritos na tabela 4) foi utilizado como controle endógeno para normalização dos valores de Ct obtidos. Nas culturas de mioblastos foram analisadas a expressão dos genes de ratos AKT, PI3K, MURF-1 e Atrogin-1, e o gene GAPDH (primers descritos na tabela 3) utilizado como controle endógeno para normalização dos valores de Ct obtidos.

Tabela 4. Sequência de primers utilizados nos ensaios de qPCR.

Primers usados nas amostras de camundongos (<i>Mus musculus</i>)		
Alvo	Sequência dos nucleotídeos (5' - 3')	Referência
<i>Mcp-1</i>	<i>Forward:</i> GCAGTTAACGCCCCACTCA	Newsome et al., 2014
	<i>Reverse:</i> CCTACTCATTGGGATCATCTTGCT	
<i>Tnf-α</i>	<i>Forward:</i> CATCTTCTCAAATTTCGAGTGACAA	Sun et al., 2016
	<i>Reverse:</i> TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	
<i>Il-1β</i>	<i>Forward:</i> AGAAGAGCCCATCCTCTGTGACTCATG	Markó et al., 2016
	<i>Reverse:</i> CACACACCAGCAGGTTATCATCA	
<i>Il-6</i>	<i>Forward:</i> TGATGCTGGTGACAACCACG	Sun et al., 2016
	<i>Reverse:</i> CAGAATTGCCATTGCACAACCTC	
<i>Il-10</i>	<i>Forward:</i> TGAATTCCCTGGGTGAGAAG	Kosaka et al., 2011
	<i>Reverse:</i> TGGCCTTGTAGACACCTTGG	
<i>Actb</i>	<i>Forward:</i> TGTCCACCTTCCAGCAGATGT	Newsome et al., 2022
	<i>Reverse:</i> GCTCAGTAACAGTCCGCCTAGAA	

5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis de interesse deste estudo foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. As comparações entre grupos do teste piloto foram feitas com o teste ANOVA para medidas repetidas (análise temporal) ou ANOVA one-way, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Para as análises entre grupos jovens e envelhecidos, sedentários e treinados, foi adotado delineamento fatorial (2x2) utilizando o teste ANOVA two-way. As análises do estudo principal *in vivo* e *in vitro* foram feitas através dos testes T de Student (ESed vs ESed+DHL) e ANOVA one-way (ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL) seguida do pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa GraphPad-Prism 9 (GraphPad Software; San Diego, CA, USA). As análises de correlações múltiplas foram realizadas utilizando o programa RStudio (1.2.5001© 2009–2019 RStudio, Inc.) com base nos resultados de correlação pelo teste de correlações de Spearman.

6 RESULTADOS

6.1 ESTUDO PILOTO - MODELO PARA AVALIAÇÃO DOS EVENTOS INICIAIS DO ENVELHECIMENTO SOBRE A FUNÇÃO MUSCULAR

6.1.1 Evolução do peso corporal

A partir da análise da evolução do peso corporal, foi possível observar que os animais apresentaram ganho de peso contínuo e consistente ao longo dos 20 meses de protocolo experimental (Figura 5).

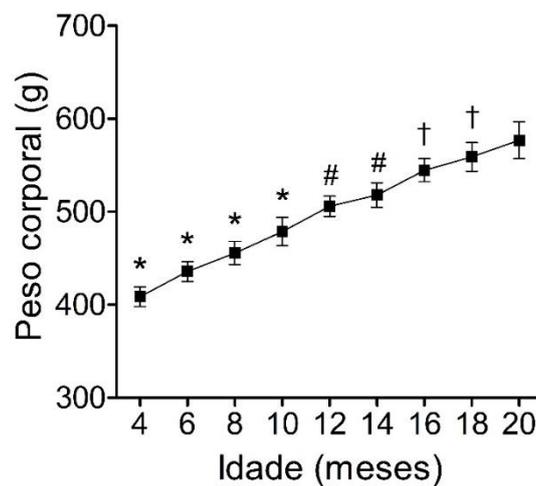


Figura 5. Acompanhamento do peso corporal dos animais ao longo de 20 meses (n=8). A análise entre os valores de cada tempo foi feita através do teste ANOVA de medidas repetidas, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferente dos demais tempos avaliados; #Diferente dos tempos 16, 18 e 20; †Diferente do tempo 20.

6.1.2 Performance física

Os resultados obtidos através do teste máximo de corrida em esteira motorizada evidenciaram uma redução da performance física a partir dos 14 meses de idade (Figura 6).

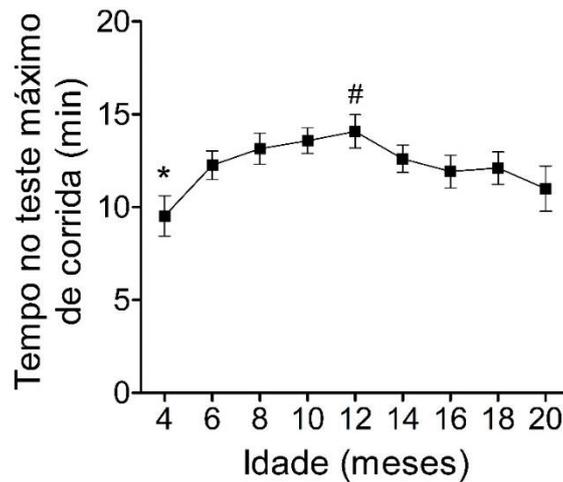


Figura 6. Avaliação da performance física dos animais ao longo de 20 meses (n=8), através do teste máximo de corrida em esteira motorizada para ratos. A análise entre os valores de cada tempo foi feita através do teste ANOVA de medidas repetidas, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferente dos demais tempos avaliados; #Diferente dos tempos 14, 16, 18 e 20.

6.1.3 Composição corporal

Os animais apresentaram aumento do peso dos depósitos de tecido adiposo abdominais até os 14 meses, idade na qual o peso se manteve para todos os depósitos viscerais de tecido adiposo (TAE, TAR e TAME) e, conseqüentemente, para o TAV, até o fim dos 20 meses. Apenas o TASC apresentou redução aos 20 meses de idade, quando comparado aos 14 e 18 meses de idade (Figura 7).

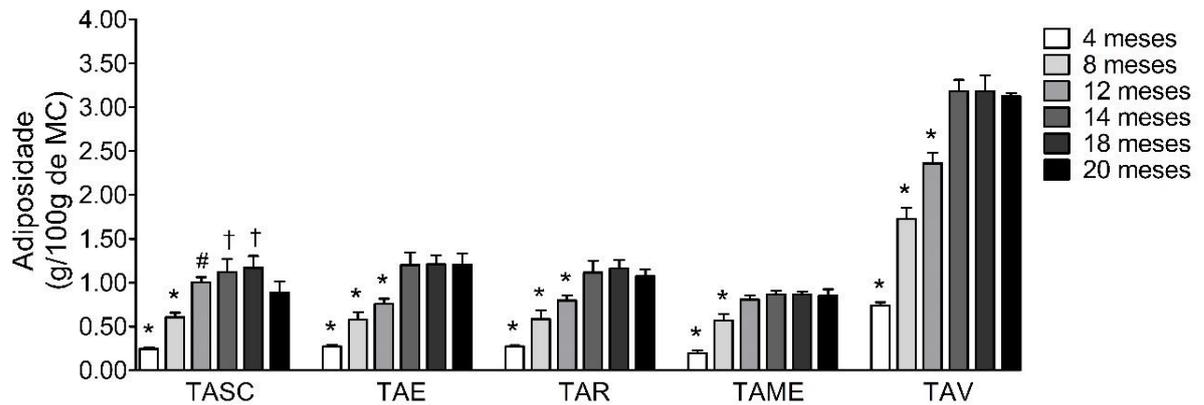


Figura 7. Peso dos depósitos de tecido adiposo subcutâneo (TASC), epididimal (TAE), retroperitoneal (TAR) e mesentérico (TAME) dos animais aos 4, 8, 12, 14, 18 e 20 meses. O tecido adiposo visceral (TAV) constitui a soma dos depósitos viscerais coletados (TAE, TAR e TAME). A análise entre os valores de cada tempo para cada tecido foi feita através do teste ANOVA de medidas repetidas, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferente dos demais tempos avaliados; #Diferente do tempo 18 meses; †Diferente do tempo 20 meses. MC, massa corporal.

Adicionalmente, a análise da massa magra evidenciou um aumento do peso até os 12 meses, seguido por uma sutil, porém significativa redução aos 14 meses, que se manteve até os 20 meses de idade (Figura 8A). De maneira semelhante, o músculo gastrocnêmio apresentou redução do peso médio a partir dos 14 meses (Figura 8B).

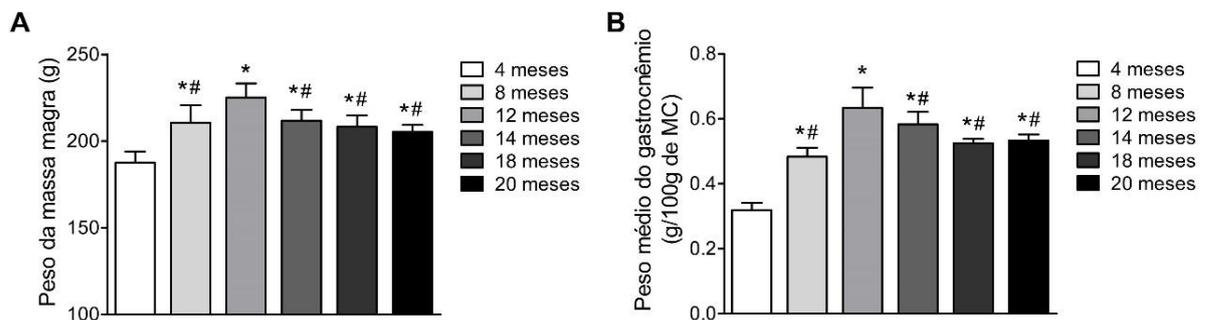


Figura 8. Peso da massa magra (A) e peso médio do músculo gastrocnêmio (B) dos animais aos 4, 8, 12, 14, 18 e 20 meses. A análise entre os valores de cada tempo para cada tecido foi feita através do teste ANOVA de medidas repetidas, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferente do tempo 4 meses; #Diferente do tempo 12 meses. MC, massa corporal.

A partir dos dados obtidos, e especialmente os resultados observados na performance física, peso da massa magra e peso dos músculos que evidenciaram o início das alterações musculares aos 14 meses de idade, buscou-se investigar se essas alterações estariam também associadas a modificações oxidativas no músculo gastrocnêmio até os 14 meses de idade.

6.1.4 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante enzimática

Os animais apresentaram elevação dos níveis de TBARS (Figura 9A) ao longo do tempo, e proteínas carboniladas (Figura 9B) a partir dos 12 meses de idade, de modo que os maiores valores foram observados aos 14 meses em comparação aos demais tempos.

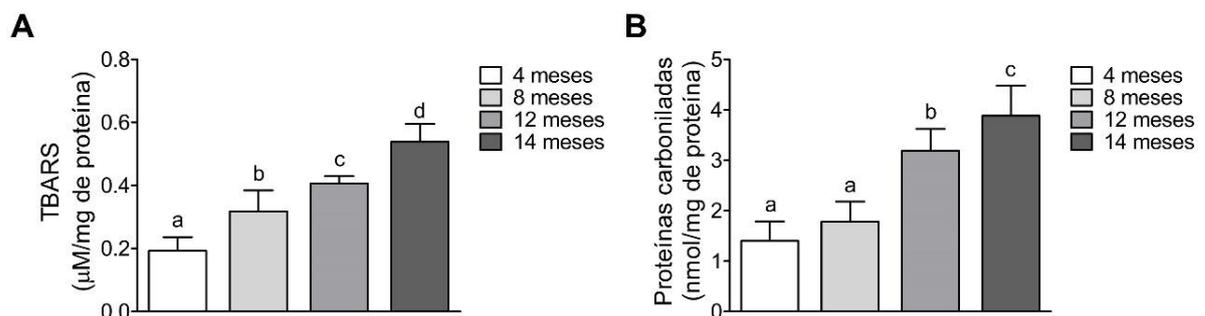


Figura 9. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (A) e proteínas carboniladas (B) no músculo gastrocnêmio dos animais aos 4, 8, 12 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.

A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase se mantiveram ao longo dos 14 meses (Figura 10A e 10B), enquanto a atividade da GPx atingiu seu pico aos 12 meses de idade, seguida por um declínio significativo aos 14 meses de idade (Figura 10C).

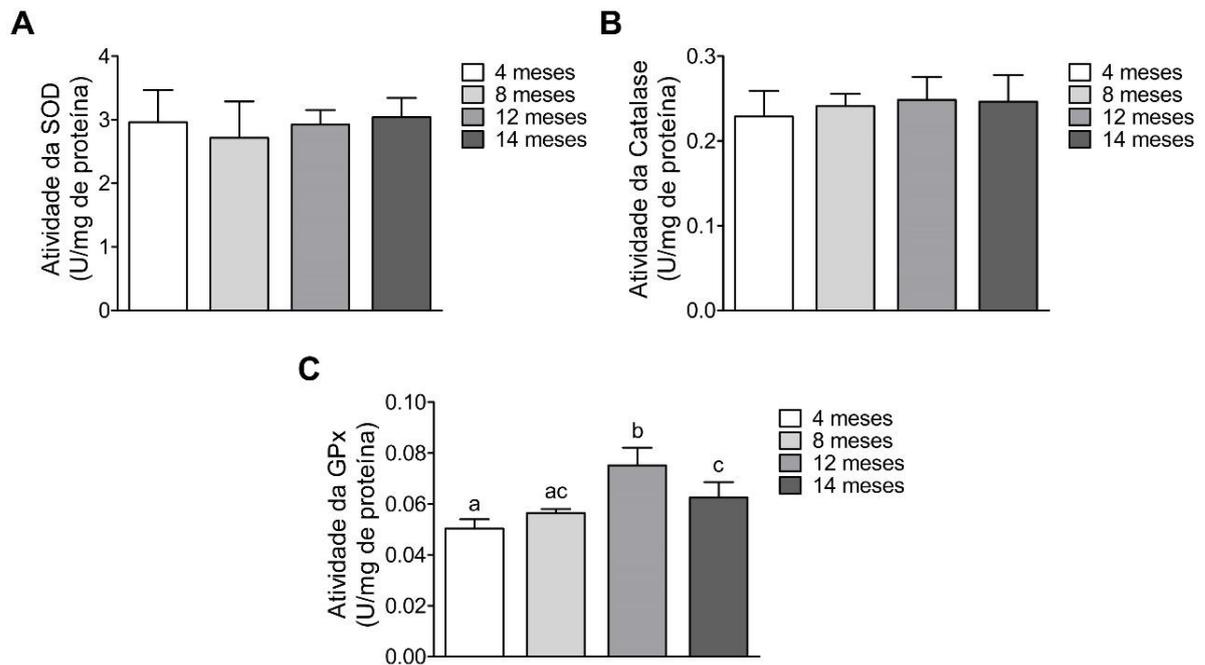


Figura 10. Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) catalase (B) e GPx (C) no músculo gastrocnêmio dos animais aos 4, 8, 12 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA, seguida de comparações múltiplas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.

6.2 ESTUDO PILOTO - EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS ESTRUTURAIS, REDOX E INFLAMATÓRIOS MUSCULARES EM ANIMAIS ENVELHECIDOS ATÉ OS 14 MESES

6.2.1 Composição corporal

Após a identificação dos efeitos iniciais do envelhecimento sobre a performance física e estrutura e função muscular aos 14 meses de idade, buscou-se avaliar se o treinamento físico aeróbico de moderada intensidade seria eficaz em proteger os animais contra alterações na estrutura, parâmetros redox e inflamatórios musculares no gastrocnêmio. Sendo assim, foi possível observar que o envelhecimento causou aumento da massa corporal (Figura 11A) e adiposidade (Figura 11B), ao passo que a realização do treinamento foi eficaz em reduzir a massa corporal aos 14 meses (Figura

11A) e a adiposidade visceral (Figura 11B) nos grupos de 8 e 14 meses, envelhecido e treinado, além de aumentar o peso do músculo gastrocnêmio (Figura 11C) em comparação aos grupos sedentários de mesma idade.

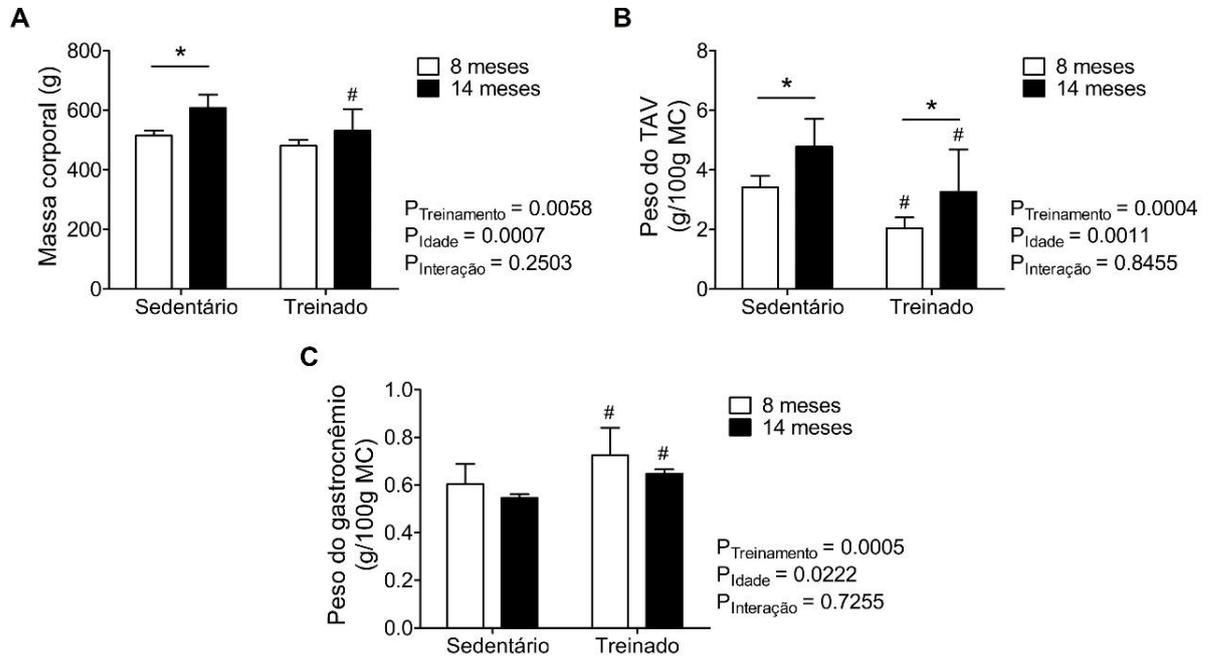


Figura 11. Avaliação da composição corporal pela medida da massa corporal (A), peso do tecido adiposo visceral – TAV (B) e peso do músculo gastrocnêmio (C) dos animais sedentários e treinados aos 8 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferença entre grupos na mesma condição de sedentarismo/treinamento (8 meses vs 14 meses); #Diferença entre grupos de mesma idade (sedentário vs treinado). MC, massa corporal.

6.2.2 Análise histológica muscular

A análise da histologia muscular evidenciou que o treinamento determinou em aumentar a ASF tanto aos 8 como aos 14 meses de idade, não havendo diferença entre grupos jovens e envelhecidos (Figura 12B e 12C). Além disso, não foram observadas diferenças entre os grupos para a variável número de fibras por campo (Figura 12A).

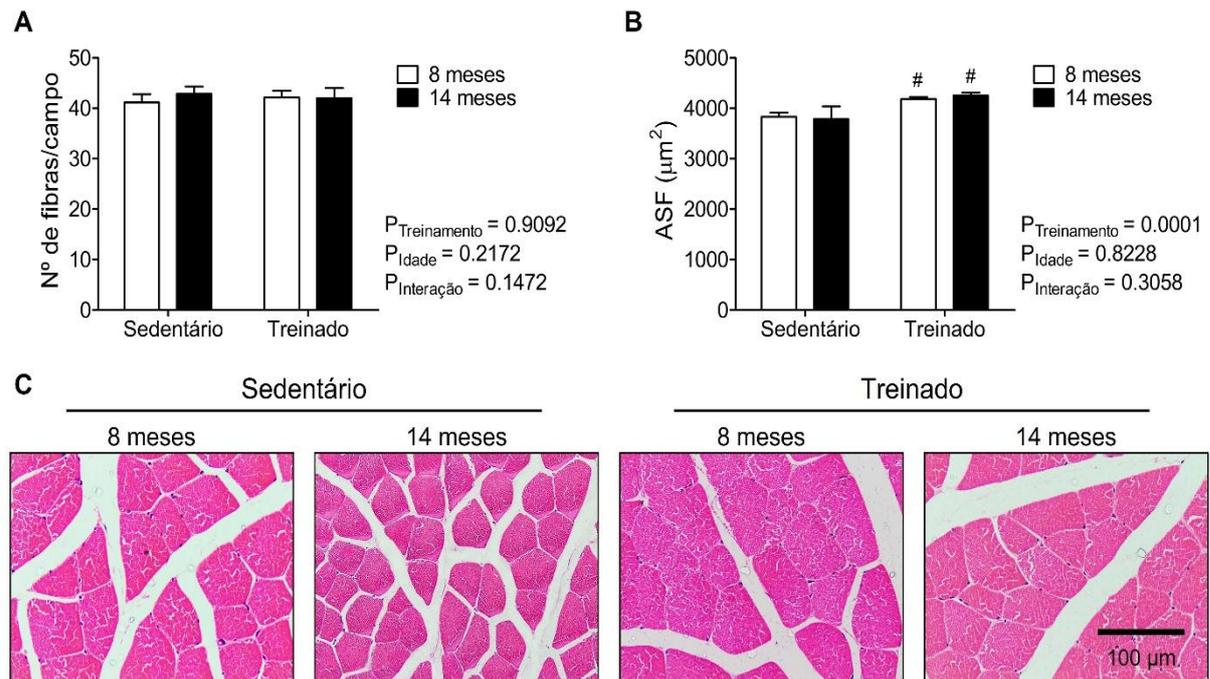


Figura 12. Análise histológica do músculo gastrocnêmio feita através da quantificação do número de fibras por campo (A) e área seccional da fibra - ASF (B) dos animais sedentários e treinados aos 8 e 14 meses. Fotomicrografias representativas da análise histológica feita pela coloração hematoxilina e eosina (C) obtidas com câmera acoplada em microscópio nos aumentos de 200x. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferença entre grupos na mesma condição de sedentarismo/treinamento (8 meses vs 14 meses); #Diferença entre grupos de mesma idade (sedentário vs treinado).

6.2.3 Perfil inflamatório muscular

Em comparação ao grupo jovem, o envelhecimento causou aumento nos níveis teciduais de TNF- α (Figura 13A) e IL-6 (Figura 13B). O treinamento físico reduziu as concentrações musculares de TNF- α (Figura 13A) e aumentou os níveis de IL-10 (Figura 13C) tanto aos 8 meses, quanto aos 14 meses de idade.

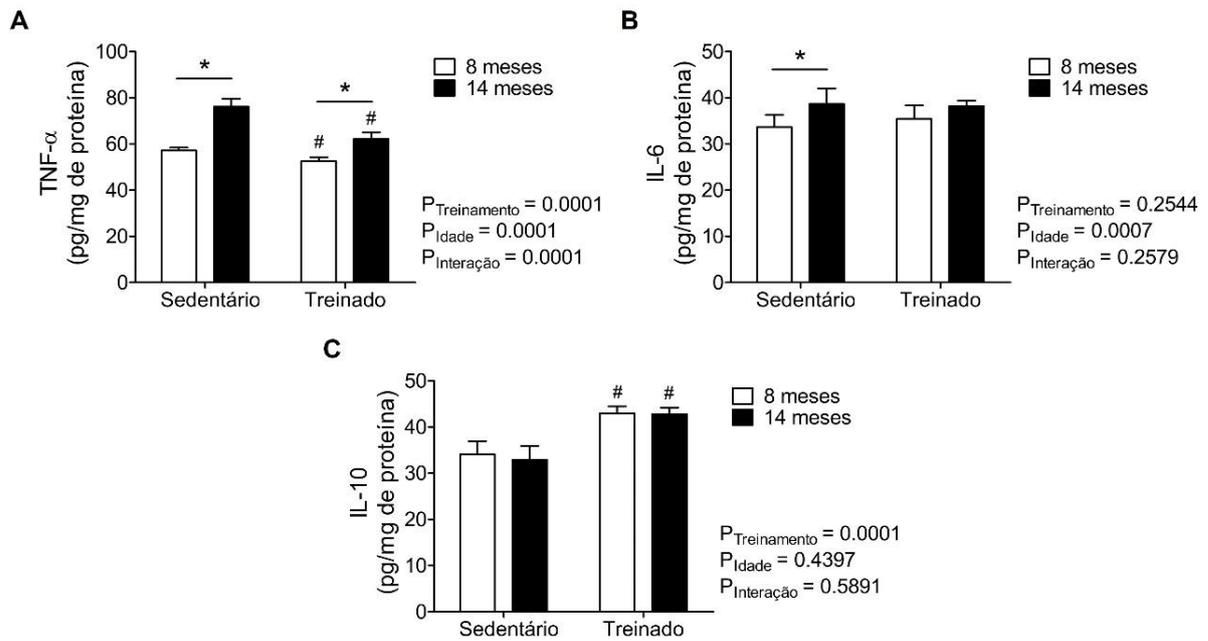


Figura 13. Quantificação por ELISA das citocinas envolvidas no processo inflamatório TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) no homogenato do músculo gastrocnêmio dos animais sedentários e treinados aos 8 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferença entre grupos na mesma condição de sedentarismo/treinamento (8 meses vs 14 meses); #Diferença entre grupos de mesma idade (sedentário vs treinado).

6.2.4 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante enzimática

Ao final dos 14 meses, os ratos apresentaram aumento dos níveis musculares de TBARS (Figura 14A) e proteínas carboniladas (Figura 14B) quando comparados aos animais de 8 meses. O treinamento físico causou a redução de ambos os marcadores de lesão oxidativa independentemente da idade.

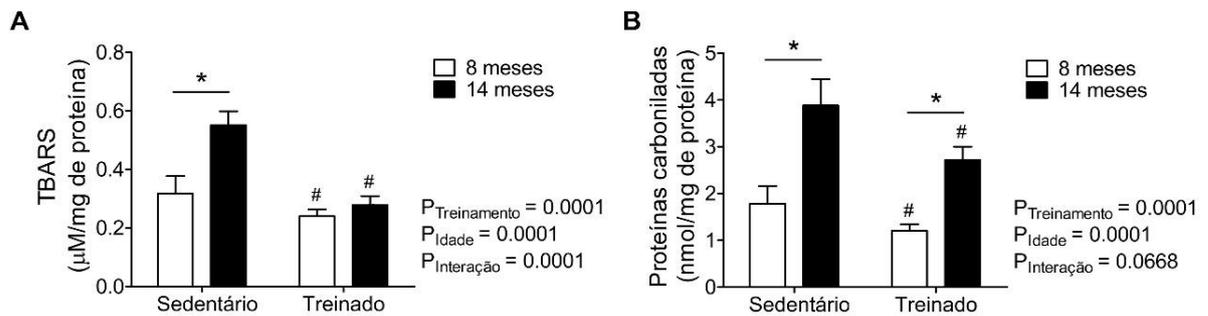


Figura 14. Dosagem dos marcadores de lesão oxidativa TBARS (A) e proteínas carboniladas (B) no homogenato do músculo gastrocnêmio dos animais sedentários e treinados aos 8 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferença entre grupos na mesma condição de sedentarismo/treinamento (8 meses vs 14 meses); #Diferença entre grupos de mesma idade (sedentário vs treinado).

O treinamento físico e a idade não afetaram a atividade antioxidante da SOD no músculo (Figura 15A). Por outro lado, nos grupos treinados observou-se aumento da atividade das enzimas catalase e GPx aos 8 e 14 meses, em comparação aos respectivos grupos controles sedentários (Figura 15B).

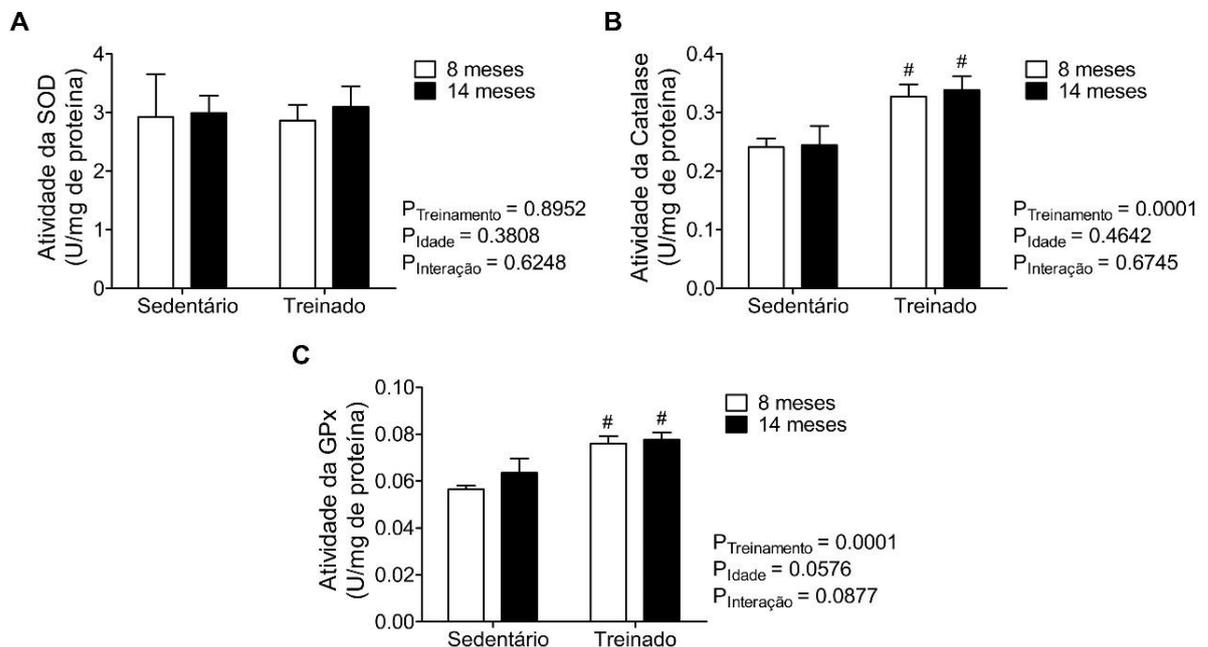


Figura 15. Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) catalase (B) e GPx (C) no músculo gastrocnêmio dos animais sedentários e treinados aos 8 e 14 meses. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferença entre grupos na mesma condição de sedentarismo/treinamento (8 meses vs 14 meses); #Diferença entre grupos de mesma idade (sedentário vs treinado).

6.3 ESTUDO PRINCIPAL *IN VIVO* - EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO TERAPÊUTICO OU AO LONGO DA VIDA SOBRE ALTERAÇÕES MUSCULARES NOS ESTÁGIOS INICIAIS DO ENVELHECIMENTO ASSOCIADO À OBESIDADE

6.3.1 Composição corporal

A análise de composição corporal dos animais envelhecidos demonstrou que 5 meses de exposição à dieta hiperlipídica causou um aumento significativo da adiposidade visceral (Figura 16A), acompanhado também da redução do peso do músculo gastrocnêmio (Figura 16B) em comparação à dieta controle. Por outro lado, ambos os protocolos de treinamento protegeram o músculo dos animais envelhecidos contra os efeitos da dieta hiperlipídica. Apenas o treinamento ao longo da vida determinou redução da adiposidade visceral.

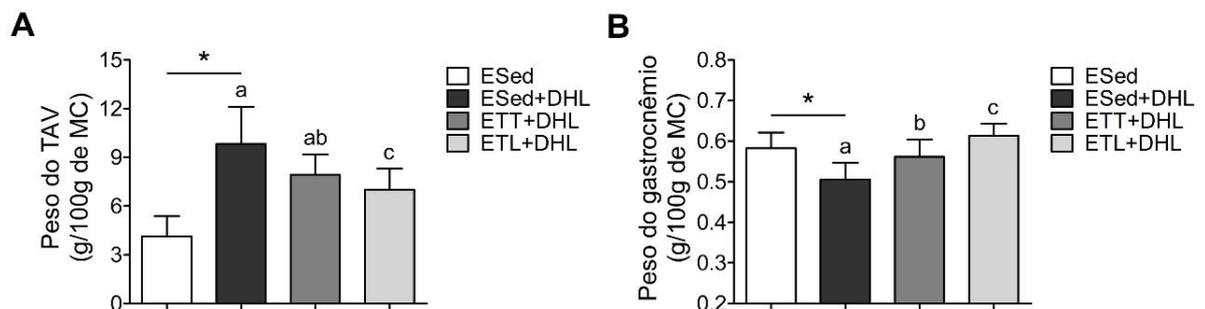


Figura 16. Peso do tecido adiposo visceral – TAV (A) e do músculo gastrocnêmio (B) dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$). MC, massa corporal.

6.3.2 Análise histológica muscular

A análise histológica do músculo gastrocnêmio evidenciou que, apesar de não terem sido observadas alterações no número de fibras musculares (Figura 17C), o uso da dieta hiperlipídica determinou redução da área seccional das fibras, aumento do espaço (Figura 17E) e fibrose intersticial (Figura 17F) em comparação ao grupo envelhecido e mantido na dieta controle. Por sua vez, ambos os treinamentos protegeram as fibras musculares dos animais envelhecidos contra os efeitos da dieta, além de reduzir a fibrose intersticial medida pela área marcada por Tricrômio de Masson. Adicionalmente, o grupo ETL+DHL apresentou os melhores resultados entre os grupos treinados.

6.3.3 Perfil inflamatório muscular

Os animais expostos à dieta hiperlipídica apresentaram aumento significativo da expressão de NF- κ B no músculo gastrocnêmio (Figura 18A e 18B), acompanhado do aumento nos níveis teciduais de TNF- α (Figura 18C), e redução dos níveis de IL-10 (Figura 18E) em comparação ao grupo ESed. Por outro lado, os protocolos de treinamento terapêutico e ao longo da vida causaram redução da marcação de NF- κ B e níveis de TNF- α e IL-6, ao passo que levaram ao aumento das concentrações de IL-10 no músculo em comparação ao grupo ESed+DHL. Apenas o grupo ETL+DHL apresentou redução nos níveis de IL-6 em comparação ao grupo ESed+DHL. Entre os grupos treinados, o grupo ETL+DHL apresentou a menor marcação de NF- κ B e maior concentração de IL-10 muscular.

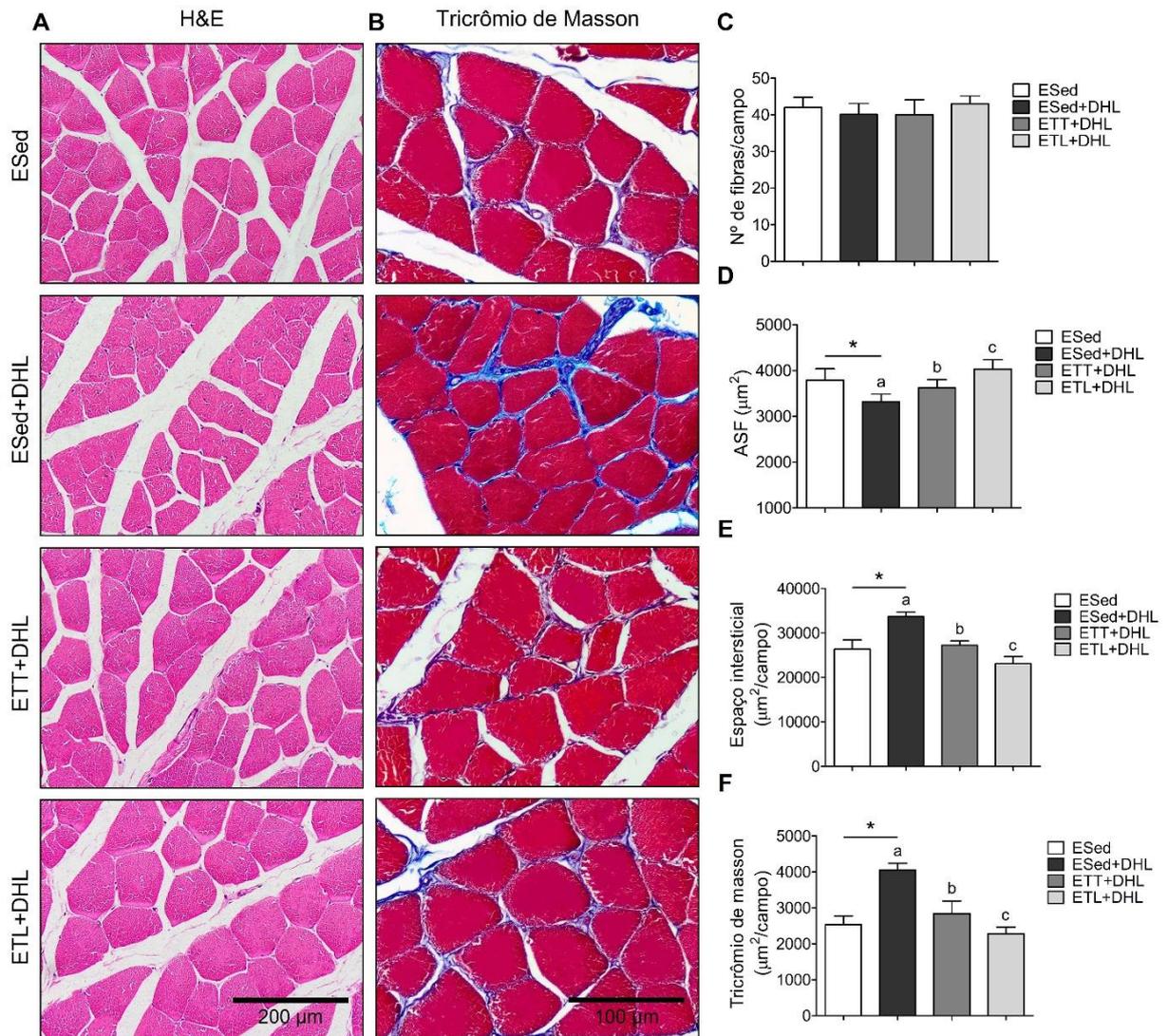


Figura 17. Análise histológica do músculo gastrocnêmio feita através da quantificação do número de fibras por campo (C), área seccional da fibra - ASF (D), espaço intersticial (E) e área marcada por Tricrômio de Masson (F) dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Fotomicrografias representativas da análise histológica feita pelas colorações especiais hematoxilina e eosina (A) e Tricrômio de Masson (B) obtidas com câmera acoplada em microscópio nos aumentos de 100x e 200x, respectivamente. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).

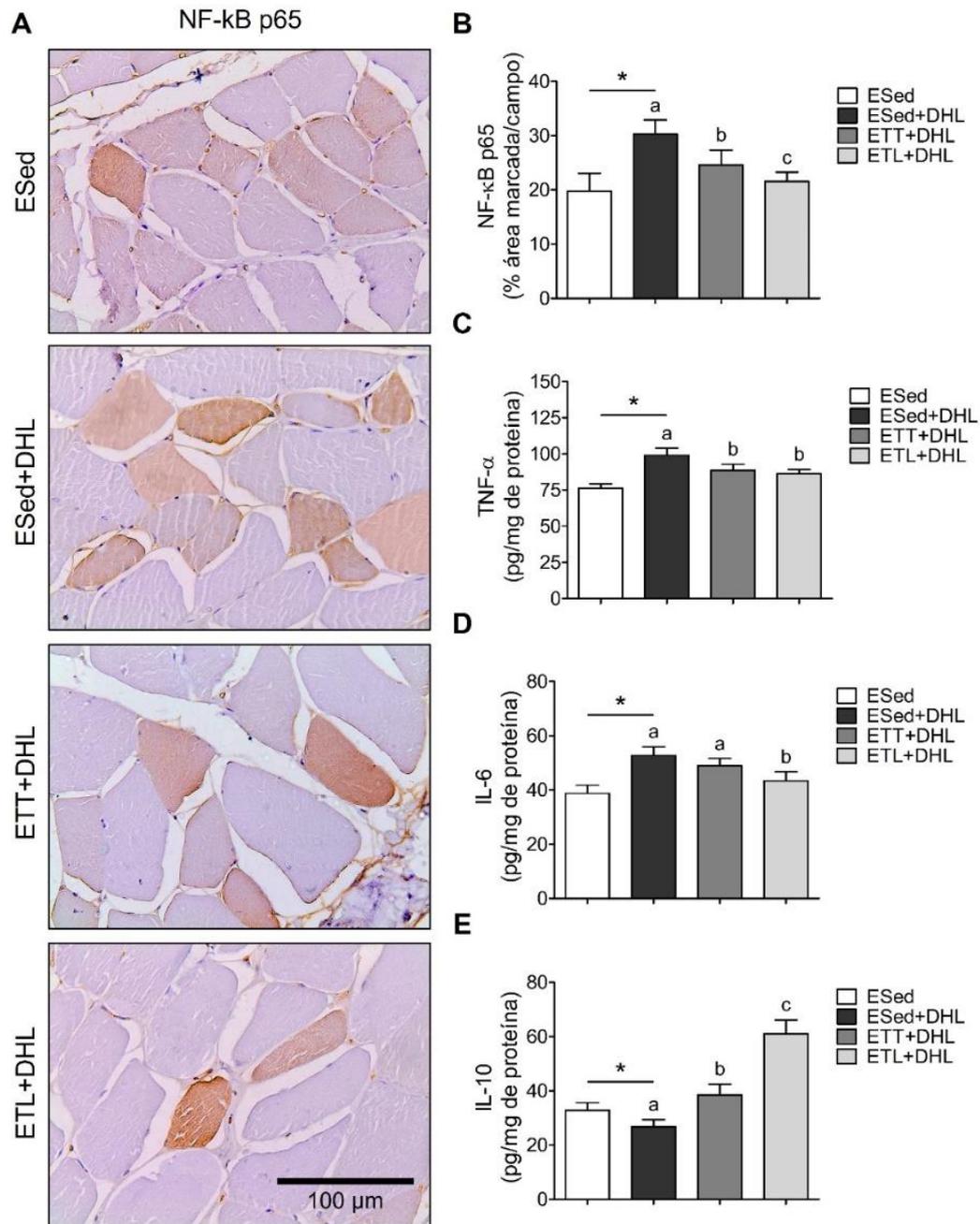


Figura 18. Avaliação de marcadores inflamatórios no músculo gastrocnêmio através da análise da imunomarcagem de NF-kB p65 representadas pelas fotomicrografias (200x) (A) e quantificação da área marcada por NF-kB no tecido muscular (B), Quantificação por ELISA dos níveis de TNF- α (C), IL-6 (D) e IL-10 (E) no homogenato do músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).

6.3.4 Metabolismo energético muscular

A análise dos marcadores do metabolismo energético muscular evidenciou que a dieta hiperlipídica reduziu a atividade da enzima citrato sintase (Figura 19A), aumentou o conteúdo de triglicerídeos (Figura 19B) e reduziu as concentrações de glicogênio (Figura 19C) no músculo gastrocnêmio dos animais envelhecidos em comparação ao grupo envelhecido e mantido na dieta controle. Por sua vez, o treinamento físico, independente do protocolo de duração, atenuou os efeitos da dieta em todos os parâmetros estudados. Além disso, o grupo ETL+DHL apresentou o maior aumento da atividade da enzima citrato sintase, e maior redução dos triglicerídeos no músculo em comparação ao grupo ETT+DHL.

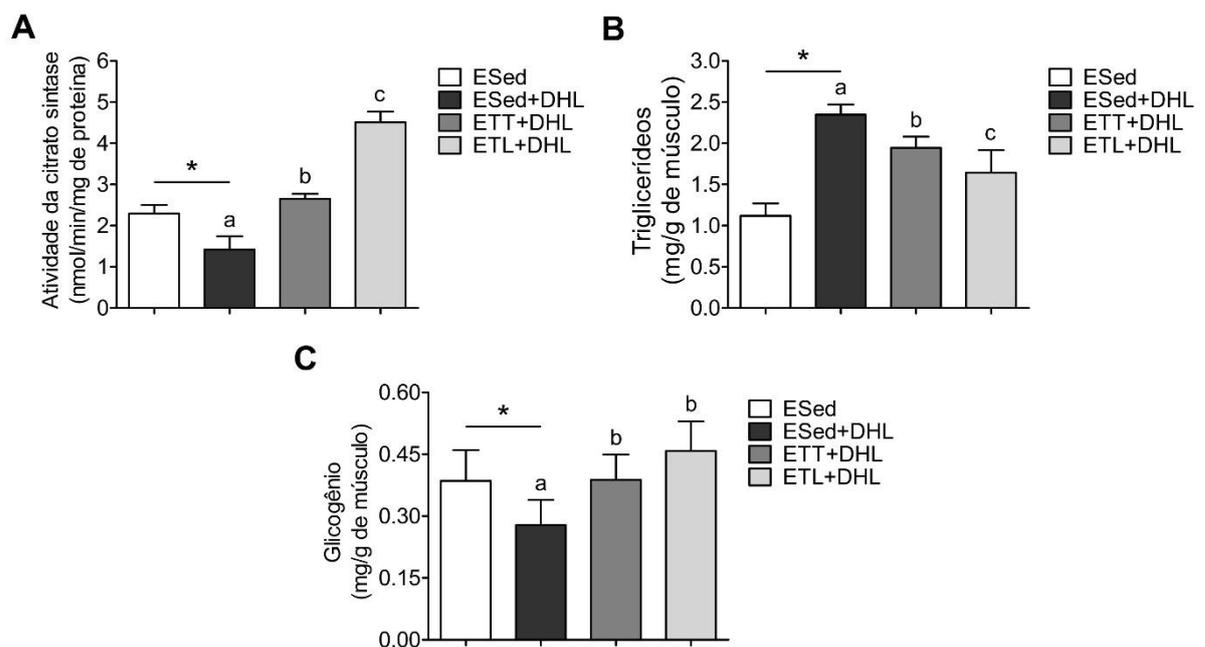


Figura 19. Avaliação do metabolismo muscular pela dosagem da atividade da enzima citrato sintase (A), e conteúdo de triglicerídeos (B) e glicogênio no músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).

6.3.5 Capacidade antioxidante enzimática muscular

A análise da capacidade antioxidante tecidual evidenciou que a dieta hiperlipídica reduziu a área marcada e atividade da enzima GPx (Figura 20A, B e C), assim como a atividade das enzimas catalase (Figura 20D) e SOD (Figura 20E). Ambos os treinamentos aumentaram a atividade da enzima catalase, e aumentar a atividade e expressão da enzima GPx em comparação ao grupo ESed+DHL. O grupo ETL+DHL foi o único grupo que apresentou aumento da enzima SOD, além de ter apresentado os maiores valores entre os grupos treinados para a atividade das enzimas catalase, GPx e expressão muscular da enzima GPx-1.

6.3.6 Marcadores de estresse oxidativo tecidual

A obesidade induzida pela dieta hiperlipídica favoreceu a instauração de um quadro pró-oxidativo evidenciado pelo aumento da marcação tecidual de nitrotirosina (Figura 21A e 21C), 8-OHdG (Figura 21B e 21D), associado ao aumento de proteínas carboniladas (Figura 20E) e peroxidação lipídica (Figura 21F) no músculo dos animais envelhecidos, em comparação ao grupo alimentado com a dieta controle. Em contrapartida, os grupos envelhecidos treinados apresentaram redução de todos os marcadores de estresse oxidativo, sendo o treinamento ao longo da vida o protocolo mais eficaz em comparação ao treinamento terapêutico.

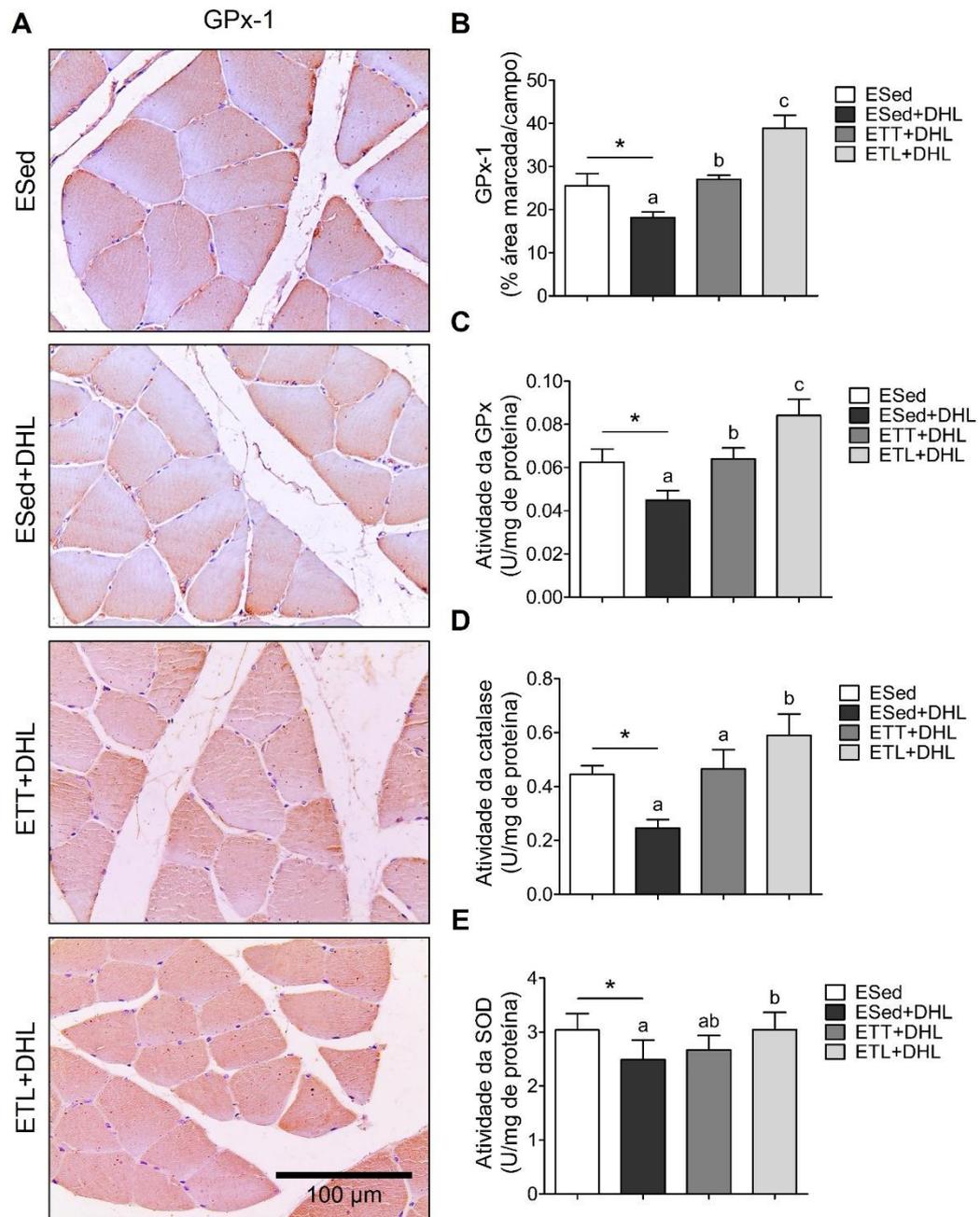


Figura 20. Avaliação da capacidade antioxidante no músculo gastrocnêmio através da análise da imunomarcagem de glutathiona peroxidase (GPx-1) representadas pelas fotomicrografias (200x) (A) e quantificação da área marcada por GPx-1 no tecido muscular (B), e atividade da GPx (C), catalase (D) e superóxido dismutase (SOD) (E) no homogenato do músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).

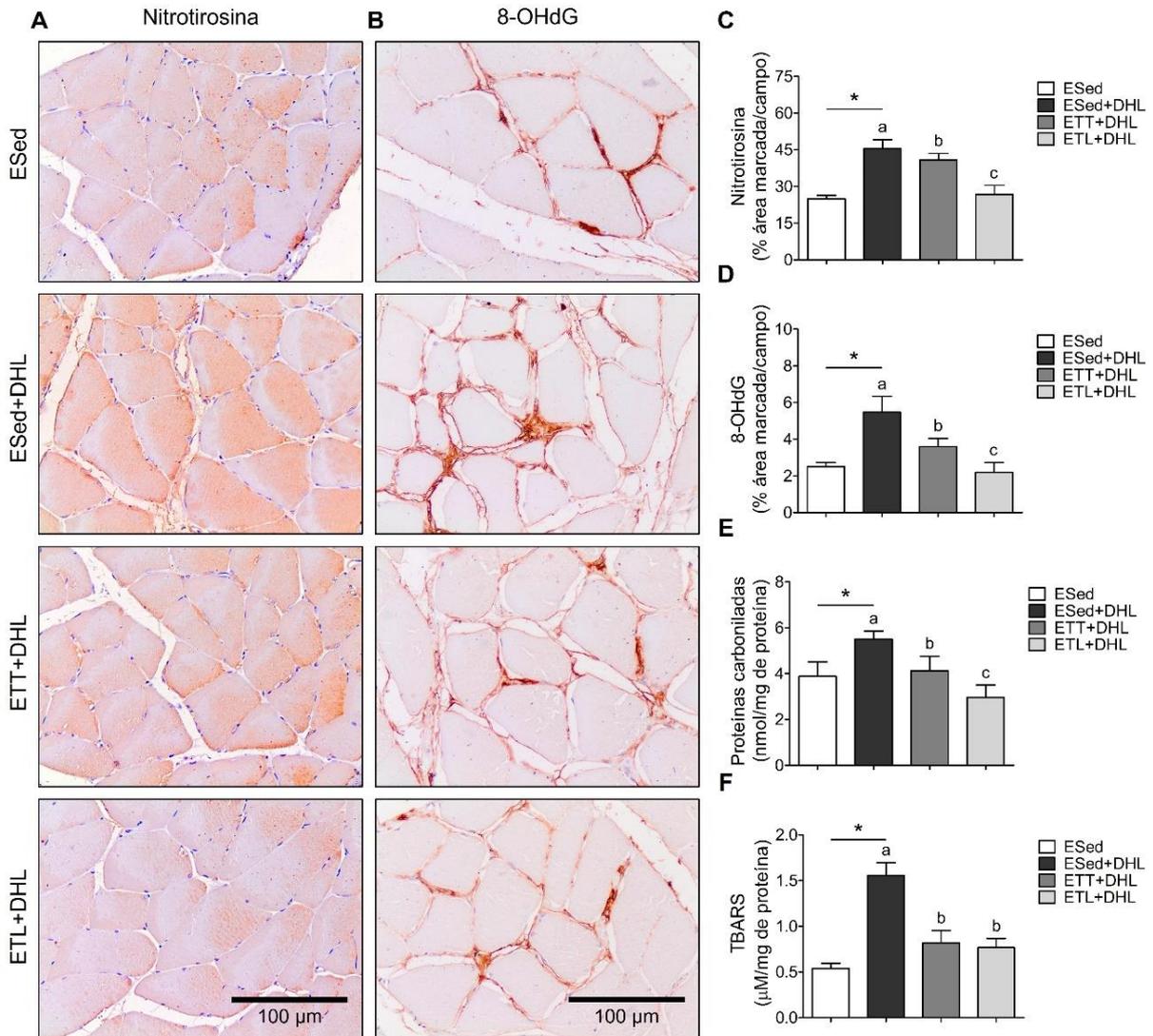


Figura 21. Quantificação dos marcadores de estresse oxidativo nitrotirosina (A e C), 8-OHdG (B e D), proteínas carboniladas (E) e TBARS (F) no músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Fotomicrografias representativas das imunomarcações para nitrotirosina (A) e 8-hidroxi-2'deoxiguanosina - 8-OHdG (B), através da técnica de imuno-histoquímica obtidas com câmera acoplada em microscópio no aumento de 100x. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).

6.3.7 Expressão gênica de mRNAs envolvidos no metabolismo muscular

A análise da expressão dos genes que codificam as citocinas inflamatórias evidenciou que a dieta hiperlipídica causou regulação positiva dos genes do TNF- α e IL-6, ao passo que reduziu a expressão do gene da IL-10 (Figura 22A) nos animais envelhecidos em relação aos animais alimentados com dieta controle. Ambos os grupos envelhecidos treinados atenuaram as alterações causadas pela dieta, especialmente o grupo ETL+DHL, que apresentou o maior aumento da expressão gênica da citocina IL-10.

No que diz respeito à expressão dos genes que codificam as proteínas envolvidas na capacidade antioxidante muscular, a dieta hiperlipídica causou *downregulation* dos genes das enzimas SOD-1, Catalase e GPx-1 (Figura 22B) nos animais envelhecidos em comparação ao grupo ESed. Por outro lado, os grupos envelhecidos treinados apresentaram aumento da expressão gênica das enzimas antioxidantes SOD-1, Catalase e GPx-1, somado à regulação positiva da expressão de NRF2. Além disso, o grupo ETL+DHL apresentou o maior aumento da expressão gênica da enzima GPx-1. Não foram observadas diferenças entre os grupos na expressão gênica da enzima HO-1.

Ademais, a dieta hiperlipídica regulou negativamente a expressão dos genes das proteínas AKT, PI3K e Klotho, associada à regulação positiva da expressão gênica de MURF-1 e Atrogin-1 (Figura 22C) no grupo ESed+DHL em comparação ao grupo ESed. Os animais envelhecidos e treinados atenuaram todas as alterações causadas pela dieta, com destaque especial ao grupo ETL+DHL que apresentou o maior aumento da expressão dos genes das proteínas AKT, PI3K e Klotho.

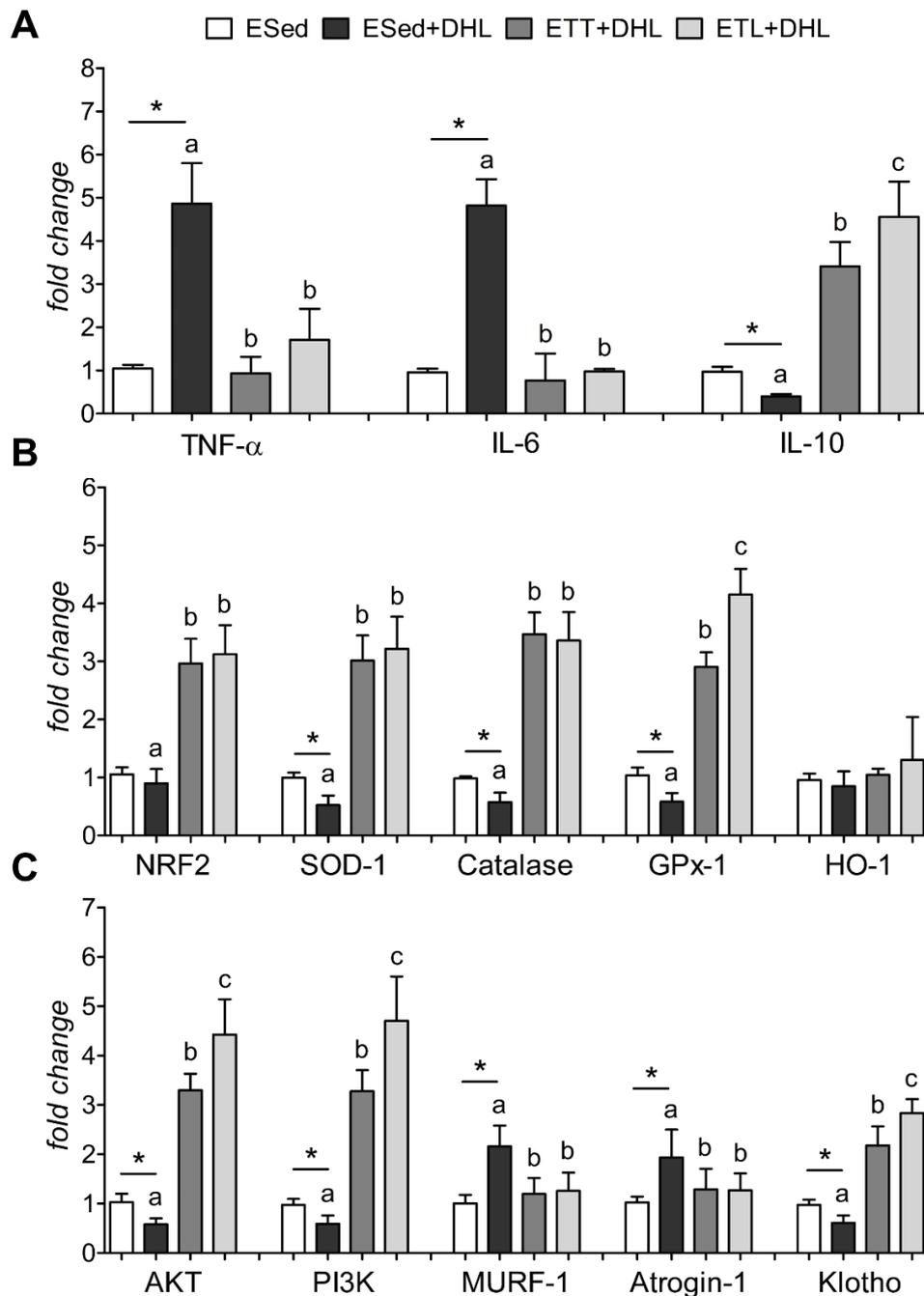


Figura 22. Quantificação por qPCR da expressão dos mRNAs que codificam as proteínas da resposta inflamatória (TNF- α , IL-6 e IL-10) (A), capacidade antioxidante (NRF2, SOD-1, Catalase, GPx-1 e HO-1) (B) e metabolismo (AKT, PI3K, MURF-1, Atrogin-1 e Klotho) (C) no músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* p <0.05). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos (p <0.05).

6.3.8 Expressão de microRNAs envolvidos no metabolismo muscular

O uso da dieta hiperlipídica determinou aumento da expressão do microRNA regulador positivo do catabolismo proteico miR-21 (Figura 23B), enquanto os treinamentos modularam positivamente a expressão microRNA regulador positivo do anabolismo proteico miR-486 (Figura 23A) e negativamente a expressão de miR-21 (Figura 23B). Além disso, o treinamento ao longo da vida determinou a menor expressão do miR-21 entre os grupos treinados. Através da análise funcional *Genes Union*, foram identificados 6 termos enriquecidos influenciados por ambos os microRNAs estudados, sendo eles a via de sinalização da Ras, proteoglicanos no câncer, vias de sinalização no câncer, via de sinalização da MAPK, resistência ao inibidor da tirosina quinase EGFR e via de sinalização da FoxO. Adicionalmente, o estudo de enriquecimento de vias pela análise *Pathways Union* demonstrou que o miR-21 está relacionado à via de sinalização PI3k-Akt (Figura 23C).

6.3.9 Análise de correlações múltiplas entre os parâmetros de composição corporal, estrutura muscular e expressão de microRNAs

Através das matrizes de correlações múltiplas expressas como corrplots, foi possível observar uma variação no padrão de correlações de importância entre os grupos para os parâmetros estruturais musculares e a expressão de microRNAs, especificamente o microRNA-21. Como é possível observar na Figura 24 (24A, B, C e D), o grupo ESed+DHL apresentou correlação negativa entre os parâmetros peso do gastrocnêmio e expressão do miR-21 (miR_21 vs Gastroc_weight), e correlação positiva entre o peso do tecido adiposo visceral e miR-21 (miR_21 vs VAT_weight). O grupo ETL+DHL apresentou correlação negativa entre o miR-21 e o número de fibras musculares e peso do gastrocnêmio (miR_21 vs Fibers / miR_21 vs Gastroc_weight). Nessa estratificação, os grupos ESed e ETT+DHL não apresentaram correlações significativas entre os parâmetros estruturais e expressão de microRNAs.

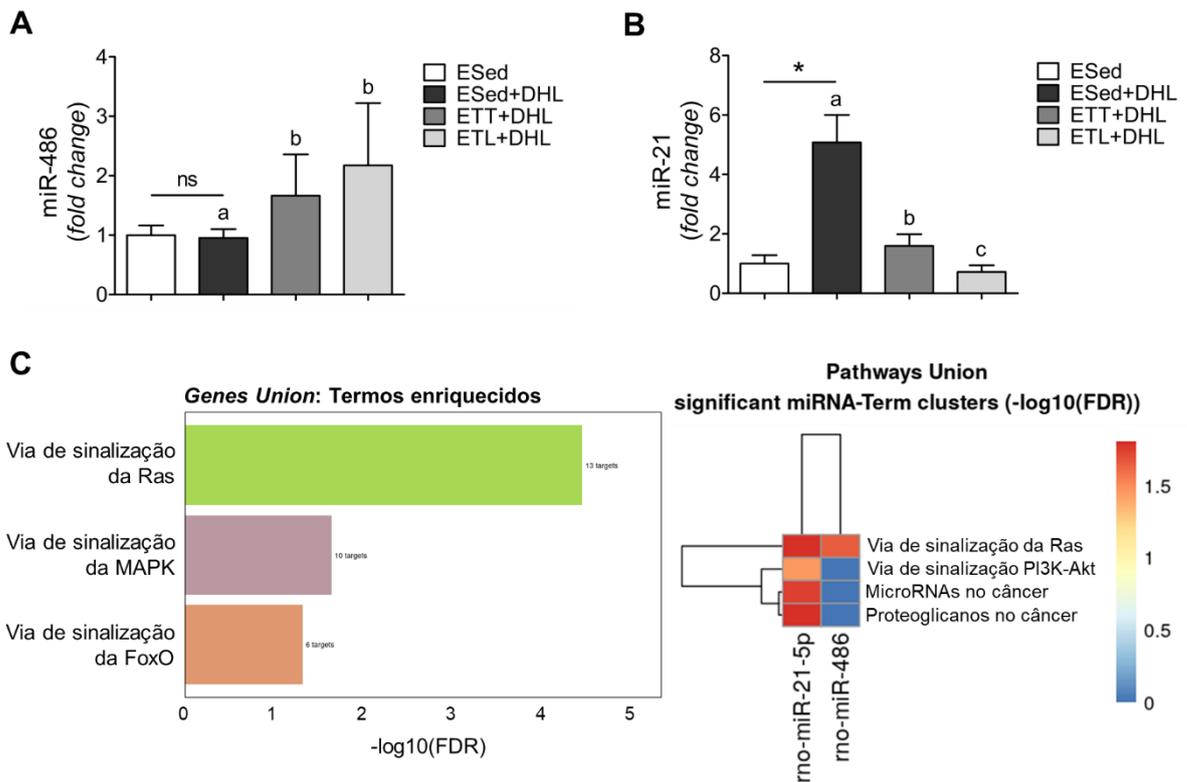


Figura 23. Quantificação por qPCR da expressão dos microRNAs miRNA-486 (A) e miRNA-21 (B) no músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$). Análise de predição funcional dos microRNAs miR-21 e miR-486 realizada pela plataforma online DIANA-miRPath v.4 (C). A barra de cores indica a intensidade da participação dos microRNAs com as vias descritas.

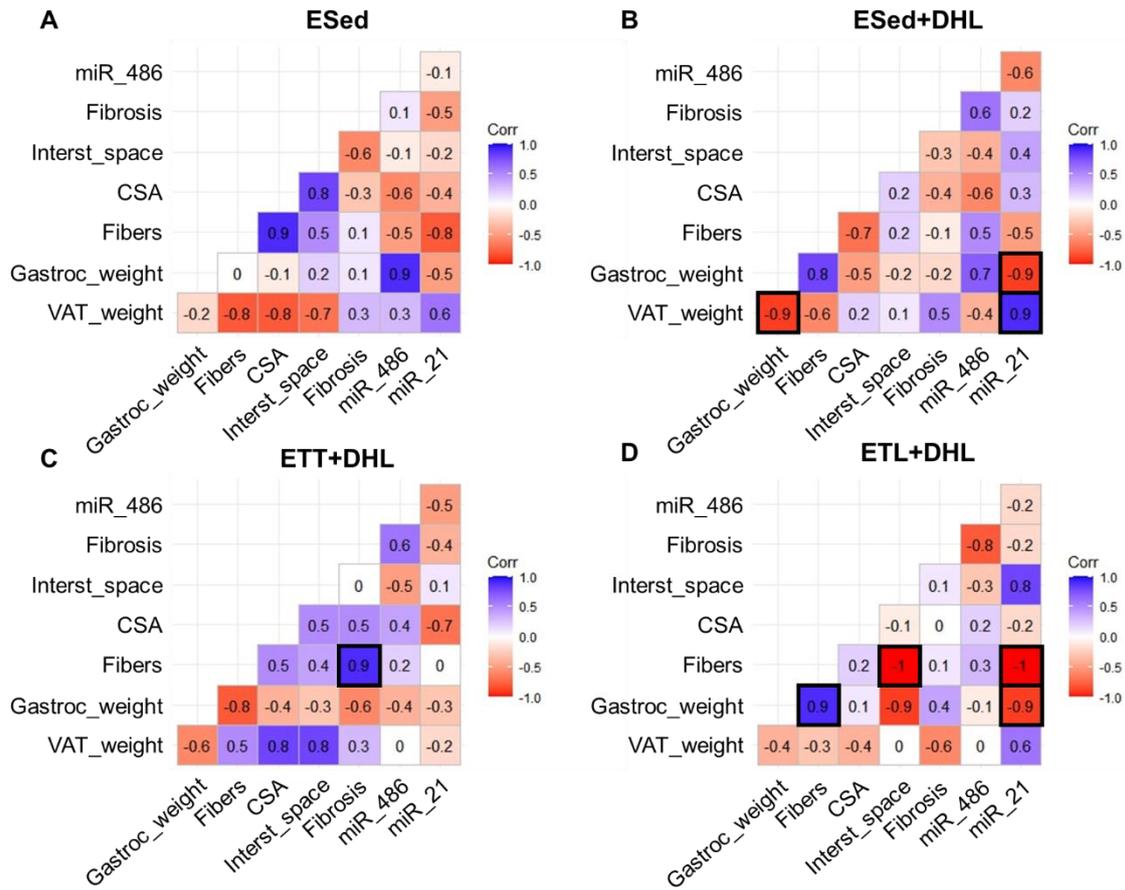


Figura 24. Análise de correlações múltiplas entre os parâmetros de composição corporal, estrutura muscular e expressão dos microRNAs miR-486 e miR-21 dos grupos envelhecido sedentário (ESed) (A), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL) (B), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) (C) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL) (D). Correlações positivas estão indicadas em azul, e negativas em vermelho. Tons escuros de cada cor indicam maiores valores de r. Os valores de p foram obtidos através do teste de correlações de Spearman. As correlações significativas estão destacadas pelo quadrado de bordas mais grossas ($p < 0.05$). As análises foram feitas utilizando o pacote corrplot do R.

6.4 ESTUDO PRINCIPAL *IN VIVO* - EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO TERAPÊUTICO OU AO LONGO DA VIDA SOBRE ALTERAÇÕES NO VENTRÍCULO CARDÍACO NOS ESTÁGIOS INICIAIS DO ENVELHECIMENTO ASSOCIADO À OBESIDADE

6.4.1 Análise histológica do ventrículo cardíaco

Os resultados da análise do peso do ventrículo e parâmetros histológicos demonstraram que a dieta hiperlipídica e os treinamentos não causaram alterações no número de fibras, ASF e EPVE dos animais envelhecidos até os 14 meses de idade (Tabela 5 e Figuras 25A e 25B). Por outro lado, a dieta hiperlipídica determinou aumento da fibrose intersticial medida através da área marcada por Tricrômio de Masson em comparação ao grupo submetido à dieta controle. Em contrapartida, ambos os treinamentos reduziram a área fibrótica em comparação ao grupo ESed+DHL. É importante ressaltar que o grupo que realizou o treinamento ao longo da vida apresentou o melhor resultado para a variável fibrose, como pode ser observado nas imagens representativas (Figura 25C).

Tabela 5. Peso do ventrículo e parâmetros histológicos e morfométricos do ventrículo esquerdo dos grupos experimentais.

Variável	ESed	ESed+DHL	ETT+DHL	ETL+DHL	T de Student	Anova one-way
Ventrículo (g/100g MC)	0.27±0.04	0.28±0.04	0.26±0.05	0.26±0.07	0.712	0.830
Nº de fibras	167.0±8	160.4±10	165.3±11	165.3±12	0.156	0.623
ASF (µm ²)	761.9±119	712.3±83	641.5±79	670.3±95	0.449	0.279
EPVE (mm)	1.88±0.09	1.84±0.07	1.87±0.07	1.86±0.09	0.443	0.855
Fibrose (%)	3.12±0.00*	7.82±0.00 ^a	6.20±0.00 ^b	1.72±0.00 ^c	<0.001	<0.0001

ASF, área seccional da fibra; EPVE, espessura da parede do ventrículo esquerdo; ESed, envelhecido sedentário; ESed+DHL, envelhecido sedentário submetido à dieta hiperlipídica; ETT+DHL, envelhecido treinado terapeuticamente e submetido à dieta hiperlipídica; ETP+DHL, envelhecido treinado preventivamente e submetido à dieta hiperlipídica. Teste t de Student entre os grupos ESed e ESed+DHL; ANOVA one-way, a,b,c, letras diferentes indicam diferença estatística comparações

múltiplas pelo teste de Bonferroni entre os grupos ESed+DHL, ETT+DHL e ETP+DHL. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

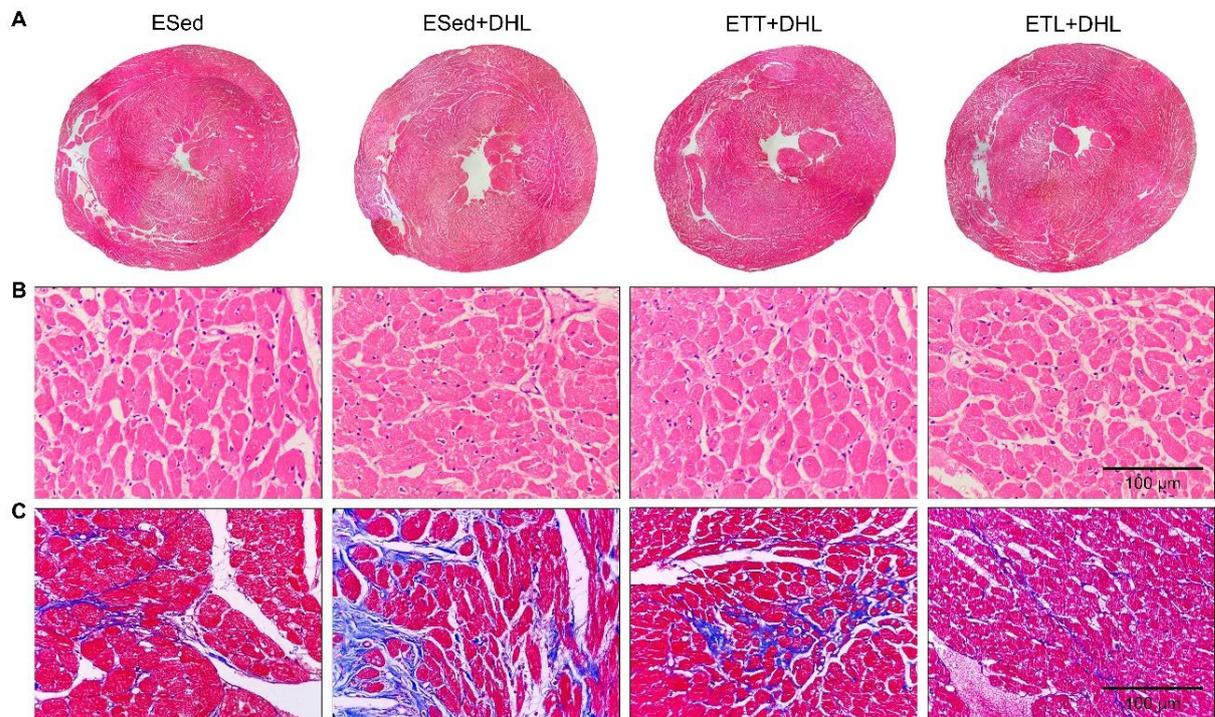


Figura 25. Fotomicrografias representativas da análise histológica do ventrículo esquerdo dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Corte transversal total dos ventrículos cardíacos evidenciando as paredes ventriculares (4x) (A), área seccional das fibras (200x) (B). A marcação em azul evidencia as áreas de fibrose intersticial pela coloração de Tricrômio de Masson (200x) (C). As fotos foram obtidas com câmera acoplada ao microscópio nos respectivos aumentos.

6.4.2 Perfil inflamatório no ventrículo cardíaco

Os animais envelhecidos e expostos à dieta hiperlipídica apresentaram aumento significativo da expressão de NF- κ B no ventrículo cardíaco (Figura 26A e 26B), acompanhado do aumento nos níveis teciduais de TNF- α (Figura 26C) em comparação ao grupo ESed. Por outro lado, apenas o protocolo de treinamento ao longo da vida reduziu a marcação de NF- κ B e níveis de TNF- α em comparação ao grupo ESed+DHL. Não foram observadas diferenças estatísticas nas análises das citocinas IL-6 e IL-10 (Figuras 26D e 26E).

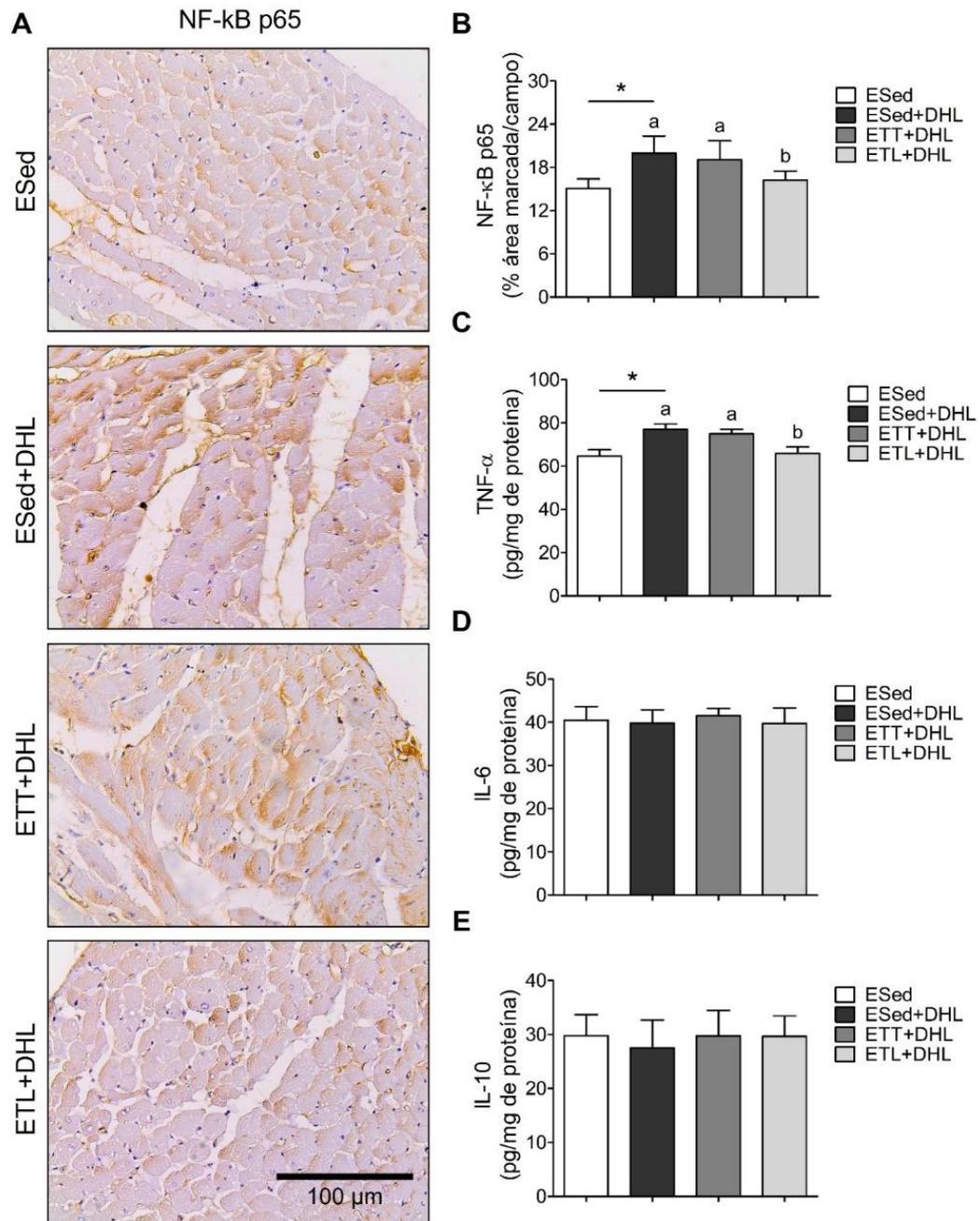


Figura 26. Avaliação de marcadores inflamatórios no ventrículo cardíaco através da imuno-marcação de NF-kB no ventrículo cardíaco representada pelas fotomicrografias (200x) (A), e quantificação da área marcada por NF-kB (B); Quantificação por ELISA dos níveis de TNF- α (C), IL-6 (D) e IL-10 (E) no homogenato do ventrículo cardíaco dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).

6.4.3 Capacidade antioxidante enzimática no ventrículo cardíaco

A dieta hiperlipídica reduziu a atividade das enzimas SOD (Figura 27E), catalase (27D) e GPx (Figura 27C), além de reduzir também a expressão da enzima GPx-1 no ventrículo cardíaco (Figuras 27A e 27B), em comparação grupo ESed. Ambos os treinamentos foram eficazes em aumentar a atividade das enzimas catalase e SOD, e aumentar a atividade e expressão da enzima GPx em comparação ao grupo ESed+DHL. Entre os grupos treinados, o grupo ETL+DHL apresentou os maiores valores para a atividade das enzimas catalase, GPx e expressão tecidual da enzima GPx-1.

6.4.4 Marcadores de estresse oxidativo no ventrículo cardíaco

A dieta hiperlipídica aumentou a marcação no ventrículo cardíaco de nitrotirosina (Figura 28A e 28C), 8-OHdG (Figura 28B e 28D), associado ao aumento de proteínas carboniladas (Figura 28E) e peroxidação lipídica (Figura 28F) dos animais envelhecidos, em comparação ao grupo sedentário alimentado com a dieta controle. Em contrapartida, ambos os grupos envelhecidos treinados apresentaram redução do nível de proteínas carboniladas, e apenas o grupo ETL+DHL apresentou redução da marcação de nitrotirosina, 8-OHdG e nos níveis teciduais de TBARS.

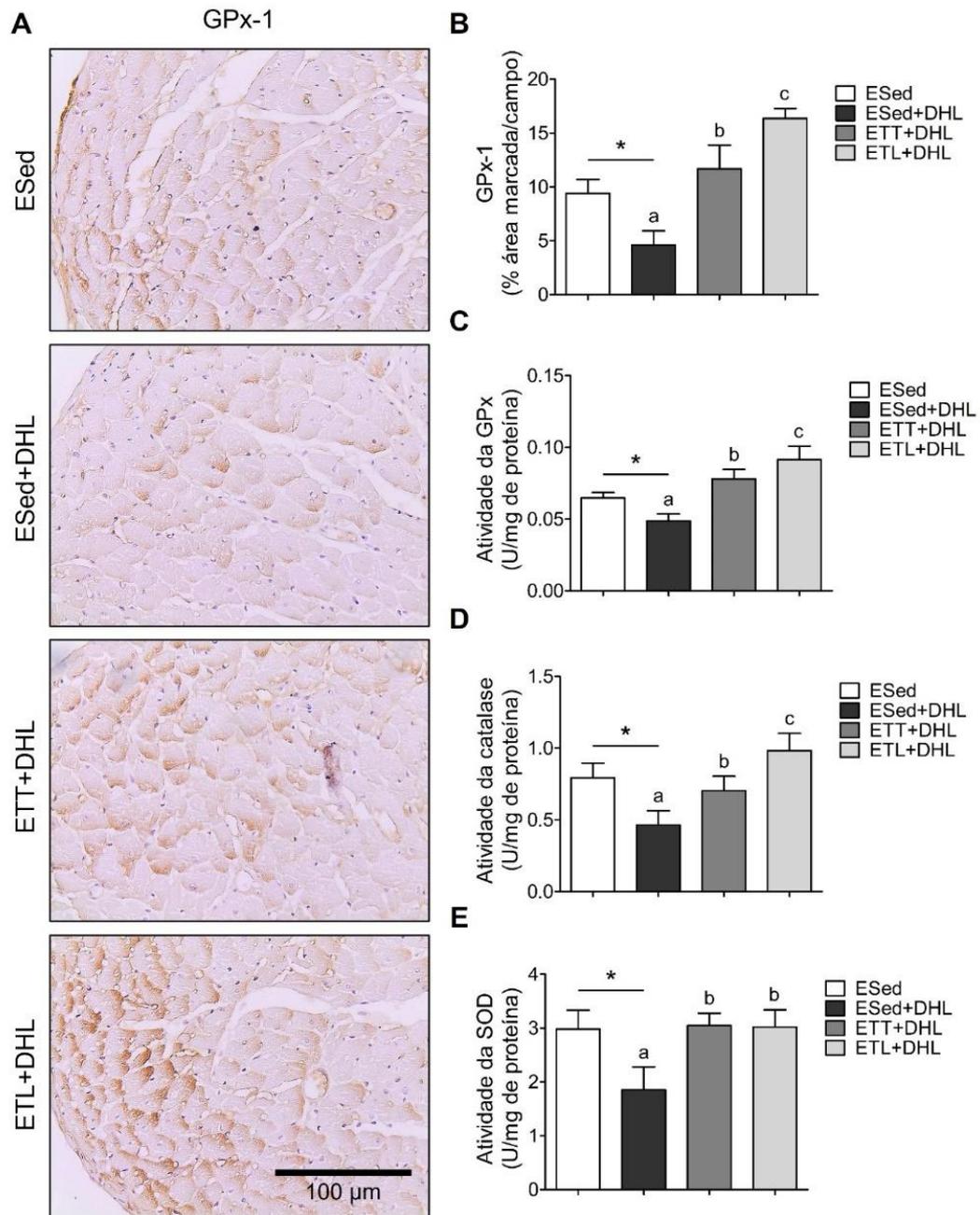


Figura 27. Avaliação da capacidade antioxidante no ventrículo cardíaco através da análise da imunomarcagem de GPx-1 representadas pelas fotomicrografias (200x) (A) e quantificação da área marcada por GPx-1 no tecido muscular (B), e atividade da GPx (C), catalase (D) e SOD (E) no homogenato do ventrículo dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$). SOD, superóxido dismutase; GPx, glutathione peroxidase.

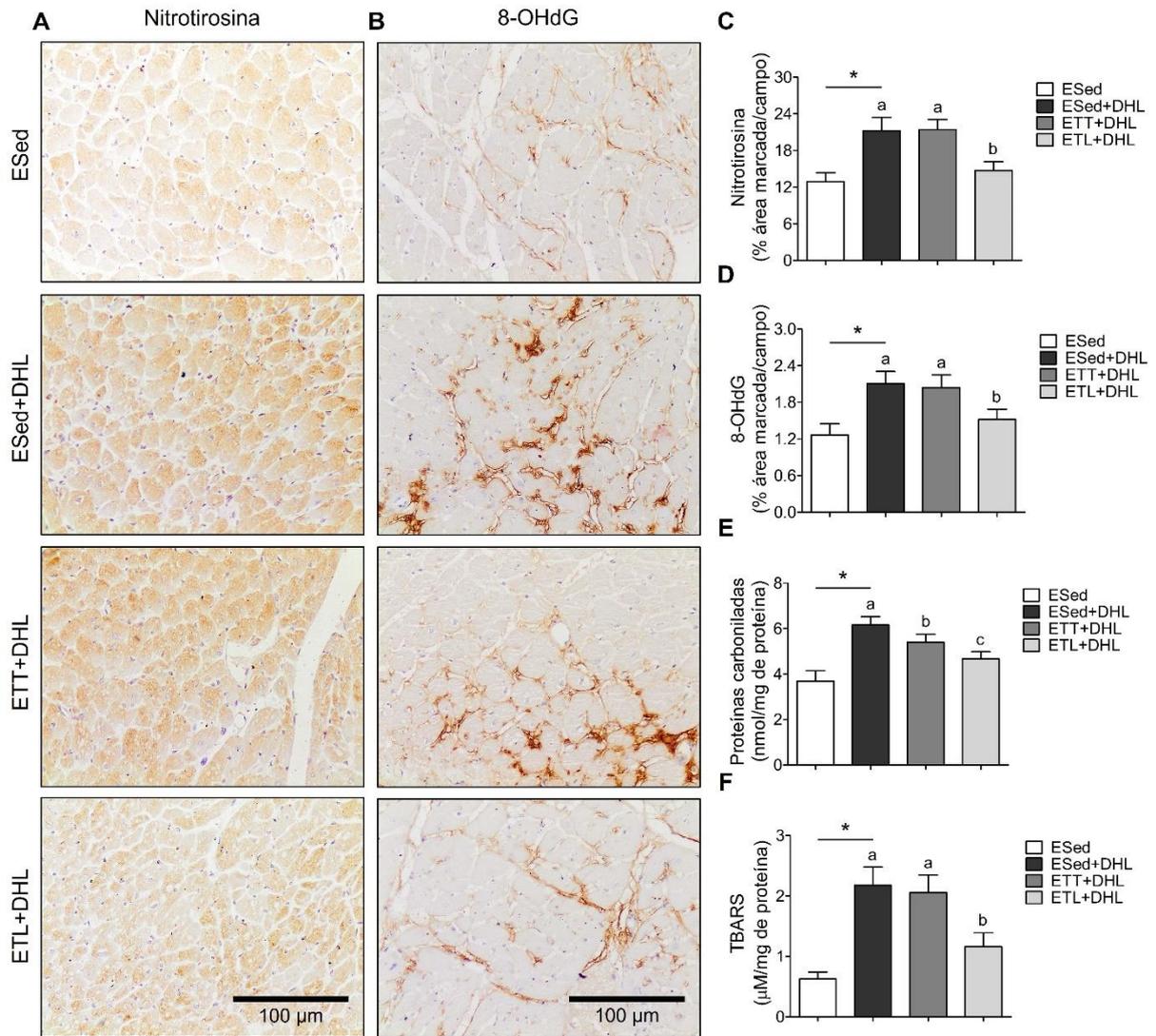


Figura 28. Quantificação dos marcadores de estresse oxidativo nitrotirosina (A e C), 8-OHdG (B e D), proteínas carboniladas (E) e TBARS (F) no ventrículo cardíaco dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Fotomicrografias representativas das imunomarcações para nitrotirosina (A) e 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina - 8-OHdG (B), através da técnica de imuno-histoquímica obtidas com câmera acoplada em microscópio no aumento de 100x. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).

6.4.5 Função mitocondrial no ventrículo cardíaco

A análise da função mitocondrial no ventrículo cardíaco evidenciou que a dieta hiperlipídica reduziu a atividade da enzima citrato sintase (Figura 29) dos animais envelhecidos em comparação ao grupo mantido na dieta controle. Por sua vez, o treinamento físico, independente do protocolo de duração, atenuou os efeitos da dieta em todos os parâmetros estudados. Além disso, o grupo ETL+DHL apresentou o maior aumento da atividade da enzima citrato sintase.

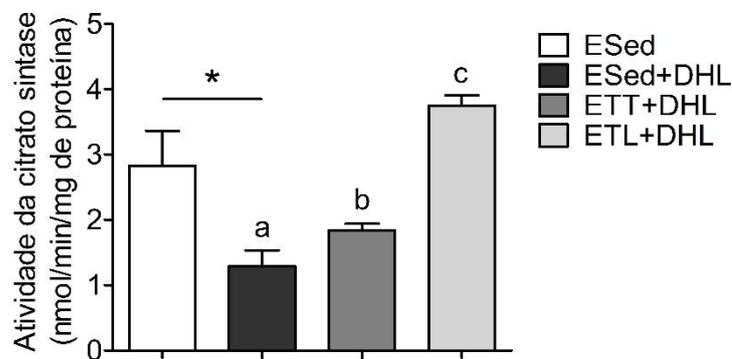


Figura 29. Avaliação da função mitocondrial pela dosagem da atividade da enzima citrato sintase no ventrículo cardíaco dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os grupos ESed vs ESed+DHL foram feitas através do teste t de Student (* $p < 0.05$). As análises entre os grupos ESed+DHL vs ETT+DHL vs ETL+DHL foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, e letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$).

6.4.6 Resumo dos achados do estudo principal *in vivo*

Tabela 6. Resumo dos resultados obtidos no estudo principal *in vivo* estratificados pelos efeitos da dieta hiperlipídica (DHL), treinamento terapêutico (TT) e treinamento ao longo da vida (TL) sobre os parâmetros avaliados.

TÓPICO	PARÂMETRO	DHL	TT	TL
Composição corporal	Peso do TAV	↑	-	↓
	Peso do gastrocnêmio	↓	↑	↑↑
Análise histológica (músculo gastrocnêmio)	Nº de fibras	-	-	-
	ASF	↓	↑	↑↑
	Espaço intersticial	↑	↓	↓↓
	Fibrose	↑	↓	↓↓
Perfil inflamatório (músculo gastrocnêmio)	NF-κB (IHQ)	↑	↓	↓↓
	TNF-α	↑	↓	↓
	IL-6	↑	-	↓
	IL-10	↓	↑	↑↑
Metabolismo muscular (músculo gastrocnêmio)	Citrato sintase	↓	↑	↑↑
	Triglicerídeos	↑	↓	↓↓
	Glicogênio	↓	↑	↑
Capacidade antioxidante (músculo gastrocnêmio)	GPx-1 (IHQ)	↓	↑	↑↑
	Atividade da GPx	↓	↑	↑↑
	Atividade da Catalase	↓	-	↑
	Atividade da SOD	↓	-	↑
Marcadores de estresse oxidativo	Nitrotirosina (IHQ)	↑	↓	↓↓
	8-OHdG (IHQ)	↑	↓	↓↓

(músculo gastrocnêmio)	Proteínas carboniladas	↑	↓	↓↓
	TBARS	↑	↓	↓
Expressão de mRNAs (músculo gastrocnêmio)	<i>TNF-α</i>	↑	↓	↑
	<i>IL-6</i>	↑	↓	↑
	<i>IL-10</i>	↓	↑	↑↑
	<i>Klotho</i>	↓	↑	↑↑
	<i>NRF2</i>	↓	↑	↑
	<i>GPx-1</i>	↓	↑	↑↑
	<i>Catalase</i>	↓	↑	↑
	<i>SOD-1</i>	↓	↑	↑
	<i>HO-1</i>	-	-	-
	<i>AKT</i>	↓	↑	↑↑
	<i>PI3K</i>	↓	↑	↑↑
	<i>MURF-1</i>	↑	↓	↓
	<i>Atrogin-1</i>	↑	↓	↓
Expressão de microRNAs (músculo gastrocnêmio)	miR-486	↓	↑	↑
	miR-21	↑	↓	↓↓
Análise histológica (ventrículo cardíaco)	Peso do ventrículo	-	-	-
	Nº de fibras	-	-	-
	ASF	-	-	-
	EPVE	-	-	-
	Fibrose	↑	↓	↓↓
Perfil inflamatório (ventrículo cardíaco)	NF-κB (IHQ)	↑	-	↓
	TNF-α	↑	-	↓

	IL-6	-	-	-
	IL-10	-	-	-
Capacidade antioxidante e função mitocondrial (ventrículo cardíaco)	Citrato sintase	↓	↑	↑↑
	GPx-1 (IHQ)	↓	↑	↑↑
	Atividade da GPx	↓	↑	↑↑
	Atividade da Catalase	↓	↑	↑↑
	Atividade da SOD	↓	↑	↑
Marcadores de estresse oxidativo (ventrículo cardíaco)	Nitrotirosina (IHQ)	↑	-	↓
	8-OHdG (IHQ)	↑	-	↓
	Proteínas carboniladas	↑	↓	↓↓
	TBARS	↑	-	↓

DHL, dieta hiperlipídica, TT; treinamento terapêutico; TL, treinamento ao longo da vida; TAV, tecido adiposo visceral; ASF, área seccional da fibra; IHQ, imuno-histoquímica; EPVE, espessura da parede do ventrículo esquerdo; ↑, aumento do parâmetro estudado; ↓, redução do parâmetro estudado; -, ausência de efeito no parâmetro estudado.

6.5 ESTUDO PRINCIPAL *IN VITRO* – ANÁLISE DOS EFEITOS SISTÊMICOS DO TREINAMENTO FÍSICO, ENVELHECIMENTO E OBESIDADE - EXPOSIÇÃO DE CULTURAS CELULARES DE MACRÓFAGOS E MIOBLASTOS AO SORO DOS GRUPOS DO ESTUDO *IN VIVO*

6.5.1 Avaliação da viabilidade celular frente a exposição com os soros

A exposição com o soro dos animais dos grupos experimentais não reduziu a viabilidade celular das culturas primárias de macrófagos em comparação ao grupo exposto ao soro fetal bovino 10% (SFB), e todos os grupos apresentaram maior viabilidade celular quando comparados ao grupo controle Triton (Figura 30A e 30B).

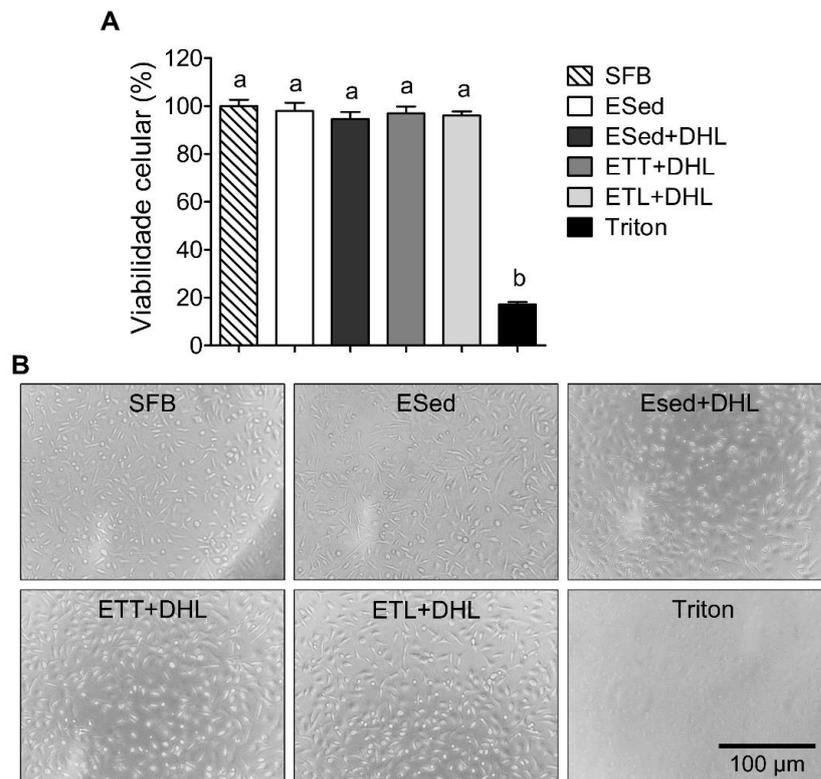


Figura 30. Viabilidade celular de macrófagos primários frente à exposição com os soros dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL), pelo ensaio de MTT (A). Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais (B). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As análises foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos. SFB, soro fetal bovino.

6.5.2 Produção de H₂O₂ e nitritos pelos macrófagos primários

A exposição ao soro do grupo ESed+DHL causou aumento da produção de H₂O₂ e nitritos pelos macrófagos primários (Figura 31A e 31B). Em contrapartida, ambos os marcadores tiveram suas concentrações reduzidas no sobrenadante das culturas expostas ao soro do grupo ETL+DHL (Figura 31A e 31B). Vale notar que a exposição ao soro dos animais envelhecidos, independente da condição associada, causou aumento de ambos os marcadores quando comparados ao grupo SFB.

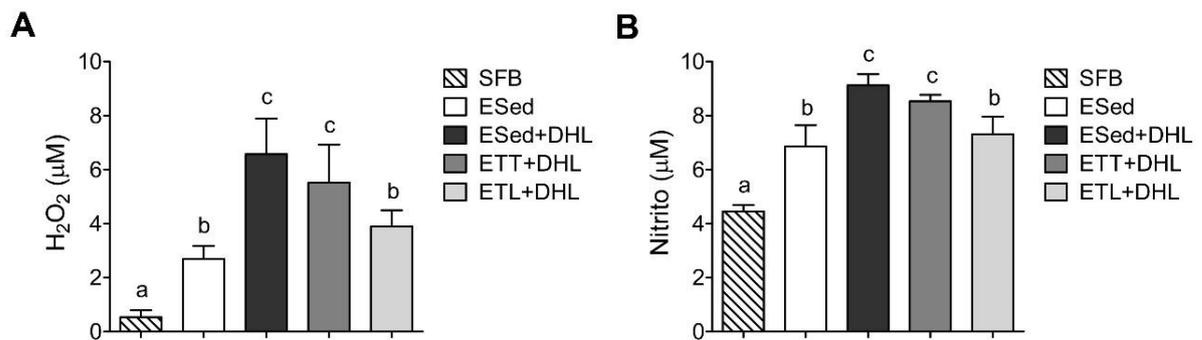


Figura 31. Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio – H₂O₂ (A) e nitritos (B) no sobrenadante das culturas primárias dos macrófagos expostos aos soros dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média. As análises foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos. SFB, soro fetal bovino.

6.5.3 Expressão de genes envolvidos na inflamação

Os macrófagos expostos ao soro dos animais que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram regulação positiva da expressão dos genes das citocinas MCP-1, TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Figura 32A, 32B, 32C e 32D) em comparação aos demais grupos. Em contrapartida, as células expostas ao soro de ambos os grupos treinados apresentaram *downregulation* dos genes para MCP-1, TNF- α e IL-6 (Figura 32A, 32B e 32C), ao passo que o soro dos mesmos grupos determinou aumento da expressão do gene da citocina IL-10 (Figura 32E). Adicionalmente, apenas a exposição ao soro

do grupo ETL+DHL causou redução da expressão do gene da citocina IL-1 β (Figura 32D), e os macrófagos expostos ao soro desse mesmo grupo apresentaram os melhores resultados entre os grupos treinados para os genes das citocinas MCP-1, TNF- α , IL-6 e IL-10. A exposição aos soros dos animais, independente dos grupos, causou aumento da expressão dos genes dos marcadores MCP-1, TNF- α e IL-6 em comparação ao grupo SFB.

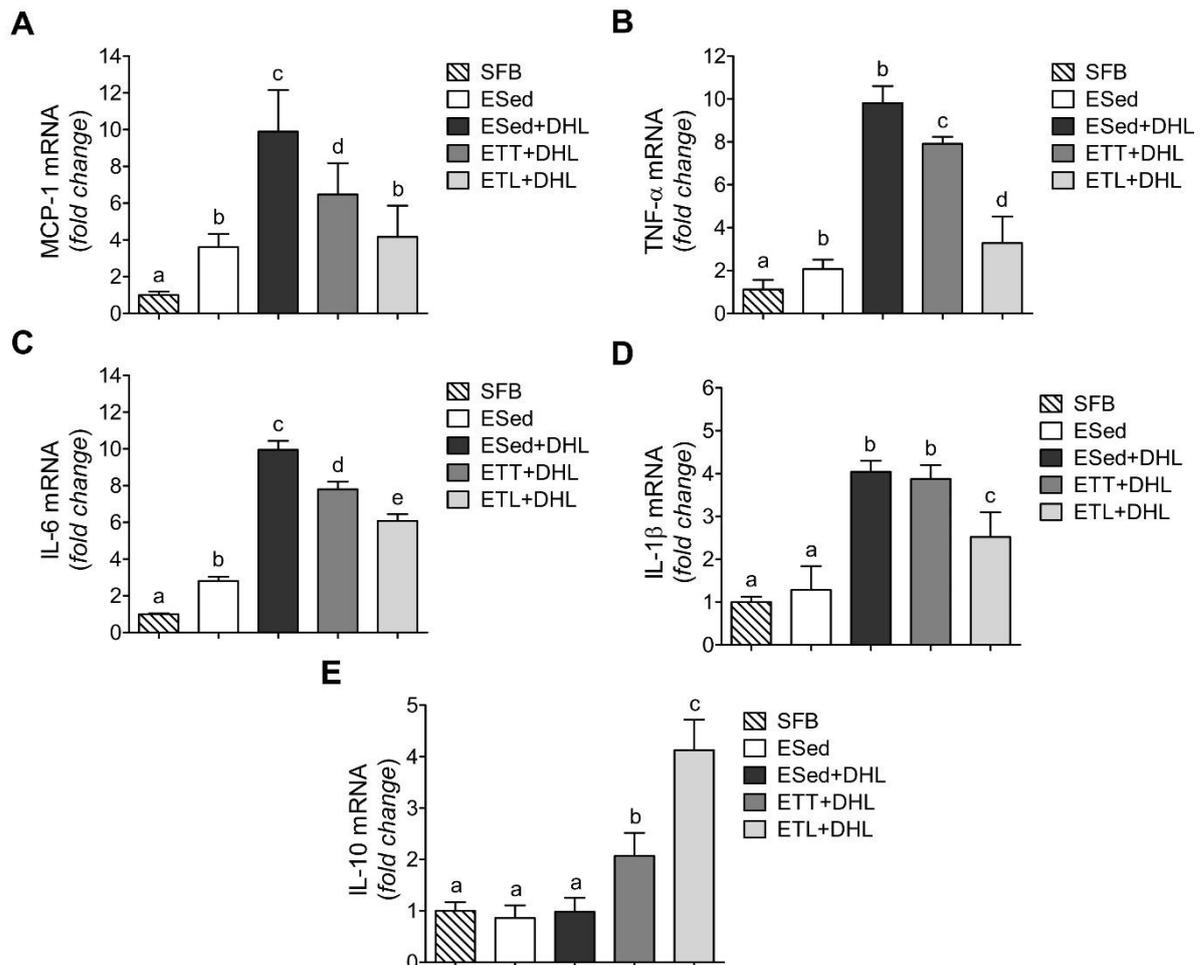


Figura 32. Quantificação por qPCR da expressão dos genes das citocinas envolvidas na resposta inflamatória MCP-1 (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-1 β (D), IL-10 (E) e TGF- β (F) dos macrófagos expostos aos soros dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média da expressão relativa considerando o controle soro fetal bovino (Fold change). As análises foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos. SFB, soro fetal bovino.

6.5.4 Expressão de genes envolvidos no catabolismo proteico muscular

A exposição de culturas primárias de mioblastos ao soro dos animais sedentários que receberam a dieta hiperlipídica causou aumento da expressão dos genes que codificam as proteínas de função catabólica MURF-1 (Figura 33A) e Atrogin-1 (Figura 33B). Por outro lado, o soro dos grupos treinados causou *downregulation* da expressão gênica de MURF-1. Apenas o soro do grupo ETL+DHL aumentou a expressão do gene da AKT (Figura 33D), e reduziu a expressão gênica de Atrogin-1 comparado ao grupo ESed+DHL, além de ter causado a maior redução da expressão gênica de MURF-1 entre os grupos de soros de animais treinados. A exposição aos soros dos animais envelhecidos, independente dos grupos, causou aumento da expressão de Atrogin-1 em comparação ao grupo SFB. Não foram observadas diferenças significativas na expressão do gene para PI3K (Figura 33C)

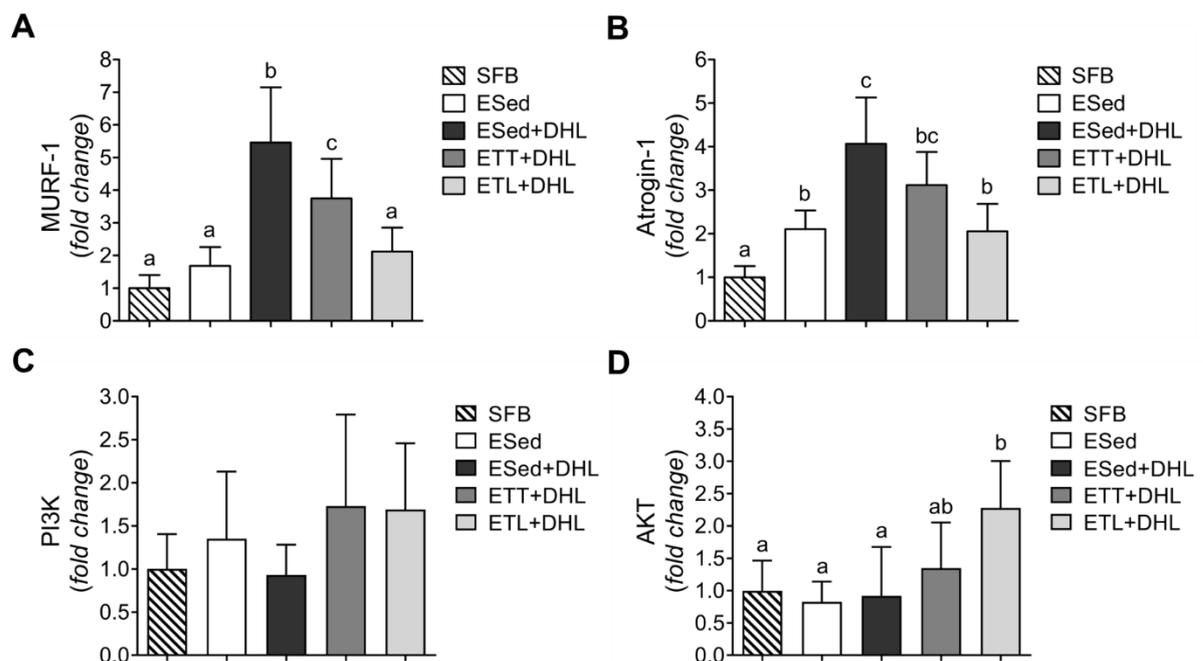


Figura 33. Quantificação por qPCR da expressão dos genes das proteínas envolvidas na proteólise MURF-1 (A) e Atrogin-1 (B) dos mioblastos expostos aos soros dos grupos experimentais envelhecido sedentário (ESed), envelhecido sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) (ESed+DHL), envelhecido treinado terapeuticamente e alimentado com DHL (ETT+DHL) e envelhecido treinado ao longo da vida e alimentado com DHL (ETL+DHL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As análises foram feitas através do teste ANOVA one-way, seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos. SFB, soro fetal bovino.

7 DISCUSSÃO

7.1 ESTUDO PILOTO

A maior parte dos estudos voltados às alterações de composição corporal e declínio morfofuncional muscular causadas pelo envelhecimento em roedores utilizam idades iguais ou superiores a 18 meses nos modelos experimentais (ARU et al., 2019; REZENDE., 2020). No presente estudo foram observadas pequenas alterações de performance física, distribuição da composição corporal e parâmetros estruturais e de balanço oxidativo musculares que já são identificáveis aos 14 meses de idade. Nessa idade, ratos Wistar machos ainda não são considerados idosos, mas os eventos iniciais e insidiosos do envelhecimento que precederiam as grandes alterações musculares presentes na sarcopenia dependente da idade já podem ser observados e avaliados.

No presente estudo foi observado um aumento da adiposidade abdominal dos animais ao longo do envelhecimento, caracterizada por um padrão de distribuição concentrado na adiposidade visceral que é frequentemente associada ao maior risco de desenvolvimento de doenças cardiometabólicas (RUIZ-CASTEL, 2021). Evidências na literatura apontam para uma alteração na composição corporal de ratos especialmente entre 8 e 24 meses, onde há o aumento significativo da massa corporal, de modo que o percentual de massa magra cai enquanto o percentual de adiposidade aumenta, indicando para uma troca de massa magra por massa gorda que reflete no aumento idade dependente da razão entre gordura e massa magra (LI et al., 2018).

Interessantemente, ao contrário do observado nos depósitos viscerais de tecido adiposo, o depósito de tecido adiposo subcutâneo analisado em nosso estudo apresentou uma redução significativa aos 20 meses de idade. Características dicotômicas inerentes a ambos os tipos de depósitos (*i.e.*, subcutâneo e visceral) contribuem para efeitos opostos e, conseqüentemente, desfechos metabólicos diferentes frente a alterações de sua razão de distribuição corporal (SUÁREZ-CUENCA et al., 2021; VON BANK et al., 2021). A expressão de citocinas pró-inflamatórias é maior nos depósitos de TAV (SPOTO et al., 2014), enquanto a expressão da adiponectina, adipocina relacionada ao aumento da sensibilidade a

insulina e efeitos anti-inflamatórios e de proteção cardiovascular, é maior no TASC (NGUYEN et al., 2020). Nesse sentido, o transplante de TASC para dentro do TAV em camundongos foi eficaz em melhorar a homeostase de glicose e contribuir para a perda de peso, evidências que apontam para efeitos benéficos e protetivos do TASC (TRAN et al., 2008). Frente ao exposto, a redução do TASC, e aumento do TAV observados no presente trabalho representa a mudança da contribuição de ambos os depósitos para a adiposidade, padrão característico do envelhecimento (VON BANK et al., 2021), e que possivelmente estaria associada à patogênese de agravos metabólicos que, com o passar do tempo, contribuem para o surgimento e progressão de alterações musculares esqueléticas.

Até os 14 meses de idade, os ratos mantiveram um ritmo de aumento da massa corporal total associado à manutenção da adiposidade visceral, mas não subcutânea, ao passo que o peso da massa magra e o peso médio do gastrocnêmio apresentam um leve, porém significativo declínio, mantido até os 20 meses. De maneira semelhante, em estudo onde foram comparados ratos machos de 8, 18 e 26 meses, os autores observaram que aos 18 meses ocorre significativo aumento da massa corporal, acompanhado do aumento da adiposidade e redução da massa magra, além da redução do tempo até exaustão no teste de corrida (LI et al., 2018).

Através do teste de corrida máximo em esteira, foi possível observar que aos 14 meses de idade os animais apresentaram redução do tempo no teste, tendência que se manteve até os 20 meses. Estudos anteriores já demonstraram que aos 18 meses são observadas alterações expressivas de desempenho físico medidas pelos testes de plano inclinado, *grip power* e teste de corrida máximo (XUE et al., 2016; SELDEEN et al., 2018; LI et al., 2018). A redução do desempenho físico durante o envelhecimento é reflexo de diversos fatores causais que parecem estar envolvidos na etiologia da sarcopenia, e dentre eles destaca-se o estresse oxidativo por sua íntima relação com o envelhecimento (AGUILAR-ALONSO et al., 2018).

Sendo assim, após a identificação de alterações de performance e composição corporal aos 14 meses, buscou-se investigar a presença de prejuízos musculares que poderiam estar associados a estes achados. Para tal, os músculos gastrocnêmios dos ratos nos tempos 4, 8, 12 e 14 meses foram destinados às análises de balanço oxidativo. O músculo gastrocnêmio do rato é um importante flexor plantar que atua durante a fase de impulsão da marcha, amplamente usado em estudos de

locomoção e alterações musculares e neuromusculares (CORNACHIONE et al., 2011).

A identificação dos eventos iniciais que precedem a instauração da sarcopenia é de fundamental importância, pois permite a tomada de decisão sobre quais mecanismos fisiopatológicos merecem atenção em seus estágios iniciais. Em nosso modelo, identificou-se que as primeiras modificações musculares se iniciam aos 14 meses, idade na qual os ratos apresentaram redução da performance física medida pelo teste máximo de corrida em esteira, associado à redução da massa magra total e no peso do gastrocnêmio. Ao mesmo tempo, os animais apresentaram aumento dos níveis de marcadores de lesão oxidativa e redução da atividade antioxidante da enzima GPx no músculo, apontando para um desbalanço oxidativo tecidual.

Um dos principais mecanismos envolvidos na redução da massa muscular no envelhecimento se baseia na maior atividade do sistema ubiquitina proteassoma (WU et al., 2023). O aumento da expressão das ubiquitina ligases MURF-1 e Atrogin-1 em animais idosos já foi relacionado à redução da ASF, indicando maior degradação proteica e atrofia muscular (SHANG et al., 2020). A super expressão isolada de MURF-1 é suficiente para indução da atrofia muscular, e o estudo de proteômica quantitativa já demonstrou que a MURF-1 regula cerca de 169 sítios de ubiquitinação em mais de 50 proteínas musculares, que envolvem proteínas constitutivas estruturais, e proteínas envolvidas no metabolismo de maneira geral (BAEHR et al., 2021).

No presente estudo, os animais apresentaram aumento dos marcadores de oxidação de lipídios e proteínas, acompanhado pela redução da atividade da enzima glutathiona peroxidase no músculo gastrocnêmio aos 14 meses de idade. O desbalanço oxidativo é um quadro comumente associado ao envelhecimento e aos desfechos deletérios na estrutura e função muscular (BARREIRO et al., 2006). O processo de envelhecimento é associado à progressiva redução da capacidade antioxidante dos tecidos, fator que contribui para interação das espécies reativas de oxigênio (ERO) com as diferentes moléculas celulares, causando lesões muitas vezes irreversíveis (PETERSEN; SMITH, 2016; JONES et al., 2002). Nesse sentido, o estresse oxidativo muscular observado aos 14 meses pode ter contribuído para o prejuízo da função muscular e, conseqüentemente, ao declínio do desempenho físico observado na mesma idade.

Após a identificação do momento em que as alterações musculares se iniciam e parecem afetar a performance física, buscou-se avaliar os efeitos do envelhecimento associado ao treinamento físico realizado ao longo da vida dos animais até os 14 meses de idade. Em adição aos resultados observados anteriormente em resposta ao envelhecimento (i. e. aumento da massa corporal e adiposidade visceral, redução do peso do gastrocnêmio e elevação dos marcadores de estresse oxidativo) comparado aos animais jovens, foi possível observar o aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 no músculo dos ratos envelhecidos até os 14 meses. Camundongos envelhecidos apresentam aumento da expressão proteica muscular de TNF- α , além de redução da força e massa do músculo gastrocnêmio (WU et al., 2023), e o bloqueio farmacológico do TNF- α previne a sarcopenia e aumenta a longevidade em modelo animal de envelhecimento (SCIORATI et al., 2020).

A inflamação crônica e de baixo grau é um dos achados do envelhecimento e caracteriza o chamado *inflammaging*, um conhecido fator de risco para morbimortalidade (LI et al., 2023). Esse quadro sustentado de inflamação é um fator crucial para o desenvolvimento dos agravos aos diferentes sistemas fisiológicos em resposta ao envelhecimento natural (SANADA et al., 2018). No músculo esquelético, o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias está relacionado à resistência anabólica (TEZZE et al., 2023), termo que caracteriza o “cegamento” das vias anabólicas no músculo em resposta, dentre outros fatores, à redução da sinalização molecular anabólica, prejuízo do recrutamento capilar, resistência à insulina e menor biodisponibilidade de aminoácidos (ARAGON et al., 2023). Dessa forma, a inflamação pode afetar negativamente a sensibilidade do sinal anabólico no músculo esquelético. Em nível molecular, citocinas pró-inflamatórias, especialmente o TNF- α , podem impedir a síntese proteica ao impedir a fosforilação das proteínas envolvidas no eixo PI3K/AKT/mTOR (LANG et al., 2002; TEZZE et al., 2023).

Se oposto aos efeitos do envelhecimento, o protocolo de treinamento físico adotado no presente estudo causou melhora da composição corporal ao reduzir o peso corporal total e adiposidade visceral, e aumentar o peso e ASF do músculo gastrocnêmio dos ratos envelhecidos. Os efeitos do treinamento aeróbico sobre a composição corporal são conhecidos e deve-se, essencialmente, à geração de um desbalanço energético causado pelo maior gasto de energia, associado à ativação de vias lipolíticas (KOLNES et al., 2021). Além disso, o treinamento físico aeróbico contribui para o aumento da massa muscular ao estimular vias anabólicas no músculo

esquelético (KONOPKA, HARBER, 2014). Nesse sentido, a realização do treinamento físico mostra-se como ferramenta eficaz contra a resistência anabólica observada na condição de envelhecimento (TEZZE et al., 2023).

A melhora da estrutura muscular observada no treinamento pode, em parte, estar associada à melhora do perfil inflamatório e oxidativo do músculo gastrocnêmio em resposta ao treinamento físico. Os animais submetidos ao treinamento físico, independentemente da idade, apresentaram redução dos níveis de TNF- α e aumento da concentração de IL-10 muscular. Esse resultado aponta para a capacidade do treinamento físico em modular a resposta inflamatória tecidual. De fato, já foi demonstrado que a prática regular de exercício físico reduz marcadores pró-inflamatórios, e aumenta os níveis de IL-10 (LI et al., 2022). Ademais, dada a importância do estresse oxidativo no contexto da sarcopenia, a redução dos níveis de TBARS e proteínas carboniladas, somada ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes catalase e GPx, pode ter contribuído para o balanço oxidativo muscular e dessa forma, proteção de sua estrutura e função. Estudos de proteômica no músculo de ratos envelhecidos e submetidos ao treinamento aeróbico de longo prazo evidenciaram que os animais treinados apresentaram melhora da força muscular e aumento do peso do músculo, associado à melhora tanto da capacidade antioxidante como da resposta inflamatória no músculo (GAO et al., 2020).

7.2 ESTUDO PRINCIPAL

De acordo com o nosso conhecimento, este se trata do primeiro estudo que avaliou os efeitos do treinamento físico aeróbico de moderada intensidade, realizado ao longo da vida ou de maneira terapêutica, sobre diferentes parâmetros das musculaturas esquelética e cardíaca em modelo animal que reproduz a associação entre envelhecimento natural e obesidade induzida por dieta. Como ilustrado na figura 34, nossos achados evidenciaram a formação *in situ* de um ambiente pró-inflamatório e pró-oxidativo resultante da obesidade e estágios iniciais do envelhecimento, que possivelmente contribuiu para a desregulação metabólica e alterações estruturais musculares observadas. O treinamento físico, especialmente o protocolo de treinamento ao longo da vida, se contrapôs aos efeitos da associação entre dieta e

envelhecimento. Além disso, nosso estudo traz luz a possíveis mecanismos de regulação de vias do metabolismo muscular esquelético mediados por microRNAs, e sugere efeitos do treinamento via modulação endócrina, como observado através dos ensaios *in vitro* de culturas celulares de macrófagos e mioblastos primários expostos ao soro dos animais envelhecidos, submetidos ou não à dieta hiperlipídica, e treinados ou não.

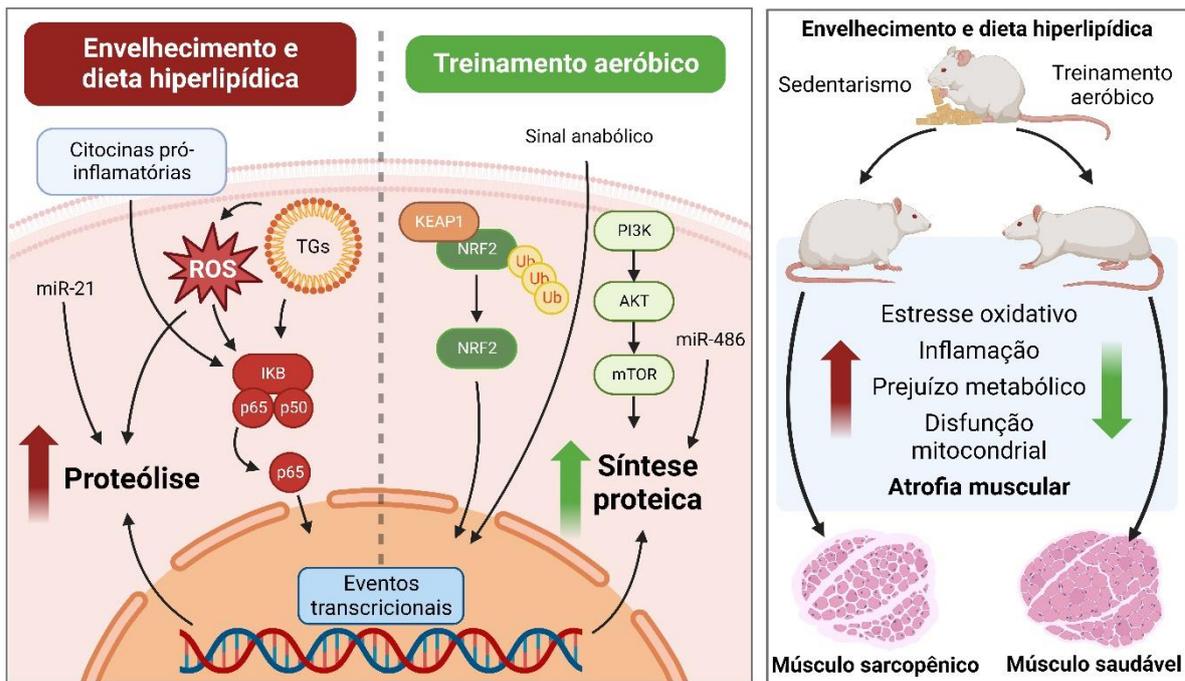


Figura 34. Resumo dos possíveis mecanismos associados aos efeitos da associação entre envelhecimento e obesidade sobre o músculo esquelético, e modulação do treinamento aeróbico. ROS, *reactive oxygen species*; TGs, triglicerídeos. A associação entre envelhecimento e obesidade estaria relacionada a ativação de mecanismos relacionados ao aumento da proteólise a partir da convergência de diferentes vias, como a inflamação e estresse oxidativo, que resultam na redução da massa e função muscular esquelético. Por outro lado, o treinamento físico aeróbico atuou como inibidor da inflamação e estresse oxidativo, ao passo que estimulou a transcrição de genes relacionados ao aumento da síntese proteica, levando à proteção morfofuncional muscular. Imagem criada com BioRender.com.

Os parâmetros de composição corporal estudados evidenciaram os efeitos da sobrecarga energética dietética notadamente sobre o aumento da adiposidade visceral abdominal, acompanhado pela redução do peso do músculo gastrocnêmio nos animais envelhecidos sedentários e submetidos à dieta hiperlipídica em comparação ao grupo envelhecido sedentário e mantido na dieta controle. Adicionalmente, os animais do grupo ESed+DHL apresentaram redução da ASF musculares. Já foi documentado que a associação entre envelhecimento e obesidade

resulta na modificação da composição corporal, caracterizada especialmente pelo aumento da adiposidade abdominal central e redução do peso da massa magra em ratos envelhecidos (BROWN et al., 2021). Esses desfechos seriam subjacentes a uma plethora de eventos fisiopatológicos que culminam na obesidade sarcopênica (ZHU et al., 2023). Em contrapartida, o treinamento ao longo da vida reduziu o peso do tecido adiposo visceral em comparação aos animais do grupo ESed+DHL, resultado que pode ser explicado, em parte, pelo efeito lipolítico do treinamento físico que se deve essencialmente ao estímulo à mobilização de ácidos graxos no tecido adiposo em resposta ao aumento da demanda energética mediada pela ativação de vias simpáticas (LIU et al., 2020). Ao contrário do observado no grupo ETL+DHL, o treinamento terapêutico não reduziu o peso do tecido adiposo visceral. Possivelmente dois fatores combinados podem ter contribuído para esse resultado, o fato de que ambos os grupos treinados foram mantidos na dieta hiperlipídica até o final do protocolo experimental, e a menor duração do treinamento terapêutico em relação ao treinamento ao longo da vida.

A redução do peso muscular e ASF observada no gastrocnêmio do grupo ESed+DHL caracteriza o desfecho de uma complexa rede de eventos associados à obesidade sarcopênica, dos quais se destacam o estresse oxidativo e a inflamação. Neste sentido, a análise dos parâmetros oxidativos evidenciou uma perturbação do metabolismo redox no músculo gastrocnêmio em resposta a obesidade, caracterizada pela regulação negativa da capacidade antioxidante enzimática pela redução da área imunomarcada, atividade e expressão gênica da GPx-1, assim como da atividade e expressão das enzimas catalase e SOD. Ademais, o grupo ESed+DHL apresentou ainda aumento dos marcadores de lesão oxidativa de lipídios (TBARS), proteínas (nitrotirosina e proteínas carboniladas) e DNA (8-OHdG) em comparação ao grupo ESed.

A relação entre envelhecimento e o aumento gradual do estresse oxidativo é classicamente conhecida, de modo que o desbalanço entre produção de espécies reativas e a capacidade antioxidante fundamenta grande parte dos mecanismos moleculares associados ao declínio das funções fisiológicas inerentes à idade (KAPLÁN et al., 2019). No mesmo sentido, a obesidade leva ao aumento do estresse oxidativo e depleção da capacidade antioxidante enzimática no músculo (LU et al., 2021). Sendo assim, a associação entre ambas as condições se mostra prejudicial, visto o sinergismo e complementariedade de vias pró-oxidativas que convergem na

lesão muscular através da oxidação de biomoléculas, ativação da inflamação e proteólise, e inibição do anabolismo proteico (ZHU et al., 2019).

No envelhecimento e na obesidade também são prejudicados os mecanismos de remoção de mitocôndrias disfuncionais que funcionam como sítios de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e podem interferir na regulação da eficiência energética e balanço redox da fibra muscular (EL ASSAR et al., 2020). O acúmulo de mitocôndrias disfuncionais favorece o *build up* de EROs nas células, especialmente pela produção de $O_2^{\cdot-}$ que pode levar a formação de H_2O_2 por uma reação de dismutação catalisada pela SOD, ou reagir diretamente com o óxido nítrico (NO^{\cdot}) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) (MURPHY, 2009). Além disso, a sobrecarga de substrato energético para a mitocôndria em resposta à dieta hipercalórica aumenta a atividade da cadeia transportadora de elétrons e conseqüentemente, a geração de EROs (JUNG, 2023).

A interação de EROs com os lipídios, principalmente ácidos graxos poli-insaturados, contribui para o prejuízo da função das membranas celulares pela alteração estrutural do arranjo da bicamada lipídica, inativação de receptores transmembrana e aumento da permeabilidade celular (BIRBEN et al., 2012; HAUCK et al., 2018). Aldeídos derivados da peroxidação lipídica reagem com cadeias laterais de aminoácidos como lisina, histidina e cisteínas presentes em proteínas através de reações de substituição nucleofílica, resultando em carbonilação (ONYANGO, 2021; HAUCK et al., 2018). Peroxinitritos reagem com resíduos de tirosina presentes em proteínas formando 3-nitro-L-tirosina, e já foi demonstrado que a nitração frequente do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) é mecanismo chave para o desenvolvimento de resistência à insulina no músculo esquelético em condição de inflamação e estresse oxidativo (PILON et al., 2010). As cadeias peptídicas com resíduos de aminoácidos danificados por oxidação são alvos de proteólise (BIRBEN et al., 2012). Por fim, a oxidação do DNA pela formação de 8-OHdG compromete a função celular em seu nível central, prejudicando os eventos de transcrição e tradução (HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ et al., 2023), e o aumento da marcação de 8-OHdG no músculo gastrocnêmio de camundongos envelhecidos foi relacionado ao aumento da atrofia muscular (ZHU et al., 2019).

Os regimes de treinamento aeróbico adotados aumentaram significativamente a capacidade antioxidante no músculo gastrocnêmio, expressa pelo aumento da imuno-marcação tecidual da GPx1, e atividade das enzimas GPx, Catalase e SOD,

sendo o aumento da SOD observado apenas no grupo ETL+DHL. Somado à melhora da capacidade antioxidante, os grupos treinados apresentaram menor dano oxidativo muscular evidenciado pela redução de todos os biomarcadores de estresse oxidativo estudados. A melhora da capacidade antioxidante observada pode resultar de mecanismos de adaptação, estresse-dependente, ao aumento da demanda metabólica e energética no treinamento. Os sinais oxidativos gerados pelo exercício servem de estímulo para ativação de padrões moleculares que resultam na transcrição de genes envolvidos na resposta antioxidante, e evidências sugerem papel central do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2) (PIRES et al., 2022). O NRF2 quando translocado do citoplasma para o núcleo atua como ativador do promotor ARE, levando a transcrição de genes que codificam componentes da resposta antioxidante, a exemplo das enzimas Hemeoxigenase-1, Catalase, SOD e GPx (SHAW; CHATTOPADHYAY, 2019). Corroborando com o exposto, sugere-se que o aumento da expressão gênica do NRF2 observado nos animais dos grupos treinados ETT+DHL e ETL+DHL resultou na regulação positiva da expressão dos genes para SOD-1, Catalase e GPx-1.

O aumento da produção de EROs e conseqüentemente, do estresse oxidativo, está intimamente ligado à ativação de vias inflamatórias que por sua vez levam a produção de EROs, estabelecendo assim um ciclo onde uma ordem causal é muitas vezes difícil de ser estabelecida (BISWAS, 2016). Os animais do grupo ESed+DHL apresentaram um *status* pró-inflamatório evidenciado pelo aumento significativo da área imunomarcada por NF- κ B/p65 no músculo gastrocnêmio, acompanhado do aumento da expressão gênica e proteica das citocinas TNF- α e IL-6, além da redução da expressão gênica e proteica da citocina IL-10 em comparação aos animais mantidos na dieta controle ao longo da vida.

A inflamação crônica é um dos principais mecanismos envolvidos no declínio das funções fisiológicas observadas no envelhecimento e obesidade (KARANTH et al., 2021; JIMENEZ-GUTIERREZ et al., 2022), especialmente na função e estrutura muscular esquelética, e o fator de transcrição NF- κ B atua como mediador crucial da ativação da resposta inflamatória (GARCÍA-GARCÍA et al., 2021). O NF- κ B é um importante regulador transcricional positivo da inflamação em células musculares, responsável pela indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (LIU et al., 2017).

O estresse oxidativo intracelular e citocinas como TNF- α podem ativar o NF- κ B no músculo e desencadear a transcrição e tradução de citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , estabelecendo assim um ciclo pró-inflamatório autossustentado (THOMA & LIGHTFOOT, 2018). Wu et al. (2023) sugerem que o TNF- α , além de atuar como ativador da via do NF- κ B, contribui de forma significativa e independente para a progressão da sarcopenia via piroptose em camundongos envelhecidos com redução da massa muscular, ASF e *grip strenght*. (WU et al., 2023). Adicionalmente, a redução dos níveis de IL-10, citocina com importante efeito anti-inflamatório (PEREIRA & ALVAREZ-LEITE, 2014), observada no grupo ESed+DHL contribui para a manutenção da inflamação muscular.

O estado pró-oxidativo e pró-inflamatório observado no grupo ESed+DHL, por meio da ativação de processos fibrogênicos no músculo esquelético, pode estar associado a gênese do aumento da área de fibrose intersticial avaliada pela coloração de Tricrômio de Masson. A fibrose é considerada uma das características mais comuns observados em doenças relacionadas à idade, e resulta na substituição de regiões de parênquima funcional por tecido fibrótico em resposta à produção excessiva de matriz extracelular (RICHTER et al., 2015; MURINE et al., 2023).

A realização do treinamento físico aeróbico foi determinante para redução do quadro pró-inflamatório muscular evocado pela dieta hiperlipídica. Os grupos ETT+DHL e ETL+DHL apresentaram redução da imunomarcação muscular de NF- κ B/p65, além da redução dos níveis teciduais e expressão gênica de TNF- α , expressão gênica de IL-6, e aumento dos níveis teciduais e expressão gênica de IL-10 em comparação ao grupo ESed+DHL. Ademais, o grupo ETL+DHL apresentou também a redução dos níveis de IL-6 no músculo quando comparado aos animais envelhecidos sedentários e mantidos na dieta hiperlipídica. Em conjunto, os resultados demonstram o efeito anti-inflamatório do treinamento físico que nós acreditamos dever-se a mecanismos dependentes e independentes da redução da adiposidade.

Como descrito anteriormente, o grupo ETL+DHL apresentou redução significativa da adiposidade visceral, e dessa forma é possível postular que os mecanismos pró-inflamatórios musculares decorrentes da inflamação sistêmica crônica causada pela obesidade foram mitigados pela realização do treinamento. Em estudo prévio do nosso grupo, o treinamento ao longo da vida atenuou a inflamação

sistêmica, com redução de até 4 vezes nos níveis séricos de TNF- α , sendo associado à menor da adiposidade abdominal em modelo de envelhecimento e obesidade similar ao aplicado no presente estudo (COQUEIRO et al., 2019). Por outro lado, o fato do grupo ETT+DHL também ter apresentado redução da expressão proteica e gênica dos marcadores pró-inflamatórios e aumento de IL-10 sem redução do peso do TAV reforça a ideia de que a resposta anti-inflamatória do treinamento físico está também associada à eventos independentes da redução da adiposidade. Corroborando com nossos achados, outros autores também observaram que a prática regular de exercício aeróbico determinou aumento dos níveis séricos (FENG et al., 2022) e musculares (LI et al., 2022) de IL-10 em modelo experimental, e essa modulação do fenótipo inflamatório poderia estar relacionado com o controle da inflamação inespecífica observada no envelhecimento e obesidade.

Já foi demonstrado que a IL-10 tem papel importante no crescimento e reparo muscular (HUYNH et al., 2023), switch de macrófagos M1 para M2 no músculo, (SHABANI et al., 2020; WELC et al., 2020) e proteção da estrutura das células musculares pela inibição da atividade e expressão de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, através do antagonismo do efeito inibitório do TNF- α sobre a sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), que por sua vez atua como ativador do eixo PI3K/AKT/mTORC1 (STRLE et al., 2007; VILLALTA et al., 2011).

Somados, os resultados observados no perfil oxidativo e inflamatório dos grupos ETT+DHL e ETL+DHL parecem ter contribuído para a significativa redução da fibrose intersticial em comparação ao grupo ESed+DHL. A inflamação crônica promove no músculo o acúmulo e prolongamento da atividade de células progenitoras fibro-adipogênicas (FAPs) com conseqüente progressão da fibrose. Evidências sugerem que a prática de exercício físico induz a senescência das FAPs e determina a inversão do estado pro-fibrótico para pró-regenerativo muscular (SAITO et al., 2020).

No músculo, a expressão dos genes proteolíticos que codificam a MURF-1 e Atrogin-1 aumentou no grupo ESed+DHL e corroborando com evidências do papel da inflamação associada a obesidade e do envelhecimento na sarcopenia, neste grupo, também se observou aumento da expressão NF-kB/p65. A atividade do NF-kB e a expressão de componentes inflamatórios no músculo levam à ativação da via proteolítica ubiquitina-proteassoma, especialmente através das ubiquitinas ligases MURF-1 e Atrogin-1/MAFbx (WU et al., 2023), sendo inclusive consideradas

“atrogenes”, dada sua importância no contexto catabólico proteico envolvido na atrofia muscular em diferentes condições (SARTORI et al., 2021). A *upregulation* das ubiquitinas ligases indica um metabolismo prono à proteólise que corrobora com os achados de redução do peso e ASF do gastrocnêmio nos animais do grupo ESed+DHL, visto que determinam a ubiquitinação, e subsequente degradação, de diversas proteínas estruturais e envolvidas no processo de contração muscular, a exemplo da troponina I, miosina de cadeias leve e pesada, e actina (HNIA et al., 2019).

O aumento da expressão de genes da via catabólica nos animais do grupo ESed+DHL foi acompanhado pela regulação negativa dos genes que codificam as proteínas PI3K e AKT, evidenciando o desbalanço entre síntese/degradação proteica também pela inibição da via anabólica. A via PI3K/AKT/mTOR atua positivamente sobre o estímulo à síntese proteica e regula negativamente a proteólise (GHOLIPOUR et al., 2022), e já foi descrita a redução da expressão proteica e gênica dos componentes deste eixo anabólico em resposta ao envelhecimento e obesidade (BROWN et al., 2021).

O treinamento por sua vez melhorou a estrutura muscular expressa pelo aumento do peso e ASF do músculo gastrocnêmio, sendo estes resultados consonantes à *upregulation* dos genes AKT e PI3K, e *downregulation* dos genes MURF-1 e Atrogin-1 em resposta a ambos os protocolos de treinamento. Apesar dos estímulos hipertróficos estarem classicamente associados ao treinamento resistido, já se sabe que a realização de regimes de treinamento aeróbico atua tanto na melhora da capacidade cardiorrespiratória, como também na manutenção e aumento da massa muscular (DE OLIVEIRA FRANÇA et al., 2020).

A vasta gama de padrões moleculares alterados na sarcopenia evidencia a necessidade de estudos que esclareçam os mecanismos envolvidos e identificação de possíveis alvos para modulação dos efeitos musculares do envelhecimento e obesidade. Nesse contexto, o gene *Klotho* é reconhecido por seus efeitos antienvhecimento especialmente em células renais, cerebrais e vasculares (AVIN et al., 2014), e sua expressão está diminuída com o envelhecimento (ARROYO et al., 2022).

Nossos resultados evidenciaram redução significativa da expressão do gene *Klotho* no músculo gastrocnêmio dos animais do grupo ESed+DHL, ao passo que ambos os grupos treinados apresentaram regulação positiva desse gene. Apesar de os estudos dos efeitos do *Klotho* sobre a musculatura de ratos em condição de

envelhecimento e obesidade serem escassos, evidências sugerem uma forte relação entre os níveis de Klotho com a força e função muscular (PHELPS et al., 2013) tanto pela regulação do estresse oxidativo (IZBEKI et al., 2010) como da inflamação (HUI et al., 2017). Sendo assim, os achados de estímulo a expressão do gene Klotho pelos treinamentos apontam para possíveis mecanismos de proteção aos danos estruturais e funcionais do músculo associados ao envelhecimento e obesidade.

A flexibilidade metabólica muscular corresponde à habilidade do músculo esquelético em se adaptar à utilização de fontes energéticas de acordo à disponibilidade de substratos, em condição de saúde e doença (GOODPASTER; SPARKS, 2017; SHOEMAKER et al., 2022). A análise dos parâmetros metabólicos musculares estudados evidenciou aumento do conteúdo de triglicerídeos e redução dos níveis de glicogênio no gastrocnêmio, associado também à redução da atividade da enzima citrato sintase no grupo ESed+DHL em comparação ao grupo ESed. Por outro lado, o treinamento se contrapôs aos efeitos da dieta aumentando o glicogênio muscular e a atividade da enzima citrato sintase e reduzindo o acúmulo de triglicerídeos intramiocelular. Corroborando com nossos dados, diferentes autores já demonstraram que o uso da dieta hiperlipídica contribui para o aumento dos níveis de lipídios no músculo esquelético, acompanhado pela redução do conteúdo de glicogênio, tanto em ratos (TERMKWANCHAROEN et al., 2022), como em humanos (BAJPEYI et al., 2012).

Triglicerídeos intramiocelulares são formados a partir da esterificação de ácidos graxos do plasma para dentro da fibra muscular, e o aumento do conteúdo lipídico no músculo é frequentemente associado a eventos de lipotoxicidade que desencadeiam processos inflamatórios e oxidativos (LAURENS; MORO, 2016) que culminam, entre outros fatores, na redução da sensibilidade muscular à insulina (GEMMINK et al., 2017). O acúmulo de lipídios na fibra muscular leva a ativação da PKC e consequente fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina, impedindo a ativação da PI3K e consequentemente, dos mecanismos *downstream* que levam à translocação do transportador GLUT4 para a membrana plasmática, e dessa forma reduzindo a captação de glicose. Além disso, o aumento de ácidos graxos na fibra muscular resulta na inibição da respiração mitocondrial pelo aumento da razão ATP/ADP e consequente redução na cadeia transportadora de elétrons (HONG; CHOI, 2020). Neste sentido, já foi demonstrado em modelo de camundongos obesos que a redução

da atividade da enzima mitocondrial citrato sintase está associada a intolerância à glicose e lipotoxicidade (ALHINDI et al., 2019).

O treinamento físico reduz o conteúdo de lipídios intramiocelulares em condição de obesidade (GOPALAN et al., 2021), além de regular positivamente a expressão dos componentes das vias de captação de glicose dependente e independente da insulina no músculo gastrocnêmio (COQUEIRO et al., 2019), e a melhora da função mitocondrial evidenciada pelo aumento da atividade da enzima citrato sintase nos grupos treinados sugere um aumento da eficiência oxidativa no músculo em resposta ao treinamento. Já foi documentado que o treinamento aeróbico determinou aumento da atividade da enzima citrato sintase em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, associado à melhora no teste de tolerância oral à glicose e redução da insulina plasmática (YUAN et al., 2013).

A modulação da expressão de microRNAs em resposta ao treinamento físico tem despertado muito interesse pelo papel regulador pós-transcricional dos microRNAs em uma infinidade de processos celulares fisiológicos e patológicos (DEXHEIMER; COCHELLA, 2020). No presente estudo, a dieta hiperlipídica regulou positivamente a expressão do miR-21, ao passo que o treinamento aeróbico reduziu a expressão do miR-21 e aumentou a expressão do miR-486 no músculo gastrocnêmio. A regulação positiva do miR-21 já foi associada à aceleração da perda muscular no envelhecimento (BROWN; GOLJANEK-WHYSALL, 2015), e a inibição do miR-21 acarreta redução da obesidade em camundongos db/db (SEEGER et al., 2014), enquanto o aumento do miR-486 em resposta ao treinamento ao longo da vida parece proteger a função e estrutura muscular de ratos envelhecidos ao ativar a via PI3K/AKT/mTOR, e regular negativamente a expressão das proteínas MURF-1 e Atrogin-1 (GAO et al., 2021).

A análise funcional dos microRNAs estudados demonstrou significativa relação com vias importantes do metabolismo celular, como a via da Ras, MAPK e FoxO, reforçando a relevância dos achados do presente estudo. A via da Ras/Raf/MAPK é provavelmente uma das mais bem descritas vias de sinalização na biologia celular, e sua função compreende os sinais de transdução do meio extracelular para o núcleo das células, que resultam na modulação da expressão de genes envolvidos no crescimento, divisão e diferenciação celular (MAEDA et al., 2021). Evidências apontam para o papel regulador dessa via sobre o desenvolvimento da musculatura esquelética, de modo que a maior ativação resulta atrofia muscular (RYU et al., 2019).

Um modelo de camundongos com deleção heterozigótica para Nf1, regulador negativo da via Ras/Raf/MAPK, os animais praticamente não apresentam alterações fenotípicas de importância muscular, entretanto, *knockouts* homozigotos para Nf1 resultam em letalidade das ninhadas com múltiplas anomalias que incluem defeitos musculares esqueléticos e cardíacos (KOSSLER et al., 2011).

A via de sinalização da proteína *forkhead box O* (FoxO) possui papel central na patogênese da atrofia muscular ao regular positivamente diferentes sistemas proteolíticos, dentre eles, o sistema ubiquitina-proteassoma. A FoxO desfosforilada pode ser translocada para o núcleo onde atua como ativador da transcrição de genes que codificam proteínas como MuRF-1, atrogin-1, e conseqüentemente, leva ao aumento da proteólise muscular. Dada sua importância, a via de sinalização da FoxO é um dos principais alvos para o desenvolvimento de terapias contra a atrofia muscular (CHEN et al., 2022). Dessa forma, nossos resultados mostram que o treinamento físico modula ativamente o perfil de expressão de microRNAs no músculo esquelético e, conseqüentemente, seus mecanismos superiores de regulação pós-transcricional/pré-traducional.

As alterações cardíacas e a sarcopenia são eventos que estabelecem entre si uma causalidade mútua. Ao passo que a obesidade sarcopênica contribuiu para o estabelecimento de agravos cardiometabólicos associados ao aumento da adiposidade visceral, resistência à insulina e estados pró-inflamatório e pró-oxidativo crônicos, os prejuízos na função cardíaca também podem predispor à perda de massa magra visto que doenças cardiovasculares (DCV) induzem um estado pró-catabólico. Essa interdependência parece dever-se ao compartilhamento das vias fisiopatológicas da obesidade sarcopênica e DCV que culminam, dentre outros desfechos, no prejuízo funcional cardíaco e aumento da mortalidade (DAMLUJI et al., 2023).

Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa no mesmo modelo de envelhecimento, obesidade e treinamento físico, foi observado que os animais que realizaram o treinamento preventivo apresentaram redução da pressão arterial média comparado ao grupo envelhecido sedentário e obeso (COQUEIRO et al., 2019). A partir disso, buscou-se investigar se a associação entre envelhecimento e dieta hiperlipídica promoveria alterações cardíacas que poderiam implicar, em algum nível, no prejuízo cardiovascular. De semelhante modo ao observado no músculo gastrocnêmio, os animais do grupo ESed+DHL apresentaram um aumento da

deposição de fibras colágenas, marcação de NF-kB tecidual e níveis de TNF- α , redução da capacidade antioxidante enzimática, elevação dos marcadores de estresse oxidativo e redução da função mitocondrial em comparação ao grupo ESed. Em conjunto, os dados apontam para o aumento da fibrose intersticial do ventrículo cardíaco que possivelmente seja um desfecho estrutural do estabelecimento de um quadro pró-inflamatório e pró-oxidativo in situ em resposta ao envelhecimento e obesidade.

Durante o envelhecimento, cardiomiócitos humanos e murinos apresentam um fenótipo específico, que dentre outros fatores compreende a secreção de citocinas pró-inflamatórias, proteases e componentes insolúveis de matriz extracelular, conhecidos como fenótipo secretório associado a senescência (LI et al., 2020). Adicionalmente, o envelhecimento cardíaco é acompanhado pelo declínio da função mitocondrial que resulta no aumento da produção de ERO, evento considerado como um dos principais mecanismos envolvidos na insuficiência cardíaca (LI et al., 2020). Nesse sentido, o compartilhamento e sinergia das vias pró-inflamatória e pró-oxidativa pelo envelhecimento e obesidade torna a associação ainda mais danosa para a função cardiovascular. A obesidade induzida por dieta hiperlipídica contribui diretamente para o prejuízo funcional cardíaco ao reduzir a função contrátil ventricular esquerda associada ao aumento da espessura da parede do ventrículo, deposição de fibras colágenas e apoptose dos cardiomiócitos (YANG et al., 2020).

Em contraste com os resultados observados no grupo ESed+DHL, os animais que seguiram os protocolos de treinamento apresentaram diminuição da fibrose intersticial no ventrículo cardíaco, melhora da capacidade antioxidante enzimática, redução dos níveis de proteínas carboniladas e proteção da função mitocondrial. Notavelmente, aqueles submetidos ao treinamento ao longo de toda a vida exibiram a maior redução na fibrose, redução da marcação de NF-kB e níveis de TNF- α e redução de todos os marcadores de estresse oxidativo tecidual estudados.

Alguns resultados promissores do treinamento físico sobre o remodelamento cardíaco já foram observados, e implicam na melhora da função ventricular e aumento na contratilidade cardíaca, evidenciado pela redução da deposição de colágeno, além de prevenir o desenvolvimento de fibrose cardíaca em modelo experimental (NOVOA, et al., 2017; FELIX, et al., 2015). Os efeitos cardioprotetores do treinamento físico podem estar associados a mecanismos relacionados a redução do estresse oxidativo e de mediadores pró-inflamatórios promovidas pelo treinamento físico, como a

diminuição dos níveis de angiotensina II, supressão de TGF- β 1 e o inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP-1), que estão diretamente envolvidos no aumento da síntese e acúmulo de colágeno no tecido cardíaco (FELIX et al., 2015). Em estudo com ratos obesos e diabéticos, o treinamento de moderada intensidade melhorou a função ventricular cardíaca, resultado associado pelos autores à redução do estresse oxidativo, da deposição de colágeno e expressão proteica de TGF- β (WANG et al., 2019).

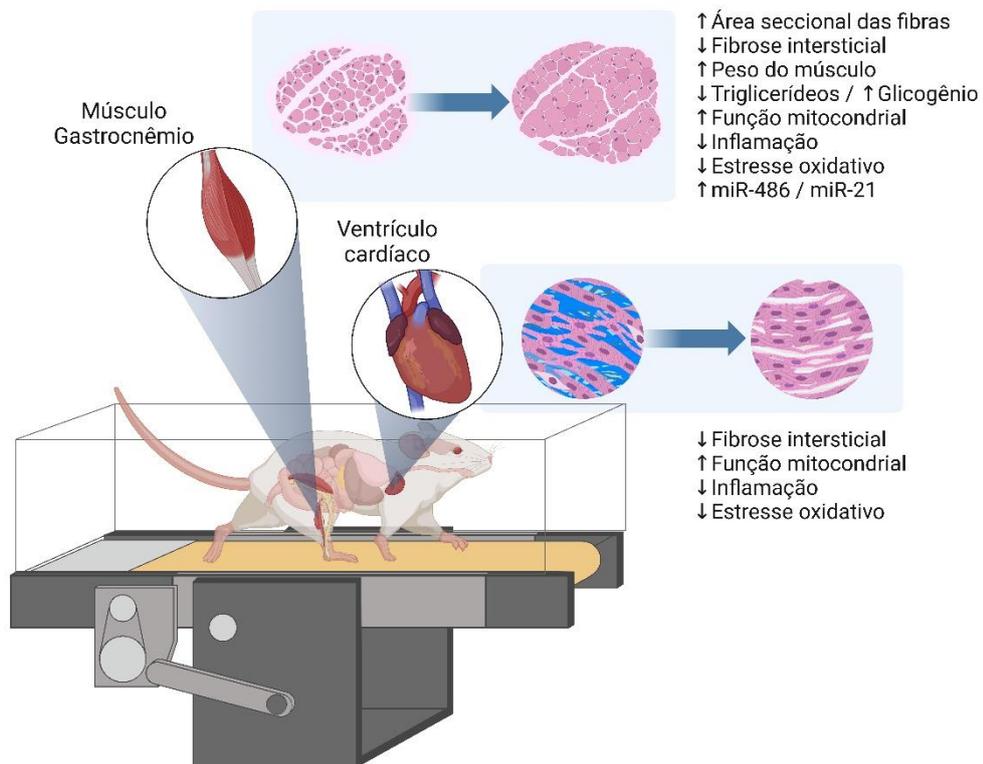


Figura 35. Efeitos do treinamento físico sobre o músculo esquelético e cardíaco de ratos Wistar envelhecidos e obesos observados no presente trabalho. Nossos achados apontam para o efeito principal do treinamento físico aeróbico, especialmente o treinamento ao longo da vida, em melhorar a capacidade mitocondrial e resposta antioxidante, ao passo que reduz o estresse oxidativo e inflamação tecidual. Imagem criada com BioRender.com.

A prevalência de efeitos cardioprotetores superiores observados no grupo ETL+DHL em comparação ao grupo ETT+DHL sugere que a maior duração do treinamento (ETL+DHL = 10 meses / ETT+DHL = 2 meses), somado ao fato do grupo ETL+DHL ter iniciado o treinamento previamente à introdução da dieta hiperlipídica, foram determinantes para os melhores desfechos. Vale ressaltar que ambos os grupos treinados se mantiveram na dieta hiperlipídica até o final do treinamento, simulando um mecanismo de redução de danos frente à adoção de um hábito

alimentar não saudável. Sendo assim, a associação dos mesmos protocolos de treinamento a medidas de reeducação alimentar poderia influenciar os resultados obtidos, e por isso, a realização de mais estudos mostra-se de muita importância. A figura 35 sumariza os eventos observados nos músculos esquelético e cardíaco em resposta ao treinamento físico no presente estudo.

Para além dos resultados *in situ* observados no músculo gastrocnêmio e ventrículo cardíaco, os achados do estudo *in vitro* nos permitem postular que os efeitos do treinamento não se limitam aos músculos exercitados, visto que possíveis fatores endócrinos circulantes no soro dos animais atuaram sobre culturas de células oriundas de animais jovens e sedentários regulando sua expressão gênica. Os resultados obtidos com a exposição dos macrófagos primários ao soro de animais em diferentes condições de dieta e treinamento modula ativamente o perfil de resposta inflamatória das células. Frente ao soro de animais envelhecidos e submetidos à dieta hiper lipídica, os macrófagos em cultura assumiram um perfil pró-oxidativo e pró-inflamatório, ao passo que a exposição ao soro de animais treinados, especialmente ao longo de toda a vida, atenuou essa alteração.

No presente estudo, a exposição ao soro dos animais dos grupos experimentais não reduziu a viabilidade celular dos macrófagos em comparação ao grupo controle SFB (Soro Fetal Bovino), mostrando que os possíveis efeitos de modulações fenotípicas de macrófagos primários perante o meio em que ele é submetido, em nosso caso, não se deveram à redução da viabilidade das células.

Os macrófagos expostos ao soro dos animais envelhecidos e obesos aumentaram significativamente a produção de H_2O_2 e nitritos totais, sendo o último um indicador da produção de óxido nítrico, e apresentaram regulação positiva da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias MCP-1, TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Em conjunto, a maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), associado ao perfil de expressão gênica observado, sugerem que a exposição ao soro do grupo ESed+DHL contribuiu para a polarização M1 dos macrófagos. Entretanto, conclusões categóricas acerca do fenótipo dos macrófagos dependem de análises mais específicas, como ensaios de citometria de fluxo, que não foram conduzidas no presente trabalho.

Macrófagos são uma das principais células envolvidas na resposta inflamatória e podem ser classificados de acordo ao perfil de atividade que exercem. Dessa forma, macrófagos M1 apresentam um fenótipo pró-inflamatório caracterizado pela produção

e liberação de citocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β , que de maneira geral, induzem a propagação e manutenção da inflamação (PENCE et al., 2014; DORNELES et al., 2020), além de produzirem EROs e ERNs (CANTON et al., 2021). Por outro lado, macrófagos M2 estão envolvidos com a finalização da inflamação, ativando fibroblastos e inibindo a manutenção do estado pró inflamatório através da produção de citocinas e fatores de crescimento como IL-10, o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) e TGF- β 1 (BONIAKOWSKI et al., 2017; DORNELES et al., 2020).

Se opondo ao observado com a exposição ao soro dos animais obesos, o soro dos grupos treinados determinou uma *upregulation* da expressão do gene da citocina IL-10 nos macrófagos, somado à *downregulation* dos genes das citocinas MCP-1, TNF- α e IL-6. Adicionalmente, o soro do grupo que foi treinado antes e ao longo da utilização da dieta hiper lipídica (ETP+DHL) mostrou-se como a melhor alternativa de exposição dentre os grupos treinados, visto que causou a maior modulação da expressão dos genes das citocinas envolvidas na inflamação, além da redução da produção de H₂O₂ e nitritos totais. De fato, já é conhecido que a prática regular de exercício é eficaz na polarização M2 de macrófagos, inclusive através do *switching* entre fenótipos (KAWANISHI et al., 2010). A discrepância de resultados obtidos entre os grupos treinados ao longo da vida ou de maneira terapêutica demonstra que, para o presente trabalho, o maior tempo de realização do treinamento foi determinante para obtenção dos melhores desfechos (Figura 36).

Corroborando com os nossos achados, Dorneles e colaboradores (2020) demonstraram que a exposição de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) ao soro autólogo de indivíduos obesos após a realização de uma única sessão de exercício físico foi capaz de reduzir o status de acetilação de histonas, o conteúdo de NF- κ B, suprimir a produção de TNF- α e IL-6, enquanto aumentou os níveis de IL-10 (Dorneles et al., 2020).

As culturas de mioblastos primários expostos ao soro dos animais do grupo ESed+DHL apresentaram aumento significativo da expressão gênica das ubiquitinas ligases MURF-1 e Atrogin-1, enquanto o soro dos animais dos dois regimes de treinamento reduziu a expressão da MURF-1. Além disso, o soro do grupo ETL+DHL determinou ainda redução da expressão de atrogin-1 nos mioblastos. Estudos com abordagens *in vitro* já demonstraram que mioblastos e miotúbulos expostos ao soro de indivíduos jovens ou idosos apresentam efeitos do envelhecimento expressos pela redução no diâmetro das células e capacidade reduzida no scratch assay

(KALAMPOUKA et al., 2018). Por outro lado, mioblastos expostos ao soro de indivíduos treinados em diferentes modalidades de exercício apresentaram aumento da diferenciação miogênica, resultado que os autores sugerem importante no contexto da prevenção contra sarcopenia associada à idade (VITUCCI et al., 2018).

Os resultados do estudo *in vitro* reforçam a evidência do efeito sistêmico do treinamento físico ao contribuir na produção e liberação de fatores na circulação periférica, controlando a expressão gênica e produção de ERO e ERN de macrófagos, prono à um fenótipo anti-inflamatório, além de modular a expressão gênica envolvida no metabolismo proteico de mioblastos. Whitham e colaboradores (2018), utilizando técnicas de proteômica quantitativa, caracterizaram a secreção induzida pelo exercício de proteínas contidas em vesículas extracelulares na circulação, sendo este um dos possíveis mecanismos envolvidos na regulação endócrina do exercício físico observada em nosso estudo, que extrapolam os mecanismos clássicos associados à redução da adiposidade corporal.

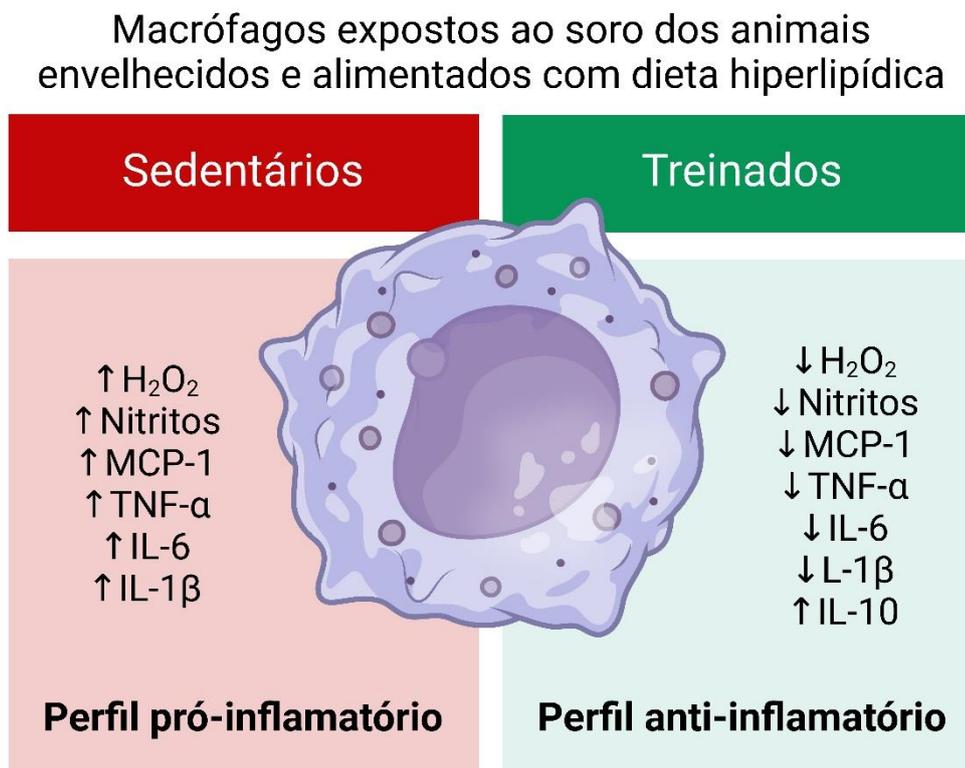


Figura 36. Resumo dos achados nos experimentos *in vitro* com macrófagos primários. A exposição dos macrófagos ao soro dos animais treinados determinou mudança do perfil inflamatório expresso pela menor produção de marcadores oxidativos peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e nitritos, além da menor expressão gênica das citocinas de resposta pró-inflamatória, somado a regulação positiva da expressão de IL-10. Imagem criada com BioRender.com.

8. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos dados reforçam os riscos da danosa associação entre o envelhecimento a obesidade sobre a saúde musculoesquelética e cardíaca, visto que alterações estruturais, metabólicas, inflamatórias e oxidativas são evidentes nos estágios iniciais do envelhecimento em ratos submetidos à dieta hiperlipídica. Nesse contexto, a prática regular de exercício físico mostra-se imperativa para mioproteção, mediada por mecanismos *in situ* e sistêmicos, contra os prejuízos estruturais e funcionais causados pela hostil associação entre envelhecimento e obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Como observado, a prática regular do treinamento físico ao longo da vida foi superior à sua realização de maneira terapêutica, enfatizando a importância de iniciar uma rotina de treinamentos ainda na juventude. Por fim, os achados dos estudos *in vitro* reforçam a importância da prática regular do treinamento físico ao demonstrar que seus efeitos são sistêmicos e podem ser mediados por fatores humorais.

REFERÊNCIAS

1. AAGAARD, P. et al. Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, v. 20, n. 1, p. 49-64, 2010.
2. ABREU, C. C.; CARDOZO, L. F. M. F.; MAFRA, D. Could physical exercises modulate Nrf2–Keap1 pathway in chronic kidney disease? *Medical hypotheses*, v. 84, n. 1, p. 44-46, 2015.
3. ABRIGO, J. et al. High fat diet-induced skeletal muscle wasting is decreased by mesenchymal stem cells administration: implications on oxidative stress, ubiquitin proteasome pathway activation, and myonuclear apoptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016, 2016.
4. AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, v. 05, p. 121-126, 1984
5. AGUILAR-ALONSO, P. et al. Evaluation of Oxidative Stress in Cardiomyocytes during the Aging Process in Rats Treated with Resveratrol. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2018, 2018.
6. ALAM, S. M. Second-hand Tobacco Smoke (ETS) – Findings of an Australian Case Study and How Dhaka can reap the Benefit from the Research Outcome. *The International Journal of Social Sciences and Humanities Invention*, v. 5, n. 9, p. 4959–4968, 2018.
7. ALHINDI Y, Vaanholt LM, Al-Tarrach M, Gray SR, Speakman JR, Hambly C, Alanazi BS, Gabriel BM, Lionikas A, Ratkevicius A. Low Citrate Synthase Activity Is Associated with Glucose Intolerance and Lipotoxicity. *J Nutr Metab*. 2019 Mar 3;2019:8594825. doi: 10.1155/2019/8594825. Erratum in: *J Nutr Metab*. 2019 Aug 1;2019:9153809. PMID: 30944739; PMCID: PMC6421790.
8. ALMAGHRABI, O. A. et al. Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney. *Saudi J Biol Sci*, v. 22, p. 227-231, 2015
9. AMBROSE, J. A.; BARUA, R. S. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*, v. 43, p. 1731-1737, 2004.
10. AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 41, p. 687, 2009.

11. AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018.
12. AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. American Physiological Society, 2006.
13. ANDRADE, F. H. et al. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *The Journal of physiology*, v. 509, p. 565-575., 1998.
14. ANDRICH, D. E. et al. A short-term high-fat diet alters glutathione levels and IL-6 gene expression in oxidative skeletal muscles of young rats. *Frontiers in physiology*, v. 10, p. 372, 2019.
15. ARAGON AA, Tipton KD, Schoenfeld BJ. Age-related muscle anabolic resistance: inevitable or preventable? *Nutr Rev*. 2023 Mar 10;81(4):441-454. doi: 10.1093/nutrit/nuac062. PMID: 36018750.
16. ARROYO E, Troutman AD, Moorthi RN, Avin KG, Coggan AR, Lim K. Klotho: An Emerging Factor With Ergogenic Potential. *Front Rehabil Sci*. 2022 Jan 6;2:807123. doi: 10.3389/fresc.2021.807123. PMID: 36188832; PMCID: PMC9397700.
17. ARU M, Alev K, Pehme A, Purge P, Önnik L, Ellam A, Kaasik P, Seene T. Changes in Body Composition of Old Rats at Different Time Points After Dexamethasone Administration. *Curr Aging Sci*. 2019;11(4):255-260. doi: 10.2174/1874609812666190114144238. PMID: 30648531; PMCID: PMC6635420.
18. AVIN KG, Coen PM, Huang W, Stolz DB, Sowa GA, Dubé JJ, Goodpaster BH, O'Doherty RM, Ambrosio F. Skeletal muscle as a regulator of the longevity protein, Klotho. *Front Physiol*. 2014 Jun 17;5:189. doi: 10.3389/fphys.2014.00189. PMID: 24987372; PMCID: PMC4060456.
19. AZIZBEIGI, K. et al. Antioxidant enzymes and oxidative stress adaptation to exercise training: Comparison of endurance, resistance, and concurrent training in untrained males. *Journal of exercise science & fitness*, v. 12, p. 1-6, 2014.
20. BAEK, K-W. et al. Effects of regular-moderate exercise on high-fat diet-induced intramyocellular lipid accumulation in the soleus muscle of Sprague-Dawley rats. *Journal of exercise rehabilitation*, v. 14, n. 1, p. 32, 2018.

21. BAJPEYI S, Reed MA, Molskness S, Newton C, Tanner CJ, McCartney JS, Houmard JA. Effect of short-term exercise training on intramyocellular lipid content. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2012 Oct;37(5):822-8. doi: 10.1139/h2012-051. Epub 2012 Jun 12. PMID: 22691059; PMCID: PMC3589127.
22. BARAIBAR, M. A. et al. Impaired energy metabolism of senescent muscle satellite cells is associated with oxidative modifications of glycolytic enzymes. *Aging (Albany NY)*, v. 8, n. 12, p. 3375, 2016.
23. BARREIRO E, Coronell C, Lavina B, Ramirez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Gea J. Envelhecimento, diferenças sexuais e estresse oxidativo nos músculos respiratórios e dos membros humanos. *Free Radic Biol Med* 41 : 797–809, 2006.
24. BASTIEN, M. et al. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, v. 56, p. 369-381, 2014.
25. BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
26. BISWAS SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:5698931. doi: 10.1155/2016/5698931. Epub 2016 Jan 5. PMID: 26881031; PMCID: PMC4736408..
27. BONIAKOWSKI AE, Kimball AS, Jacobs BN, Kunkel SL, Gallagher KA. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. *J Immunol.* 2017 Jul 1;199(1):17-24. doi: 10.4049/jimmunol.1700223. PMID: 28630109.
28. BOOTH, F. W. et al. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Comprehensive Physiology*, v. 2, n. 2, p. 1143, 2012.
29. BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.
30. BRIOCHE, T. et al. Growth hormone replacement therapy prevents sarcopenia by a dual mechanism: improvement of protein balance and of antioxidant defenses. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, v. 69, n. 10, p. 1186-1198, 2013.
31. BROWN DM, Goljanek-Whysall K. microRNAs: Modulators of the underlying pathophysiology of sarcopenia? *Ageing Res Rev.* 2015 Nov;24(Pt B):263-73. doi: 10.1016/j.arr.2015.08.007. Epub 2015 Sep 2. PMID: 26342566.

32. BROWN LA, Perry RA Jr, Haynie WS, Lee DE, Rosa-Caldwell ME, Brown JL, Greene NP, Wolchok JC, Washington TA. Moderators of skeletal muscle maintenance are compromised in sarcopenic obese mice. *Mech Ageing Dev.* 2021 Mar;194:111404. doi: 10.1016/j.mad.2020.111404. Epub 2020 Nov 26. PMID: 33249192.
33. CANTON M, Sánchez-Rodríguez R, Spera I, Venegas FC, Favia M, Viola A and Castegna A (2021) Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Front. Immunol.* 12:734229. doi: 10.3389/fimmu.2021.734229.
34. CAO, Q.; HARRIS, D. C. H.; WANG, Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. *Physiology*, v. 30, p. 183-194, 2015.
35. CAO, Shicheng et al. Effects of exercise on AMPK signaling and downstream components to PI3K in rat with type 2 diabetes. *PLoS One*, v. 7, n. 12, p. e51709, 2012.
36. CARTEE, G. D. et al. Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. *Cell metabolism*, v. 23, n. 6, p. 1034-1047, 2016.
37. CASTRO, A. M. et al. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. *Revista Médica del Hospital General de México*, v. 80, n. 2, p. 101-105, 2017.
38. CECILIO, C.A. et al . Aging alters the production of iNOS, arginase and cytokines in murine macrophages. *Braz J Med Biol Res, Ribeirão Preto* , v. 44, n. 7, p. 671-681, July 2011 . Epub May 27, 2011 <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500067>.
39. CHEN K, Gao P, Li Z, Dai A, Yang M, Chen S, Su J, Deng Z, Li L. Forkhead Box O Signaling Pathway in Skeletal Muscle Atrophy. *Am J Pathol.* 2022 Dec;192(12):1648-1657. doi: 10.1016/j.ajpath.2022.09.003. Epub 2022 Sep 27. PMID: 36174679.
40. CHEN, D. et al. A high-fat diet impairs mitochondrial biogenesis, mitochondrial dynamics, and the respiratory chain complex in rat myocardial tissues. *Journal of cellular biochemistry*, v. 119, n. 11, p. 9602-9602, 2018.
41. CHOI, D. H. et al. Effect of treadmill exercise on skeletal muscle autophagy in rats with obesity induced by a high-fat diet Do Keun Cho1. *JENB (Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry)*, v. 21, n. 3, p. 26-34, 2017.
42. CHOOI, Y. C. et al. The epidemiology of obesity. *Metabolism*, v. 92, p. 6-10, 2019.

43. COFFEY, V. G. et al. Interaction of contractile activity and training history on mRNA bundance in skeletal muscle from trained athletes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 290, n. 5, p. E849-E855, 2006.
44. CONSTANTINO, S. et al. Ageing, metabolism and cardiovascular disease. *J. Physiol.*, v. 594, p. 2061-2073, 2016.
45. COQUEIRO, R. S. et al. Therapeutic and preventive effects of exercise on cardiometabolic parameters in aging and obese rats. *Clinical nutrition ESPEN*, v. 29, p. 203-212, 2019.
46. CORNACHIONE AS, Benedini-Elias PC, Polizello JC, Carvalho LC, Mattiello-Sverzut AC. Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult Wistar rats. *Acta Histochem Cytochem*. 2011 Apr 28;44(2):43-50. doi: 10.1267/ahc.10031. Epub 2011 Mar 30. PMID: 21614165; PMCID: PMC3096081.
47. CORREIA, T. M. L. et al. Interaction between cigarette smoke exposure and physical training on inflammatory and oxidative profile in mice muscle. *Chem Biol Interact*, v. 1, Epub 109913, 2022.
48. CUNHA, M. J. et al. Physical exercise reverses glutamate uptake and oxidative stress effects of chronic homocysteine administration in the rat. *Int. J. Devl. Neuroscience.*, v. 30, p. 69-74, 2012.
49. DALLE, S. et al. The role of inflammation in age-related sarcopenia. *Frontiers in physiology*, v. 8, p. 1045, 2017.
50. DAMLUJI AA, Alfaraidhy M, AlHajri N, Rohant NN, Kumar M, Al Malouf C, Bahrainy S, Ji Kwak M, Batchelor WB, Forman DE, Rich MW, Kirkpatrick J, Krishnaswami A, Alexander KP, Gerstenblith G, Cawthon P, deFilippi CR, Goyal P. Sarcopenia and Cardiovascular Diseases. *Circulation*. 2023 May 16;147(20):1534-1553. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.123.064071. Epub 2023 May 15. PMID: 37186680; PMCID: PMC10180053.
51. DARBAND, S. G. et al. Combination of exercise training and l-arginine reverses aging process through suppression of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in the rat heart. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, p. 1-10, 2019.
52. DEACON, R. M. J. Measuring the strength of mice. *J Vis Exp.*, v. 2, 2013.

53. DEXHEIMER PJ, Cochella L. MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jun 3;8:409. doi: 10.3389/fcell.2020.00409. PMID: 32582699; PMCID: PMC7283388.
54. DICKINSON, J. M. et al. Exercise and nutrition to target protein synthesis impairments in aging skeletal muscle. *Exercise and sport sciences reviews*, v. 41, n. 4, p. 216, 2013.
55. DO, K. C. et al. Effect of treadmill exercise on skeletal muscle autophagy in rats with obesity induced by a high-fat diet. *Journal of exercise nutrition & biochemistry*, v. 21, n. 3, p. 26, 2017.
56. DORNELES GP, da Silva IM, Santos MA, Elsner VR, Fonseca SG, Peres A, Romão PRT. Immunoregulation induced by autologous serum collected after acute exercise in obese men: a randomized cross-over trial. *Sci Rep.* 2020 Dec 10;10(1):21735. doi: 10.1038/s41598-020-78750-z. PMID: 33303928; PMCID: PMC7729871.
57. DOS SANTOS, D. C. et al. Effects of 5 α -dihydrotestosterone on the modulation of monocyte/macrophage response to *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *Biol Sex Differ*, v. 14, 2023
58. DOWLING L, Duseja A, Vilaca T, Walsh JS, Goljanek-Whysall K. MicroRNAs in obesity, sarcopenia, and commonalities for sarcopenic obesity: a systematic review. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2022 Feb;13(1):68-85. doi: 10.1002/jcsm.12878. Epub 2022 Jan 4. PMID: 34984856; PMCID: PMC8818592.
59. DRAPER, H. H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 15, n. 4, p. 353–63, out. 1993.
60. DRUMMOND MJ, McCarthy JJ, Sinha M, Spratt HM, Volpi E, Esser KA, et al. Aging and microRNA expression in human skeletal muscle: a microarray and bioinformatics analysis. *Physiol Genomics* 2011;43: 595–603
61. DUMORTIER, O.; Hinault, C.; Van Obberghen, E. MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis. *Cell Metab.* 2013, 18, 312–324.
62. EL ASSAR M, Angulo J, Rodríguez-Mañas L. Frailty as a phenotypic manifestation of underlying oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2020 Mar;149:72-77. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.011. Epub 2019 Aug 15. PMID: 31422077.

63. ELTABLAWY, N. et al. Vitamin D protection from rat diabetic nephropathy is partly mediated through Klotho expression and renin-angiotensin inhibition. *Arch Physiol Biochem*, v. 124, p. 461-467, 2018.
64. FANAELI, H. et al. Gallic acid protects the liver against NAFLD induced by dust exposure and high-fat diet through inhibiting oxidative stress and repressing the inflammatory signaling pathways NF- κ B/TNF- α /IL-6 in Wistar rats. *Avicenna J Phytomed*, v. 11, p. 527-540, 2021.
65. FERRETTI, R. et al. High-fat diet suppresses the positive effect of creatine supplementation on skeletal muscle function by reducing protein expression of IGF-PI3K-AKT-mTOR pathway. *PloS one*, v. 13, n. 10, p. e0199728, 2018.
66. FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 407-411, 1957.
67. FRANÇA GO, Frantz EDC, Magliano DC, Bargut TCL, Sepúlveda-Fragoso V, Silveiras RR, Daliry A, Nascimento ARD, Borges JP. Effects of short-term high-intensity interval and continuous exercise training on body composition and cardiac function in obese sarcopenic rats. *Life Sci*. 2020 Sep 1;256:117920. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117920. Epub 2020 Jun 6. PMID: 32522571.
68. FRANCESCATO, H. D. C. et al. Previous Exercise Effects in Cisplatin-Induced Renal Lesions in Rats. *Kidney and Blood Pressure Research*, v. 43, n. 2, p. 582-593, 2018.
69. GAO HE, Wu DS, Sun L, Yang LD, Qiao YB, Ma S, Wu ZJ, Ruan L, Li FH. Effects of lifelong exercise on age-related body composition, oxidative stress, inflammatory cytokines, and skeletal muscle proteome in rats. *Mech Ageing Dev*. 2020 Jul;189:111262. doi: 10.1016/j.mad.2020.111262. Epub 2020 May 15. PMID: 32422206.
70. GAO, H. E. et al. . Lifelong Exercise in Age Rats Improves Skeletal Muscle Function and MicroRNA Profile. *Med Sci Sports Exerc*, v. 53, p. 1873-1882, 2021.
71. GARBER, C. E. et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, v. 43. P. 1334-1359, 2011.
72. GARCÍA-GARCÍA VA, Alameda JP, Page A, Casanova ML. Role of NF- κ B in Ageing and Age-Related Diseases: Lessons from Genetically Modified Mouse

- Models. *Cells*. 2021 Jul 27;10(8):1906. doi: 10.3390/cells10081906. PMID: 34440675; PMCID: PMC8394846.
73. GAROFALO, C. et al. A systematic review and meta-analysis suggests obesity predicts onset of chronic kidney disease in the general population. *Kidney Int.*, v. 91, p. 1224-1235, 2017.
74. GEMMINK A, Goodpaster BH, Schrauwen P, Hesselink MKC. Intramyocellular lipid droplets and insulin sensitivity, the human perspective. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017 Oct;1862(10 Pt B):1242-1249. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.07.010. Epub 2017 Jul 22. PMID: 28739280.
75. GHOLIPOUR, M., Seifabadi, M. & Asad, M.R. Endurance exercise training under normal diet conditions activates skeletal muscle protein synthesis and inhibits protein degradation signaling except MuRF1. *Sport Sci Health* 18, 1033–1041 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11332-021-00888-8>
76. GIMENES, S. N. C. et al. Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. *Sci Rep.*, v. 7. P. 70-77, 2017.
77. GOODPASTER BH, Sparks LM. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab*. 2017 May 2;25(5):1027-1036. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.015. PMID: 28467922; PMCID: PMC5513193.
78. GOPALAN V, Yaligar J, Michael N, Kaur K, Anantharaj R, Verma SK, Sadananthan SA, Le GTT, Goh J, Velan SS. A 12-week aerobic exercise intervention results in improved metabolic function and lower adipose tissue and ectopic fat in high-fat diet fed rats. *Biosci Rep*. 2021 Jan 29;41(1):BSR20201707. doi: 10.1042/BSR20201707. PMID: 33432988; PMCID: PMC7846962.
79. GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.*, v. 126. P. 131-138, 1982.
80. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. ed. [s.l.] Oxford: Clarendon, 2007.
81. HAUCK AK, Huang Y, Hertzell AV, Bernlohr DA. Adipose oxidative stress and protein carbonylation. *J Biol Chem*. 2019 Jan 25;294(4):1083-1088. doi: 10.1074/jbc.R118.003214. Epub 2018 Dec 18. PMID: 30563836; PMCID: PMC6349117.
82. HEKIMI, J. L.; LAPOINTE, J.; YANG, W. "Taking a 'good' look at free radicals in the aging process". *Trends in Cell Biology.*, v. 21, p. 569. 2011.

83. HEO, J-W. et al. Exercise training attenuates obesity-induced skeletal muscle remodeling and mitochondria-mediated apoptosis in the skeletal muscle. *International journal of environmental research and public health*, v. 15, n. 10, p. 2301, 2018.
84. HERMIDA MDR, Malta R, de S Santos MDPC, Dos-Santos WLC. Selecting the right gate to identify relevant cells for your assay: a study of thioglycollate-elicited peritoneal exudate cells in mice. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):695. Published 2017 Dec 6. doi:10.1186/s13104-017-3019-5
85. HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ D, Rosado-Pérez J, Gavia-García G, Arista-Ugalde TL, Aguiñiga-Sánchez I, Santiago-Osorio E, Mendoza-Núñez VM. Aging, Physical Exercise, Telomeres, and Sarcopenia: A Narrative Review. *Biomedicines*. 2023 Feb 17;11(2):598. doi: 10.3390/biomedicines11020598. PMID: 36831134; PMCID: PMC9952920.
86. HNIA K, Clausen T, Moog-Lutz C. Shaping Striated Muscles with Ubiquitin Proteasome System in Health and Disease. *Trends Mol Med*. 2019 Sep;25(9):760-774. doi: 10.1016/j.molmed.2019.05.008. Epub 2019 Jun 21. PMID: 31235369.
87. HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *Journal of biological chemistry*, v. 242, n. 9, p. 2278-2282, 1967.
88. HONG SH, Choi KM. Sarcopenic Obesity, Insulin Resistance, and Their Implications in Cardiovascular and Metabolic Consequences. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 13;21(2):494. doi: 10.3390/ijms21020494. PMID: 31941015; PMCID: PMC7013734.
89. HUGHES, V. A. et al. Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 80, p. 475- 482, 2004.
90. HUI H, Zhai Y, Ao L, Cleveland JC Jr, Liu H, Fullerton DA, Meng X. Klotho suppresses the inflammatory responses and ameliorates cardiac dysfunction in aging endotoxemic mice. *Oncotarget*. 2017 Feb 28;8(9):15663-15676. doi: 10.18632/oncotarget.14933. PMID: 28152512; PMCID: PMC5362514.
91. HUNTER, G. R. et al. Sarcopenia and Its Implications for Metabolic Health. *Journal of obesity*, v. 2019, 2019.
92. HUYNH T, Reed C, Blackwell Z, Phelps P, Herrera LCP, Almodovar J, Zaharoff DA, Wolchok J. Local IL-10 delivery modulates the immune response and

- enhances repair of volumetric muscle loss muscle injury. *Sci Rep.* 2023 Feb 3;13(1):1983. doi: 10.1038/s41598-023-27981-x. PMID: 36737628; PMCID: PMC9898301.
93. HYATT, H. W. et al. Comparative changes in antioxidant enzymes and oxidative stress in cardiac, fast twitch and slow twitch skeletal muscles following endurance exercise training. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.*, v. 25, p. 160-168, 2016.
 94. IZBEKI F, Asuzu DT, Lorincz A, Bardsley MR, Popko LN, Choi KM, Young DL, Hayashi Y, Linden DR, Kuro-o M, Farrugia G, Ordog T. Loss of Kitlow progenitors, reduced stem cell factor and high oxidative stress underlie gastric dysfunction in progeric mice. *J Physiol.* 2010 Aug 15;588(Pt 16):3101-17. doi: 10.1113/jphysiol.2010.191023. Epub 2010 Jun 25. PMID: 20581042; PMCID: PMC2956948.
 95. JIANG, Q.; Wang, Y.; Hao, Y.; Juan, L.; Teng, M.; Zhang, X.; Li, M.; Wang, G.; Liu, Y. miR2Disease: A manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, D98–D104.
 96. JIMENEZ-GUTIERREZ GE, Martínez-Gómez LE, Martínez-Armenta C, Pineda C, Martínez-Nava GA, Lopez-Reyes A. Molecular Mechanisms of Inflammation in Sarcopenia: Diagnosis and Therapeutic Update. *Cells.* 2022 Aug 1;11(15):2359. doi: 10.3390/cells11152359. PMID: 35954203; PMCID: PMC9367570.
 97. JONES DP, Mody VC, Jr., Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P., Jr. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic. Biol. Med.* 2002;33:1290–1300.
 98. JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 8, n. 9–10, p. 1865–1879, 2006.
 99. JOSEPH, G. A. et al. Partial Inhibition of mTORC1 in Aged Rats Counteracts the Decline in Muscle Mass and Reverses Molecular Signaling Associated with Sarcopenia. *Mol Cell Biol.*, v. 11, pii: e00141-19, 2019.
 100. JUNG, J. U.; CHOI, M. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 15, p. 6184-6223, 2014.
 101. KALAMPOUKA I, van Bekhoven A, Elliott BT. Differing Effects of Younger and Older Human Plasma on C2C12 Myocytes in Vitro. *Front Physiol.* 2018 Feb

- 27;9:152. doi: 10.3389/fphys.2018.00152. PMID: 29535644; PMCID: PMC5835329.
102. KANG, Y. E. et al. The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction. *PLoS One*, v. 21, e0154003, 2016.
103. KAPLÁN P, Tatarková Z, Lichardusová L, Kmeťová Sivoňová M, Tomašcová A, Račay P, Lehotský J. Age-Associated Changes in Antioxidants and Redox Proteins of Rat Heart. *Physiol Res*. 2019 Dec 30;68(6):883-892. doi: 10.33549/physiolres.934170. Epub 2019 Oct 25. PMID: 31647296.
104. KARANTH SD, Washington C, Cheng TD, Zhou D, Leeuwenburgh C, Braithwaite D, Zhang D. Inflammation in Relation to Sarcopenia and Sarcopenic Obesity among Older Adults Living with Chronic Comorbidities: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2006. *Nutrients*. 2021 Nov 5;13(11):3957. doi: 10.3390/nu13113957. PMID: 34836213; PMCID: PMC8621174.
105. KAWANISHI, N. et al. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc. Immunol. Rev.*, v. 16, p. 105-118, 2010.
106. KELLER, P.; Gburcik, V.; Petrovic, N.; Gallagher, I.J.; Nedergaard, J.; Cannon, B.; Timmons, J.A. Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. *BMC Endocr. Disord*. 2011, 11, 7.
107. KHOO, J. et al. Exercise-induced weight loss is more effective than dieting for improving adipokine profile, insulin resistance, and inflammation in obese men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.*, v. 25, p. 566-575, 2015.
108. KIM, D. D. et al. Estimating the medical care costs of obesity in the United States: systematic review, meta-analysis, and empirical analysis. *Value in Health*, v. 19, n. 5, p. 602-613, 2016.
109. KIM, Shin-Hye; PARK, Mi-Jung. Effects of growth hormone on glucose metabolism and insulin resistance in human. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism*, v. 22, n. 3, p. 145, 2017.

110. KOB, R. et al. Gender-specific differences in the development of sarcopenia in the rodent model of the ageing high-fat rat. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, v. 6, n. 2, p. 181-191, 2015.
111. KOLNES KJ, Petersen MH, Lien-Iversen T, Højlund K, Jensen J. Effect of Exercise Training on Fat Loss-Energetic Perspectives and the Role of Improved Adipose Tissue Function and Body Fat Distribution. *Front Physiol*. 2021 Sep 24;12:737709. doi: 10.3389/fphys.2021.737709. PMID: 34630157; PMCID: PMC8497689.
112. KONDZIELA, W. Eine neue method zur messung der muskularen relaxation bei weissen mausen. *Arch Int Pharmacodyn.*, v. 152, p. 277-284, 1964.
113. KONOPKA AR, Harber MP. Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. *Exerc Sport Sci Rev*. 2014 Apr;42(2):53-61. doi: 10.1249/JES.0000000000000007. PMID: 24508740; PMCID: PMC4523889.
114. KOSAKA, S. et al. Il-10 controls th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunobiology*, v. 216, n. 7, p. 811–820, 2011.
115. KOSSLER N, Stricker S, Rödelsperger C, Robinson PN, Kim J, Dietrich C, Osswald M, Kühnisch J, Stevenson DA, Braun T, Mundlos S, Kolanczyk M. Neurofibromin (Nf1) is required for skeletal muscle development. *Hum Mol Genet*. 2011 Jul 15;20(14):2697-709. doi: 10.1093/hmg/ddr149. Epub 2011 Apr 9. PMID: 21478499; PMCID: PMC3118757.
116. KOZOMARA A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D155–D162.
117. KRÜGER, K. et al. Exercise training reverses inflammation and muscle wasting after tobacco smoke exposure. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 314, p. 366-376, 2018.
118. LAGOS-QUINTANA, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858 (2001).
119. LANDRIER, J. et al. MicroRNAs in Obesity and Related Metabolic Disorders. *Cells*. 8, 859, 2019
120. LANG, C.H.; Frost, R.A.; Nairn, A.C.; MacLean, D.A.; Vary, T.C. TNF-Alpha Impairs Heart and Skeletal Muscle Protein Synthesis by Altering Translation Initiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2002, 282, E336–E347.

121. LAURENS C, Moro C. Intramyocellular fat storage in metabolic diseases. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2016 Apr 1;26(1):43-52. doi: 10.1515/hmbci-2015-0045. PMID: 26741351.
122. LEDUC-GAUDET, J-P. et al. The impact of a short-term high-fat diet on mitochondrial respiration, reactive oxygen species production, and dynamics in oxidative and glycolytic skeletal muscles of young rats. *Physiological reports*, v. 6, n. 4, p. e13548, 2018.
123. LEE, S-R. et al. Effects of chronic high-fat feeding on skeletal muscle mass and function in middle-aged mice. *Aging clinical and experimental research*, v. 27, n. 4, p. 403-411, 2015.
124. LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 464–478, 1990.
125. LI H, Hastings MH, Rhee J, Trager LE, Roh JD, Rosenzweig A. Targeting Age-Related Pathways in Heart Failure. *Circ Res.* 2020 Feb 14;126(4):533-551. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315889. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32078451; PMCID: PMC7041880.
126. LI N, Shi H, Guo Q, Gan Y, Zhang Y, Jia J, Zhang L, Zhou Y. Aerobic Exercise Prevents Chronic Inflammation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle of High-Fat Diet Mice. *Nutrients.* 2022 Sep 10;14(18):3730. doi: 10.3390/nu14183730. PMID: 36145106; PMCID: PMC9503887.
127. LI Y, Sun Y, Zang Y, Su Y, Zhou H, Wang J, Xie M, Chen G, Liu L, Mei Q. GanMeijian ameliorates lipid accumulation and oxidative damage in alcoholic fatty liver disease in Wistar rats. *Life Sci.* 2020 Aug 15;255:117721. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117721. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32360617.
128. LI, C., Ni, YQ., Xu, H. et al. Roles and mechanisms of exosomal non-coding RNAs in human health and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 6, 383 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00779-x>
129. Li, X., Li, C., Zhang, W. et al. Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. *Sig Transduct Target Ther* 8, 239 (2023).
130. LI, Y. E. et al. GanMeijian ameliorates lipid accumulation and oxidative damage in alcoholic fatty liver disease in Wistar rats. *Life Sci*, v. 15, Epub 117721, 2020.
131. LIAO, Z-Y. et al. The effect of exercise, resveratrol or their combination on Sarcopenia in aged rats via regulation of AMPK/Sirt1 pathway. *Experimental gerontology*, v. 98, p. 177-183, 2017.

132. LIU SH, Chiu CY, Wang LP, Chiang MT. Omega-3 Fatty Acids-Enriched Fish Oil Activates AMPK/PGC-1 α Signaling and Prevents Obesity-Related Skeletal Muscle Wasting. *Mar Drugs*. 2019 Jun 25;17(6):380. doi: 10.3390/md17060380. PMID: 31242648; PMCID: PMC6628302.
133. LIU T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023–. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23. Epub 2017 Jul 14. PMID: 29158945; PMCID: PMC5661633.
134. LIU Y, Chen S, Li W, Du H, Zhu W. Isolation and characterization of primary skeletal muscle satellite cells from rats. *Toxicol Mech Methods*. 2012 Nov;22(9):721-5. doi: 10.3109/15376516.2012.720302. Epub 2012 Sep 26. PMID: 22901082.
135. LIU Y, Dong G, Zhao X, Huang Z, Li P, Zhang H. Post-exercise Effects and Long-Term Training Adaptations of Hormone Sensitive Lipase Lipolysis Induced by High-Intensity Interval Training in Adipose Tissue of Mice. *Front Physiol*. 2020 Nov 25;11:535722. doi: 10.3389/fphys.2020.535722. PMID: 33324231; PMCID: PMC7723847.
136. LIU, J. Irisin as an exercise-stimulated hormone binding crosstalk between organs. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 19, n. 2, p. 316-21, 2015.
137. LIU, S-H. et al. Omega-3 Fatty Acids-Enriched Fish Oil Activates AMPK/PGC-1 α Signaling and Prevents Obesity-Related Skeletal Muscle Wasting. *Marine drugs*, v. 17, n. 6, p. 380, 2019.
138. LIU, Y. et al. Isolation and characterization of primary skeletal muscle satellite cells from rats. *Toxicol Mech Methods*, v. 22, p. 721-725, 2012.
139. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.
140. LOWE, G. et al. Circulating inflammatory markers and the risk of vascular complications and mortality in people with type 2 diabetes and cardiovascular disease or risk factors: the ADVANCE study. *Diabetes*, v. 63, p. 1115-1123, 2014.
141. LU Y, Li Y, Sun Y, Ma S, Zhang K, Tang X, Chen A. Differences in energy metabolism and mitochondrial redox status account for the differences in propensity for developing obesity in rats fed on high-fat diet. *Food Sci Nutr*. 2021 Jan 23;9(3):1603-1613. doi: 10.1002/fsn3.2134. PMID: 33747472; PMCID: PMC7958544.

142. MA, J. et al. Mid-adulthood cardiometabolic risk factor profiles of sarcopenic obesity. *Obesity*, v. 24, n. 2, p. 526-534, 2016.
143. MAEDA Y, Tidyman WE, Ander BP, Pritchard CA, Rauen KA. Ras/MAPK dysregulation in development causes a skeletal myopathy in an activating BrafL597V mouse model for cardio-facio-cutaneous syndrome. *Dev Dyn*. 2021 Aug;250(8):1074-1095. doi: 10.1002/dvdy.309. Epub 2021 Feb 13. PMID: 33522658.
144. MALAVIYA, R.; LASKIN, J. D.; LASKIN, D. L. Oxidative stress-induced autophagy: role in pulmonary toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology.*, v. 275, p. 145-151, 2014.
145. MARGARITELIS, N. V. et al. Principles for integrating reactive species into in vivo biological processes: examples from exercise physiology. *Cellular Signalling*, v. 28, n. 4, p. 256-271, 2016.
146. MARGOLIS LM, Lessard SJ, Ezzyat Y, Fielding RA, Rivas DA. Circulating microRNA are predictive of aging and acute adaptive response to resistance exercise in men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017; 72(10):1319–26.
147. MARKLUND, S. T., MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, v. 47, p. 469-474, 1974.
148. MARKÓ, L. et al. Role of Cystathionine Gamma-Lyase in Immediate Renal Impairment and Inflammatory Response in Acute Ischemic Kidney Injury. *Scientific Reports*, v. 6, n. May, p. 1–10, 2016.
149. MAROSI, K. et al. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. *Neuroscience*, v. 226, p. 21-28, 2012.
150. MARTINEZ, P. F. et al. Modulation of MAPK and NF- κ B signaling pathways by antioxidant therapy in skeletal muscle of heart failure rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 39, n. 1, p. 371-384, 2016.
151. MAVROS, Y. et al. Reductions in C-reactive protein in older adults with type 2 diabetes are related to improvements in body composition following a randomized controlled trial of resistance training. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, v. 5, n. 2, p. 111-120, 2014.
152. MICHALAKIS, K. et al. Obesity in the ageing man. *Metabolism*, v. 62, n. 10, p. 1341-1349, 2013.

153. MOCHALOVA, E. P. et al. Atrogin-1/MAFbx mRNA expression is regulated by histone deacetylase 1 in rat soleus muscle under hindlimb unloading. *Sci Rep*, v. 9, Epub 10263, 2019.
154. MOKDAD, A. H. et al. Burden of obesity in the Eastern Mediterranean Region: findings from the Global Burden of Disease 2015 study. *International journal of public health*, v. 63, n. Suppl, p. 165-176, 2018.
155. MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55–63, 1983.
156. MOSOLE, S. et al. Long-term high-level exercise promotes muscle reinnervation with age. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 73, n. 4, p. 284-294, 2014.
157. MURAINÉ L, Bensalah M, Butler-Browne G, Bigot A, Trollet C, Mouly V, Negroni E. Update on anti-fibrotic pharmacotherapies in skeletal muscle disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2023 Feb;68:102332. doi: 10.1016/j.coph.2022.102332. Epub 2022 Dec 23. PMID: 36566666.
158. MURPHY MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009 Jan 1;417(1):1-13. doi: 10.1042/BJ20081386. PMID: 19061483; PMCID: PMC2605959.
159. N. Onyango, Arnold. 'Lipid Peroxidation as a Link between Unhealthy Diets and the Metabolic Syndrome'. *Accenting Lipid Peroxidation*, IntechOpen, 8 Dec. 2021. Crossref, doi:10.5772/intechopen.98183.
160. NASCIMENTO, C. M. et al. Sarcopenia, frailty and their prevention by exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 132, p. 42-49, 2019.
161. NAVARRO, A. et al. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 286, p. 505-511, 2004.
162. NEWSOME, B. J. et al. Green tea diet decreases PCB 126-induced oxidative stress in mice by up-regulating antioxidant enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 25, n. 2, p. 126–135, 2014.
163. NGUYEN, T. et al. The effects of resting and exercise serum from children with cystic fibrosis on C2C12 myoblast proliferation in vitro. *Physiological reports*, v. 2, n. 6, p. e12042, 2014.

164. NOVOA, Ulises et al. High-intensity exercise reduces cardiac fibrosis and hypertrophy but does not restore the nitroso-redox imbalance in diabetic cardiomyopathy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2017, 2017.
165. OGONOVSKY, H. et al. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. *Canadian Journal of Applied Physiology*, v. 30, n. 2, p. 186-195, 2005.
166. OPOKU-ACHEAMPONG, A. B. et al. Prostate cancer cell growth characteristics in serum and prostate-conditioned media from moderate-intensity exercise-trained healthy and tumor-bearing rats. *American journal of cancer research*, v. 9, n. 4, p. 650, 2019.
167. ORGAN JM, Allen MR, Myers-White A, et al. Effects of treadmill running in a rat model of chronic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;16:19-23. Published 2018 Sep 14. doi:10.1016/j.bbrep.2018.09.001
168. PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 70, n. 1, p. 158–69, jul. 1967.
169. PALMER, A. K.; KIRKLAND, J. L. Aging and adipose tissue: potential interventions for diabetes and regenerative medicine. *Exp. Gerontol.*, v. 15, p. 97-105, 2016.
170. PALMER, J.D.; Soule, B.P.; Simone, B.A.; Zaorsky, N.G.; Jin, L.; Simone, N.L. MicroRNA expression altered by diet: Can food be medicinal? *Ageing Res. Rev.* 2014, 17, 16–24.
171. PARK, S-J. et al. Obesity and the Risk of Dementia: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Korean Journal of Family Practice*, v. 8, n. 1, p. 118-124, 2018.
172. PASSONNEAU, J. V.; LAUDERDALE, V. R. A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues. *Analytical biochemistry*, v. 60, n. 2, p. 405-412, 1974.
173. PAVLOU S, Wang L, Xu H, Chen M. Higher phagocytic activity of thioglycollate-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. *J Inflamm (Lond)*. 2017;14:4. Published 2017 Feb 10. doi:10.1186/s12950-017-0151-x
174. PEDERSEN, B.K. et al. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol.*, v. 8, p. 457-465, 2012.

175. PENCE BD, Woods JA. Exercise, Obesity, and Cutaneous Wound Healing: Evidence from Rodent and Human Studies. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014 Jan 1;3(1):71-79. doi: 10.1089/wound.2012.0377. PMID: 24761347; PMCID: PMC3900100.
176. PEREIRA SS, Alvarez-Leite JI. Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. *Curr Obes Rep*. 2014 Dec;3(4):422-31. doi: 10.1007/s13679-014-0124-9. PMID: 26626919.
177. PETERSEN KS, Smith C. Ageing-associated oxidative stress and inflammation are alleviated by products from grapes. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2016;2016:6236309..
178. PHELPS M, PATTan-Brewer C, Ladiges W, Yablonka-Reuveni Z. Decline in muscle strength and running endurance in klotho deficient C57BL/6 mice. *Biogerontology*. 2013 Dec;14(6):729-39. doi: 10.1007/s10522-013-9447-2. Epub 2013 Sep 13. PMID: 24030242; PMCID: PMC3851892.
179. PIASECKI, M. et al. Age-dependent motor unit remodelling in human limb muscles. *Biogerontology*, v. 17, n. 3, p. 485-496, 2016.
180. PILON G, Charbonneau A, White PJ, Dallaire P, Perreault M, Kapur S, MarATTe A. Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOO⁻ induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle. *PLoS One*. 2010 Dec 28;5(12):e15912. doi: 10.1371/journal.pone.0015912. PMID: 21206533; PMCID: PMC3011021.
181. PINHO, R. A. et al. High-fat diet induces skeletal muscle oxidative stress in a fiber type-dependent manner in rats. *Free radical biology and medicine*, v. 110, p. 381-389, 2017.
182. PINTO, A. et al. Effects of physical exercise on inflammatory markers of atherosclerosis. *Current pharmaceutical design*, v. 18, p. 4326-4349, 2012.
183. PIRES RA, Correia TML, Almeida AA, Coqueiro RDS, Machado M, Teles MF, Peixoto ÁS, Queiroz RF, Pereira R. Time-Course of Redox Status, Redox-Related, and Mitochondrial-Dynamics-Related Gene Expression after an Acute Bout of Different Physical Exercise Protocols. *Life (Basel)*. 2022 Dec 15;12(12):2113. doi: 10.3390/life12122113. PMID: 36556478; PMCID: PMC9781780.

184. PLOTNIKOVA O, Baranova A, Skoblov M. Comprehensive Analysis of Human microRNA-mRNA Interactome. *Front Genet.* 2019 Oct 8;10:933. doi: 10.3389/fgene.2019.00933. PMID: 31649721; PMCID: PMC6792129.
185. RAHAL, A.; et al. "Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay". *BioMed Research International.*, v. 1, 2014.
186. RANJBARAN, M. et al. Renal tissue pro-inflammatory gene expression is reduced by erythropoietin in rats subjected to hemorrhagic shock. *J Nephrothol*, v. 6, p. 69-73, 2017.
187. REZENDE, Leonardo Mateus Teixeira de. Comparações nos efeitos do envelhecimento na fisiologia cardiovascular e termorregulatória em ratos Wistar, Wistar Kyoto e espontaneamente hipertensos durante o repouso e o exercício físico agudo. 2020. 171 f. Tese (Doutorado em Educação Física) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2020.
188. RICHARD K, Vogel SN, Perkins DJ. Quantitation of TLR4 Internalization in Response to LPS in Thioglycollate Elicited Peritoneal mouse Macrophages by Flow Cytometry. *Bio Protoc.* 2019;9(18):e3369. doi:10.21769/BioProtoc.3369
189. RICHTER K, Konzack A, Pihlajaniemi T, Heljasvaara R, Kietzmann T. Redox-fibrosis: Impact of TGF β 1 on ROS generators, mediators and functional consequences. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:344-352. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.015. Epub 2015 Aug 28. PMID: 26335400; PMCID: PMC4565043.
190. ROSENBERG, I. H. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *The Journal of nutrition*, v. 127, n. 5, p. 990S-991S, 1997.
191. ROSENO, S. L. et al. Short-term, high-fat diet accelerates disuse atrophy and protein degradation in a muscle-specific manner in mice. *Nutrition & metabolism*, v. 12, n. 1, p. 39, 2015.
192. RUBIO-RUIZ, M. E. et al. Mechanisms underlying metabolic syndrome-related sarcopenia and possible therapeutic measures. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 3, p. 647, 2019.
193. RUIZ-CASTELL, Maria et al. Estimated visceral adiposity is associated with risk of cardiometabolic conditions in a population based study. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 9121, 2021.
194. RYU Y, Lee D, Jung SH, Lee KJ, Jin H, Kim SJ, Lee HM, Kim B, Won KJ. Sabinene Prevents Skeletal Muscle Atrophy by Inhibiting the MAPK-MuRF-1

- Pathway in Rats. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 8;20(19):4955. doi: 10.3390/ijms20194955. PMID: 31597276; PMCID: PMC6801606.
195. SAFDAR, A. et al. The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 12, n. 9, p. 504, 2016.
 196. SAITO, Y., Chikenji, T.S., Matsumura, T. et al. Exercise enhances skeletal muscle regeneration by promoting senescence in fibro-adipogenic progenitors. *Nat Commun* 11, 889 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14734-x>
 197. SALLAM, N.; LAHER, I.. Exercise modulates oxidative stress and inflammation in aging and cardiovascular diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, 2016.
 198. SANADA F, Taniyama Y, Muratsu J, Otsu R, Shimizu H, Rakugi H, Morishita R. Source of Chronic Inflammation in Aging. *Front Cardiovasc Med.* 2018 Feb 22;5:12. doi: 10.3389/fcvm.2018.00012. PMID: 29564335; PMCID: PMC5850851.
 199. SANNICANDRO AJ, Soriano-Arroquia A, Goljanek-Whysall K. Micro(RNA)-managing muscle wasting. *J Appl Physiol* 2019; 127:619–632.
 200. SARTORI R, Romanello V, Sandri M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nat Commun.* 2021 Jan 12;12(1):330. doi: 10.1038/s41467-020-20123-1. PMID: 33436614; PMCID: PMC7803748.
 201. SCIORATI C, Gamberale R, Monno A, Citterio L, Lanzani C, De Lorenzo R, Ramirez GA, Esposito A, Manunta P, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Pharmacological blockade of TNF α prevents sarcopenia and prolongs survival in aging mice. *Aging (Albany NY).* 2020 Nov 26; 12:23497-23508 . <https://doi.org/10.18632/aging.202200>
 202. SEEGER, T.; Fischer, A.; Muhly-Reinholz, M.; Zeiher, A.M.; Dimmeler, S. Long-term inhibition of miR-21 leads to reduction of obesity in db/db mice. *Obesity (Silver Spring)* 2014, 22, 2352–2360.
 203. SELDEEN KL, Lasky G, Leiker MM, Pang M, Personius KE, Troen BR. High Intensity Interval Training Improves Physical Performance and Frailty in Aged Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018 Mar 14;73(4):429-437. doi: 10.1093/gerona/glx120. PMID: 28633487.
 204. SHABANI M, Sadeghi A, Hosseini H, Teimouri M, Babaei Khorzoughi R, Pasalar P, Meshkani R. Resveratrol alleviates obesity-induced skeletal muscle

- inflammation via decreasing M1 macrophage polarization and increasing the regulatory T cell population. *Sci Rep.* 2020 Mar 2;10(1):3791. doi: 10.1038/s41598-020-60185-1. PMID: 32123188; PMCID: PMC7052230.
205. SHANG GK, Han L, Wang ZH, Liu YP, Yan SB, Sai WW, Wang D, Li YH, Zhang W, Zhong M. Sarcopenia is attenuated by TRB3 knockout in aging mice via the alleviation of atrophy and fibrosis of skeletal muscles. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020 Aug;11(4):1104-1120. doi: 10.1002/jcsm.12560. Epub 2020 Feb 25. PMID: 32096609; PMCID: PMC7432570.
206. SHANG, R., Lee, S., Senavirathne, G. et al. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet* (2023). <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00611-y>
207. SHAW P, Chattopadhyay A. Nrf2-ARE signaling in cellular protection: Mechanism of action and the regulatory mechanisms. *J Cell Physiol.* 2020 Apr;235(4):3119-3130. doi: 10.1002/jcp.29219. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31549397.
208. SHEN, X. et al. Activation of Nrf2/HO-1 Pathway by Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibition Attenuates Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Diabetic Rats. *Kidney Blood Press Res*, v. 42, p. 369-378, 2017.
209. SHOEMAKER ME, Pereira SL, Mustad VA, Gillen ZM, McKay BD, Lopez-Pedrosa JM, Rueda R, Cramer JT. Differences in muscle energy metabolism and metabolic flexibility between sarcopenic and nonsarcopenic older adults. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2022 Apr;13(2):1224-1237. doi: 10.1002/jcsm.12932. Epub 2022 Feb 17. PMID: 35178889; PMCID: PMC8978004.
210. SISHI, B. et al. Diet-induced obesity alters signalling pathways and induces atrophy and apoptosis in skeletal muscle in a prediabetic rat model. *Exp Physiol.*, v. 96, p. 179-193, 2011.
211. SOGLIA, Francesca; PETRACCI, Massimiliano; ERTBJERG, Per. Novel DNPH-based method for determination of protein carbonylation in muscle and meat. *Food chemistry*, v. 197, p. 670-675, 2016.
212. SPINAZZI, M. et al. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature protocols*, v. 7, n. 6, p. 1235, 2012.
213. SPOTO B, Di Betta E, Mattace-Raso F, Sijbrands E, Vilardi A, Parlongo RM, Pizzini P, Pisano A, Vermi W, Testa A, Cutrupi S, D'Arrigo G, Lonardi S, Tripepi

- G, Cancarini G, Zoccali C. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in subcutaneous and visceral fat in severe obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014 Oct;24(10):1137-43. doi: 10.1016/j.numecd.2014.04.017. Epub 2014 May 27. PMID: 24984824.
214. STEENBERG, A. et al. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol.*, v. 537, p. 633-639, 2001.
215. STORZ, P. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 14, p. 593-605, 2011.
216. STRLE K, McCusker RH, Tran L, King A, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. Novel activity of an anti-inflammatory cytokine: IL-10 prevents TNF α -induced resistance to IGF-I in myoblasts. *J Neuroimmunol.* 2007 Aug;188(1-2):48-55. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.05.003. Epub 2007 Jun 18. PMID: 17572510; PMCID: PMC2078530.
217. SUÁREZ-CUENCA, Juan Antonio et al. Enlarged adipocytes from subcutaneous vs. visceral adipose tissue differentially contribute to metabolic dysfunction and atherogenic risk of patients with obesity. *Scientific reports*, v. 11, n. 1, p. 1831, 2021.
218. SUGIHARA, H. et al. Oxidative stress-mediated senescence in mesenchymal progenitor cells causes the loss of their fibro/adipogenic potential and abrogates myoblast fusion. *Aging (Albany NY)*, v. 10, n. 4, p. 747, 2018.
219. SUN, C.; LI, S.; LI, D. Sulforaphane mitigates muscle fibrosis in mdx mice via Nrf2- mediated inhibition of TGF- β /Smad signaling. *Journal of Applied Physiology*, v. 120, n. 4, p. 377–390, 2016.
220. TANG, K.; WAGNER, P. D.; BREEN, E. C. TNF- α -mediated reduction in PGC-1 α may impair skeletal muscle function after cigarette smoke exposure. *J Cell Physiol.*, v. 222, p. 320–327, 2010.
221. TASTSOGLOU S, Skoufos G, Miliotis M, Karagkouni D, Koutsoukos I, Karavangeli A, Kardaras FS, Hatzigeorgiou AG. DIANA-miRPath v4. 0: expanding target-based miRNA functional analysis in cell-type and tissue contexts. *Nucleic Acids Research.* 2023 Jun 1: gkad431.
222. TCHERNOF, A., DESPRÉS, J. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.*, v. 93, p. 359-404, 2013.

223. TERMKWANCHAROEN C, Malakul W, Phetrungnapha A, Tunsophon S. Naringin Ameliorates Skeletal Muscle Atrophy and Improves Insulin Resistance in High-Fat-Diet-Induced Insulin Resistance in Obese Rats. *Nutrients*. 2022 Oct 4;14(19):4120. doi: 10.3390/nu14194120. PMID: 36235772; PMCID: PMC9571698.
224. TEZZE C, Sandri M, Tessari P. Anabolic Resistance in the Pathogenesis of Sarcopenia in the Elderly: Role of Nutrition and Exercise in Young and Old People. *Nutrients*. 2023 Sep 20;15(18):4073. doi: 10.3390/nu15184073. PMID: 37764858; PMCID: PMC10535169.
225. THOMA A, Lightfoot AP. NF- κ B and Inflammatory Cytokine Signalling: Role in Skeletal Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1088:267-279. doi: 10.1007/978-981-13-1435-3_12. PMID: 30390256..
226. THORNTON, J. S. et al. Physical activity prescription: a critical opportunity to address a modifiable risk factor for the prevention and management of chronic disease: a position statement by the Canadian Academy of Sport and Exercise Medicine. *British Journal of Sports Medicine*, v. 50, p. 1109-1114, 2016.
227. TRAN TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab*. 2008 May;7(5):410-20. doi: 10.1016/j.cmet.2008.04.004. PMID: 18460332; PMCID: PMC3204870.
228. VILLALTA SA, Rinaldi C, Deng B, Liu G, Fedor B, Tidball JG. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum Mol Genet*. 2011 Feb 15;20(4):790-805. doi: 10.1093/hmg/ddq523. Epub 2010 Nov 30. PMID: 21118895; PMCID: PMC3024048.
229. VITUCCI D, Imperlini E, Arcone R, Alfieri A, Canciello A, Russomando L, Martone D, Cola A, Labruna G, Orrù S, Tafuri D, Mancini A, Buono P. Serum from differently exercised subjects induces myogenic differentiation in LHCN-M2 human myoblasts. *J Sports Sci*. 2018 Jul;36(14):1630-1639. doi: 10.1080/02640414.2017.1407232. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29160161.
230. VON BANK H, Kirsh C, Simcox J. Aging adipose: Depot location dictates age-associated expansion and dysfunction. *Ageing Res Rev*. 2021 May;67:101259. doi: 10.1016/j.arr.2021.101259. Epub 2021 Jan 27. PMID: 33515751; PMCID: PMC8379680.

231. WANG SQ, Li D, Yuan Y. Long-term moderate intensity exercise alleviates myocardial fibrosis in type 2 diabetic rats via inhibitions of oxidative stress and TGF- β 1/Smad pathway. *J Physiol Sci.* 2019 Nov;69(6):861-873. doi: 10.1007/s12576-019-00696-3. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31392590.
232. WANG, R. et al. Impacts of exercise intervention on various diseases in rats. *J Sport Health Sci*, v. 9, p. 211-227, 2020.
233. WELC SS, Wehling-Henricks M, Antoun J, Ha TT, Tous I, Tidball JG. Differential Effects of Myeloid Cell PPAR δ and IL-10 in Regulating Macrophage Recruitment, Phenotype, and Regeneration following Acute Muscle Injury. *J Immunol.* 2020 Sep 15;205(6):1664-1677. doi: 10.4049/jimmunol.2000247. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32817369; PMCID: PMC7484367.
234. WHITHAM, M. et al. Extracellular vesicles provide a means for tissue crosstalk during exercise. *Cell metabolism*, v. 27, n. 1, p. 237-251. e4, 2018.
235. WU, J., Lin, S., Chen, W. et al. TNF- α contributes to sarcopenia through caspase-8/caspase-3/GSDME-mediated pyroptosis. *Cell Death Discov.* 9, 76 (2023).
236. XING, Y. et al. Reduction of the PI3K/Akt related signaling activities in skeletal muscle tissues involves insulin resistance in intrauterine growth restriction rats with catch-up growth. *PLoS*, v. 9, Epub e0216665, 2019.
237. XU, X. et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cellpopulation in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Inteqr Comp Physiol*, v. 300, p. 1115-1125, 2011.
238. XUE QL, Yang H, Li HF, Abadir PM, Burks TN, Koch LG, Britton SL, Carlson J, Chen L, Walston JD, Leng SX. Rapamycin increases grip strength and attenuates age-related decline in maximal running distance in old low capacity runner rats. *Aging (Albany NY).* 2016 Apr;8(4):769-76. doi: 10.18632/aging.100929. PMID: 26997106; PMCID: PMC4925827.
239. YANG H, Xin X, Yu H, Bao Y, Jia P, Wu N, Jia D. microRNA Expression Profiles in Myocardium of High-Fat Diet-Induced Obesity Rat. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020 Apr 15;13:1147-1159. doi: 10.2147/DMSO.S248948. PMID: 32346302; PMCID: PMC7167270.
240. YUAN H, Niu Y, Liu X, Yang F, Niu W, Fu L. Proteomic analysis of skeletal muscle in insulin-resistant mice: response to 6-week aerobic exercise. *PLoS One.* 2013;8(1):e53887. doi: 10.1371/journal.pone.0053887. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23326526; PMCID: PMC3541238.

241. ZHU H, Sun Q, Tang H, Chen Y, Tan K, Xu X, Wang S. A novel rat model of sarcopenic obesity based on aging and high-fat diet consumption. *Biogerontology*. 2023 Apr;24(2):235-244. doi: 10.1007/s10522-022-10010-1. Epub 2023 Jan 6. PMID: 36607484.
242. ZHU S, Tian Z, Torigoe D, Zhao J, Xie P, Sugizaki T, Sato M, Horiguchi H, Terada K, Kadomatsu T, Miyata K, Oike Y. Aging- and obesity-related peri-muscular adipose tissue accelerates muscle atrophy. *PLoS One*. 2019 Aug 23;14(8):e0221366. doi: 10.1371/journal.pone.0221366. PMID: 31442231; PMCID: PMC6707561.

ANEXO I



Universidade Federal da Bahia
 Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira
 COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS
 (CEUA - IMS/CAT - UFBA)



PROJETO DE PESQUISA - Protocolo 079/2020 - Apreciação em 10/08/2020 – Aprovado sem restrições

Título: Estudos *in vivo* e *in vitro* dos efeitos do treinamento físico sobre alterações musculares decorrentes do sedentarismo, obesidade e envelhecimento

Protocolo: 079/2020

Pesquisador: Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão

Instituição: Instituto Multidisciplinar em Saúde – Campus Anísio Teixeira – UFBA

CERTIFICADO

A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA - IMS/CAT - UFBA) certifica que o projeto de pesquisa "**Estudos *in vivo* e *in vitro* dos efeitos do treinamento físico sobre alterações musculares decorrentes do sedentarismo, obesidade e envelhecimento**", Protocolo nº 079/2020, do pesquisador **Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão**, que foi submetido à avaliação desta Comissão, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foi **aprovado** na 30ª Reunião Ordinária do dia 15 de julho de 2020.

CERTIFICATE

The Committee on Ethics in Animal Use (CEUA - IMS / CAT - UFBA) certifies that the research project "***In vivo* and *in vitro* studies of the effects of physical training on muscle changes resulting from physical inactivity, obesity and aging** " Protocol nº 079/2020 of the researcher **Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão** who was submitted to the evaluation of this Commission is in accordance with the ethical principles of animal experimentation and was approved at the 30th ordinary meeting on 07/15/2020.

Vitória da Conquista, 10 de agosto de 2020.

Bruno Lopes Bastos
 Coordenador CEUA - IMS/CAT – UFBA