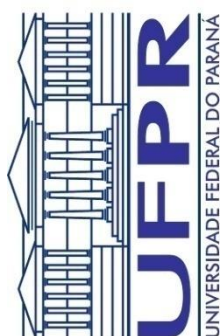
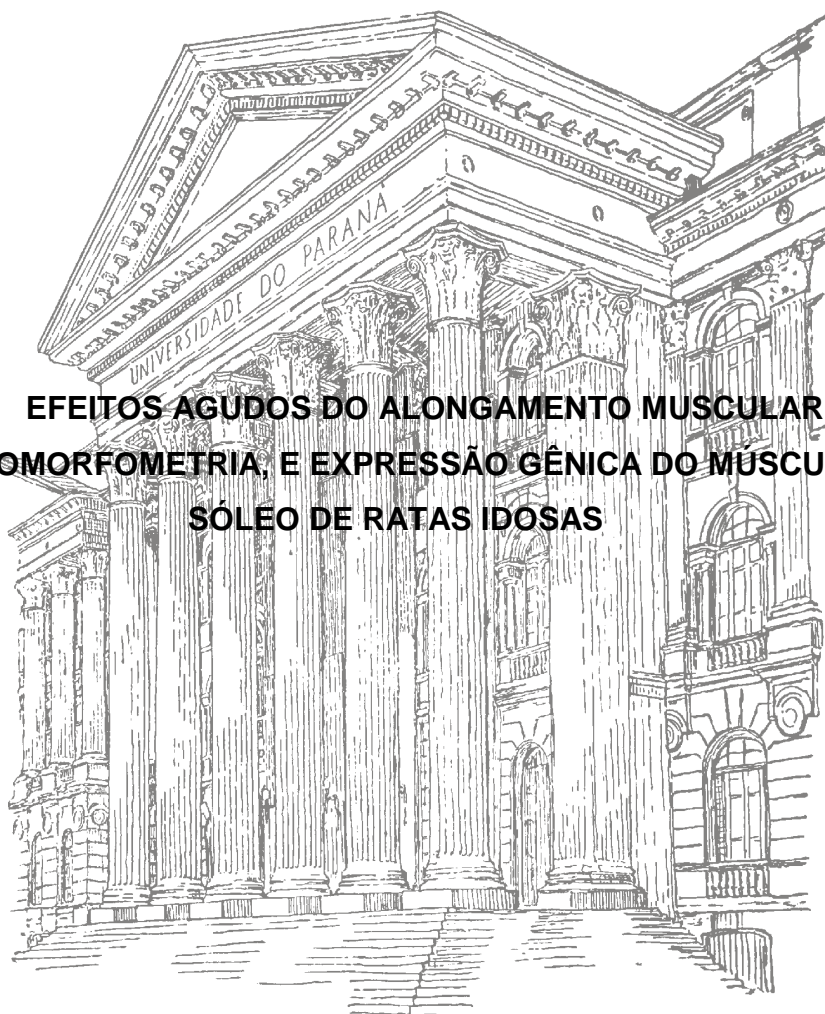


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

HILANA RICKLI FIUZA MARTINS

**EFEITOS AGUDOS DO ALONGAMENTO MUSCULAR NA
HISTOMORFOMETRIA, E EXPRESSÃO GÊNICA DO MÚSCULO
SÓLEO DE RATAS IDOSAS**



CURITIBA
2015

HILANA RICKLI FIUZA MARTINS

**EFEITOS AGUDOS DO ALONGAMENTO MUSCULAR NA
HISTOMORFOMETRIA, E EXPRESSÃO GÊNICA DO MÚSCULO SÓLEO DE
RATAS IDOSAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Educação Física, do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof. Dra Anna Raquel Silveira Gomes

Curitiba

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Martins, Hilana Rickli Fiuza

Efeitos agudos do alongamento muscular na histomorfometria, e expressão gênica do músculo sóleo de ratas idosas. / Hilana Rickli Fiuza Martins. – Curitiba, 2015.

108 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Anna Raquel Silveira Gomes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Educação Física.

1. Exercícios de alongamento 2. Sarcopenia 3. Envelhecimento 4. Expressão gênica 5. Matriz extracelular I. Título II. Gomes, Anna Raquel Silveira III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Educação Física.

CDD (20. ed.) 613.7



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Educação Física

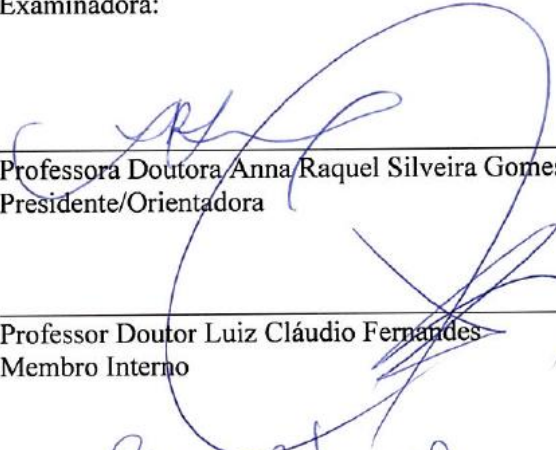


TERMO DE APROVAÇÃO

HILANA RICKLI FIUZA MARTINS

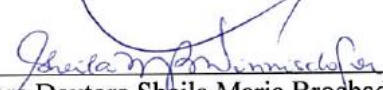
“Efeitos agudos do alongamento muscular na histomorfometria e expressão gênica do músculo sóleo de ratas idosas”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Educação Física, Área de Concentração Exercício e Esporte, Linha de Pesquisa de Atividade Física e Saúde do Programa de Pós-Graduação em Educação Física do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:



Professora Doutora Anna Raquel Silveira Gomes
Presidente/Orientadora

Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes
Membro Interno



Professora Doutora Sheila Maria Brochado Winnischofer
Membro Externo

Curitiba, 11 de Dezembro de 2015.

Aos meus pais, Roberto e Estael.

Ao Marcos.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

“Por tudo o que Tens feito e por tudo que Vais fazer, por Tuas promessas e tudo o que És, eu quero Te agradecer com todo o meu ser”.

Aos meus pais, Roberto e Estael, pela família estruturada que tive e tenho, pelos ensinamentos, correções, incentivo, e comemorações diante de cada vitória. Vocês me ensinaram a comemorar conquistas simples do dia a dia, que proporcionaram ter a estrutura que tenho hoje. Obrigada pelo investimento em minha formação educacional! Amo vocês!

Ao Marcos, por ter me incentivado a fazer o mestrado! Por ser meu companheiro! Por ser meu amigo! Por ser meu amor! Obrigada por ser meu tranquilizante nos momentos de ansiedade, por ouvir meus desabafos, por me dar ideias e sugestões durante o desenvolvimento dessa dissertação, por me ajudar na estatística, e por tolerar a minha brabeza! **Te amo!**

Ao Lucas e Débora, por que além de irmã e cunhado são meus amigos! Obrigada por vibrar comigo a cada conquista, e por me receber na casa de vocês em Pitanga, me oferecendo banho quentinho e um chá! Esses momentos foram um refrigerio em minha rotina de trabalho e estudo!

Ao Leonardo, Mônica e Anna Júlia. Obrigada por me receberem em sua casa, pela hospitalidade e cuidado que tiveram comigo! Prima, agradeço à Deus por sua família e pela família que somos! Amo vocês!

A tia Sandra, por me receber em sua casa me oferecendo um lugar para descansar e por divertir a minha estada em Curitiba! Gosto muito do seu bom humor!!

As amigas que fiz durante o mestrado: Talita, Elis, Luiza, Liliana. Obrigada por serem tão divertidas e embora não tenhamos convivido diariamente, bendito seja o WhatsApp!

Ao Rafael e Renato, colegas de mestrado, por me levarem até a rodoviária para conseguir pegar o ônibus das 13:00 nas sextas feiras após a aula da Dora!!

À diretoria da APAE de Turvo, por permitir ausentar-me do trabalho e entender as minhas “trocas de dias” para poder cursar o mestrado!

À Janete, diretora da APAE, por ser tão divertida, torcer por mim e me elogiar!! E ainda, obrigada pela amizade!

À Fer, Audrei e Elis, minhas colegas de trabalho no Turvo! Obrigada pelo companheirismo e pelos bons e divertidos dias de trabalho que passamos juntas!

À minha ex-coordenadora de curso e atual amiga Vânia Brondani, por abrir as portas para a carreira de docente do ensino superior, por torcer por mim em todas as etapas do mestrado, e por me ajudar a controlar os alunos da Educação Física! Foi muito bom ter trabalhado contigo!

À coordenação do Curso de Fisioterapia da Faculdade Guairacá pela compreensão com as minhas viagens para Curitiba! À Josiane, obrigada pelo dinamismo e eficiência no trabalho burocrático!

À Marina, Elisa e Luciane da Clínica de Fisioterapia Santa Fé, obrigada pela amizade e pela torcida quando decidi fazer o mestrado!

Ao Rafael Zotz, por cuidar tão bem das ratas idosas! A sua organização e cuidado com o Biotério da PUC-PR são admiráveis!

À Prof. Dra Lucia Noronha e à Marina Azevedo pela confecção das lâminas de imunohistoquímica e pela gentileza em responder meus e-mails, me auxiliando em minhas dúvidas!

Ao Seigo, por me ensinar a trabalhar no Image Pro-Plus e dar suporte com seus vídeos tutoriais!

Ao Prof. Dr. Mario Navarro pela permissão para usar o seu laboratório para o desenvolvimento da etapa da Biologia Molecular. Obrigada por me permitir usar o microscópio para fotografar as lâminas.

À Debora Rebecchi pelos ensinamentos em Biologia Molecular e à Betina por me ensinar a fotografar no Axion Vision!

Ao Prof. Dr. Emanuel M.de Souza, por autorizar a utilização do StepOne.

À Prof. Renata Romano (UNICENTRO) e às meninas do laboratório, Isa, Samantha, Paty e Naty por me permitirem acompanhar a rotina do laboratório para aprender a Biologia Molecular, e por me ensinarem a manusear o StepOne.

Ao Programa de Pós Graduação em Educação Física da Universidade Federal do Paraná.

Ao Rodrigo, secretário do PPGEDF, pela ajuda no processo licitatório do SYBR Green e por ser tão gentil e educado!

À vó Ila, tios e tias que oram por mim e pelo Marcos e nos incentivam a correr atrás dos nossos objetivos. Agradeço a Deus pela família que tenho!

Aos meus pacientes, por compreenderem as transferências dos atendimentos e por se preocuparem comigo!

Aos professores Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes (PPGEDF-UFPR) e Prof.^a Dr.^a Sheila Maria Brochado Winnischofer (PPGBIOQ-UFPR) por aceitarem compor minha banca de qualificação e defesa, por contribuírem com essa pesquisa e pela forma gentil como compartilharam seu conhecimento.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Anna Raquel,

Existe um ditado popular que diz “Deus escreve certo por linhas tortas”, mas gosto mais da versão escrita pela banda Pimentas do Reino que diz “Deus escreve certo por linhas certas, torto é quem não sabe interpretar”. Creio nisso, e hoje entendo que ter sido sua orientanda foi uma dessas linhas escritas por Deus em minha vida.

Obrigada por ter me aceitado como aluna ouvinte na sua disciplina e por ter sido exemplo de professora, o que me motivou a prestar o processo seletivo.

Obrigada por ter me recebido como sua orientanda de forma tão gentil e pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa.

Obrigada por ter me ensinado a escrever um ofício, a escrever um projeto para uma licitação e ter êxito nele, por ter me convidado para ser colaboradora em um manuscrito, por ter me ensinado a responder aos revisores dos artigos, por ter me ensinado a fazer contatos e parcerias e por todos os ensinamentos que você me deu!

Anna, admiro sua organização e a pessoa ética e correta que você é! Espelho-me em você!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Talita,

Eu te conheci na mesma oportunidade em que conheci a Anna, e entendo que esse era o momento certo. Como a gente sempre fala “tudo tem seu tempo”, e esse período do mestrado foi o tempo também de fazer amizades verdadeiras!

Talita, agradeço por você ter me permitido acompanhar a sua pesquisa de doutorado! Obrigada por ter me ensinado a manipular um animal de laboratório, por ter me ensinado a rotina do laboratório e a pipetar, por ter me ensinado a contar sarcômeros e a mensurar a área de secção transversa, por ter enviado os seus “passo-a-passo” dos procedimentos, por ter me ensinado a Biologia Molecular, por ter confiado em mim como colaboradora em manuscrito... não sei se eu consigo relacionar tudo o que eu preciso te agradecer!

Obrigada pela companhia na viagem que fizemos juntas, pelas caronas que você me deu até à rodoviária e pelas vezes que você foi me buscar cedinho lá também. Obrigada pelos almoços, cafés (chás, rs), por me ouvir, por me incentivar e também por ser exemplo!

Deus abençoe muito sua vida, e lhê dê em dobro tudo o que você fez por mim! Gosto muito de você!!

RESUMO

Os exercícios de alongamento são frequentemente recomendados para a pessoa idosa e têm-se mostrado como uma técnica capaz de melhorar a amplitude de movimento, o equilíbrio, padrão da marcha, capacidade funcional e diminuir o risco de quedas. Porém, ainda não se sabe quais os efeitos agudos histológicos e moleculares no músculo esquelético, decorrentes dos exercícios de alongamento em idosos. Dessa forma, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar os efeitos agudos do alongamento passivo estático na histomorfometria muscular, imunomarcacão e expressão gênica no músculo sóleo de ratas idosas. Foram utilizadas 15 ratas idosas, com 26 meses, divididas em grupo alongamento e grupo controle. O protocolo de alongamento consistiu em alongamento mecânico passivo do músculo sóleo esquerdo, composto de uma série de 4 repetições de 1 minuto, com intervalo de 30 segundos entre as repetições, realizado 3 vezes por semana, durante uma semana. Para realização do protocolo, as ratas foram sedadas por via inalatória com isoflurano, inclusive as pertencentes ao grupo controle. No 6º dia do experimento, as ratas foram anestesiadas para a retirada do músculo sóleo esquerdo e posteriormente eutanasiadas. Foi realizada pesagem da massa corporal inicial e final e massa absoluta do músculo sóleo. A massa muscular relativa ao peso corporal foi estimada. A morfologia do músculo sóleo foi avaliada com microscopia de luz, em cortes histológicos transversais, corados com hematoxilina e eosina. A área de secção transversa das fibras musculares foi mensurada por meio do Programa *Image J* versão 1.45q. Foi realizada imunohistoquímica para análise da marcação de TNF α , TIMP-1, TGF β -1, Colágeno tipo I e tipo III no músculo sóleo. A expressão dos genes TGF β , Colágeno tipo I e tipo III foram analisados pela técnica de PCR em Tempo Real. Para a comparação entre a massa corporal inicial e final foi utilizado o teste t pareado. Para a comparação entre os grupos foi aplicada ANOVA *one way* para dados paramétricos e para não paramétricos o *Kruskal-Wallis*. Verificou-se menor área de secção transversa das fibras musculares quando se comparou o grupo alongamento com o controle ($4148 \pm 1568 \mu\text{m}^2$ vs $5032 \pm 2125 \mu\text{m}^2$; $p=0,001$, *Kruskal Wallis*); menor porcentagem de imunomarcacão do colágeno tipo I por área de fibra muscular ($1,41 \pm 1,21\%$ vs $1,67 \pm 1,91\%$ $p=0,01$, *Kruskal-wallis*), maior porcentagem de imunomarcacão de TNF α ($0,12 \pm 0,11\%$ vs $0,07 \pm 0,08\%$, $p=0,04$, *Kruskal Wallis*) e colágeno tipo III ($7,06 \pm 6,88\%$ vs $4,92 \pm 5,30\%$, $p=0,01$, *Kruskal Wallis*). O TGF β -1 apresentou menor porcentagem de imunomarcacão ($1,60 \pm 1,69\%$ vs $1,90 \pm 2,85\%$, $p=0,04$, *Kruskal-wallis*) e expressão gênica ($0,83 \pm 0,89$ vs $4,47 \pm 5,65$ UA, $p=0,0001$, ANOVA *one way*) em relação ao grupo controle. Não foi encontrada diferença significativa na massa muscular absoluta e relativa, marcação imunopositiva de TIMP-1 e expressão gênica de Colágeno I e III entre os grupos. Os efeitos agudos do exercício de alongamento causaram hipotrofia muscular esquelética, no entanto, fatores envolvidos com o remodelamento da matriz extracelular indicaram efeito anti-fibrótico, no músculo esquelético de ratas idosas.

Palavras-chave: Exercício de alongamento muscular, sarcopenia, envelhecimento, matriz extracelular, ratas, expressão gênica, histomorfometria.

ABSTRACT

The muscle stretching exercises are usually recommended to elderly people, and it has been seen as able to improve the balance, gait pattern, increase range of motion and functional capacity and decrease the risk of falls. Considering that stretching exercise induces skeletal muscle and connective tissue adaptation we aimed to evaluate the effect of acute passive stretch on aged soleus muscle on muscle histomorphometry, immunohistochemistry and gene expression. Fifteen old female rats, with 26 months, were separated in stretching group and control group. The stretching protocol consisted of 4 repetitions each of 1 minute with 30 seconds interval between sets, 3 times a week during 1 week, on the left soleus muscle. The rats were anesthetized with isoflurane inhalation, including the control group. At the 6th day of the experiment, the rats were anesthetized to remove soleus muscle and then euthanized. Initial and final body weight and absolute weight of the soleus muscle were evaluated. The relative muscle mass was also identified. The soleus muscle was stained with hematoxylin and eosin and was analyzed morphologically by light microscope. The cross sectional area of muscle fiber was assessed by *Image J 1.45q* software. Immunohistochemistry for quantification of TNF α , TGF- β 1, type I and type III collagen and TIMP-1 and gene expression by PCR Real Time for quantification of TGF β -1, type I Collagen and type III Collagen were performed. The statistical analysis was the paired t-test, ANOVA one way test for parametric and *Kruskal-Wallis* test for nonparametric data. The stretching group showed smallest cross-sectional area of muscle fibers when compared to the control group ($4148 \pm 1568 \mu\text{m}^2$ vs $5032 \pm 2125 \mu\text{m}^2$; $p=0,001$, Kruskal Wallis), less type I collagen percentage of immunostain ($1,41 \pm 1,21\%$ vs $1,67 \pm 1,91\%$ $p=0,01$, Kruskal-wallis), largest TNF α percentage of immunostain ($0,12 \pm 0,11\%$ vs $0,07 \pm 0,08\%$, $p=0,04$, Kruskal Wallis) and type III collagen percentage of immunostain ($7,06 \pm 6,88\%$ vs $4,92 \pm 5,30\%$, $p=0,01$, Kruskal Wallis), and lower TGF- β 1 percentage of immunostain per soleus muscle fiber area ($1,60 \pm 1,69\%$ vs $1,90 \pm 2,85\%$, $p=0,04$, Kruskal-wallis) and gene expression ($0,83 \pm 0,89$ vs $4,47 \pm 5,65$ UA, $p=0,0001$, ANOVA one way). There was no significant difference in relative and absolute muscle mass, TIMP percentage of immunostain and gene expression of collagen I and III between groups. The acute effect of muscle stretching was muscle atrophy, however, the factors involved in the extracellular matrix remodeling showed anti-fibrotic effect in muscle of aged rats.

Key words: Muscle stretching exercise, sarcopenia, aging, extracellular matrix, rats, gene expression, histo morfometry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Alterações moleculares, fisiológicas e declínio funcional que levam à fragilidade.

Figura 02: Maquinaria da transdução do sinal do TGF β .

Figura 03: Maquinaria da transdução do sinal do TNF α .

Figura 04: Mecanotransdução.

Figura 05: Aparato de alongamento.

Figura 06: Desenho esquemático das secções realizadas no músculo sóleo.

Figura 07: Corte histológico transversal do músculo sóleo em objetiva de 10X.

Figura 08: Análise das imagens pelo image Pro Plus®.

Figura 08-A: Imunomarcação

Figura 08-B: Mensuração da área da fibra muscular

Figura 09: Massa corporal inicial e final de ratas idosas.

Figura 10: Área de secção transversa da fibra muscular.

Figura 11: Fotomicrografia de corte histológico transversal do músculo sóleo de ratas idosas com imunopositividade para TNF α .

Figura 12: Fotomicrografia de corte histológico transversal do músculo sóleo de ratas idosas com imunopositividade para TGF β .

Figura 13: Fotomicrografia de corte histológico transversal do músculo sóleo de ratas idosas com imunopositividade para colágeno tipo I.

Figura 14: Fotomicrografia de corte histológico transversal do músculo sóleo de ratas idosas com imunopositividade para Colágeno tipo III.

Figura 15: Fotomicrografia de corte histológico transversal do músculo sóleo de ratas idosas com imunopositividade para TIMP.

Figura 16: Prováveis vias de sinalização envolvidas na resposta aguda do músculo ao exercício de alongamento.

LISTA DE TABELAS:

Tabela 01: Comparação da massa corporal inicial e final, massa muscular absoluta e massa muscular relativa entre os grupos.

Tabela 02: Comparação da área de imunopositividade e porcentagem de TNF α no músculo sóleo entre os grupos.

Tabela 03: Comparação da área de imunopositividade e porcentagem de TGF β no músculo sóleo entre os grupos.

Tabela 04: Comparação da área de imunopositividade e porcentagem de colágeno tipo I no músculo sóleo entre os grupos.

Tabela 05: Comparação da área de imunopositividade e porcentagem de Colágeno tipo III no músculo sóleo entre os grupos.

Tabela 06: Comparação da área de imunopositividade e porcentagem de TIMP no músculo sóleo entre os grupos.

Tabela 07: Comparação da expressão gênica no músculo sóleo entre os grupos.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Mecanismos envolvidos na sarcopenia

LISTA DE ABREVIações

µg: micrograma

µl: microlitro

4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenol

AGES: Produtos finais da Glicação Avançada

Akt: proteína quinase B (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*)

ASTFM: área de secção transversa da fibra muscular

C2C12: células mioblastos de rato

Ca²⁺: cálcio

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX2: Ciclo-oxigenase-2

CTGF: Fator de crescimento de tecido conjuntivo

DNA: ácido desoxirribonucleico

ENOS: espécies reativas de nitrogênio

ERK: proteína quinase regulada por sinal extracelular

EROS: Espécies reativas de oxigênio

FOXO: Forkhead box O

g: gramas

GA: grupo alongamento

GC: grupo controle

GH: hormônio do crescimento

GPx: glutathione peroxidase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IGF-1: Fator tipo 1 de crescimento semelhante a insulina

IGF-1Ec: isoforma do fator tipo 1 de crescimento semelhante a insulina. Conhecido como fator mecânico de crescimento. Contém proteína codificada pelos exons 3 e 4.

IGF-1Eb: isoforma do fator tipo 1 de crescimento semelhante a insulina. Contém proteína codificada pelos exons 5.

IL-1B: Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

JNK: Kinase c-JUN-N-terminal

Kg: quilogramas

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MAPKerk1,2: proteína quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2

MAPK-erk5: quinase 5 regulada por sinal extracelular

MAPKp38: proteína quinase ativada por mitógeno p38

MEC: matriz extracelular

Mg: miligramas

Min: minutos

ml: mililitros

MGF: *mechano growth factor*

MMP-2 metaloprotease gelatinase A

MMP-9: metaloprotease gelatinase B

MMPs: Metaloproteases

MRFs: Fatores miogênicos regulatórios

mTOR: *mammalian Target Of Rapamycin*

MURF: Muscle Ring finger protein

NaCl: Cloreto de sódio

NF-κB: Fator nuclear Kappa B

nm: nanômetro

p70S6K: kinase S6 ribossomal

PCR-RT: reação em cadeia polimerase em tempo real

p13K: fosfatidilinositol 3 kinase

RER: Retículo endoplasmático rugoso

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

Rpm: rotações por minuto

RT: reação de transcrição reversa

SMAD: Small mothers againts decapentaplegic

SOD: superóxido dismutase

TGFβ: Fator beta transformador de crescimento

TIMP: inibidor tecidual das metaloproteases

TNF α : Fator alfa de necrose tumoral

TRX: tioredoxina redutase

Sumário

RESUMO	11
ABSTRACT	12
LISTA DE TABELAS:.....	14
LISTA DE QUADROS	15
LISTA DE ABREVIACÕES.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 MECANISMOS RELACIONADOS AO ENVELHECIMENTO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	25
2.2 MATRIZ EXTRACELULAR DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO	33
2.3 EXERCÍCIO DE ALONGAMENTO	42
3. OBJETIVOS.....	53
3.1 OBJETIVO GERAL.....	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4. HIPOTHESES.....	53
5. MATERIAIS E MÉTODOS	54
5.1 EXPERIMENTO	54
5.1.1 PROTOCOLO DE ALONGAMENTO	55
5.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO	56
5.2.1 ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA	58
5.2.2 IMUNOHISTOQUÍMICA	59
5.2.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	62
5.2.4 RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE – POLYMERASE CHAIN REACTION).....	63
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
6. RESULTADOS	66

6.1 MASSA CORPORAL, MASSA MUSCULAR ABSOLUTA E RELATIVA E HISTOMORFOMETRIA	66
6.1.1 MASSA CORPORAL INICIAL E FINAL	66
6.1.2 MASSA MUSCULAR	67
6.1.3 ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS MUSCULARES (ASTFM)	67
6.2 IMUNOHISTOQUÍMICA	68
6.2.1 IMUNOPOSITIVIDADE PARA TNFA POR ÁREA TOTAL DE FIBRA MUSCULAR	68
6.2.2 IMUNOPOSITIVIDADE PARA TGF-B1 POR ÁREA TOTAL DE FIBRA MUSCULAR	69
6.2.3 IMUNOPOSITIVIDADE PARA COLÁGENO TIPO I POR ÁREA TOTAL DE FIBRA MUSCULAR	70
6.2.4 IMUNOPOSITIVIDADE PARA COLÁGENO TIPO III POR ÁREA TOTAL DE FIBRA MUSCULAR	72
6.2.5 IMUNOPOSITIVIDADE PARA TIMP POR ÁREA TOTAL DE FIBRA MUSCULAR	73
6.3 EXPRESSÃO GÊNICA NO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS IDOSAS SUBMETIDAS AO EXERCÍCIO DE ALONGAMENTO	74
7. DISCUSSÃO	76
8. CONCLUSÃO	89
REFERENCIAS	90
ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO

O declínio físico relacionado ao sistema musculoesquelético durante o processo de envelhecimento pode acarretar prejuízos no desempenho das habilidades motoras, funcionalidade e equilíbrio (SANTOS et al., 2009; CASEROTTI, 2010). A diminuição da mobilidade é uma das maiores causas das disfunções musculoesqueléticas relacionadas ao envelhecimento e é determinante para a diminuição da massa muscular denominada sarcopenia, da força muscular denominada dinapenia e do equilíbrio, denominada presbiastasia (LANG et al., 2010; CLARK; MANINI, 2010; GALLON et al., 2011; RUWER et al., 2005; CALLISAYA et al., 2009).

Sarcopenia é uma síndrome multifatorial que envolve mudanças na morfologia e função muscular em resposta a alterações no balanço oxidativo, processo inflamatório, nível de atividade física e estado nutricional (GUNN; LEWANOWSKI, 2013; MENG; YU, PARK; PROLA, 2005; NILWIK et al, 2013). Afeta diretamente a arquitetura muscular reduzindo a área de secção transversa, comprimento das fibras musculares, volume e ângulo de penetração dos músculos, além de reduzir a capacidade de produzir força (BAPTISTA; VAZ, 2009).

O processo de envelhecimento pode vir acompanhado de redução da síntese de proteínas musculares esqueléticas e aumento nas concentrações de mediadores inflamatórios, fenômeno conhecido como *inflammaging* (CALDOW et al, 2012; PEAKE et al, 2010; OGAWA et al, 2010).

Inflammaging é definido como o estado de inflamação crônica, de pequena intensidade, sistêmico e sub-clínico, caracterizado por aumento em até quatro vezes nas concentrações circulantes de citocinas pró inflamatórias (ROCHA et al, 2010; SIMPSON et al, 2012).

Porém, é necessário o equilíbrio na concentração de citocinas, uma vez que a elevação das concentrações ainda que moderada, pode contribuir para diminuição de força e massa muscular, como já observado em ratos idosos saudáveis (RIEU et al, 2009; NICKLAS; BRINKLEY, 2009).

A sarcopenia parece ser resultante da produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator alfa de necrose tumoral (TNF α) (ROCHA *et al*,2010; VOLTARELLI *et al*, 2007). TNF α é capaz de ativar a caspase-8, a qual ativa a caspase-3, iniciando então a cascata da apoptose, sendo que a caspase-3 parece ser capaz de degradar o complexo actina-miosina (VOLTARELLI, *et al*,2007; TEIXEIRA *et al*, 2012). Portanto, a via da apoptose sinalizada por TNF α parece desempenhar papel significativo na sarcopenia (MARZETTI *et al*,2010; MENG; YU,2010; PEAK *et al*,2010).

Foi verificado que TNF α estimulou a apoptose em maior grau em células musculares de ratos idosos do que jovens, sugerindo que a sensibilidade para o TNF α aumenta com a idade (PEAKE *et al*,2010). Ainda, espécies reativas de oxigênio parecem atuar como segundo mensageiros para a sinalização de TNF α no músculo esquelético (MENG; YU, 2010), agindo assim como um indutor importante da atrofia muscular (SALVINI *et al*,2006; MENG; YU,2010, MUSSARO *et al*,2010).

Além da perda de massa muscular, o músculo envelhecido exibe ainda aumento de tecido conjuntivo e adiposo (BUFORD *et al* 2012, IMAMURA *et al*,1999). Esse aumento do tecido conjuntivo é responsável pela fibrose do tecido muscular idoso e pode estar relacionada com o aumento das concentrações de colágeno na matriz extracelular (ARTHUR; COOLEY, 2012; GILLIES; LIEBER, 2011).

Um mecanismo promotor da fibrose é a ativação do Fator Beta Transformador de Crescimento (TGF β) latente (LIU, *et al*, 2010). Foi relatado que o músculo envelhecido apresenta concentrações elevadas de TGF β , o que afeta negativamente a regeneração do músculo e induz a transformação de células miogênicas em fibróticas, após lesão (SAKUMA; YAMAGUCHI, 2012; BURKS; COHN, 2011).

Para prevenção e tratamento da sarcopenia tem sido recomendada a realização de exercícios físicos (IMAMURA *et al*,1999; SHAI *et al*,2008;). A prática regular de exercício é considerada intervenção não medicamentosa, com amplos benefícios sobre sistemas fisiológicos que exibem deterioração funcional e estrutural com o envelhecimento (ACSM, 2009). Tem sido sugerido que o alongamento ou

contração muscular possuem papel no desenvolvimento e manutenção da massa muscular (SQUECCO et al, 2008). Temaki et al (2014) afirmam que prescrições específicas para a prevenção e tratamento da sarcopenia ainda permanecem incertas, embora o alongamento moderado e nutrição rica em proteína parecem prover evidências favoráveis. Recentemente foi relatado que a combinação de treinamento de resistência progressiva e ingestão de proteína incluída na dieta ou sob forma suplementada são suficientes para minimizar a sarcopenia (MONTORO et al,2015; GOISSER et al,2015). Ainda de acordo com Phu et al (2015) o exercício pode ter efeitos benéficos sobre os mecanismos que causam a sarcopenia, o que inclui a redução da inflamação, aumento das células satélites e redução da infiltração de gordura.

Os exercícios físicos tais como alongamento ou exercício excêntrico, comparado a contrações concêntricas, provém significativa fonte de estresse mecânico ao músculo, que pode resultar em mudanças na morfologia muscular, incluindo o remodelamento da matriz extracelular e hipertrofia (BOPPART et al,2001; GILLIES et al,2011). Além disso, o alongamento muscular tem sido considerado como um estímulo para o aumento no comprimento muscular em série (longitudinal), na área de secção transversa das fibras musculares, na expressão de fatores regulatórios miogênicos e melhora da orientação das fibras colágenas em ratos (COUTINHO et al, 2004;COUTINHO et al, 2006;SALVINI et al, 2006; SECCHI et al,2008;CAÇÃO-BENEDINI et al, 2013; FOWLES et al,2000; GOMES et al,2006; PEVIANI et al,2007).

Essas respostas do músculo esquelético ao estímulo mecânico do exercício de alongamento só acontecem mediante o envolvimento de moléculas extracelulares sinalizadas por meio da mecanotransdução (DE DEYNE, 2001; GOMES et al, 2006). A mecanotransdução promove ainda respostas na matriz extracelular as quais causam seu remodelamento o que é dependente da ação coordenada da degradação e síntese de componentes da matriz (PEVIANI et al, 2009). As metaloproteinases da matriz (MMPs) desempenham papel importante no remodelamento, pois atuam na degradação de componentes da MEC e são

controladas pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (VU; VERB, 2000; PEVIANI et al, 2009).

Apesar de estudo recente não ter observado modificação da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) após uma semana de exercício de alongamento em ratos jovens, ainda não se sabe os efeitos das MMPs e dos TIMPs após exercício de alongamento em ratos idosos (PEVIANI et al, 2009).

Dessa forma, a investigação dos genes e proteínas envolvidos no trofismo do músculo idoso, após exercício de alongamento é importante para a compreensão dos efeitos agudos e das vias envolvidas nos processos de remodelamento da matriz extracelular.

Ainda, o uso de modelos animais beneficia essas investigações, tendo em vista que a maioria das alterações que contribuem para o envelhecimento muscular em humanos é mimetizada em roedores (DEMONTIS et al, 2013).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos agudos do alongamento mecânico passivo estático, na histomorfometria, imunomarcção e expressão gênica do músculo sóleo de ratas idosas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mecanismos relacionados ao envelhecimento do músculo esquelético

Os avanços da saúde no que se refere à prevenção e o tratamento de doenças tem gerado aumento da longevidade e da expectativa de vida (BAPTISTA & VAZ, 2009). O envelhecimento é processo complexo regulado em múltiplos níveis, incluindo o genético, molecular, celular, orgânico e sistêmico (CALVO et al , 2010).

O envelhecimento é acompanhado por declínio progressivo na massa e força muscular o que pode levar à diminuição da funcionalidade (BALLAK et al,2014; DEMONTIS et al, 2013; WALSTOM et al, 2006; ARTHUR;COOLEY,2012). A perda da força e potência muscular podem contribuir para o aumento da probabilidade de quedas e diminuir a independência em idosos (WELLE, 2002).

Sarcopenia é síndrome multifatorial desenvolvida a partir de mudanças na morfologia do músculo, estresse oxidativo e inflamação, redução do nível de atividade física, sedentarismo e nutrição (GUNN; LEWANOWSKI, 2013; MENG; YU, 2010; PARK; PROLA, 2005; NILWIK et al, 2013). Afeta diretamente a arquitetura muscular, reduzindo a área de secção transversa, comprimento das fibras musculares, volume e ângulo de penetração dos músculos, além da visível redução da capacidade de produzir força (BAPTISTA; VAZ, 2009).

A sarcopenia é percebida inicialmente nas extremidades inferiores, que pode estar relacionada com a redução do nível de atividade física relacionada com o avançar da idade e/ou a diminuição de unidades motoras mais pronunciada nos músculos dos membros inferiores comparada com os músculos dos membros superiores (ARTHUR; COOLEY, 2012; NILWIK et al, 2013; KOOPMAN; LOON,2009). As fibras musculares tipo IIb são preferencialmente reduzidas e podem ainda apresentar inflamação, infiltração por tecido adiposo, fibrose e decréscimo da capilarização (DEMONTIS, et al, 2013; NILWIK et al, 2013; KOOPMAN; LOON, 2009).

A diminuição progressiva de massa e função muscular no envelhecimento é importante aspecto da fragilidade, sendo responsável pela apresentação clínica de perda de peso, fraqueza e dificuldade na locomoção do idoso (DEMONTIS, et al,

2013; PIETRANGELO et al, 2009), apresentadas na figura 01. A redução da massa muscular se inicia aproximadamente na 4ª década de vida e se acelera principalmente após os 75 anos (ACSM, 2009; PIETRANGELO, et al, 2009; ARTHUR; COOLEY, 2012; WU *et al*, 2011; DEMONTIS et al, 2013). Aos 80 anos, a capacidade de geração de força é aproximadamente 60% da capacidade de força mostrada aos 20-30 anos e o idoso pode ficar mais susceptível a síndrome da fragilidade (BALLAK et al, 2014).

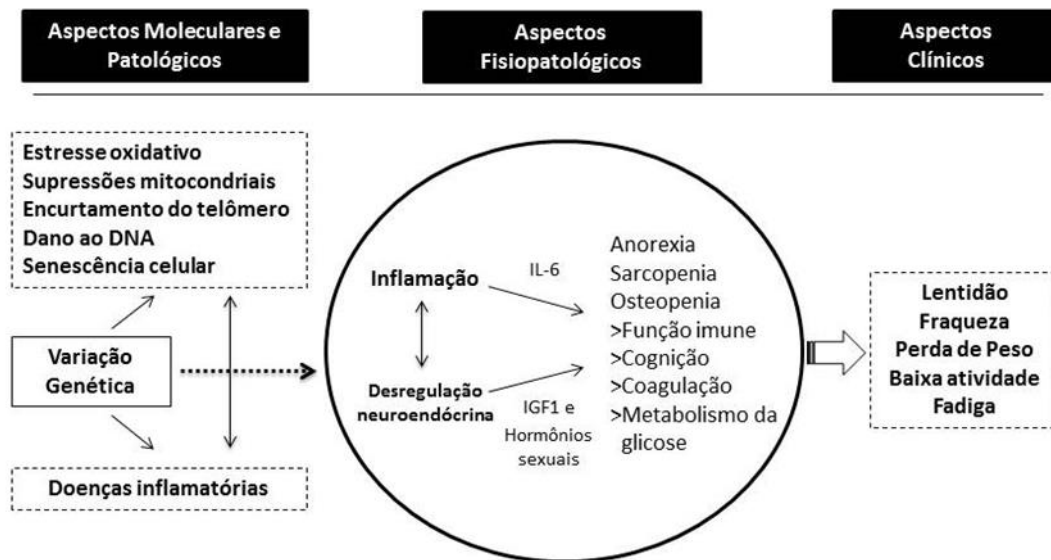


Figura 01: Alterações moleculares, fisiológicas e declínio funcional que levam a fragilidade (adaptado de WALTONS et al, 2006). IL-6: Interleucina 6; DNA: Ácido desoxirribonucleico; IGF-1: Fator de crescimento tipo 1 semelhante a insulina.

Ainda, existe declínio na síntese proteica muscular com o envelhecimento em humanos (NAIR, 2005). O balanço proteico deriva de processos anabólicos (síntese) e catabólicos (degradação). Se o processo anabólico é predominante, o músculo tende a hipertrofia, e se o processo catabólico predominar o músculo tende a atrofia (PIETROANGELO et al, 2009; WU et al, 2011; KOOPMAN; LOON,2009). Os sistemas proteolíticos que contribuem para a perda de massa muscular são o sistema calpaina cálcio dependente, protease lisossomal (catepsinas), via de sinalização das caspases e sistema ubiquitina proteassoma (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; LIU, 2011; MACHADO et al, 2009).

Durante o processo de degradação proteica, as proteínas são marcadas pela proteína ubiquitina, e posteriormente são degradadas no proteassoma por

proteólise. A via de degradação proteassômica é essencial para muitos processos celulares, incluindo o ciclo celular, regulação da expressão de genes e também respostas ao estresse oxidativo (PIETROANGELO, et al, 2009). O sistema ubiquitina-proteassoma é o mais importante na proteólise muscular. A ubiquitinação consiste numa modificação pós-traducional reversível que forma uma ligação isopeptídica entre a ubiquitina e a proteína-substrato e envolve pelo menos a ação de três classes de enzimas. Nesse processo, a classe E3 é a responsável pela especificidade da ubiquitinação, sendo capaz de reconhecer e marcar um conjunto de substratos para a degradação (SALVINI et al,2012).

As principais E3 são atrogina-1, também conhecida como MAFbx, e membros da família MuRF1 (Muscle RING Finger 1). A atrogina-1 está envolvida em processos como a septicemia, caquexia, diabetes mellitus, uremia, privação de alimento, imobilização e desnervação, enquanto a MuRF1 está associado à ubiquitinação dos componentes miofibrilares, como a titina, cadeia pesada e leve de miosina e proteína C miosina-ligante, bem como ao desalinhamento e degradação de proteínas miofibrilares (SALVINI et al,2012). A Atrogina-1 e MURF são genes que são fortemente codificados pelas ubiquitina-ligases músculo específicas (BONALDO; SANDRI, 2013):-

Em nível celular, várias vias sinalizadas por estímulos celulares e ambientais determinam o tamanho da miofibrila por meio da síntese e degradação proteica e incluem as vias de sinalização IGF-1/Akt/mTOR e Akt/GSK-3, as quais promovem a síntese proteica e a manutenção da massa muscular. Ainda, vias associadas com o catabolismo proteico envolvem a ativação de NFκB pelos mediadores inflamatórios TNFα e IL-6, entre outros. A sinalização via NFκB incluem a regulação da atrogina-1 e MURF que estão envolvidas na atrofia muscular (PATEL et al,2014).

Por exemplo, a Atrogina-1 promove a degradação de MyoD, fator chave na transcrição do músculo esquelético (BONALDO; SANDRI, 2013). A regulação positiva da atrogina-1, MURF e de outros genes relacionados a autofagia são normalmente bloqueados pela Akt (serina proteína kinase) pela regulação negativa de fatores de transcrição FOXO. Assim, a redução da atividade da Akt resulta em decréscimo da fosforilação da FOXO no citoplasma com consequente aumento de

FOXO nuclear. Dessa forma, quando a Akt é ativada, a degradação proteica é suprimida e quando FOXO é induzido, a síntese proteica é abolida (BONALDO; SANDRI, 2013).

Raue et al (2007) avaliaram a expressão de genes proteolíticos comparando mulheres idosas com mulheres jovens em repouso e após uma única sessão de exercício resistido. Os resultados apontaram que ao repouso, mulheres idosas apresentam concentrações mais elevadas de FOXO3A e MURF-1 em comparação a mulheres jovens. Não foram encontradas diferenças na expressão do gene atrogin-1 e TNF α entre mulheres idosas e jovens. Quatro horas após o exercício resistido foi encontrado aumento de 2,5 vezes na expressão da atrogin-1 nas mulheres idosas enquanto as mulheres jovens não mostraram diferença. A expressão dos genes FOXO3A, MURF-1 e TNF α não sofreram mudança após o exercício resistido.

Os autores atribuem o aumento da expressão da Atrogin-1 após exercício apenas nas mulheres idosas. A expressão de TNF α não alterada pela idade e pelo exercício foi explicada pelos autores como sendo devido à diferença metodológica em comparação a outros estudos e sugerem que o protocolo de exercício não foi suficiente para induzir aumento no TNF α nem mesmo em jovens, ou ainda que o TNF α não apresenta atividade precoce tendo em vista que a biopsia muscular foi realizada 4 horas após o exercício (RAUE et al, 2007).

As principais cascatas de sinalização intracelulares reguladoras de massa muscular são afetadas pelo envelhecimento, pois este compromete a capacidade do músculo esquelético em ativar a sinalização da Akt, proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e proteína kinase S6 ribossomal (p70S6K) (WU et al, 2011).

A proteína kinase B (Akt/PKB) é uma proteína serina/treonina kinase com papel já citados anteriormente nas respostas anabólicas e catabólicas. A via de sinalização da Akt transduz sinais emanados por fatores de crescimento, nutrientes, citocinas e estímulo mecânico, estimulando assim a síntese proteica, a hipertrofia muscular e a sobrevivência celular, enquanto antagoniza a perda de proteína muscular. Akt é altamente sensível a estímulos mecânicos e sua ativação é mediada pela PI3K (fosfatidilinositol-3-kinase) (Wu et al, 2011; SANDRI, 2008; SAKAMOTO et al, 2003).

Outra quinase importante que responde ao estresse mecânico é a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Trata-se de proteína serina/treonina quinase que responde também a fatores de crescimento, estressores ambientais e citocinas inflamatórias como TNF α , interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6). A MAPK é ponto de convergência para várias vias de sinalização que regulam a expressão gênica, incluindo cascata sinalizada por fatores de crescimento e seus receptores de superfície e cascatas ativadas por estresse físico (WU et al, 2011; MARTINEAU; GARDINER,2001). Proteínas MAPK como as kinases reguladas por sinal extracelular (ERK), kinase c-JUN-N-terminal (JNK) e p38 MAPK são mecanicamente sensíveis, por exemplo, ao estímulo de alongamento, o qual promove o aumento da ativação de JNK e p38 (BOPPART et al, 2001).

O exercício é considerado um dos mais potentes estímulos para induzir mudanças estruturais, metabólicas e funcionais das células do músculo esquelético. Tem sido reconhecido que a expressão aumentada de certos fatores de crescimento, intervém largamente na habilidade intrínseca do músculo esquelético para desenvolver hipertrofia, em resposta à sobrecarga mecânica e para regenerar-se em resposta a dano metabólico ou mecânico, decorrente de exercício desacostumado ou excessivo (PHILLIPOU et al, 2007).

Processos celulares de regeneração e hipertrofia da miofibrila podem ser decorrentes da ativação, proliferação e subsequente diferenciação de células satélites. Esses processos parecem ser modulados pelo fator 1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) e suas isoformas. No músculo esquelético humano a isoforma é IGF-1Ec, que corresponde a isoforma IGF-1Eb em roedores. IGF-1Ec, conhecido como fator mecânico de crescimento (MGF) tem sua expressão aumentada nas situações de exercício e lesão muscular, o que provavelmente induz o crescimento muscular e hipertrofia (PHILLIPOU et al, 2007).

O IGF-I é descrito como um dos principais fatores moleculares envolvidos na hipertrofia do músculo esquelético (SANDRI, 2008; SALVINI et al, 2012). A sua interação com o receptor de membrana muscular (IGF-1R) ativa a via IGF/PI3K/Akt (fator tipo 1 de crescimento semelhante a insulina/ fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B) que promove o aumento da síntese de proteínas com ação direta nos

mionúcleos, bem como por meio da ativação, proliferação e fusão das células satélites (SALVINI et al, 2012; MENG;YU, 2010). Conquanto, o envelhecimento está associado com atenuação da habilidade em sintetizar IGF-1 e dessa forma é atenuada a habilidade do IGF-1 para promover a proliferação de células satélites (MENG; YU, 2010).

É importante mencionar que espécies reativas de oxigênio (EROS) adicionalmente desempenham papel importante no disparo da sarcopenia no músculo esquelético durante o progresso do envelhecimento (PIETROANGELO et al, 2009). O músculo sarcopênico mostra concentrações elevadas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e baixos níveis de enzimas antioxidantes, como a catalase e glutathiona peroxidase (GPx) (GUNN; LEWANOWSKI, 2013). Assim sendo, o músculo esquelético é propenso ao estresse oxidativo durante o envelhecimento, o que aumenta a concentração de fatores inflamatórios no músculo por fatores de regulação como $TNF\alpha$, IL6, IL-1 e NF- κ B (SRIRAM et al, 2011; MENG; YU,2010).

O impacto do estresse oxidativo e da inflamação é sugerido como sendo responsáveis por promover perturbação das proteínas de sinalização anabólicas, como IGF-1 e ativação de sinais catabólitos, como a degradação no proteassoma (SRIRAM, et al, 2011). O $TNF-\alpha$ causa resistência à insulina e supressão da via de sinalização IGF1-Akt (BONALDO; SANDRI, 2013).

Outro fator regulador da massa muscular é a miostatina, membro da família do TGF- β , expressa e secretada predominantemente pelo músculo esquelético, e que age como regulador negativo do crescimento muscular (BONALDO; SANDRI, 2013; SANDRI, 2008; JACKMAN; KANDARIAN, 2004; SRIRAM et al, 2011). Em rato sarcopênico, a perda de massa muscular provocada pela miostatina foi associada com o sistema ubiquitina-proteassoma por meio da FOXO1 (GUNN; LEWANOWSKI, 2013; SRIRAM et al, 2011). Ainda, Sriram et al (2011) propõem que a miostatina age também como pro-oxidante capaz de sinalizar a produção de EROS via NF- κ B e $TNF\alpha$ em células musculares.

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) representa a família de 5 fatores de transcrição que regulam uma série de processos, dependente do tipo de célula e sinal, o que inclui a apoptose, imunidade e inflamação, desenvolvimento e

diferenciação (JACKMAN; KANDARIAN, 2004). Membros da família NF- κ B são expressos no músculo esquelético e modulam a expressão de um número de genes associados com a miogênese (JACKSON; McARDLE, 2011). Por exemplo, o TNF α induz a ativação de NF- κ B que é então envolvida na degradação ubiquitina-proteassoma. Também, a ativação de NF- κ B leva a regulação negativa da MyoD, que por sua vez leva ao decréscimo da síntese miofibrilar (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; MENG; YU,2010).

Alguns dos alvos que a via NF- κ B regula, incluem ligases músculo específicas E3 como a MuRF1, e que estão envolvidas no processo de redução de massa muscular e degradação por meio da redução da expressão gênica da MyoD (SRIRAM et al, 2011).

O músculo envelhecido sofre mudança na atividade miogênica e fibrogênica, de modo que o músculo senescente apresenta reduzida capacidade de reparo e regeneração, à medida que se torna cada vez mais fibrótico (WANG et al, 2015; MCGREGOR et al,2014). Com o envelhecimento, existe aumento na formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs), que resultam em modificações no colágeno, os quais aumentam o tecido conjuntivo muscular. As pontes cruzadas das AGEs enrijecem as fibras de colágeno, o que contribui para a função muscular prejudicada em pessoas idosas. Recente estudo com modelo animal mostrou que as concentrações das AGEs eram maiores em músculo idoso que em músculo adulto (LACRAZ et al, 2015).

Deste modo, o desenvolvimento da sarcopenia envolve aspectos moleculares, celulares, histológicos, fisiológicos, os quais acarretam desfechos clínicos. Segue abaixo o quadro 01, resumindo os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da sarcopenia.

Quadro 01: Mecanismos envolvidos na sarcopenia.

Mecanismos envolvidos na Sarcopenia	
Diminuição da concentração dos hormônios sexuais	Declínio nas concentrações de estrogênio e testosterona estão relacionados com o aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF α , que podem acelerar a diminuição de massa durante a sarcopenia.
Estresse oxidativo	O acúmulo de espécies reativas de oxigênio pode causar atrofia muscular, aumento de tecido fibrótico, diminuição da função muscular, degradação do tecido muscular. Estresse oxidativo pode induzir lesão de DNA e prejudicar a habilidade da DNA polimerase para copiar as fitas, resultando em encurtamento dos telômeros.
Encurtamento de telômeros	Instabilidade dos telômeros pode cessar a divisão celular e limitar replicações celulares.
Apoptose	Apoptose é ativada por sinais intrínsecos e extrínsecos como receptores de morte, acúmulo de espécies reativas de oxigênio, estresse no retículo endoplasmático ou mitocôndria. Músculo idoso tem aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas e caspases e fragmentação de DNA, com diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas.
Aumento de citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-6	TNF α : Associado com outros fatores que contribuem para a sarcopenia, incluindo a degradação proteica, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e apoptose. TNF α pode estar relacionado com sarcopenia por promover resistência à insulina, atrasando o reparo muscular e exacerbando as respostas pro-inflamatórias pela regulação ascendente da IL-6.
Desequilíbrio síntese/degradação proteica	Decréscimo da síntese proteica na sarcopenia pode ser resultado da expressão elevada de miostatina no músculo idoso. Miostatina pode inibir o crescimento muscular por impedir a ativação de células satélites.
Alterações nas fibras musculares e unidades motoras	Redução de fibras musculares e diminuição da área de secção transversa. Pode haver mudança de fibras tipo II para tipo I. Maior perda de fibras musculares tipo II do que tipo I no músculo esquelético envelhecido. Remodelação na arquitetura muscular em que o comprimento da fibra muscular e o ângulo de penação diminuem, e ocorre possivelmente perda do número de sarcômeros. Denervação acelerada pode estar relacionada com elevado estresse oxidativo e disfunção proteica na junção neuromuscular

 Continuação: Mecanismos envolvidos na sarcopenia

Aumento da fibrose intramuscular e tecido adiposo	Elevação nas concentrações de colágeno na matriz extracelular. Acúmulo de detritos da degradação proteica. Maior expressão de fibronectina em miofibrilas envelhecidas. Aumento de depósitos de gordura inter e intra fibras musculares.
Redução da força muscular	A diminuição da área de secção transversa e conseqüente atrofia muscular, perda de fibras musculares, alteração na porcentagem de tecido muscular contrátil e déficit na inervação muscular, incluindo recrutamento e disparo de unidades motoras, são as principais causas da redução da força muscular verificada na população idosa.
Velocidade da marcha	Maior declínio da força nos membros inferiores em comparação aos membros superiores e nos músculos extensores em comparação aos flexores. Em geral, existe maior declínio da força do que da massa muscular, com o declínio da força isométrica do extensor do joelho estando entre 55-76%.

Adaptado de Arthur e Cooley (2012); Baptista; Vaz (2009); Hiona; Leeuwenburg (2008); Davini; Nunes, 2003. Fielding et al,2012. TNF α : Fator de necrose tumoral α ; IL-6: Interleucina 6; GH: Hormônio do crescimento; IGF1: Fator transformador do crescimento semelhante a insulina; DNA: ácido desoxirribonucleico.

2.2 Matriz extracelular do músculo estriado esquelético

Para a compreensão das vias de sinalização intracelulares do músculo esquelético e o entendimento do papel das moléculas sinalizadoras, proteínas, e genes envolvidos no desenvolvimento da sarcopenia, torna-se necessário também a análise da composição e do comportamento das estruturas extracelulares. Essas estruturas formam a matriz extracelular (MEC), a qual também é acometida pelas manifestações do processo de envelhecimento do músculo esquelético.

A matriz extracelular é constituída por colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e enzimas de remodelamento (GILLIES; LIEBER, 2011). O colágeno é importante componente da matriz extracelular e desempenha importante papel na função muscular, especialmente em relação à transmissão de força (HEINEMEIER et al, 2007; SEENE et al, 2012).

O colágeno tipo I e o tipo III são isoformas primárias no músculo esquelético, e cada um apresenta propriedades mecânicas diferenciadas (MILLER, et al, 2001), em que o colágeno tipo I é tipicamente associado com rigidez do tecido (resistência ao alongamento), enquanto o tipo III está relacionado à complacência tecidual (rapidamente alongado) (MILLER et al, 2001). É sugerido que o colágeno tipo I é predominante no epimísio enquanto o colágeno tipo III parece ser melhor distribuído no endomísio. No perimísio quantidades iguais de ambos os tipos de colágeno são encontradas (GILLIES et al, 2011; JARVINEN et al, 2002).

O tecido conjuntivo muscular é importante para a transmissão de força e suporte estrutural. O colágeno tipo I, uma das maiores proteínas que compõe o tecido conjuntivo do músculo esquelético, tem estrutura de tripla hélice composta por duas cadeias $\alpha 1(I)$ e uma cadeia $\alpha 2(I)$. Essa característica estrutural da molécula fornece ao músculo alta força de tensão e elasticidade limitada, quando agregado às suas miofibrilas. Dessa forma, mudanças na síntese de colágeno tipo I terão um significado fisiológico na resposta do músculo exposto a forças mecânicas (HIROSE et al, 2008).

A estrutura e função normal do colágeno tipo I, sua produção e deposição na matriz extracelular dependem de várias etapas. As moléculas de colágeno são secretadas pelos fibroblastos na forma de procolágeno solúvel, que é ladeado por duas estruturas globulares de peptídeos contendo nitrogênio (N-) e carbono (C-) terminais. O procolágeno é secretado dentro das vesículas, formado no aparelho de Golgi e, em sequência, é secretado para a matriz extracelular (SILVA; PENNA, 2012; BAYNES, 2015).

No meio extracelular, as extensões não helicoidais do procolágeno são removidas por proteinases N- e C- terminais específicas. As moléculas de tropocolágeno são organizadas em fibrilas de colágeno insolúveis, que serão estabilizadas pela formação de ligações cruzadas intermoleculares derivadas de aldeídos (BAYNES, 2015). As ligações cruzadas do colágeno podem ser classificadas em enzimáticas e não enzimáticas, ocorrendo primeiramente a etapa enzimática catalisada pela atividade da enzima extracelular lisil-oxidase e posteriormente o processo de glicosilação de resíduos devido a processo oxidativo.

São conhecidos dois tipos de ligações cruzadas, as intramoleculares que ocorrem no interior da molécula e as intermoleculares que ligam uma tripla hélice à outra (VOET et al,2008; CHAMPLE;HARVEY,1996).

A capacidade mecânica das fibras de colágeno tipo I depende muito da enzima lisil oxidase a qual irá regular a formação de ligações cruzadas intermoleculares fortes (SNEDEKER; GAUTIERI, 2014).

Apesar da formação de ligações cruzadas enzimáticas alcançar um platô na maturação do colágeno, a rigidez do tecido conjuntivo aumenta com a idade, e esse enrijecimento do tecido é decorrente de uma forma adicional de ligação cruzada não enzimática, encontrada no tecido conjuntivo e que levam à formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) (MARTIM, et al,2015; HAUS et al,2007; SNEDEKER;GAUTIERI, 2014).

Anormalidades em uma dessas etapas podem causar aumento de transcrição do gene e da síntese, causando acúmulo do colágeno tipo I, que pode provocar disfunções em humanos, como a fibrose (VERRECHIA; MAUVIEL, 2004). O músculo esquelético idoso revela aumento na concentração de colágeno, ligações cruzadas e AGEs, os quais têm sido associado com aumento da rigidez muscular e redução da função (HAUS et al,2007). Foi reportado que a proporção relativa de colágeno tipo I aumenta enquanto colágeno tipo III diminui com a idade em animais envelhecidos, avaliados por meio da técnica de imunohistoquímica, o que pode contribuir para a deterioração das propriedades mecânicas do músculo observadas com o envelhecimento (KRAGSTRUP et al, 2011).

O aumento das pontes cruzadas do colágeno, verificadas principalmente no músculo esquelético envelhecido pode afetar a mecanotransdução bem como a extensibilidade músculo-tendínea (GOSSELIN et al,1998).

A quantidade de colágeno intracelular e extracelular é determinada pelo equilíbrio entre síntese e degradação (SIWIK et al, 2001). As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são responsáveis pela degradação e remodelamento do colágeno. Em condição fisiológica normal, a atividade das MMPs é regulada precisamente no nível da transcrição, pela ativação do precursor zimogênio, pela interação com componentes específicos da matriz extracelular e inibição por

inibidores endógenos. A inibição endógena das MMPs é executada pelos inibidores teciduais das metaloproteinases, as TIMPs (SIWIK, et al, 2001; VISSE; NAGASE, 2003).

Uma MMP típica consiste de um pro-peptídeo com cerca de 80 aminoácidos, um domínio catalítico com cerca de 170 aminoácidos, um ligante peptídeo de comprimento variável e um domínio do tipo hemopexina com cerca de 200 aminoácidos. As MMPs são sintetizadas como pré-proenzimas e quando o peptídeo sinal é removido durante a translação as proMMPs são geradas. Uma vez ativada, MMPs podem modular o potencial proteolítico global do meio extracelular por meio do zimogênio, ativar e degradar de maneira inibitória ou inativar outras proteases. Variados promotores das MMPs partilham inúmeros elementos cis em suas regiões promotoras, dos quais têm sido observado que algumas MMPs são co-reguladas por vários estímulos indutores, tais como fatores de crescimento e citocinas e podem ser também co-reprimidas por glicocorticoides e retinóides (LOFFECK et al, 2011).

É bem estabelecido que o equilíbrio entre a produção de metaloproteinases ativas e sua inibição é crítica para evitar as condições de descontrole do *turnover* da MEC, inflamação e crescimento celular e migração desregulada, os quais podem resultar em doença (LOFFECK et al, 2011). Forças de estiramento e cisalhamento influenciam a expressão, produção e atividade de MMPs podendo causar desequilíbrio entre MMPs e TIMPs, que resulta em mudança no remodelamento do tecido, afetando suas propriedades mecânicas (NAGASE et al, 2006).

MMPs têm papel regulatório no crescimento e desenvolvimento do músculo, e também são importantes no processo de reparo após lesão traumática ou miopatias. Atrofia muscular também é acompanhada por mudanças tanto em MMPs quanto em TIMPs. MMP-2 é constitutivamente expressa em mioblastos e fibroblastos do tecido muscular normal, e tem sua expressão aumentada na MEC em muitas condições patológicas, processo inflamatório e exercício excessivo (CARMELI et al, 2004).

Ainda, MMP-2 e MMP-9 são enzimas chaves envolvidas no processo de remodelamento do músculo esquelético (CARMELI et al, 2009; PEVIANI et al, 2009). Em condições normais, o músculo produz MMP-2 enquanto a MMP-9 é apenas ativada na presença de lesão muscular (PEVIANI et al, 2009). No entanto, no

músculo sóleo de ratos jovens não foi observada modificação das MMP-2 e MMP-9, em resposta ao alongamento (PEVIANI et al,2009).

A deposição apropriada dos componentes da MEC evita fibrose e melhora o processo de mecanotransdução. O aumento da concentração de TIMP-1 e TIMP-2 medeiam a atividade da protease e acúmulo dos componentes da matriz. MMPs desempenham papel no desenvolvimento da fibrose, pois o colágeno acumula quando sua taxa de síntese é maior que a taxa de degradação pelas MMPs, isto é, quando o equilíbrio entre a atividade da TIMP e MMP favorece a TIMP (MANN et al, 2011).

O envelhecimento pode alterar a constituição da MEC, conduzindo a um estado pseudofibrótico (PIETROANGELO, et al, 2009). Por exemplo, a baixa motilidade de mioblastos e miotubos senescentes pode ser atribuída ao aumento na deposição de componentes da matriz extracelular, como proteoglicanos, colágenos, e lamininas em vários pontos da diferenciação, somados à desregulação de citocinas e interferons (PIETROANGELO et al, 2009).

Outro fator relacionado ao estado fibrótico é o TGF- β , que no músculo adulto, afeta negativamente a regeneração e induz a transformação de células miogênicas em fibróticas, após lesão (SAKUMA; YAMAGUCHI, 2012). TGF- β existe em três formas (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) com múltiplas funções envolvendo a regulação da proliferação celular, diferenciação, apoptose, adesão e migração, além do papel de pivô na patogênese de muitas doenças (LIU; PRAVIA, 2010).

Além disso, TGF- β também estimula a produção de EROS em vários tipos de células, induz a apoptose e regula a expressão de proteínas da MEC, incluindo colágenos e TIMPs (LIU; PRAVIA, 2010; BLESER et al, 1999; LIU et al, 2010).

Dessa forma o TGF β é considerado regulador chave na composição e remodelamento da MEC. Sua ação é exercida através de duas vias complementares, uma que reduz a degradação da matriz e outra que estimula o acúmulo. Em termos simplificados, TGF- β inibe a síntese de proteinases extracelular enquanto aumenta a produção de seus inibidores e dos componentes estruturas da MEC (VERRECHIA; MAUVIEL, 2004). Igualmente importante é a capacidade do TGF- β em diminuir a produção de enzimas que degradam a MEC, como as

colagenases, enquanto aumenta a produção de enzimas que inibem a degradação da MEC, como as TIMPs (MANN et al, 2011).

TGF- β ativado induz os fibroblastos a produzir colágeno tipo I, fibronectina, fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) e suprime MMPs (GILLIES; LIEBER, 2011). A sinalização antagônica do TGF- β por agentes terapêuticos tem mostrado inibir a fibrose e melhorar a regeneração muscular em modelos animais (MANN et al, 2011). Begs et al (2004) sugerem que existe um intrigante relacionamento entre a via do TGF- β alterada, fibrose e envelhecimento muscular. Os autores relatam que a via de sinalização do TGF β é ativa em progenitores miogênicos envelhecidos e que uma característica dessas células é a superexpressão do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e subsequente fibrose.

Entre os reguladores da transcrição do colágeno tipo I está a via de sinalização TGF- β /SMAD. Após ativação, a superfamília TGF- β inicia sua ação celular por meio da ligação aos receptores serina/treonina quinase. O receptor da família TGF- β consiste em duas subfamílias de estrutura similar, o receptor tipo I e o receptor tipo II, com as regiões extracelulares ricas em pequenas cisteínas e a região intracelular consistindo de domínios de quinases (VERRECHIA; MAUVIEL, 2002).

Após ativação dos ligantes, a sinalização até o núcleo ocorre predominantemente pela fosforilação de mediadores citoplasmáticos que pertencem à família SMAD. Ainda, um terceiro grupo de proteínas da família SMAD, as SMADs inibitórias Smad-6 e Smad-7 previnem a fosforilação das outras SMADs. Após a transcrição do gene alvo, o complexo SMAD é liberado da cromatina e passa pela ubiquitinação, seguida pela degradação no proteassoma (VERRECHIA; MAUVIEL, 2002). A figura 02 demonstra a transdução de sinal na via TGF- β /SMAD.

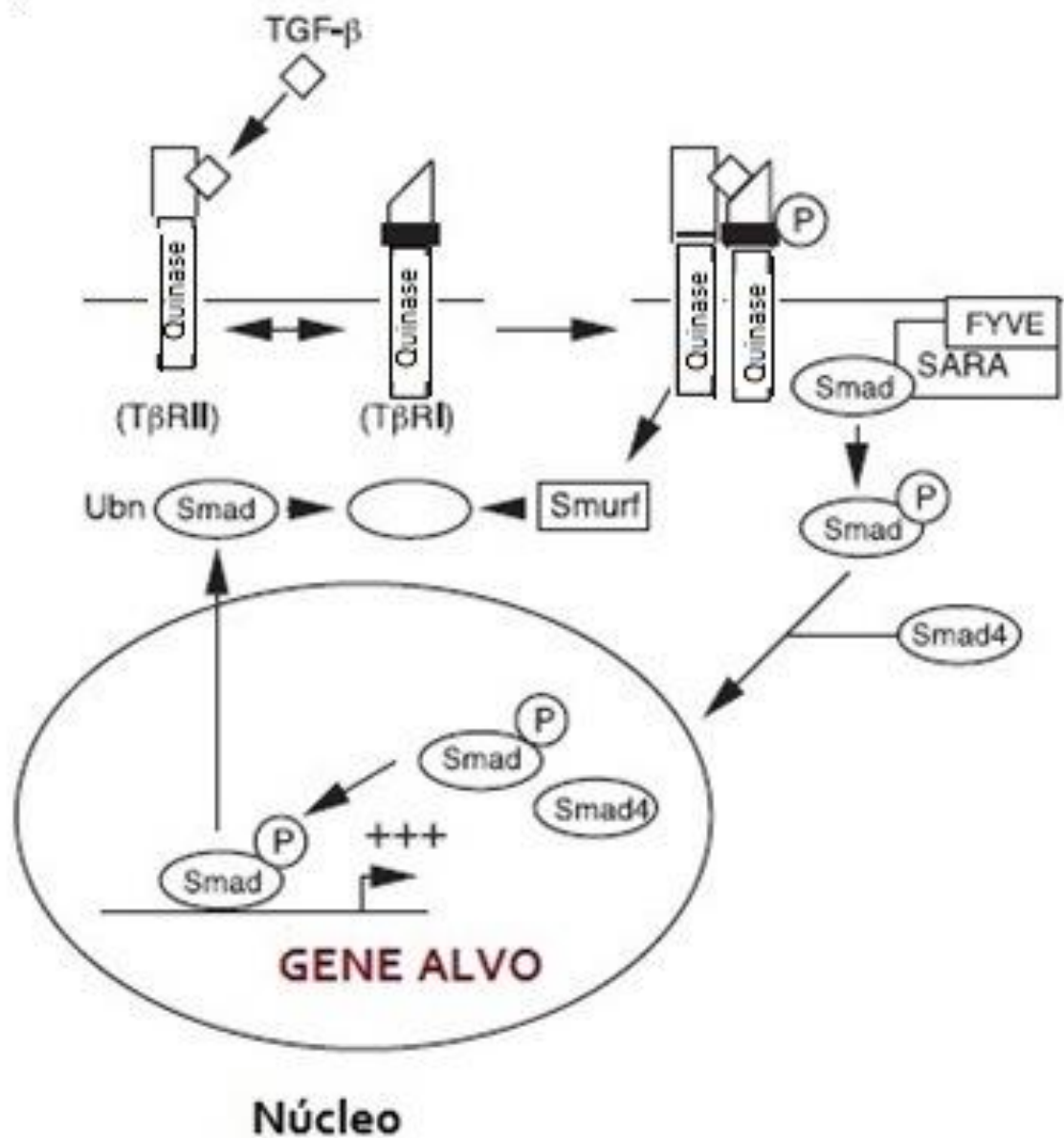


Figura 02: Transdução do sinal do TGF- β . Adaptado de VERRECHIA; MAUVIEL (2004). TGF β : *Transforming Growth fator beta*, Fator beta de crescimento transformante. Quinase: enzima que catalisa a fosforilação de proteínas. T β RI: Receptor transmembrana do TGF β tipo I, composto por cadeia tipo I de serina/treonina quinase. T β RII: Receptor transmembrana do TGF β tipo II, composto por cadeia tipo II de serina/treonina quinase. FYVE: domínio da proteína Zinc Finger. SARA: *SMAD anchor for receptor activation*. Proteína. Ubn: *ubiquitin-mediated degradation* - Ubiquitinação. SMURF: *Smad Ubiquitin Regulatory Factor*. SMAD: *Small mothers againts decapentaplegic*, Família de proteínas envolvidas na translocação de sinais dos receptores do TGF- β . SMAD4: SMAD mediadora comum (Co-SMAD). P: fosforilação. Setas: Indicam a transdução do sinal do TGF- β . +++: Ativação de genes alvos.

O TNF α é uma citocina liberada por macrófagos que provoca localmente amplo espectro de respostas metabólicas e atividades celulares (GREENWEL et al, 2000). Concentrações de citocinas podem ser influenciadas pela idade, sexo, suplementos antioxidantes, homeostase de cálcio, exercício e drogas anti-inflamatórias. Concentração aumentada de TNF α aumenta a atividade e degradação proteica enquanto inibe a síntese proteica. Processos anabólicos são também inibidos pelo TNF α (THOMAS, 2013). Na comparação entre homens idosos e jovens foi verificado aumento na expressão de vários genes inflamatórios e apoptóticos nos idosos (POEL et al, 2011).

TNF α exerce suas funções pela interação com dois receptores (TNF-R1 e TNF-R2). Várias proteínas interagem direta ou indiretamente com os domínios citoplasmáticos desses receptores e que levam à ativação das vias do NF κ B e JNK. JNK é normalmente ativada por uma variedade de sinais químicos e físicos, mas também pela citocina TNF α e podem ser sinalizados pela MAPK. A figura 03 apresenta a sinalização do TNF α .

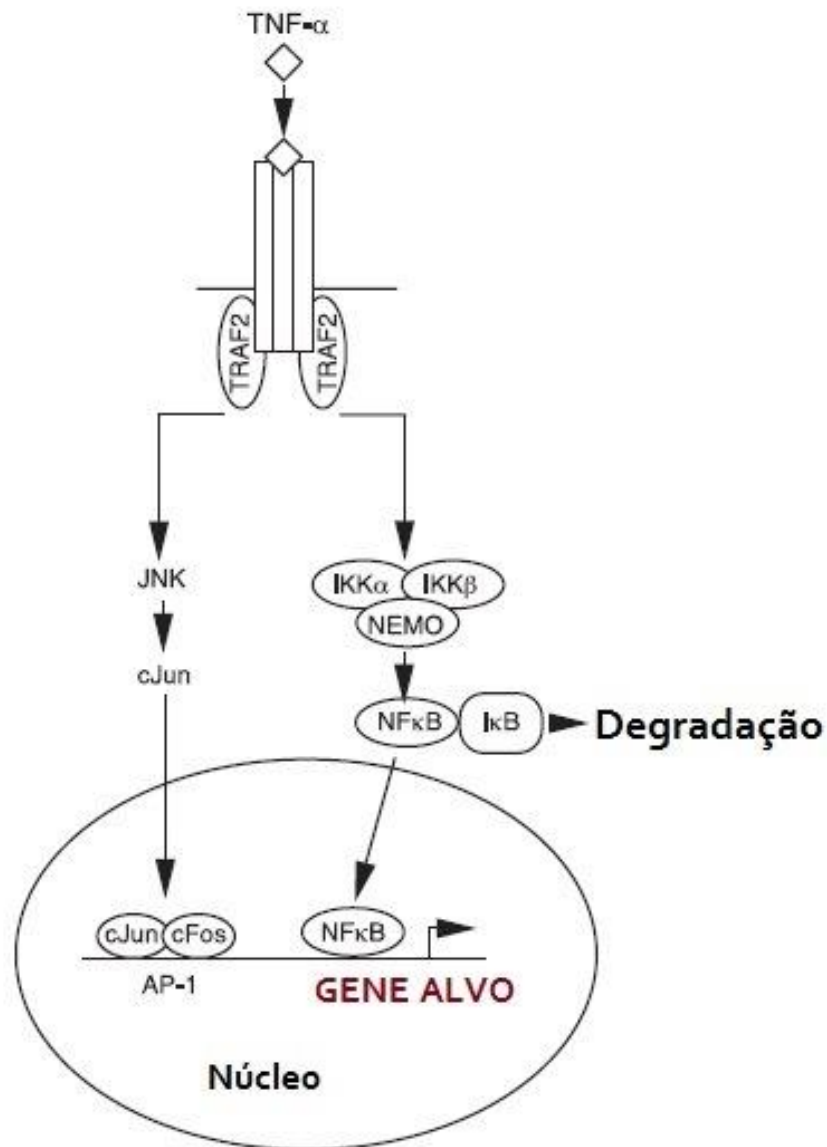


Figura 03: Transdução de sinal do TNF α . Adaptado de VERRECHIA; MAUVIEL (2004). TNF α : Fator alfa de necrose tumoral. TRAF2: *tumor necrosis factor type 2 receptor associated protein*. JNK: *c-Jun N-terminal kinase*. cJun: fator de transcrição que faz parte do complexo de transcrição AP-1. I κ B: Complexo quinase I κ B (IKK), que contém a ação das subunidades catalíticas quinases IKK α e IKK β e a regulação de proteínas não enzimáticas (NEMO). NF κ B: *Nuclear factor- κ B*, fator de transcrição nuclear *kappa B*. Setas: Transdução do sinal de TNF α .

O TNF α reduz a deposição da MEC pela indução e produção de colagenases ou pela inibição da síntese de componentes estruturais como o colágeno tipo I. TNF α também neutraliza a estimulação do receptor do TGF β que estimula a síntese de colágeno tipo I. Dessa maneira o TNF α é reconhecido como antagonista da

sinalização do TGF β , o que reflete uma natureza antagonica funcional dessas citocinas e que representa um complexo de sinais celulares que formam e remodelam a matriz extracelular (HIROSE et al, 2008; VERRECHIA; MAUVIEL, 2004).

Dessa forma, a matriz extracelular do músculo esquelético é de suma importância para o mecanismo de mecanotransdução, já que interfere na produção de força muscular, podendo prejudicar a manutenção da massa muscular durante o processo de envelhecimento (Kragstrup et al, 2011; Haus et al, 2007; SNEDEKER; GAUTIERI, 2014; WOOD et al, 2014). Além disso, as formações de pontes cruzadas intra e intermoleculares nas fibras colágenas, decorrentes do processo de envelhecimento, contribuem para a redução da amplitude de movimento articular, diminuindo a mobilidade (Abate et al, 2010). Portanto, estratégias terapêuticas como os exercícios de alongamento, têm sido frequentemente utilizadas para minimizar o processo de envelhecimento músculo esquelético e otimizar a funcionalidade do idoso (Zotz et al, 2014; Gallo et al, 2015).

2.3 Exercício de alongamento

É característica do envelhecimento a redução da amplitude de movimento articular com conseqüente diminuição dos níveis de flexibilidade muscular, diminuição da mobilidade corporal e comprometimento da realização das atividades da vida diária de forma independente (ACSM, 2009; Gallo et al, 2013; Rodacki et al, 2009; Stathokostas et al, 2012; Stanziانو et al, 2009). Ainda, a redução da amplitude de movimento nas articulações do quadril e tornozelo constitui fator de risco de quedas em idosos (Rodacki et al, 2009).

Exercícios de alongamento são extensivamente utilizados na reabilitação, principalmente quando o objetivo é aumentar a amplitude de movimento (Stathokostas et al, 2012). Podem ser classificados de acordo com a técnica de execução em estático, dinâmico, ativo ou combinado (facilitação neuromuscular proprioceptiva) (McDermott; Mernitz, 2006). Comumente constituem programas de atividade física voltados para a pessoa idosa, e têm-se mostrado como recurso

capaz de melhorar o equilíbrio e padrão da marcha (RODACKI, et al, 2009; ACSM,2009), aumentar a amplitude de movimento e capacidade funcional em idosas da comunidade e institucionalizadas (GALLO et al, 2013; STANZIANO et al,2009; GALLON et al, 2011). Igualmente, a diminuição do risco de lesão e prevenção de quedas são motivos comuns para a recomendação de programas de alongamento para idosos (STATHOKOSTAS, et al,2012).

Deste modo, é importante a avaliação individualizada do idoso para a definição dos objetivos a serem atingidos e da necessidade ou não da prescrição de exercícios de alongamento, sempre baseado em evidencias científicas. Assim sendo, as recomendações para a prescrição de exercícios de alongamento para idosos são: 30 a 60 segundos de manutenção, sendo que para ganhos de amplitude de movimento é recomendada a manutenção de 60 segundos para cada grupo muscular alongado. A frequência deve ser maior que duas vezes por semana e referente à intensidade do exercício, a recomendação é que o idoso tenha a percepção de um leve desconforto. Ainda, é recomendado o alongamento estático (GARBER et al, 2011; ACSM,2014).

O exercício de alongamento na população idosa possui importante aplicação prática, pois é um exercício de fácil aprendizagem e aplicabilidade, não exige material e local específico e demonstra ser um importante aliado contra os efeitos deletérios do envelhecimento (GALLO et al, 2013).

O estímulo de alongamento oferecido ao músculo esquelético pode resultar em mudanças moleculares, celulares, morfológicas, fisiológicas, biomecânicas, funcionais e clínicas. É relatado aumento da expressão do IGF-1 (YANG et al, 1997), de MRFs (ABE et al,2009) e MyoD (GOMES et al,2006), modificações na expressão da atrogina-1 e miostatina (PEVIANI et al,2007) e aumento da ativação de proteínas quinase JNK e p38 (BOPPART et al,2001; CHAMBERS et al,2009). Ainda, é descrito o aumento da síntese proteica (GOLDSPINK et al,2002) e indução da hipertrofia muscular (SAKAMOTO et al,2003). O alongamento muscular auxilia na prevenção da atrofia (GOMES et al,2007; COUTINHO et al,2004; GOMES et al,2004; SAKAKIMA; YOSHIDA,2002) e pode prevenir a proliferação de tecido conjuntivo e

promover o remodelamento do colágeno (COUTINHO et al,2006). O exercício de alongamento pode aumentar a amplitude de movimento (STATHOKOSTAS et al,2012), flexibilidade de tronco e quadril (GALLO et al,2015; STANZIANO et al,2009) melhorar o padrão de marcha e reduzir o risco de quedas em idosos (RODACKI et al,2009).

As respostas celulares e moleculares do músculo esquelético ao estímulo do alongamento ocorrem devido ao processo denominado mecanotransdução. A mecanotransdução é o mecanismo pelo qual o estresse mecânico inicia a sinalização do meio extracelular para o intracelular (ZHAN et al, 2007; MARTINEAU; GARDINER, 2001; CAÇÃO-BENEDINI et al, 2014). As células do músculo esquelético são sensíveis à tensão mecânica, já que aplicação de carga mecânica pode aumentar o tamanho da célula, gerando hipertrofia, do contrário, isto é, na ausência de carga, pode ocorrer diminuição do tamanho da célula, denominando-se atrofia (MARTINEAU; GARDINER, 2001).

A figura 04 é um desenho esquemático, demonstrando as estruturas extras e intracelulares, envolvidas na mecanotransdução desencadeada pelo estímulo de alongamento. Durante o alongamento muscular, o estímulo mecânico é transmitido da matriz extracelular, a qual é composta principalmente por colágeno e glicoproteínas que envolvem as fibras musculares, para proteínas transmembrana como as integrinas. Estas proteínas detectam o estímulo e o transmitem para o meio intracelular, promovendo a ativação de várias proteínas do citoplasma, como a vinculina, talina e α -actinina, desencadeando “cascata de sinalização”, até atingir o núcleo da célula. Dependendo da intensidade do estímulo de alongamento, pode ocorrer o aumento da expressão de genes músculo-específicos, que posteriormente regulam a tradução de proteínas, contribuindo para o aumento da síntese proteica (MARTINS et al, 2013; CAÇÃO-BENEDINI et al, 2014; KANEKO et al, 2009; DE DEYNE, 2001; SALVINI et al, 2012; RASO et al, 2012).

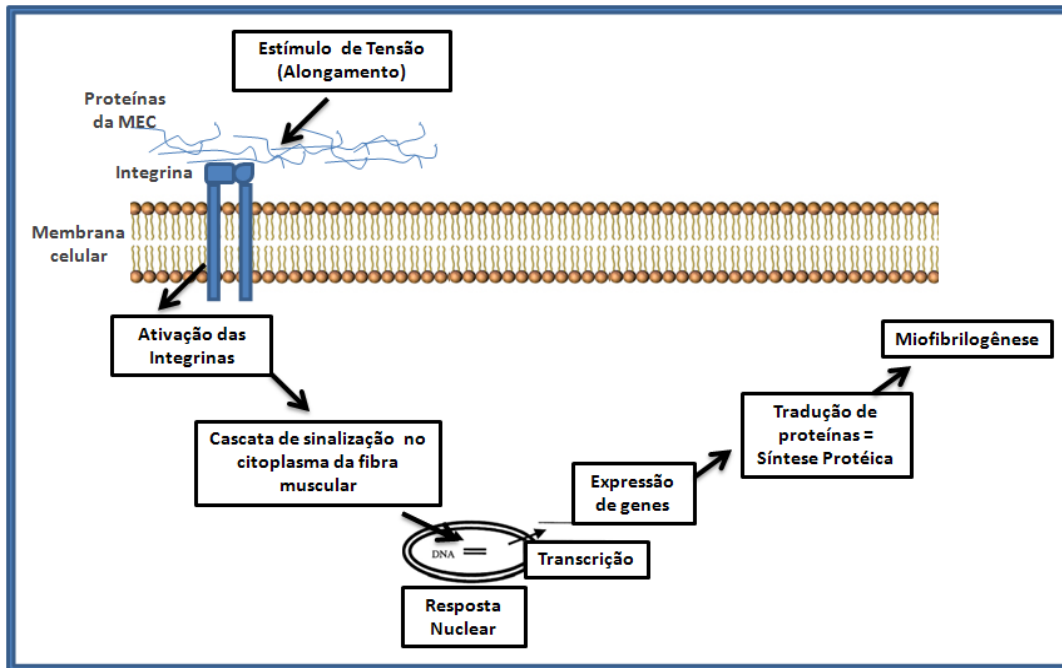


Figura 04: Desenho esquemático do mecanismo de mecanotransdução induzido pelo estímulo de alongamento na fibra muscular esquelética (adaptado de DE DEYNE, 2001; RASO, GREVE, 2012).

Várias vias de sinalização intracelular para a mecanotransdução tem sido sugeridas, e incluem a quinase de adesão local (FAK –focal adhesion kinase), paxilina, quinase ligada a integrina (ILK-1- integrin- linked kinase) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). A via da MAPK é essencial para a conversão da carga mecânica ao tecido de adaptação induzindo a sinalização do citosol até o núcleo (KJAER, 2004; MAMOTO et al,2012).

Já foi descrito que vários tipos de células e subgrupos de MAPKs, tais como a quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (MAPK-erk1 2), proteína quinase ativada por estresse p38 (MAPK-p38), quinase c-jun NH₂ (MAPK-JNK) e quinase 5 regulada por sinal extracelular (MAPK-erk5), podem ser ativadas por estresse mecânico, bem como por pH baixo, fatores de crescimento, hormônios e espécies reativas de oxigênio (KJAER, 2004).

No músculo, a via da MAPK pode ser ativada tanto como resultado de contração ativa quanto de alongamento passivo. Há indícios que o tipo específico de carga a que o tecido é submetido, e o tipo de exercício, irão estimular de forma diferente os subtipos de MAPK em miócitos e fibroblastos. Exercício de *endurance*

estimula a via da MAPK-ERK, enquanto exercício de força é mais propenso a usar a via MAPK-JNK. Exercício de alongamento passivo estimula a via da MAPK-p38 tanto no tecido muscular quanto no tecido conjuntivo (KJAER, 2004).

O alongamento do músculo sóleo de rato durante 5, 10, 30 e 60 minutos mostrou por meio da imunohistoquímica a ativação de JNK e da p38 (BOPPART et al, 2001). Chambers et al (2009) mostraram aumento da fosforilação da p38 com o alongamento do músculo extensor longo dos dedos de rato. Ainda, segundo esses autores, o estímulo mecânico aumenta a taxa de captação de glicose, produção de radicais livres e síntese proteica muscular. Assim, o alongamento estimula a produção de espécies reativas de oxigênio para ativar a MAPK p38 para aumentar o consumo de glicose (CHAMBERS et al, 2009).

Os principais componentes da matriz extracelular (MEC) do músculo esquelético são os colágenos tipo I e tipo III, os quais possuem funções importantes em relação à transmissão de força (PEVIANI, et al, 2009; HEINEMEIER et al, 2007). Dessa forma, os colágenos ao serem ativados pelo estímulo de alongamento, apresentam alteração de seu estado conformacional. Coutinho et al (2006) demonstraram que sessões diárias de alongamento muscular, durante 3 semanas, foram capazes de reorganizar as fibras de colágeno de músculo previamente imobilizado de ratos, que pode contribuir para melhora da função musculoesquelética.

Cação-Benedini et al (2013) aplicaram protocolo de alongamento em músculo de ratas previamente imobilizado e verificaram que após um dia de alongamento, houve aumento na concentração de colágeno tipo III, e menor concentração de colágeno tipo I, indicando melhora na extensibilidade tecidual.

Heinemeier et al (2007) avaliaram o comportamento do colágeno muscular do gastrocnêmio frente aos 3 tipos de contração, excêntrica, concêntrica e isométrica. Apontaram aumento da expressão de colágenos tipo I e tipo III na contração excêntrica em comparação a concêntrica, sugerindo que o exercício excêntrico parece ter maior influência sobre a expressão de colágenos.

As fibras do colágeno tipo I são as mais tolerantes ao estresse e apresentam alta força tênsil e limitada elasticidade, indicando, portanto, maior capacidade de

transmissão de força (HAN et al., 1999) longitudinal (MATTIELO-SVERZUT et al., 2013), além de ser predominante no músculo envelhecido (MATTIELO-SVERZUT et al., 2013; HINDLE et al., 2009). Do aspecto biomecânico, o colágeno tipo I representa a força tênsil durante a aplicação de uma carga na fase elástica e o colágeno tipo III representa a complacência tecidual durante o ciclo de deformação comprimento-tensão (MATTIELO-SVERZUT et al., 2013).

Ainda com relação à MEC, as metaloproteinasas da matriz (MMPs) desempenham importante papel no seu remodelamento (PEVIANI et al, 2009). A mecanotransdução induzida pelo alongamento pode induzir o remodelamento do tecido conjuntivo, por meio das MMPs, uma vez que estas têm função de degradação dos componentes da MEC (MARTINS et al,2013).

Peviani et al (2009) mostrou que tanto em uma única sessão de alongamento (10 alongamentos com 1 minuto de duração, com intervalo de 30 segundos entre as repetições) quanto em mais sessões durante uma semana (2, 3 e 7 sessões), em rato jovem, não houve modificação da atividade da MMP-2, bem como não ocorreu alteração da expressão de MMP-9. Assim, os autores concluem que os protocolos de alongamento aplicados em músculo de rato jovem, não induziram modificação na via das MMPs, e sugerem que a MMP-2 não está envolvida no processo de remodelamento do músculo submetido ao exercício de alongamento.

Por outro lado, Wang *et al* (2011) realizaram alongamento cíclico *in vitro* de fibroblastos sinoviais do joelho de indivíduos com artrite reumatoide. As células foram submetidas à tração, por estimulação mecânica de 0.05 Hz, entre 3 a 5 repetições. Os autores mostraram que o alongamento regula negativamente MMP-1 e que o estiramento mecânico pode regular a expressão de citocinas inflamatórias pela via de sinalização da NF-kB. Deste modo, são observadas poucas evidências científicas sobre o papel das MMPs na adaptação do músculo esquelético ao exercício de alongamento.

Heinemeier *et al* (2007) analisaram os efeitos de diferentes tipos de contração, concêntrica ou excêntrica, no músculo gastrocnêmio de rato, por meio da eletroestimulação (10 estímulos, durante 2 segundos e intervalo de 18 segundos entre os estímulos), durante 4 dias consecutivos. Os autores verificaram que a

expressão do TGF- β , TIMP-1 e TIMP-2 no músculo são maiores no exercício excêntrico do que no exercício concêntrico. Dessa forma, sugerem que o treinamento excêntrico teria maior impacto na expressão do colágeno muscular, do que o concêntrico. Interessantemente, TIMPs são frequentemente ativadas ao mesmo tempo com as MMPs durante o exercício, indicando a ocorrência simultânea de estimulação e inibição dos componentes da matriz extracelular e balanço proteolítico final (KJAER, 2004).

O TGF- β estimula a produção de proteínas da matriz extracelular e inibe a sua degradação, resultando em produção de fibrose e reparo tecidual (NAROLA et al, 2013). Em idosos, as concentrações de TGF- β são maiores (SAKUMA; YAMAGUCHI, 2012), assim, a resposta à mecanotransdução é diferenciada. Em músculo maduro, TGF- β afeta negativamente a regeneração pela inibição da proliferação das células satélites, fusão de mioblasto e expressão de genes específicos do músculo, além de induzir a transformação de células miogênicas em fibróticas, após lesão (SAKUMA; YAMAGUCHI, 2012).

A citocina próinflamatória TNF α é potente ativador da p38 no músculo, e tem sido mostrado que desenvolve importante papel na reparação muscular e miogênese, além de ser reconhecido o seu papel patológico na mediação de doenças que apresentam perda de massa muscular (ZHAN et al, 2007).

A exposição permanente às respostas inflamatórias leva a alteração da MEC e aumenta as concentrações de fatores de crescimento e citocinas, incluindo TGF- β e TNF α (SAKUMA; YAMAGUCHI, 2012). TNF α induz a proteólise pelo aumento de MURF1, ao mesmo tempo em que inibem a sinalização PI3K-Akt. Já o aumento das concentrações de TGF- β inibe a ativação de células satélites, prejudicando a diferenciação do miócito (MARINI; VEICSTREINAS, 2010; SAKUMA; YAMAGUCHI, 2012).

Zhan et al (2007) mostraram que o alongamento de 8-9% do comprimento inicial, realizado com um dispositivo de alongamento em mioblasto, ativa a p38 e miogênese em camundongo, e que esta ativação da miogênese é dependente de TNF α . Assim, esses resultados permitem dizer que o alongamento ativa a miogênese e que essa ação é mediada pela ativação da p38 via TNF α .

Yang et al (2005) ao realizar alongamento em cultura de fibroblasto de tendão, encontrou que alongamento uniaxial cíclico diminuiu a inflamação, por meio da redução da expressão genica de COX2 e MMP-1, resultando em decréscimo na produção de prostaglandina E.

Pizza et al (2002) administraram uma única sessão de contração excêntrica, alongamento passivo ou contração isométrica com duração de 5 minutos em um grupo de camundongos, enquanto outro grupo foi submetido aos mesmos procedimentos acrescidos de uma sessão de contração excêntrica, 2 semanas depois. A observação importante desse estudo foi elevação de neutrófilos resultante da exposição ao protocolo tanto de alongamento estático quanto de contração isométrica, os quais não promoveram sinais histológicos ou funcionais de lesão. O estudo indica que a elevação de neutrófilos após alongamento passivo ou contração isométrica promoveu proteção contra lesão induzida por uma posterior contração excêntrica. Os autores ainda propõem que lesão de magnitude pequena pode ter ocorrido após alongamento e contração isométrica, liberando ou produzindo um ou mais quimioatratantes para os neutrófilos.

Abe et al (2009) realizaram o alongamento mecânico em células C2C12 (uma linha de células originárias do músculo esquelético de camundongos), promovendo o alongamento cíclico da membrana celular durante 1 segundo, com 1 segundo de relaxamento. Foi verificado aumento significativo de MyoD e miogenina no grupo alongado comparado ao grupo controle, após 12 horas de alongamento de mioblastos *in vitro*, e aumento no número de células no grupo alongamento após 24 e 36 horas. Os resultados sugerem que a aplicação do alongamento mecânico promove a diferenciação e proliferação de mioblastos imediatamente após o alongamento, devido ativação da MyoD, e que esse estímulo pode influenciar no aumento do número de células.

Peviani et al (2007) mostraram que uma única sessão de alongamento passivo em musculo sóleo de rato jovem, que consistia em 10 repetições de alongamento, mantidas por 60 segundos cada repetição, com intervalo de 30 segundos entre as repetições, aumentou a expressão gênica da MyoD, enquanto sessões diárias, durante 7 dias não mostraram mudanças. Ainda, o mesmo grupo de

autores mostraram aumento da expressão gênica da MyoD, 24 horas após uma única sessão de 30 minutos de alongamento no músculo sóleo de rato jovem (GOMES et al, 2006).

O efeito do alongamento na hipertrofia do músculo tem sido relacionado à estimulação da expressão de fatores regulatórios miogênicos, dos quais incluem Myo-D; miogenina e MRF-4 (ABE et al,2009; TATSUMI et al, 2005). O aumento da expressão destes fatores contribuem para a adição de sarcômeros em série (McKOY et al,1999; LYNN; MORGAN,1994; BUTTERFIELD et al, 2005; SECCHI et al,2008) e aumento da área de secção transversa das fibras musculares esqueléticas (AOKI et al, 2006).

Com relação aos fatores de crescimento, Yang et al (1997), mostraram aumento da expressão de RNAm de IGF-1 após 6 dias de alongamento dos músculos tibial anterior e extensor longo dos dedos de coelhos jovens. O aumento de IGF-1 muscular pelo alongamento contribui para sarcomerogênese e hipertrofia muscular (McKOY et al,1999).

No entanto, Salvini et al (2006), avaliaram os efeitos do alongamento passivo (10 repetições mantidas por 60 segundos cada repetição com intervalo de 30 segundos entre cada repetição), e revelaram que sessões aplicadas diariamente ou 3 vezes por semana, foram efetivas para induzir a sarcomerogênese em músculos previamente imobilizados em posição de encurtamento, sem mostrar ganhos na área de secção transversa em comparação ao grupo apenas imobilizado.

Gomes et al (2004) identificaram que uma sessão de alongamento, aplicada uma vez por semana, durante 40 minutos, em músculo sóleo de rato jovem previamente imobilizado em posição de encurtamento, foi suficiente para prevenir a perda de sarcômeros em série e atrofia muscular.

Coutinho et al (2004) também verificaram que o alongamento impediu a atrofia muscular ao aplicarem 40 minutos de alongamento, 3 vezes por semana, durante 3 semanas, em músculo sóleo de ratos jovens previamente imobilizado em posição de encurtamento. Neste mesmo estudo, ainda foi observado que em músculos que não foram previamente encurtados por imobilização, o protocolo de alongamento induziu sarcomerogênese e hipertrofia muscular.

Assim, nota-se que o músculo esquelético tem a capacidade de alterar suas características moleculares e morfofisiológicas em resposta ao estímulo mecânico (McKOY et al,1999). Porém, a capacidade de detectar e responder aos estímulos mecânicos é diminuída no músculo idoso (WU, et al, 2011). Owino et al (2001) afirmam que músculos envelhecidos apresentam capacidade reduzida para responder a carga mecânica, possivelmente em decorrência da diminuição de fatores de crescimento como o IGF-1 bem como fatores regulatórios miogênicos como Myo-D.

O mecanismo de mecanotransdução gerado pelo alongamento promove respostas na matriz extracelular e no meio intracelular do músculo esquelético, mecanismo denominado remodelamento. O remodelamento do músculo esquelético depende da ação coordenada da degradação e síntese de proteínas intracelulares e de componentes da matriz extracelular. Tendo em vista que inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP) regulam a degradação da MEC, por controlar a atividade de MMPs específicas, é necessário melhor entendimento sobre a participação de MMPs e TIMPs na resposta do músculo idoso ao exercício de alongamento.

Ainda, convém entender os efeitos do alongamento sobre o comportamento das citocinas inflamatórias, tendo em vista que o estímulo de alongamento promove ativação de vias celulares nas quais estas estão envolvidas. Até o presente momento, desconhece-se estudo que tenha analisado os efeitos do alongamento sobre as concentrações de TNF α em músculo de ratas idosas.

Rotinas de alongamento são recomendadas em programas de exercícios físicos voltados para a população idosa, e a ACSM (2014) recomenda uma frequência maior que dois dias por semana. Em mulheres idosas os efeitos agudos do alongamento têm demonstrado melhora na amplitude de movimento de quadril, joelho e tornozelo quando o alongamento foi realizado apenas uma vez, durante 60 segundos (ZAKAS et al, 2005). Rodacki et al (2009) encontraram aumento na velocidade da marcha, comprimento do passo, e redução do tempo na fase de duplo apoio na marcha de idosas após uma única sessão de alongamento dos músculos extensores e flexores do quadril. Ainda, Gurjão et al (2010) relataram que uma única

sessão de alongamento estático com duração de 30 segundos, realizada durante 3 repetições não comprometeu a capacidade de produzir força em mulheres idosas.

No entanto, os mecanismos intracelulares relacionados ao processo de adaptação do músculo esquelético do idoso, em resposta ao alongamento, ainda não foram elucidados. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos agudos de um protocolo de alongamento, sobre a histomorfometria, imunomarcagem e expressão de genes envolvidos com o remodelamento do músculo esquelético de ratas idosas. A compreensão dos efeitos histológicos e moleculares em resposta ao alongamento no músculo esquelético poderá contribuir para embasar a prescrição deste exercício para população idosa, afim de que os benefícios dessa modalidade de exercício sejam obtidos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos agudos do alongamento mecânico passivo estático, na histomorfometria, imunomarcção e expressão gênica no músculo sóleo de ratas idosas.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a massa corporal e massa muscular;
- Mensurar a área de secção transversa das fibras musculares;
- Quantificar no músculo sóleo colágeno tipo I e III, TGF- β 1, TNF α e TIMP-1;
- Analisar a expressão gênica dos colágenos tipo I e III e TGF- β 1

4. HIPOTHESES

H0: O alongamento muscular não modifica a histomorfometria, imunomarcção e expressão gênica do músculo sóleo de ratas idosas.

H1: O alongamento muscular promove aumento da área de secção transversa das fibras do músculo sóleo de ratas idosas.

H2: O exercício de alongamento possui efeito anti-fibrótico, diminuindo a imunomarcção e expressão de TGF β e do colágeno tipo I no músculo sóleo de ratas idosas.

H3: O exercício de alongamento apresenta propriedade anti-inflamatória, reduzindo TNF α no músculo sóleo de ratas idosas.

H4: O exercício de alongamento aumenta a imunomarcção e expressão gênica de colágeno tipo III no músculo sóleo de ratas idosas.

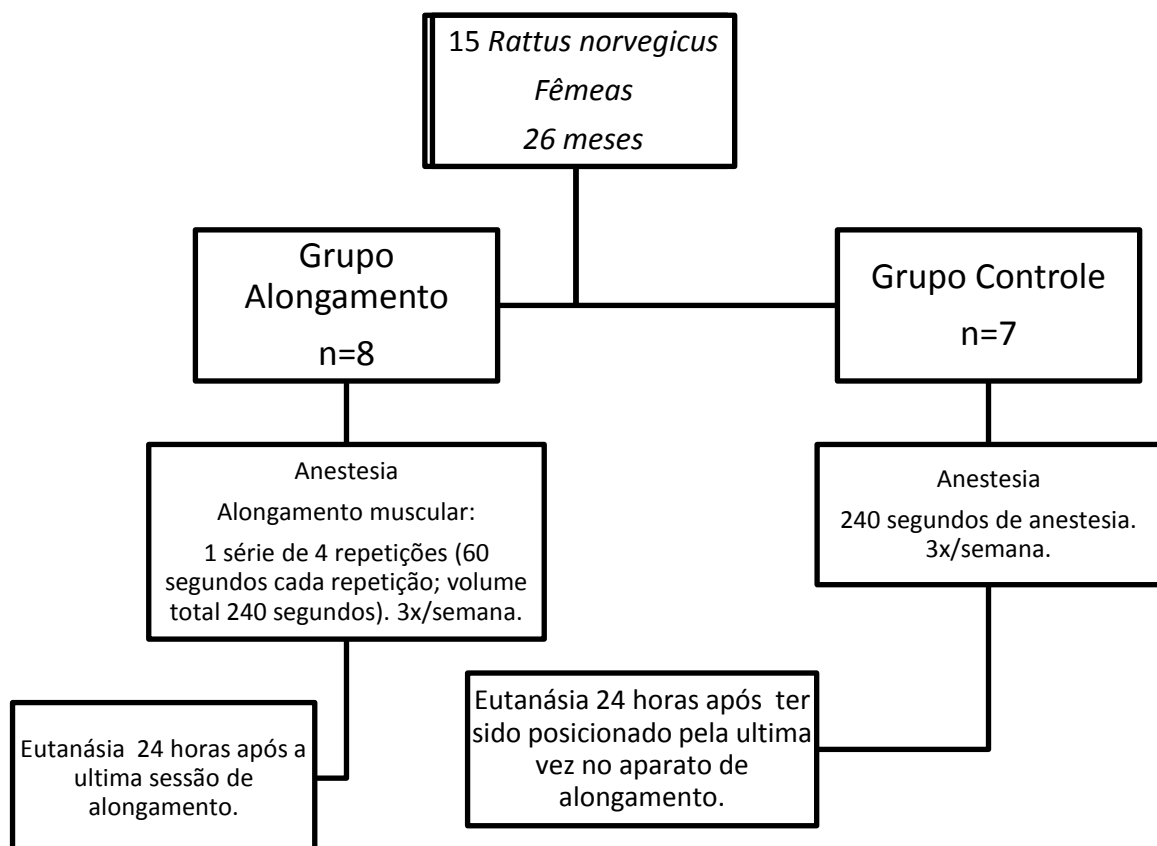
H5: O exercício de alongamento diminui a imunomarcção da TIMP-1 por promover processo de remodelamento no músculo sóleo de ratas idosas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado estudo do tipo experimental, randomizado, controlado, cego e de caráter transversal. Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e ração peletizada, no biotério da PUC-PR. O estudo foi conduzido em conformidade com a Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e Resolução nº 1, de 09 de julho de 2010, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUC-PR, sob o número 732 (anexo 01).

5.1 Experimento

A amostra foi composta por 15 *Rattus norvegicus*, fêmeas, da linhagem Wistar, albino, com 26 meses de idade, divididas aleatoriamente em 2 grupos:



Os animais foram distribuídos em cinco caixas (numeradas de 1 a 5), cada uma contendo três animais os quais foram numerados de 1 a 3. Para definição dos grupos, foi realizado o método de aleatorização simples, por meio do sorteio. Inicialmente foi selecionada a caixa com os animais para a definição dos grupos. Após foi realizado o sorteio para definição do grupo e na sequência foi sorteado o número do animal. Dessa forma, dois sorteios foram realizados: Sorteio 1: grupo alongamento ou grupo controle. Sorteio 2: número do animal (animal 1, animal 2, animal 3). Assim, animais do grupo controle e grupo alongamento permaneceram juntos nas caixas.

5.1.1 Protocolo de alongamento

Para aplicação do alongamento passivo mecânico no músculo sóleo esquerdo, o animal foi previamente pesado em uma balança (Mettler/Toledo com capacidade de 25g a 3 Kg). Em seguida, foi anestesiado por via inalatória (isoflurano) e posicionado em um aparato de alongamento, desenvolvido por Zotz et al (2014), no qual a articulação talo-crural era fixada em flexão dorsal máxima, e assim, mecanicamente, o músculo sóleo era mantido em posição de alongamento pelo aparato (PEVIANI et al, 2007; ZOTZ et al., 2014). O aparato de alongamento desenvolvido por Zotz et al (2014) tem patente com registro BR1020150205740.

O aparato de alongamento é constituído por uma célula de carga, capaz de captar a força necessária para promover a deformação músculo-tendínea. Assim, a força aplicada foi monitorada durante cada repetição de exercício de alongamento passivo mecânico estático (ZOTZ et al., 2014).

Os animais foram anestesiados com inalação de isoflurano (5% para 2,5 L O₂ min⁻¹) para o posicionamento no aparato de alongamento. Para manter a anestesia durante o alongamento foi utilizada concentração de 2,5% de isoflurano.

As imagens do aparato de alongamento e o procedimento para indução do alongamento estão demonstrados na figura 05.

O protocolo de alongamento consistiu em uma série de 4 repetições (KERRIGAN et al.,2003; CRISTOPOLISKI et al.,2009, GALLON et al,2011; TAYLOR et al.,1990) com duração de 60 segundos cada repetição (FELAND et al, 2001; GALLON et al,2011; CRISTOPOLISKI et al.,2009; WATT et al, 2011; WATT et al, 2011), com intervalo de 30 segundos entre elas (KERRIGAN et al, 2003; STAUBER et al, 2002), monitorado por um cronômetro (Technos).

O alongamento foi realizado no músculo sóleo esquerdo, 3 vezes por semana (GALLON et al, 2011; ACSM,2011), durante uma semana (KAMIKAWA et al.,2013; PEVIANI et al, 2007), sempre no mesmo horário do dia, isto é, no período da manhã, pela mesma pessoa posicionando o animal no aparato de alongamento.

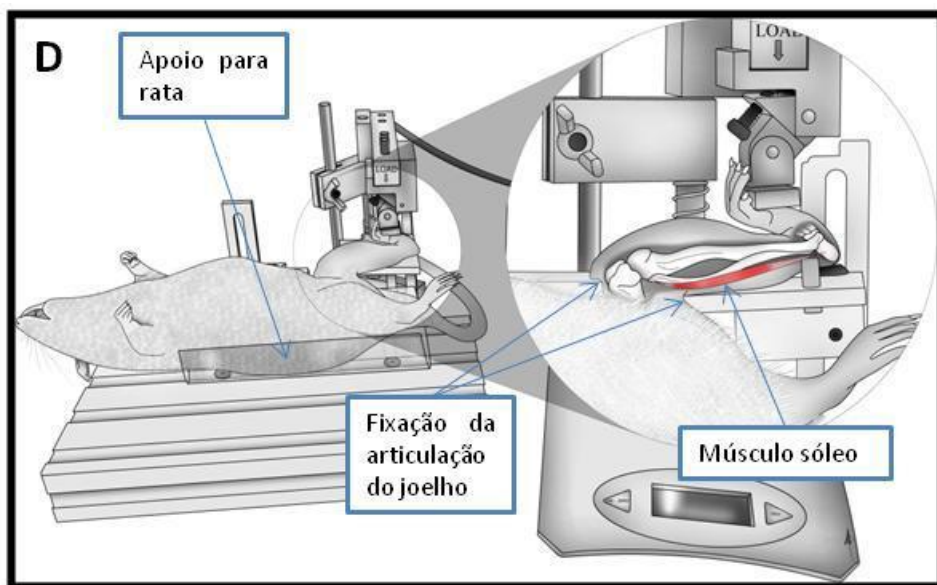


Figura 05: Aparato de Alongamento. Desenho esquemático apresentando detalhes da posição da ratadurante o alongamento do músculo sóleo esquerdo (Zotz et al, 2014).

5.2 Métodos de avaliação

Após uma semana de alongamento, isto é no 6º dia do experimento e 24 horas após a última sessão de alongamento, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de 80mg/kg de ketamina e 8mg/kg de xilasina para coleta do músculo sóleo esquerdo. Em seguida e ainda sob efeito anestésico, foi aplicado

uma injeção intracardíaca de 240mg/kg de ketamina e 24 mg/kg de xilasina para ortotanásia.

Após dissecação, o músculo foi pesado em uma balança analítica de precisão (Mettler/Toledo) com capacidade mínima de 10 mg e máxima de 210 g e lupa (Olympus), e posteriormente os músculos foram gotejados periodicamente com solução salina (NaCl 0,9%) para evitar ressecamento tecidual. Foi observada a massa absoluta (expressa em gramas) e sua relação com a massa corporal do respectivo animal (massa relativa, expressa em porcentagem).

Na sequência, os músculos foram divididos longitudinalmente, com uma lâmina (Feather) em duas partes iguais. A porção medial do músculo foi cortada transversalmente em duas partes iguais, em que a porção proximal foi destinada para a técnica de imunohistoquímica e mensuração da área de secção transversa. A análise do comprimento muscular e sarcômeros em série também foram realizadas e incluídas na tese de doutorado de ZOTZ (2014)

Toda a porção lateral restante foi utilizada para avaliação da expressão gênica, sendo assim, armazenada em freezer a -80° C para posterior análise.

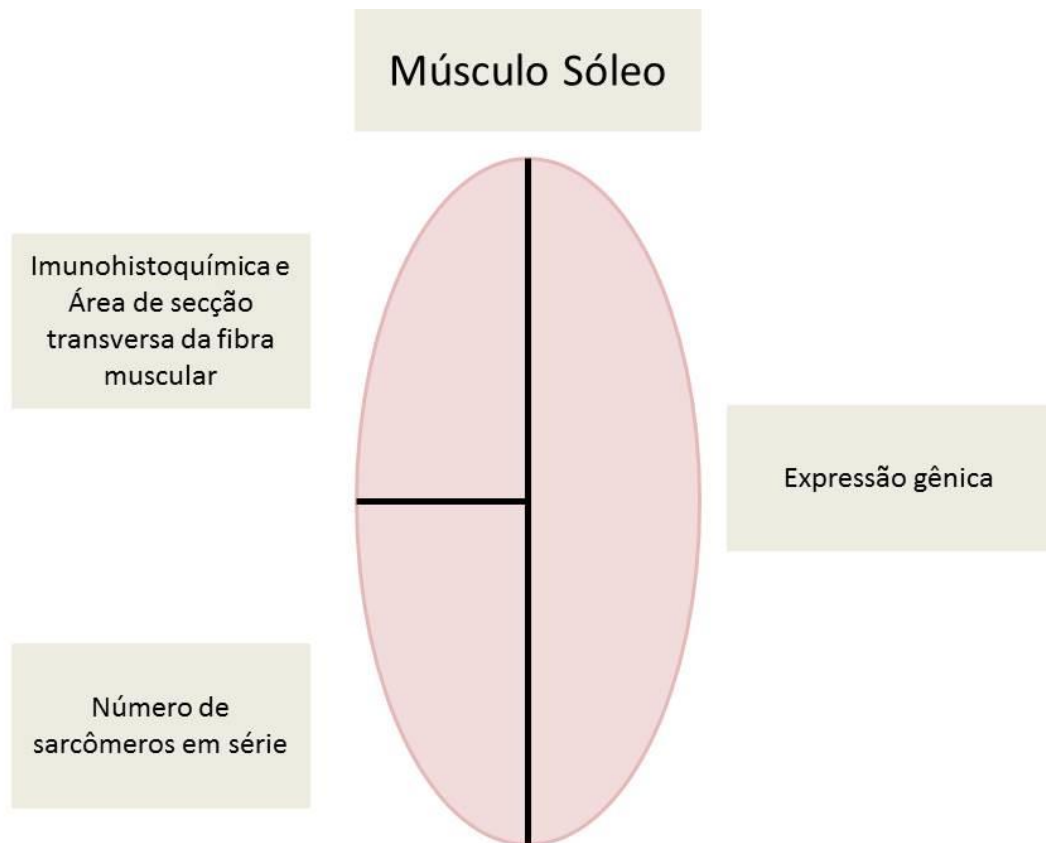


Figura 06: Desenho esquemático das secções realizadas no músculo sóleo. Em cada porção do músculo sóleo esquerdo seccionado, está descrito ao lado o tipo de processamento realizado. Imunohistoquímica e área de secção transversa das fibras musculares: os mesmos cortes histológicos processados para imunohistoquímica foram utilizados para a mensuração da AST das fibras musculares; Sarcômeros em série: porção destinada ao processamento para a contagem do número de sarcômeros em série; Expressão gênica: porção destinada à avaliação da expressão gênica.

5.2.1 Área de secção transversa

Para fotomicrografia dos cortes histológicos foi utilizado o fotomicroscópio de Luz (Olympus BX50) capturadas em sistema de vídeo-imagem (câmera Sony CCD IRIS) por meio do Software Image Pro Plus 4.5. Foram avaliados os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina.

Para análise da área de secção das fibras musculares (ASTFM) foi escolhido um campo contendo um corte histológico de cada músculo. A escolha do corte foi baseada na ausência de artefatos, isto é, maior quantidade de fibras musculares,

menor quantidade de depósitos de reagentes, presença de fibras dobradas, rasgadas ou mal focalizadas. Em seguida, o corte selecionado foi focalizado em objetiva de 10x em microscópio de luz (Olympus BX50) e fotografado em câmera digital (Camera Sony CCD IRIS). Posteriormente, a imagem foi transferida para um computador, onde 100 fibras foram selecionadas de modo aleatório, sem o conhecimento do grupo experimental, para tornar a análise com caráter cego, na região central da secção histológica como descrito por Coutinho et al. (2004) e Gomes et al. (2004). As ASTFM foram mensuradas com o auxílio do programa Image J (versão 1.45q), como representado na figura abaixo.

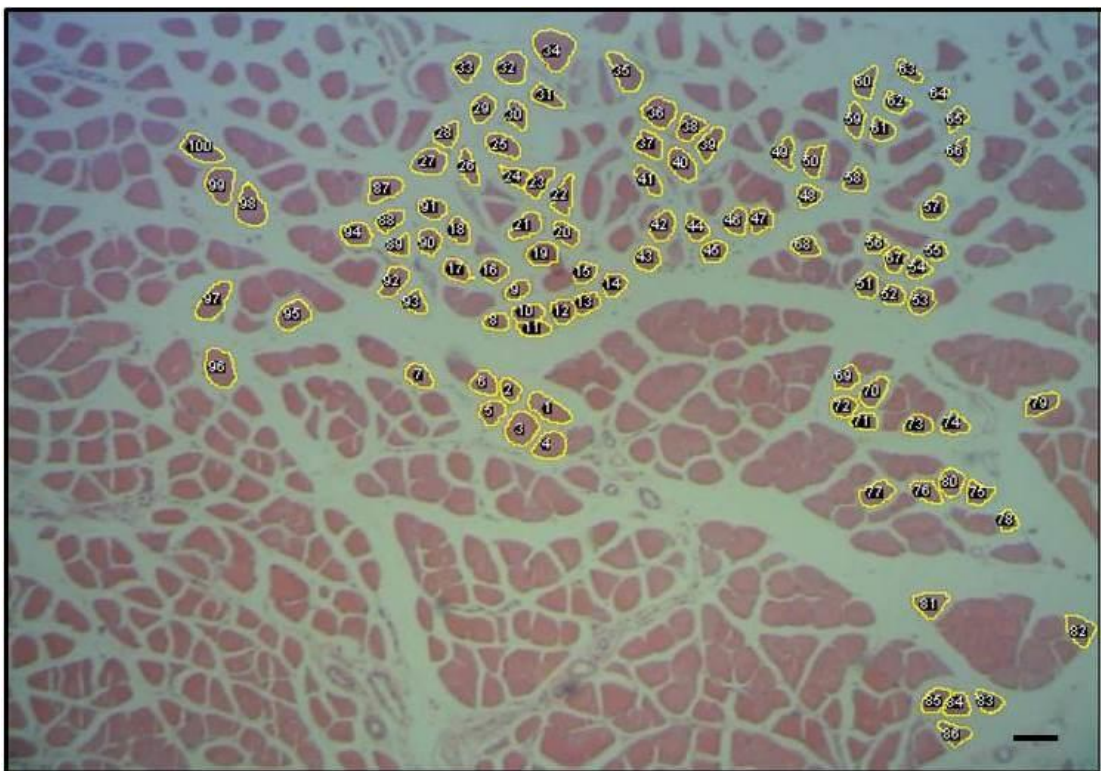


Figura 07: Corte histológico transversal do músculo sóleo em objetiva de 10x. O contorno na cor amarela representa o método utilizado para mensuração das ASTFM, por meio do software *Image J*. Barra=20 μ m.

5.2.2 Imunohistoquímica

As lâminas de imunohistoquímica foram preparadas pela equipe coordenada pela Bióloga Marina Azevedo, do laboratório de Patologia Experimental, da PUC-PR, sob coordenação e anuência da Profa Dra Lucia Noronha.

A porção lateral superior do músculo sóleo esquerdo coletado de cada rata foi fixado em formalina 10% durante 48 horas. Posteriormente, a porção foi desidratada e diafanizada e emblocada em parafina. A porção foi então seccionada transversalmente em micrótomo (Olympus), em cortes de 4µm, posteriormente transferidos para lâminas próprias (AutoWrite Green Adesin Sakura 76 X 26 mm) para imunohistoquímica. Após secarem *overnight* a 37°C, foi realizada a desparafinização e o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% (peróxido diluído em metanol). Em seguida foi efetuada a recuperação antigênica: sendo as lâminas mergulhadas em recuperador ImunoRetriver (Dako®) e na sequencia lavadas em água destilada, e, riscadas com caneta hidrofóbica Dako pen (Dako®), delimitando a área do corte.

As lâminas permaneceram em tampão PBS (tampão fosfato-salino) tris pH 7.3, até que as alíquotas de anticorpo fossem gotejadas, evitando a secagem do corte. Os anticorpos primários específicos para reações imunohistoquímicas foram Rabbit Polyclonal Collagen Type I (AB34710, Abcam, Cambridge, MA, USA), Rabbit Polyclonal Collagen Type III (AB7778, Abcam, Cambridge, MA, USA), Mouse Monoclonal TGFβ-1 (2C5: sc-52891, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany), Human Monoclonal TNF alpha (MA-091-5, Imuny Biothechnology, Campinas, SP, BR) e Mouse monoclonal [102D1] to TIMP1 (AB1827, Abcam, Cambridge, MA, USA). As diluições dos anticorpos foram: TNFα 1:50, TGFβ-1 1:200, Colágeno I 1:200, Colágeno III 1:200 e TIMP-1 1:100.

Para detectar a imunoatividade, o *ImmPRESS*[™] kit (Anti-Mouse/Rabbit Ig Peroxidase Reagent, MP 7500, Vector Labs, USA) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Todos os anticorpos usados nesse experimento tem reatividade com ratos.

As alíquotas (100 µl) das soluções dos anticorpos Colágeno I (Rabbit Polyclonal Collagen Type I, AB34710, Abcam, Cambridge, MA, USA), Colágeno III (Rabbit Polyclonal Collagen Type III, AB7778, Abcam, Cambridge, MA, USA), TGF-β1 (Mouse Monoclonal TGFβ-1, 2C5: sc-52891, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany), TNFα (Human Monoclonal TNF alpha (MA-091-5, Imuny

Biothecnology, Campinas,SP,BR) e TIMP (Mouse monoclonal [102D1] to TIMP1 AB1827, Abcam, Cambridge, MA, USA) foram gotejadas sobre os cortes e levadas para câmara úmida (Easy path) e à geladeira (Consul) *overnight*.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em tampão TBS tris pH 7.3 e deixadas no tampão por 15 min. Novamente foram lavadas em tampão, secadas e então foi administrado Advance link (Dako®) e deixado por 30 min. Em seguida, foram lavadas em tampão e gotejados Advance enzyme (Dako®), mantido por 30 min. Novamente foram lavadas em tampão, secado e pingado cromógeno DAB (1:1) até a visualização da cor castanha, e na sequencia lavadas rapidamente em água destilada. Após, foram contracoradas com Hematoxilina de Gill por 5 min, lavadas em água da torneira e deixadas por 5 minutos, desidratadas com álcool etílico absoluto (3x 1 min.), diafanizadas com xilol (3 x 5 min) e então realizada montagem da lâmina com Entellan® (Merck, Germany).

A coloração foi desenvolvida por meio do Kit ImmPACT™ DAB (Vector Labs, US).

As lâminas foram fotografadas em objetiva de 40x. Os critérios utilizados para realização da fotografia foram fotos preenchidas, sem dobra, sem rasgo, sem artefato de coloração, homogeneidade em relação à coloração e sem sobreposição de foto. Após aplicação desses critérios, foram fotografadas 10 imagens por animal utilizando a técnica de varredura.

As lâminas dos anticorpos TNF α , TGF β , colágeno I, colágeno III TIMP e foram analisadas por meio do método quantitativo morfométrico (KONDO et al., 2011). As lâminas foram fotografadas no microscópio ZEISS Axio Scope A1, por meio do programa Axio Vision SE64. As imagens também foram analisadas utilizando o programa Image Pro Plus®.

Foi fornecida ao programa uma amostra da coloração castanha considerada positiva para permitir a quantificação pelo método de colorimetria (RECHERT-FARIA, 2012). Esta fotomicrografia passou a ser a “máscara”, de acordo com Calvi e colaboradores (2012), a máscara é confeccionada a partir de estrutura específica que é demarcada em uma imagem.

Dessa forma, após selecionar a estrutura específica, o programa identificou os pixels da estrutura e, a partir disso, o software selecionou pixels adjacentes com cores similares e identificou a área da imunomarcação (CALVI et al.,2012), figura 08-A. Ainda, com o programa Image Pro Plus, foi determinada a área da fibra muscular e assim, identificada a porcentagem de imunomarcação por área de fibra muscular total (Figura 08-B).

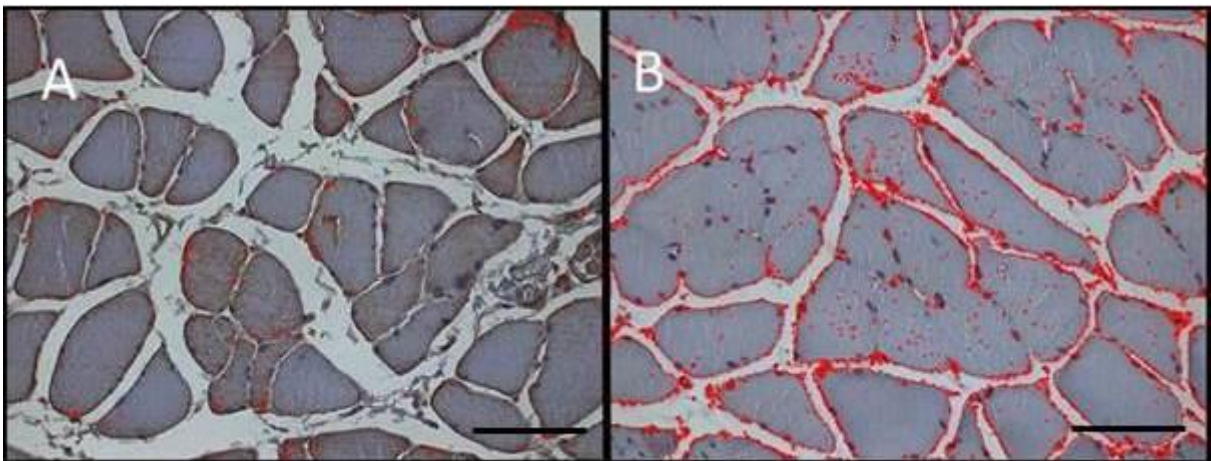


Figura 08: Análise das imagens pelo Image Pro Plus®. A: Imunomarcação, sinalizada pela cor castanha e demarcada pela cor vermelha. B: Mensuração da Área da fibra muscular. Barra 200µm.

5.2.3 Extração de RNA total

Após a dissecação e retirada do músculo sóleo, a porção medial foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada em freezer à -80°C , para posterior extração do RNA total.

Para a extração do RNA total, o fragmento do músculo sóleo foi macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado com Trizol (Gibco) (1ml), seguindo as orientações do fabricante (Life Technologies, Inc., USA). Após a homogeneização foi acrescentado 0,2 ml de clorofórmio às amostras, misturadas por inversão e incubadas por 2 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 min, 12.000 rpm (centrífuga refrigerada, Eppendorf). A fase aquosa, que contém o RNA, foi coletada e transferida para outro tubo autoclavado e adicionado 0,5 ml de álcool isopropílico. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos visando a precipitação do RNA.

Ao final do período de precipitação, as amostras foram centrifugadas por 10 min à 13.000 rpm (centrífuga refrigerada, Eppendorf). Foi realizada a lavagem do RNA precipitado com 1 ml de etanol (75%, diluído em água DEPC- diethyl pytocarbonate 97%). Após breve agitação, as amostras foram novamente centrifugadas por 5 min à 10.000 rpm e o álcool foi removido (sobrenadante). O RNA foi seco ao ar livre e posteriormente resuspendido em 30ml de tampão TE pH 7,6 (TRIS HCL/EDTA). Para a solubilização do pelet, foi realizada incubação à 57°C por 5 minutos (Thermomixer- Eppendorf).

A absorbância das amostras foi determinada por espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Scientific), nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. No sentido de avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorbâncias 260 e 280 nm (razão $\geq 1,8$). Foram considerados adequados os valores entre 1,6 e 2,0. A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, do Departamento de Zoologia, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com anuência do coordenador, Prof. Dr. Mario Navarro.

5.2.4 RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)

A reação da transcrição reversa (RT) contendo 1 ug de RNA total, 1 ul de oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água (para volume de 10,5ul) foi incubada à 70°C por 10 minutos e então resfriada rapidamente em gelo. Foi adicionada a cada amostra uma mistura contendo: 1ul de dNTPmix (deoxynucleotide triphosphate) contendo 0,2 mmol·L⁻¹ de cada dNTP (ATP, CTP, GTP e TTP) (Promega, Madison, WI), 2ul de DTT 0,1 mol·L⁻¹, 4ul de tampão 5x e 200U daenzima M-MLV RT (Promega, Madison, WI) e então as amostras foram reaquecidas a 42°C por 60 min e a 95°C por 10 min.

A integridade do produto da RT (cDNAs) foi conferida em de gel de agarose (1%) não desnaturante, corado com Safer em tampão TBE 1x. Este procedimento foi

realizado no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, do Departamento de Zoologia, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com anuência do coordenador, Prof. Dr. Mario Navarro.

As reações em cadeia polimerase (PCR) foram realizadas em equipamento que monitora a geração de amplicons em tempo real (PCR real-time, *Applied Biosystems*). As reações foram efetuadas utilizando-se 40ng/ul de cDNA, para todos os genes avaliados, adicionado a uma reação contendo 25ul de SYBR Green PCR master mix, e 180nM do primer, em uma solução com volume final de 55ul, dividido em dois tubos (duplicata). Para cada gene, todas as amostras foram amplificadas simultaneamente e em duplicatas. Os dados foram analisados usando o método comparativo do ciclo limiar (Ct). A expressão de cada gene alvo foi normalizada para o gene GAPDH. Além disso, foi utilizado um controle negativo contendo água.

As condições de ciclagem consistiram em 2 passos: 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos com duas etapas, 15s de desnaturação à 95°C e 60s de anelamento à 60°C. Após a reação de PCR, foi possível determinar o início da fase de amplificação exponencial (Ct, cycle threshold) de cada amostra, que foi utilizada como dado para a análise da expressão gênica do gene alvo.

Os oligonucleotídeos, que foram utilizados como primers, para as reações de polimerase em cadeia foram:

Genes alvos e gene referência:

RNAm	Forward	Reverse
Col1A1a	5'-ATCAGCCCAAACCCCAAGGAGA -3'	CGCAGGAAGGTCAGCTGGATAG
Col 3A1a	5'-TGATGGGATCCAATGAGGGAGA-3'	GAGTCTCATGGCCTTGCGTGTTT
TGF-β-1a	5'-CCCCTGGAAAGGGCTCAACAC-3'	TCCAACCCAGGTCCTTCCTAAAGTC
GADPHa	5'-CCATTCTTCCACCTTTGATGCT-3'	TGTTGCTGTAGCCATATTCATTGT

Para análise da expressão gênica através do PCR-RT foi utilizado o método delta-delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct). Calculou-se inicialmente o Δ Ct da cada amostra, subtraindo-se os valores de Ct (treshold cycle ou limiar do ciclo), do gene controle GAPDH dos valores de Ct dos genes alvos (TGF-β-1A, Col1A1a e Col3A1a). Para o cálculo do

$\Delta\Delta C_T$ a média do ΔC_T do grupo foi subtraída do valor de ΔC_T de cada amostra. Após, para se chegar ao valor da Unidade Arbitrária (UA), foi calculada a potência do valor do $\Delta\Delta C_T$ de cada amostra.

O PCR Real Time foi realizado no Laboratório do Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com anuência do coordenador; Prof Dr. Emanuel M. de Souza.

5.3 Análise Estatística

Os resultados foram descritos como média \pm desvio padrão. A análise de normalidade dos dados foi realizada com o teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo teste Levene. Para comparação entre grupos, quando os resultados apresentaram distribuição normal e homogênea aplicou-se ANOVA one way. E, para dados não paramétricos foi utilizado o teste Kruskal. O teste t pareado foi usado na comparação entre as massas corporal inicial e final em cada grupo.

Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$, para todas as comparações. As análises foram realizadas no pacote estatístico SPSS versão 20.0

6. RESULTADOS

6.1 Massa corporal, massa muscular absoluta e relativa e histomorfometria

6.1.1 Massa corporal inicial e final

Os resultados da massa corporal inicial e final apresentaram distribuição normal ($p=0,28$, Shapiro Wilk e $p=0,35$, Shapiro Wilk, respectivamente) e homogênea ($p=0,33$, Levene; $p=0,56$, Levene, respectivamente). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($p=0,98$, ANOVA one way, $F_{1,13}=0,001$) na comparação entre a massa corporal inicial e final. No entanto, na comparação intra grupo, o grupo controle mostrou redução estatisticamente significativa da massa corporal ($p=0,009$, teste t de *Student* pareado) enquanto o grupo alongamento não apresentou diferença significativa ($p=0,62$, teste t de *Student* pareado).

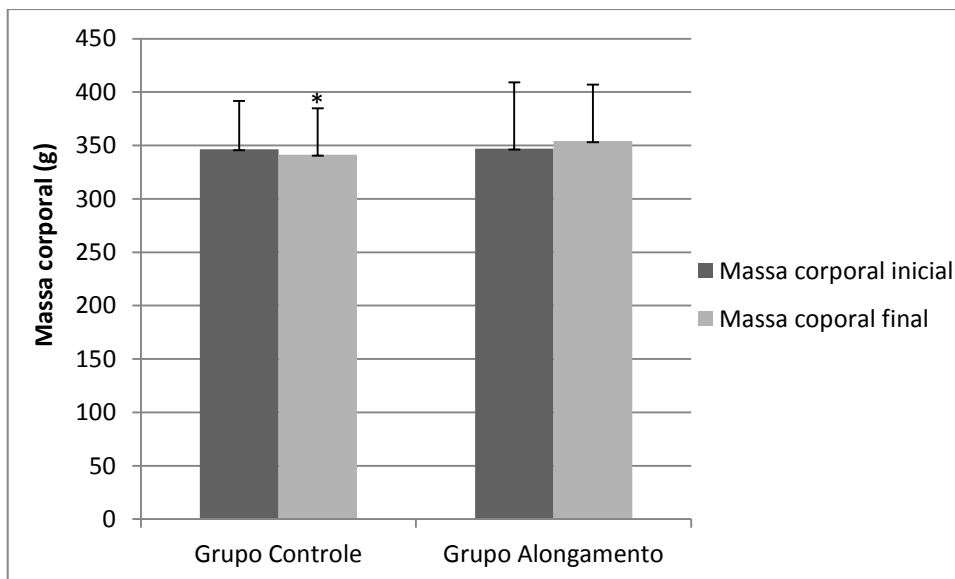


Figura 09: Massa corporal inicial e final das ratas idosas. Grupo controle (n=7): Massa corporal inicial 346,42±54,18 e massa corporal final 341,00±43,32. Grupo alongamento (n=8): Massa corporal inicial 347,12±61,90 e massa corporal final 354,12±52,92. * $p=0,009$ em relação à massa corporal inicial.

6.1.2 Massa muscular

Os resultados da massa muscular apresentaram distribuição normal ($p=0,66$, Shapiro Wilk), e homogeneidade ($p=0,86$ Levene). Não foi observada diferença estatisticamente significativa na massa muscular absoluta ($p=0,38$ ANOVA one way $F_{1,13}=0,79$) e relativa ($p=0,43$ ANOVA one way $F_{1,13}=0,64$) no grupo alongamento quando comparado ao grupo controle. Os resultados estão apresentados na tabela 01.

Tabela 01: Comparação da massa corporal inicial e final, massa muscular absoluta e massa muscular relativa entre os grupos.

Grupo	Massa corporal inicial (g)	Massa corporal final (g)	Massa muscular (g)	Massa muscular relativa (%)
Controle	346,42±45,18	341,4 ± 43,32	0,179 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Alongamento	347,12±61,90	354,1 ± 52,92	0,266 ± 0,257	0,08 ± 0,10
Valor de p	0,98	0,98	0,38	0,43

Os resultados estão descritos como média e desvio padrão.

6.1.3 Área de secção transversa das fibras musculares (ASTFM)

Os dados da área de secção transversa das fibras musculares não apresentaram normalidade ($p=0,001$, Shapiro Wilk), e homogeneidade ($p=0,05$, Levene). A ASTFM foi significativamente menor ($17,5 \pm 31,1\%$) em ratas idosas submetidas ao exercício de alongamento, quando comparadas às ratas do grupo controle ($4148 \pm 1568 \mu\text{m}^2$ vs $5032 \pm 2125 \mu\text{m}^2$; $p=0,001$, *Kruskall wallis*).

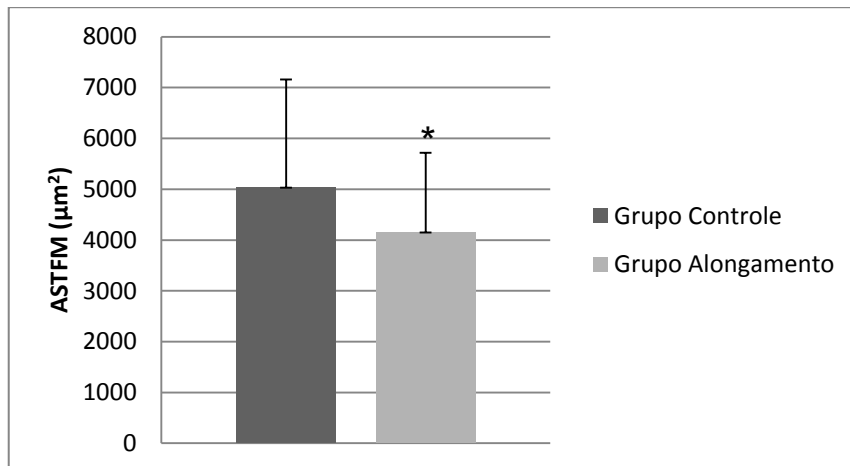


Figura 10: Área de secção transversa das fibras musculares (ASTFM). * $p=0,001$, Kruskal Wallis, em relação ao grupo controle. Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão.

6.2 Imunohistoquímica

6.2.1 Imunopositividade para TNF α por área total de fibra muscular

A área de imunopositividade do TNF α foi expressa em percentagem por área total de fibra muscular. Os resultados da área de imunopositividade não apresentaram distribuição normal ($p=0,00$, *Shapiro Wilk*), mas apresentaram homogeneidade ($p=0,08$, *Levene*), e não foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p=0,08$, *Kruskal wallis*). Os resultados da percentagem de TNF α por área total de fibra muscular não apresentaram distribuição normal ($p=0,001$, *Shapiro Wilk*), e homogeneidade ($p=0,01$, *Levene*), e foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p=0,04$, *Kruskal wallis*). Os resultados estão apresentados na tabela 02.

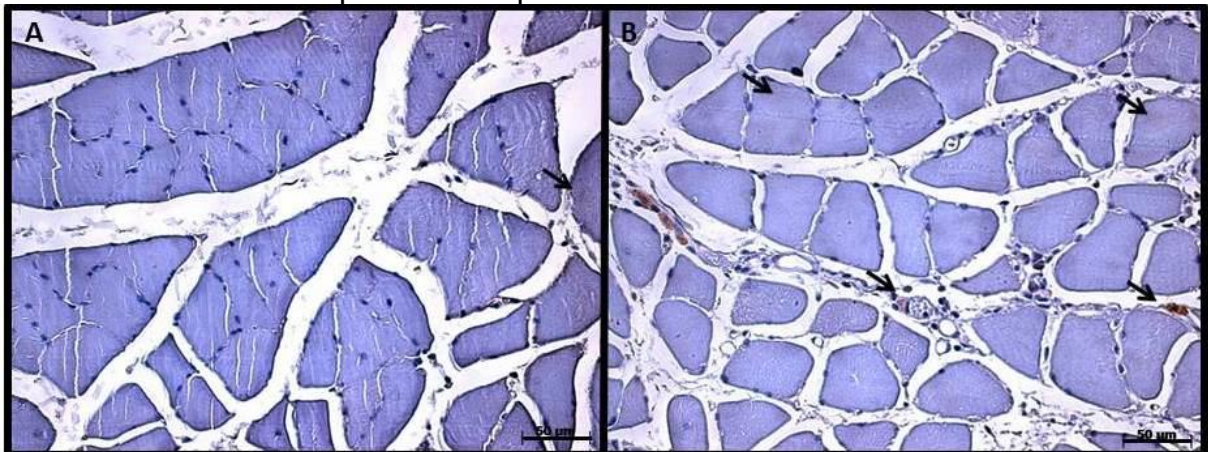
Tabela 02. Comparação da área de imunopositividade e porcentagem de TNF α no músculo sóleo entre os grupos.

Grupo	Área total de fibra muscular (μm^2)	Área total de imunopositividade (μm^2)	Porcentagem de TNF α por área total de fibra muscular (%)
Controle	85.238.709 \pm 14.870.670	62.689 \pm 80.724	0,07 \pm 0.08
Alongamento	80.228.598 \pm 18.662.926	97.528 \pm 93.094	0,12 \pm 0.11*

*Comparado ao grupo controle ($p=0,04$, *Kruskall Wallis*). Os resultados estão descritos como a média \pm desvio padrão.

A figura 11 demonstra a análise qualitativa morfológica, indicando maior imunopositividade do TNF α no grupo alongamento (A) comparado ao controle (B).

Figura 11: Fotomicrografia de corte histológico transversal do músculo sóleo de ratas idosas com imunopositividade para TNF α .



Objetiva de 40x. A: Grupo Controle. B: Grupo Alongamento. Setas demonstram marcação positiva para TNF- α . Barra 50 μm .

6.2.2 Imunopositividade para TGF- β 1 por área total de fibra muscular

A área do TGF- β 1 foi expressa em porcentagem por área total de fibra muscular. Tanto a imunopositividade quanto a porcentagem de TGF- β 1 por área total de fibra muscular apresentaram redução estatisticamente significativa no grupo alongamento quando comparado ao grupo controle ($p=0,02$, $p=0,04$, *Kruskall- Wallis*, respectivamente). Os resultados estão apresentados na Tabela 03.

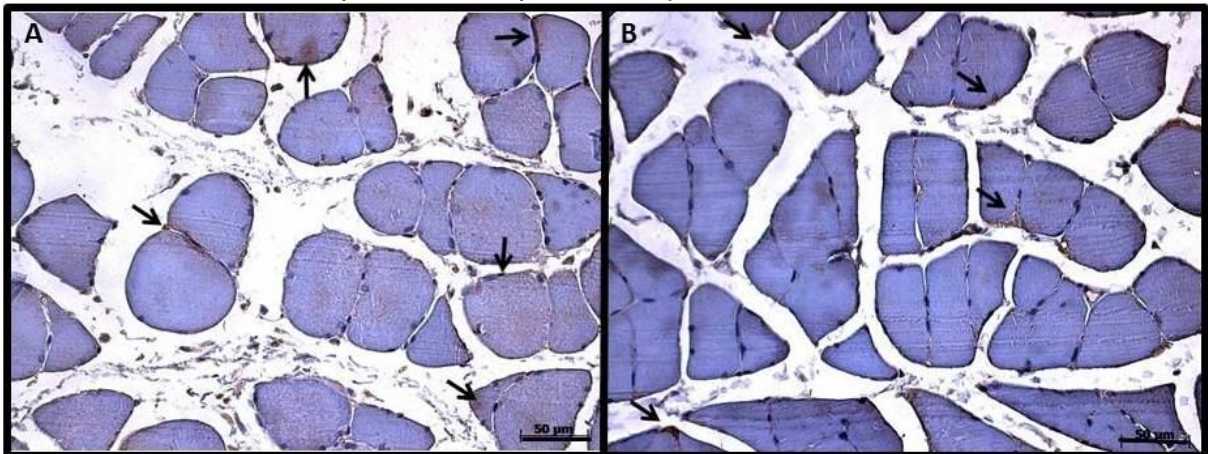
Tabela 03: Comparação da área de Imunopositividade para TGF β no músculo sóleo entre os grupos.

Grupo	Área total de fibra muscular (μm^2)	Área total de imunopositividade (μm^2)	Porcentagem de TGF β por área total de fibra muscular (%)
Controle	72.102 \pm 13.606	1.280 \pm 1.871	1,90 \pm 2,85
Alongamento	72.663 \pm 12.961	1.009 \pm 928*	1,60 \pm 1,69 [§]

*Área significativamente menor quando comparado ao grupo controle ($p=0,02$, Kruskal-wallis).[§] Porcentagem significativamente menor quando comparado ao grupo controle ($p=0,04$, Kruskal-wallis). Os resultados estão descritos como a média \pm desvio padrão.

A figura 12 demonstra o aspecto morfológico da menor imunopositividade do TGF- β 1 do grupo alongamento (B) em relação ao grupo controle (A).

Figura 12: Fotomicrografia de corte histológico transversal do músculo sóleo de ratas idosas com imunopositividade para TGF- β 1.



Objetiva de 40x. A: Grupo Controle. B: Grupo Alongamento; Setas demonstram marcação positiva para TGF β . Barra 50 μm .

6.2.3 Imunopositividade para Colágeno tipo I por área total de fibra muscular

Os dados da imunopositividade para o colágeno tipo I mostraram distribuição normal ($p=0,60$, Shapiro Wilk), mas não foram homogêneos ($p=0,001$, Levene).

A área do colágeno I está expressa em porcentagem por área total de fibra muscular. Foi encontrada redução significativa da imunopositividade e porcentagem

de colágeno tipo I no grupo alongamento comparado ao controle ($p=0,001$ e $p=0,001$, *Kruskal-Wallis*, respectivamente, tabela 04).

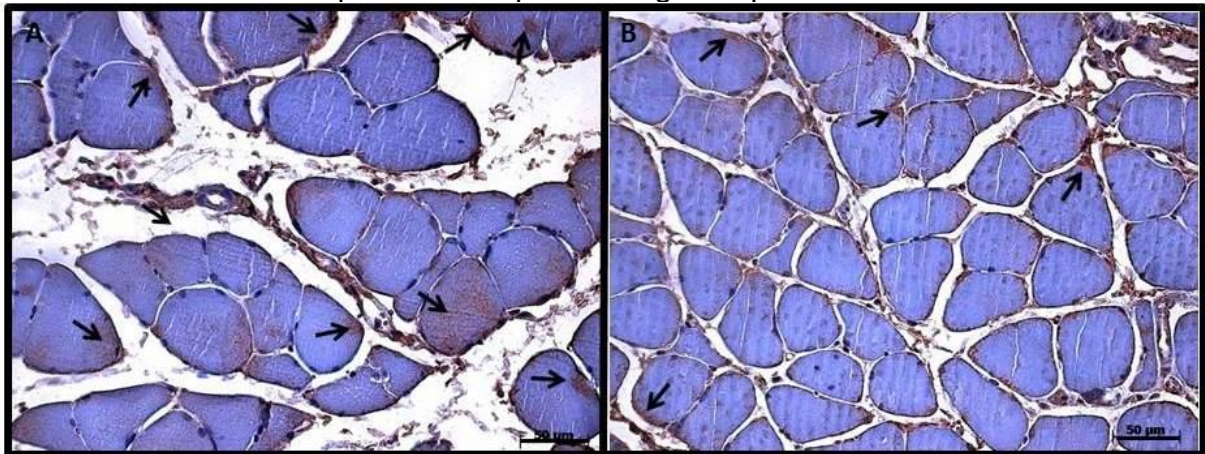
Tabela 04. Comparação da área de Imunopositividade para Colágeno tipo I no músculo sóleo entre os grupos.

Grupo	Área total de fibra muscular (μm^2)	Área total de imunopositividade (μm^2)	Porcentagem de Colágeno I por área total de fibra muscular (%)
Controle	137.043 \pm 19.334	996 \pm 1013	1,67 \pm 1,91
Alongamento	88.980 \pm 14.231	752 \pm 547*	1,41 \pm 1,21 [§]

*Área significativamente menor quando comparado ao grupo controle ($p=0,001$, *Kruskal-wallis*). § Porcentagem significativamente menor quando comparada ao grupo controle ($p=0,001$, *Kruskal-wallis*). Os resultados estão descritos como a média \pm desvio padrão.

A figura 13 apresenta a morfologia demonstrando maior imunopositividade do Colágeno tipo I nos grupos controle (A) em relação ao alongamento (B).

Figura 13: Fotomicrografia de corte histológico transversal do músculo sóleo de ratas idosas com imunopositividade para Colágeno tipo I.



Objetiva de 40x. A: Grupo Controle. B: Grupo Alongamento. Setas demonstram marcação positiva para Colágeno tipo I. Barra 50 μm .

6.2.4 Imunopositividade para Colágeno tipo III por área total de fibra muscular

Os dados da imunopositividade do colágeno tipo III mostraram distribuição normal ($p=0,81$, Shapiro-Wilk), porém não homogênea ($p=0,001$, Levene).

A área do colágeno III foi expressa em porcentagem por área total de fibra muscular. Foi observado aumento significativo da imunopositividade e porcentagem de colágeno tipo III no grupo alongamento comparando ao grupo controle ($p=0,001$ e $p=0,001$, *Kruskal-Wallis*, respectivamente). Os resultados estão apresentados na tabela 05.

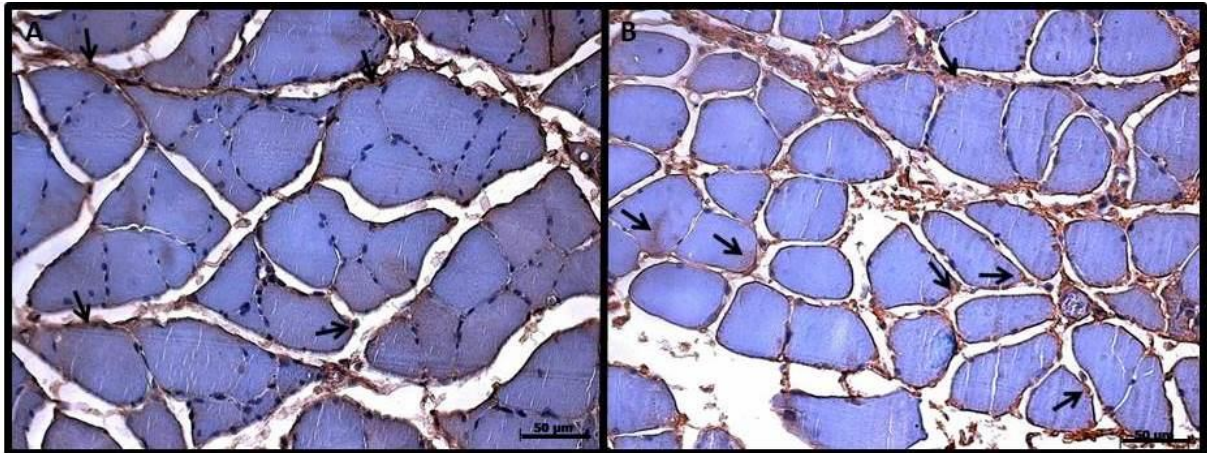
Tabela 05: Comparação da área de Imunopositividade para Colágeno tipo III no músculo sóleo entre os grupos.

Grupo	Área total de fibra muscular (μm^2)	Área total de imunopositividade (μm^2)	Porcentagem de Colágeno III por área total de fibra muscular (%)
Controle	67.412 \pm 12.159	2.924 \pm 2.210	4,92 \pm 5,30
Alongamento	69.349 \pm 15.524	3.915 \pm 2.864*	7,06 \pm 6,88 [§]

*Área significativamente maior quando comparado ao grupo controle ($p=0,001$, *Kruskal-wallis*). § Porcentagem significativamente maior quando comparado ao grupo controle ($p=0,001$, *Kruskal-wallis*). Os resultados estão descritos como a média \pm desvio padrão.

A figura 14 apresenta a morfologia demonstrando o aumento da imunopositividade do Colágeno tipo III no grupo alongamento (B) comparado ao controle (A).

Figura 14: Fotomicrografia de corte histológico transversal do músculo sóleo de ratas idosas com imunopositividade para Colágeno III.



Fotomicrografia do músculo sóleo. Imunohistoquímica. Objetiva de 40x. A: Grupo Controle. B: Grupo Alongamento. Setas demonstram marcação positiva para Colágeno tipo III. Barra 50µm.

6.2.5 Imunopositividade para TIMP por área total de fibra muscular

A área da TIMP foi expressa em porcentagem por área total de fibra muscular. Os resultados da imunopositividade e porcentagem de TIMP por área total de fibra muscular não apresentaram distribuição normal ($p=0,001$, Shapiro Wilk; $p=0,001$, Shapiro Wilk, respectivamente), mas apresentaram homogeneidade ($p=0,09$, Levene; $p=0,34$, Levene, respectivamente). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,64$, $p=0,89$, *Kruskal Wallis*, respectivamente).

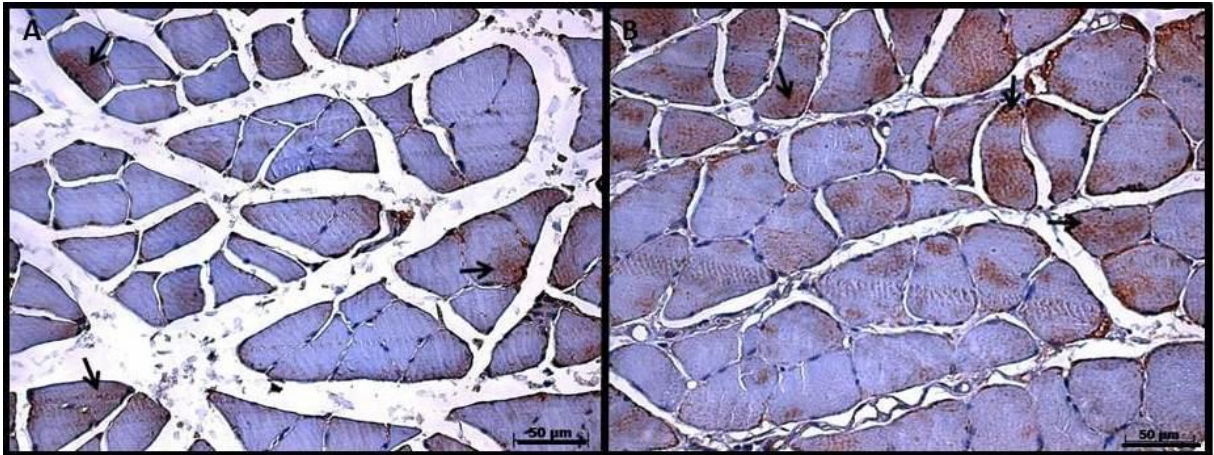
Tabela 06: Comparação da área de imunopositividade para TIMP no músculo sóleo entre os grupos.

Grupo	Área total de fibra muscular (μm^2)	Área total de imunopositividade (μm^2)	Porcentagem de TIMP por área total de fibra muscular (%)
Controle	83.213.892±12.264.786	2.407.248±3.139.133	3,10±3.62
Alongamento	80.478.661±12.386.708	2.352.003±2437.509	2.56±2.53

Os resultados estão descritos como a média±desvio padrão.

A figura 15 demonstra a imunomarcação da TIMP nos grupos controle (A) e alongamento (B) de forma semelhante.

Figura 15: Corte transversal do músculo sóleo de ratas idosas com imunopositividade para TIMP.



Objetiva de 40x. A: Grupo Controle. B: Grupo Alongamento. Setas demonstram marcação imunopositiva para TIMP. Barra 50µm.

6.3 Expressão gênica no músculo sóleo de ratas idosas submetidas ao exercício de alongamento

Os resultados da expressão dos genes TGF- β -1a; Col1A1a e Col 3A1a apresentaram distribuição normal ($p=0,32$, Shapiro Wilk; $p=0,11$, Shapiro Wilk; $p=0,46$, Shapiro Wilk, respectivamente) e homogeneidade ($p=0,40$, Levene; $p=0,05$, Levene; $p=0,83$, Levene). Não foi observada diferença significativa entre os grupos na expressão gênica do colágeno tipo I ($p=0,21$, ANOVA *one way*, $F_{1,2} = 2,12$) e na expressão gênica do colágeno tipo III ($p=0,94$, ANOVA *one way*, $F_{1,2} = 0,00$).

A expressão gênica do TGF- β -1a apresentou diminuição estatisticamente significativa no grupo alongamento quando comparada ao grupo controle ($0,83 \pm 0,89$ vs $4,47 \pm 5,65$, $0,001$, ANOVA *one way*).

Tabela 07: Expressão gênica no músculo sóleo.

Gene	Grupo Controle	Grupo Alongamento	Valor de p
TGF-β-1a	4,47 \pm 5,65	0,83 \pm 0,89*	0,001
Col1A1a	0,52 \pm 0,45	0,13 \pm 0,11	0,21
Col 3A1a	0,15 \pm 0,13	0,14 \pm 0,12	0,94

*Diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle (ANOVA *one way*). Os valores são unidade arbitrária (UA). Os resultados estão descritos como a média \pm desvio padrão

7. DISCUSSÃO

Este estudo buscou identificar e compreender os efeitos agudos do exercício de alongamento, realizado no músculo sóleo de ratas idosas, analisados 24 horas após a última sessão. Os resultados mostraram que alongamento muscular estático mecânico passivo, aplicado três vezes durante uma semana, causou atrofia muscular, mas promoveu efeito antifibrótico.

A redução de $17,5 \pm 31,1\%$ da área de secção transversa das fibras do músculo sóleo, após o protocolo de alongamento, causou estranheza, no sentido de que o músculo idoso apresenta redução da massa muscular, denominada sarcopenia, e dessa forma poderia ser entendido que o exercício de alongamento estaria favorecendo o estado sarcopênico (ARTHUR; COOLEY, 2012; NILWIIK et al, 2013; NARICI; MAFFULLI, 2010; WILLIANS et al, 2002).

Entretanto, embora o músculo alongado tenha mostrado redução da ASTFM, isso não foi refletido em diminuição da massa muscular absoluta. Outros autores também observaram redução (14%) da ASTFM após 3 sessões de alongamento, realizadas 1 vez por semana, durante 3 semanas, porém, em ratos jovens (GOMES et al, 2004). Estes autores reportaram que a falta de diferença na massa muscular absoluta pode ser atribuída a baixa porcentagem de atrofia muscular, que não foi suficiente para alterar a massa muscular total (GOMES et al, 2004). Além disso, a mensuração da ASTFM é um método mais preciso quando comparado à avaliação da massa muscular absoluta, para avaliar o trofismo muscular (GOMES et al, 2004).

Salvini et al (2012) afirmam que o remodelamento do músculo esquelético após alongamento passivo pode envolver tanto a ativação de vias da atrofia quanto da hipertrofia.

Peviani et al (2007) aplicaram alongamento estático manual passivo no músculo sóleo de ratos jovens em uma única sessão, constituída de 10 repetições, mantidas durante um minuto cada repetição, com intervalo de 30 segundos entre cada repetição. Os animais foram avaliados 8, 24, 48, 72 e 168 horas após o alongamento. Os resultados mostraram aumento na expressão gênica da atrogina-1,

48 horas após uma única sessão de alongamento quando comparada ao grupo controle. Em um segundo momento do estudo, novos grupos de ratos foram alongados durante 2, 3 ou 7 dias, seguindo a mesma prescrição. Os resultados também mostraram aumento da expressão da atrogina-1, nas 3 situações, quando comparado ao grupo controle, sendo que quando o alongamento foi realizado 3 vezes durante uma semana, a expressão da atrogina foi maior que nas outras situações. Os autores apontam que repetições curtas de alongamento estático manual passivo ativam a via proteossoma no músculo sóleo de rato, a qual contribui para atrofia muscular.

Gomes et al (2006) realizaram o alongamento muscular do músculo sóleo durante 30 minutos consecutivos em ratos jovens e compararam os efeitos após uma única sessão, duas sessões, 3 sessões ou sete sessões. Os resultados mostraram aumento da expressão gênica da atrogina-1 nos animais que receberam 2, 3 e 7 sessões de alongamento, enquanto não foi observada alteração na expressão gênica após uma única sessão, demonstrando ativação de via da atrofia quando o estímulo de alongamento é realizado com frequência igual ou superior a 2 sessões semanais.

Assim, apesar dos estudos anteriores terem sido realizados com ratos jovens, pode-se sugerir que o músculo idoso responde de maneira semelhante. Além disso, detectou-se que quando o estímulo do alongamento é realizado intermitente, isto é, sem imobilização e por um período de apenas uma semana, pode ocorrer atrofia muscular.

Entretanto, tem sido descrito que o exercício de alongamento é considerado um potente estímulo para prevenir a atrofia e induzir a hipertrofia muscular (COUTINHO, et al, 2004; GOLDSPINK et al, 2002). SALVINI et al (2006), em contrapartida, não encontraram diferença na área de secção transversa do músculo sóleo de ratos jovens, previamente imobilizado em posição de encurtamento, durante 4 semanas e posteriormente submetido a um protocolo de alongamento, constituído de 10 repetições de 1 minuto, intervaladas por 30 segundos, 3 vezes por semana, durante 3 semanas. Os autores relatam que apesar de não observarem alteração na ASTFM, encontraram aumento do número de sarcômeros em série e

sugerem que o protocolo proposto foi mais eficiente para ativar sensores mecânicos envolvidos na sarcomerogênese (crescimento em série) do que os envolvidos no crescimento radial (em paralelo). Ainda, em estudo do mesmo grupo de pesquisa, verificaram que quando protocolo semelhante de alongamento foi realizado 3 vezes por semana, impediu a atrofia e quando realizado diariamente causou hipertrofia muscular esquelética, demonstrando maior efeito do alongamento no trofismo muscular, quando a frequência semanal é aumentada (COUTINHO et al, 2006).

Dessa forma, observa-se que o exercício de alongamento induz modificações no músculo esquelético dependendo da frequência semanal e do período de treinamento. Quando a frequência semanal foi de 1 vez por semana causou atrofia, quando realizou-se 3 vezes por semana impediu atrofia e o treinamento diário induziu hipertrofia (GOMES et al, 2004; COUTINHO et al, 2006). Além disso, quando o período de treinamento foi de 1 semana, ocorreu aumento da expressão de genes relacionados com a atrofia e redução da área de secção transversa das fibras musculares, porém, quando realizado por 3 semanas, observaram aumento da área de secção transversa das fibras musculares (GOMES et al, 2004; GOMES et al, 2006; PEVIANI et al, 2007; COUTINHO et al, 2004). Assim, verifica-se que o efeito de 3 sessões de alongamento estático mecânico passivo, realizadas durante uma semana, em músculo sóleo de ratas idosas, apresentou o mesmo comportamento do músculo sóleo de ratos jovens, submetidos ao alongamento estático manual passivo, isto é, causou atrofia.

No sentido de investigar os mecanismos envolvidos com o processo de atrofia muscular induzida pelo alongamento, o presente estudo analisou a expressão das citocinas TNF α e TGF- β 1, proteínas estruturais (colágeno tipo I e tipo III) e inibidores da degradação proteica da matriz extracelular (TIMPs) do músculo sóleo.

Por meio da técnica de imunohistoquímica, verificou-se que o grupo submetido ao alongamento apresentou maior porcentagem de imunomarcção do TNF α por área de músculo quando comparada ao grupo controle, o que pode ter contribuído para a atrofia muscular.

O TNF α faz parte de um grupo de peptídeos denominados caquetinas, devido seus efeitos catabólicos e, contribuem para diminuição de massa muscular

(GREIWE et al,2001) e está associada com o aumento da expressão do gene ubiquitina e ubiquitinação de proteínas do músculo esquelético (HAMADA et al, 2004). Ping Li et al (2005) sugerem que o TNF α atua via p38 para aumentar a expressão do gene atrogina no músculo esquelético. É importante observar que concomitante ao decréscimo na área de secção transversa no grupo alongamento foi observado o aumento da imunomarcagem de TNF α , o que sugere que o TNF α pode ter sido responsável pela sinalização da via da atrofia e possivelmente pela atrofia.

O envelhecimento é caracterizado por estado inflamatório crônico de baixa intensidade (MARTINIS, et al,2006). Baixo grau de inflamação sistêmica pode causar aumento de 2 a 3 vezes na concentração plasmática de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-1ra, sTNF-R e proteína C reativa (CALVO et al,2010; PETERSEN; PEDERSEN, 2006; BRUUNSGAARD; PEDERSEN, 2000) e são considerados fatores de risco para morbidade e mortalidade em idosos (MARTINIS, et al,2006; PEREIRA et al,2013; GREIWE et al,2001). Existem fortes evidências indicando a importância dos fatores inflamatórios na redução de massa muscular relacionada à idade (POEL et al, 2011).

Músculo mecanicamente alongado pode induzir inflamação local e atrair leucócitos que exercem funções essenciais e favoráveis nos processos de adaptação, remodelamento e reparo do músculo esquelético. A resposta inflamatória de curta duração promovida pelo próprio músculo exercitado é necessária para iniciar a adaptação ao exercício. Em contrapartida, a inflamação sistêmica crônica tem impacto negativo na homeostase do músculo, resultando em atividade proteolítica desequilibrada e prejudicial à capacidade de regeneração (BEITER et al, 2015).

Perturbações simples do músculo esquelético tal qual o alongamento ativo durante um exercício excêntrico, aumenta marcadamente a expressão da interleucina 1 (IL-1 β) e TNF α (BUTTERFIELD et al, 2006). Os neutrófilos são os primeiros a chegar e sinalizar a resposta inflamatória durante o exercício e lesão de tecidos moles. No entanto, essa resposta imediata por parte dos neutrófilos tem sido observada após exercício de alongamento e exercício isométrico sem lesão do

músculo, mostrando que a presença dos neutrófilos não necessariamente significa lesão (BUTTERFIELD et al, 2006).

Pizza et al (2002) realizaram alongamento passivo do músculo extensor longo dos dedos, em camundongos adultos. O alongamento consistiu no posicionamento do músculo em comprimento 20% maior comparado ao seu comprimento inicial, durante 5 minutos, realizado uma única vez. Foi observado aumento de 5,5 vezes no número de neutrófilos comparado com o grupo controle, 3 dias após o alongamento passivo, enquanto não houve aumento significativo no número dos macrófagos em comparação ao grupo controle. Estes autores reportaram que o músculo extensor longo dos dedos dos camundongos submetidos ao alongamento, apresentou aumento da concentração de neutrófilos sem apresentar sinais histológicos e funcionais de lesão. Estes achados também foram observados no grupo de camundongos submetidos à contração isométrica.

Dessa forma, mesmo na ausência de lesão muscular, o estudo de Pizza et al (2002) confirma a existência de resposta inflamatória local decorrente do alongamento passivo, também observado no presente estudo, pelo aumento da imunomarcagem do TNF α no músculo sóleo.

Cação Benedini et al (2014) reportaram que ratas fêmeas imobilizadas e posteriormente submetidas ao alongamento por 3 dias, apresentaram significativamente mais macrófagos quando comparadas com ratas que foram imobilizadas e mantidas livres também por 3 dias, com ratas imobilizadas e alongadas apenas em 1 dia, bem como com ratas imobilizadas e alongadas durante 10 dias. Os autores sugerem que esse resultado pode ter sido decorrente de lesão do músculo sóleo induzida pelo alongamento passivo realizado durante 3 dias. Os autores ainda reportaram que na análise da citoarquitetura das miofibrilas que foram imobilizadas e posteriormente remobilizadas pelo livre movimento ou alongamento muscular, observou-se padrão descontínuo da distrofina e ondulações no sarcolema, principalmente quando o alongamento foi realizado por 3 dias. A descontinuidade desses elementos observados ao longo do sarcolema sugere vulnerabilidade intersticial dos elementos extracelulares, evidenciada pelo aparecimento de grande número de macrófagos na fase inicial pós-imobilização (3 dias).

As fibras musculares em condições de lesão, alongamento mecânico bem como contração muscular têm capacidade notável para alterar o meio inflamatório local e assim atrair leucócitos, os quais exercem funções de adaptação, remodelamento e processos de reparo no músculo esquelético. Essa resposta inflamatória pode ser decorrente do dano às miofibrilas por sobrecarga excêntrica, mas também é um pré-requisito para o subsequente remodelamento e adaptação do tecido muscular esquelético (BEITER et al, 2015).

Evidentemente, resposta inflamatória aguda, iniciada ou promovida pelo próprio músculo exercitado é necessária para iniciar a adaptação ao exercício. O exercício agudo provoca estado pró-inflamatório transitório, que afeta a homeostase corporal e metabolismo, e especificadamente alvos inflamatórios locais no músculo esquelético. Resposta inflamatória bem controlada é importante para o subsequente processo reparativo e adaptativo, incluindo a ativação de células satélites e diferenciação (BEITER et al,2015).

O exercício de alongamento passivo pode estimular a diapedese dos neutrófilos, com subsequente localização dos neutrófilos na MEC do músculo esquelético (BUTTERFIELD et al,2006). Dessa forma, o aumento das células inflamatórias após exercício, pode indicar que elas desempenham outro papel além de apenas o reparo tecidual, já que no presente estudo não foram encontrados sinais de lesão nos músculos submetidos ao alongamento (KOH et al,2003).

Dessa forma, pode-se sugerir que o aumento do TNF observado no presente estudo, pode ter sido decorrente de processo inflamatório induzido pelo efeito agudo do exercício de alongamento. Outros autores tem reportado aumento da concentração de células inflamatórias como neutrófilos, não acompanhado de lesão muscular, após protocolo de alongamento (Pizza et al, 2002).

O músculo esquelético adapta-se às condições mecânico-biológicas que estão presentes ou ausentes, induzindo respostas celulares e moleculares, as quais regulam a área de secção transversa, comprimento e tipo de fibras musculares. O processo mecânico-biológico se inicia na matriz extracelular em resposta a estímulos, tais como o alongamento (TOIGO; BOUTELLIER, 2006). Portanto,

mudanças na síntese e degradação da matriz extracelular são eventos importantes que ocorrem em resposta ao estresse mecânico (CHIQUET et al, 2009).

Os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) são frequentemente ativados juntos com as metaloproteinases (MMPs), em resposta à atividade física, indicando estimulação e inibição simultânea da degradação dos componentes da matriz extracelular. Ao invés de considerar isso como uma atividade competitiva, é provável que a atividade das MMPs preceda a atividade da TIMP, e assim TIMPs atuam como reguladores da degradação, a fim de garantir quantidade limitada desta (KJAER, 2004).

TIMP-1 é sintetizada por vários tipos de tecidos conjuntivos e pelos macrófagos (CHEN; LI,2009) e são regulados em nível transcricional por várias citocinas e fatores de crescimento (MURPHY, 2011).

TIMPs equilibram a degradação da MEC por parte das MMPs e mostram aumento de RNAm mais tardiamente após o exercício de alongamento tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sugerindo que o aumento precoce da atividade das MMPs ativam o remodelamento da MEC e da migração das células satélites. Ainda, a expressão da TIMP em momentos mais tardios após o exercício, aumentam para equilibrar as ações das MMPs (PASSEY et al, 2011).

Dennis et al (2008) compararam a expressão de genes envolvidos com a inflamação, sinalização celular ou remodelamento e crescimento no músculo esquelético de jovens (32 ± 7 anos) e idosos (72 ± 5 anos) antes e após 72 horas de uma sessão de exercício resistido em membro inferior. As concentrações de RNAm de MMP-2 foram menores em idosos humanos comparadas a de jovens no estado de repouso, enquanto TIMP-1 mostrou-se mais responsiva ao exercício em jovens (DENNIS et al,2008). Em parte, estes resultados poderiam explicar a não responsividade da expressão da TIMP-1, 24h após a realização do protocolo de alongamento, realizado nas ratas idosas do presente estudo.

Outro achado do presente estudo foi a menor imunomarcagem e expressão gênica do TGF- β 1 no músculo sóleo submetido ao exercício de alongamento. Podemos sugerir que o exercício de alongamento ativa fator pré - transcricional, que

se reflete na pós transcrição, e que promove respostas nos componentes da matriz extracelular.

TGF- β é uma proteína multifuncional que desempenha papel importante na fibrose muscular relacionada à idade. Quando o TGF- β encontra-se ativado, pode induzir o fibroblasto a produzir colágeno tipo I, fibronectina e fator de crescimento do tecido conjuntivo (cTGF) e ainda suprimir a atividade das MMPs. Estes desfechos contribuem para explicar a redução da imunomarcagem e expressão do TGF β -1 e do colágeno I, bem como a não responsividade da TIMP, indicando o efeito anti-fibrótico do alongamento (NAROLA et al, 2013; KARASIK; COHEN-ZINDER, 2012).

Um dado interessante em nosso estudo, é que simultânea à redução do TGF- β 1 foi também observada redução significativa na imunomarcagem do colágeno tipo I. Dessa forma, é possível sugerir que a redução da expressão do TGF- β 1 se refletiu em inibição da síntese de colágeno tipo I.

Além disso, no presente estudo foi verificado maior imunomarcagem do TNF α e menor expressão do TGF- β 1, os quais contribuem para redução da porcentagem de colágeno tipo I, sugerindo efeito anti-fibrótico (VERRECHIA; MAURRIEL, 2004; GREENWEL et al,2000; KOUBA et al,1999).

TNF α reduz a deposição da MEC, tanto pela indução da produção de collagenases ou pela inibição da síntese de componentes estruturais como o colágeno tipo I, o maior componente estrutural do tecido conjuntivo. TNF α ainda contrapõe o TGF- β no estímulo à expressão do gene colágeno tipo I (VERRECHIA; MAUVIEL, 2004). Os resultados do presente estudo corroboram com estes mecanismos envolvidos no remodelamento da matriz, já que, o aumento do TNF α foi acompanhado pela redução do TGF β -1 e do colágeno tipo I.

No entanto, apesar da diminuição da imunomarcagem do colágeno I, não foi observada alteração da expressão gênica do colágeno I. Hirose et al (2008) examinaram os efeitos da suspensão da pata posterior, na expressão do gene COL1A2, conteúdos de TGF β -1 e TNF α , e na fosforilação da SMAD3. Durante a imobilização, o conteúdo de RNAm de COL1A2 diminuiu nos primeiros dias e retornou aos valores iniciais no 7º dia. Por sua vez, a suspensão do membro durante 3, 7 e 14 dias resultou em aumento no conteúdo de TNF α no músculo sóleo, quando

comparado ao grupo controle e com o grupo que teve a pata suspensa apenas por 1 dia. O conteúdo de TGF β -1 aumentou no 7º dia diminuindo gradativamente até o 14º dia. Os autores consideraram que o aumento do TNF α a partir do 3º dia até o 14º dias suprimiu a sinalização da via TGF β /Smad por meio do NF κ B.

A ativação do receptor do TGF β -1 (TGF β RI) aciona duas vias de sinalização, a via SMAD 2/3 e a via TAK1 MAPK, que medeiam várias ações intracelulares do TGF- β , incluindo a síntese de proteínas da MEC (MENDIAS et al, 2012).

Assim, nossos resultados sugerem que o alongamento mecânico passivo estático do músculo idoso, diminui o TGF- β 1, em nível transcricional e pós traducional que conseqüentemente pode ter contribuído para reduzir a síntese de colágeno tipo I mediada pelo TNF α .

Tamaki et al (2014) observaram aumento de tecido conjuntivo, diminuição do recrutamento motor e da velocidade de contração do músculo extensor longo dos dedos em ratos idosos quando comparado com ratos jovens. Na análise do conteúdo de colágeno tipo I no músculo plantar, por meio da técnica de imunohistoquímica, foi constatado que o grupo de ratos idosos mostrou conteúdo significativamente maior do que os outros grupos, sem diferença entre ratos adultos e ratos adultos de meia idade. Os autores sugerem que a rigidez muscular pode ser maior em ratos idosos devido ao aumento no conteúdo de colágeno tipo I, sugerindo afetar os aspectos funcionais do músculo (TAMAKI et al, 2014). No presente estudo foi observada redução da porcentagem de colágeno tipo I, indicando que o protocolo de alongamento causou efeito anti-fibrótico, já que o músculo de animais idosos apresenta maior conteúdo de colágeno tipo I em comparação com animais jovens.

A característica estrutural da molécula de colágeno tipo I fornece ao músculo maior força tênsil e elasticidade limitada quando agregado às miofibrilas e dessa forma, mudanças na quantidade de colágeno tipo I podem ter significância na rigidez muscular (HIROSE et al, 2008).

Ainda, nossos resultados mostraram maior conteúdo do colágeno tipo III no músculo sóleo submetido ao alongamento em comparação ao grupo controle.

Kaneko et al (2009) investigaram as mudanças na expressão dos colágenos após aplicação de 3 horas de alongamento cíclico *in vitro*, em fibroblastos de

ligamento de coelhos. Foram analisadas a expressão dos genes colágeno tipo I e colágeno tipo III, por meio do PCR-RT, imediatamente após o alongamento e 2, 6, 12 e 18 horas depois. Duas horas após o término do alongamento, a expressão do colágeno tipo I foi 40% maior e do colágeno III foi 71% maior que a do grupo controle. Seis horas após o alongamento, a expressão do gene colágeno tipo I foi 67% maior enquanto a expressão do colágeno III foi 131% maior que a do grupo controle. Doze horas após, a expressão dos colágenos I e III continuou supra regulada. Entretanto, 18 horas após o término do alongamento, nenhuma expressão foi observada.

Hsieh et al (2002) investigaram o efeito do alongamento em fibroblastos do ligamento cruzado anterior de ratos, ao longo de 20h após o alongamento. Foi verificado que 1 hora após o alongamento a expressão do colágeno tipo I estava aumentada, porém, após 2 horas já estava reduzida. Apesar de estes resultados terem sido observados em fibroblastos de ligamento, podem em parte explicar os achados do presente estudo, já que não foi observada modificação da expressão do Colágeno I e III no músculo sóleo, 24h após a última sessão do protocolo de alongamento.

Os achados do presente estudo sugerem que os efeitos agudos no músculo idoso em resposta ao exercício de alongamento agudo inclui resposta da matriz extracelular, por meio da redução do colágeno tipo I, aumento da porcentagem do colágeno tipo III por área de músculo e diminuição da área de secção transversa da fibra muscular, mediados pelo $TNF\alpha$ e $TGF-\beta 1$.

Hipóteses de eventos celulares envolvidos na resposta aguda do músculo esquelético do idoso ao exercício de alongamento:

Sugere-se que os efeitos agudos do exercício de alongamento no músculo idoso tenham sido mediados pela sinalização do $TNF\alpha$ e $TGF-\beta 1$. Propomos abaixo, na figura 16, as vias de sinalização envolvidas nesse processo. O estímulo do alongamento sinalizaria o segundo mensageiro MAPK por meio do $TNF\alpha$. Ainda, os efeitos agudos do alongamento também poderia aumentar a atividade do NFkB, já

que detectamos redução da área de secção transversa das fibras musculares (COFFEY; HAWLEY, 2007; ZHAN et al,2007; BOPPART et al,2001).

O estímulo do alongamento provavelmente promoveu aumento das células inflamatórias no músculo sóleo, que contribuíram para o aumento do TNF α . O TNF α , por sua vez, ativa dois receptores de membrana que sinalizam duas famílias de fatores de transcrição, MAPK e NF κ B. O NF κ B sinaliza a maquinaria ubiquitina-proteassoma (COFFEY; HAWLEY, 2007).

A sinalização do TGF β é mediada pela fosforilação de membros da família SMAD. Porém, SMAD foi sugerida como capaz de mediar a inibição do TGF- β quando ativada por citocinas inflamatórias (VERRECHIA; MAUVIEL, 2002).

A ativação da via da MAPK interfere na interação SMAD-DNA, para inibir a via de sinalização do TGF β /SMAD. Ainda, NF κ B pode induzir a expressão de SMAD-7 que impede a fosforilação das outras SMADS. O TNF α também diminui a ativação do receptor do TGF- β e estimula a degradação da matriz extracelular pela indução das proteinases e inibição da síntese de componentes estruturais (HIROSE et al,2007; VERRECHIA; MAUVIEL, 2002; GREENWEL et al,2000).

O TGF β inibe a síntese de proteinases da matriz extracelular enquanto regula de forma positiva a produção de seus inibidores (TIMP) e componentes estruturais da matriz (VERRECHIA; MAUVIEL, 2004).

Dessa forma, sugere-se que os efeitos agudos ao estímulo do alongamento no músculo esquelético de ratas idosas pode ter sinalizado duas vias, NF κ B e MAPK, que inibiram a sinalização do TGF β via SMAD e dessa forma a síntese de colágeno tipo I. Por sua vez, MMPs podem ter sido sinalizadas, embora não analisadas no presente estudo, mas que poderia ter favorecido o aumento do colágeno tipo III, indicando efeito anti-fibrótico.

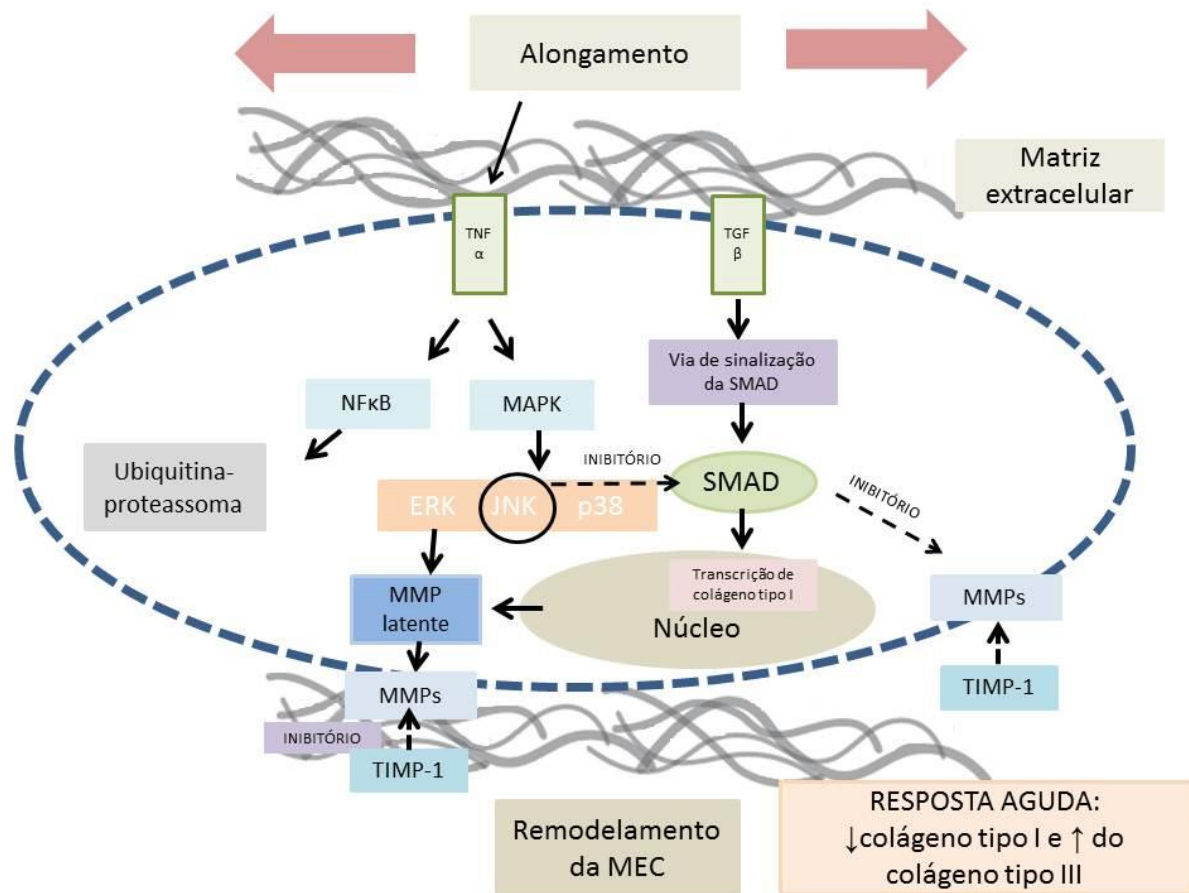


Figura 16: Prováveis vias de sinalização envolvidas na resposta aguda do músculo esquelético ao exercício de alongamento. Estímulo do alongamento aumentou a imunomarcagem de TNF α no músculo sóleo, e o TNF α pode ter ativado a via da MAPK e NF κ B. A via da MAPK pode ter inibido a fosforilação da SMAD via TGF β e assim inibido a imunomarcagem de colágeno tipo I. Ainda, TNF α pode ter inibido a ativação do receptor do TGF β e assim, a via TGF β /SMAD. MAPK ainda pode ter sinalizado e ativado metaloproteínas (MMPs) que têm sua atividade controlada por seus inibidores (TIMPs). TNF α ainda pode ter sinalizado a via NF κ B que pode ter ativado a proteólise via sistema ubiquitina-proteassoma. Linhas pontilhada na cor azul: representa a membrana celular; emaranhados na cor cinza: Representam as fibras de colágeno e elastina da matriz extracelular; setas contínuas: indicam ativação; setas pontilhadas: indicam inibição; TNF α : receptor do TNF α ; TGF β : receptor do TGF β ; NF κ B: Fator de Transcrição; MAPK: proteína quinase; SMAD: Família de proteínas envolvidas na translocação de sinais dos receptores do TGF- β ; ERK: proteína quinase regulada por sinal extracelular; JNK: Kinase c-JUN-N-terminal; p38: proteína quinase ativada por mitógeno p38 MMP: Metaloproteases; TIMP-1: inibidor tecidual das metaloproteases; MEC: Matriz extracelular.

Entretanto, sugerimos para estudos futuros a investigação das vias de sinalização aqui propostas, para melhor compreensão dos efeitos agudos do exercício de alongamento no músculo esquelético em processo de envelhecimento. Cabe ainda, a investigação de quais metaloproteínas são envolvidas nesse processo e de que forma seus inibidores são sinalizados. Ainda, recomenda-se que

os mecanismos sejam analisados imediatamente e nas horas subsequentes ao exercício de alongamento, afim de que seja possível compreender a atividade dos genes envolvidos.

Aplicações clínicas:

O processo de envelhecimento pode causar redução de massa muscular, aumento de tecido conjuntivo e adiposo (BUFORD et al 2012, IMAMURA et al,1999).

O aumento do tecido conjuntivo contribui para fibrose do tecido muscular do idoso e pode estar relacionada com o aumento das concentrações de colágeno tipo I na matriz extracelular, reduzindo o comprimento da unidade musculotendínea (ARTHUR; COOLEY, 2012; GILLIES; LIEBER, 2011; TAMAKI et al, 2014). Todos estes fatores podem causar redução da amplitude de movimento articular e da mobilidade, comprometendo a realização das atividades da vida diária de forma independente e aumentando o risco de quedas (ACSM, 2009; GALLO et al, 2013; RODACKI et al, 2009; STATHOKOSTAS et al, 2012; STANZIANO et al, 2009; RODACKI et al, 2009).

Nesse sentido, o presente estudo mostrou que o alongamento mantido por 240 segundos, realizado três vezes por semana, durante uma semana, induziu efeito anti-fibrótico. Assim, sugere-se que o exercício de alongamento seja prescrito para impedir a redução da amplitude de movimento, podendo contribuir para manutenção da independência nas atividades de vida diária, assim como prevenir quedas.

8. CONCLUSÃO

O efeito agudo do protocolo de exercício de alongamento foi atrofia muscular, que pode ter sido mediada pelo $TNF\alpha$ e $TGF-\beta$. Porém, induziu efeito anti-fibrótico, demonstrado pela redução do conteúdo de colágeno tipo I e do $TGF-\beta$ bem como pelo aumento do conteúdo de colágeno tipo III. Portanto, sugere-se que o alongamento muscular pode ser prescrito para impedir a redução de mobilidade em idosos.

REFERENCIAS

ABE, S; RHEE, S; IWANUMA, O; HIROKI, E; YANAGISAWA, N; SAKYAMA, K; IDE, Y. Effect of Mechanical Stretching on Expressions of Muscle Specific Transcription Factors MyoD, Myf-5, Myogenin and MRF4 in Proliferated Myoblasts. **Anat. Histol. Embryol**, 2009; 38 (4), 305–310.

ABATE, M; SCHIAVONE, C; PELOTTI, P; SALINI, V. Limited joint mobility in diabetes and ageing: recent advances in pathogenesis and therapy. **Int J Immunopathol Pharmacol**. 2010, 23(4):997-1003.

American College of Sports Medicine: **ACSM's guidelines for exercise testing and prescription**. 9th ed, 2014.

ACMS (GARBER C.E; BLISSMER B; DESCHENES M.R; FRANKLIN B. A; LAMONTE M. J; LEE I. M; NIEMAN D. C; SWAIN D. P). Quantity and Quality of Exercise for Developing and Maintaining Cardiorespiratory, Musculoskeletal, and Neuromotor Fitness in Apparently Healthy Adults: Guidance for Prescribing Exercise, *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **Med Sci Sports Exerc**.43(7): 1334-1359, 2011.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE (ACSM); CHODZKO-ZAJKO, W.J; PROCTOR, D.N; FIATARONE SINGH, M.A; MINSON, C.T; NIGG, C.R; SALEM, G.J; SKINNER, J.S. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. **Med Sci Sports Exerc**. 2009. 41(7):1510-30. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181a0c95c.

AOKI, M.S; MIYABARA, E.H; SOARES, A.G; SAITO, E.T; MORISCOT, A.S. mTOR pathway inhibition attenuates skeletal muscle growth induced by stretching. **Cell Tissue Res**. 2006; 324(1):149-56.

ARTHUR, S.T; COOLEY, I.D. The Effect of Physiological Stimuli on Sarcopenia; Impact of Notch and Wnt Signaling on Impaired Aged Skeletal Muscle Repair. **Int. J. Biol. Sci.**, 2012; 8(5); 731-60. doi: 10.7150/ijbs.4262.

BALLAK, S.B; DEGENS, H; HAAN, A; JASPERS, R.T Aging related changes in determinants of muscle force generating capacity: A comparison of muscle aging in men and male rodents. **Ageing Res.**, 2014; 14, 43-55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2014.01.005>

BAPTISTA, R.R; VAZ, M.A. Arquitetura muscular e envelhecimento: adaptação funcional e aspectos clínicos; revisão da literatura. **Fisioter Pesqui**, 2009; 16 (4): 368-73.

BAYNES, J.W. **Bioquímica médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

BEGGS, M.L; NAGARAJAN, R; TAYLOR-JONES, J.M; NOLEN, G; MACNICOL, M; PETERSON, C.A; Alterations in the TGFbeta signaling pathway in myogenic progenitors with age. **Aging Cell**, 2004, 3(6), 353-61.

BEITER, T; HOENE, M; PRENZLER, F; MOOREN, F.C; STEINACKER, J.M; WEIGERT, C. NIEß, A.M; MUNZ, B.Exercise, skeletal muscle and inflammation: ARE-binding proteins as key regulators in inflammatory and adaptive networks. **Exerc Immunol Rev.** 2015;21:42-57.

BLESER,P.J. XU, G. ROMBOUTS,K; ROGIERS,V.R; GEERTS,A. Glutathione Levels Discriminate between Oxidative Stress and Transforming Growth Factor-b Signaling in Activated Rat Hepatic Stellate Cells. **J. Biol. Chem**, 1999. 274:33881-33887.

BONALDO, P; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle Atrophy.**Dise Model Mechan** 2013, 6 (1) 25-39, doi:10.1242/dmm.010389

BOPPART, M.D; HIRSHMAN, M.F; SAKAMOTO, K; FIELDING, R.A; GOODYEAR, L.J. Static stretch increases c-Jun NH2-terminal kinase activity and p38 phosphorylation in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, 2001; 280 (2) 352–358,.

BOUFFARD, N. A.; CUTRONEO, K.R.; BADGER, G.J.; WHITE, S.L; BUTTOLPH, T.R.; EHRlich, H.P; TUTTLE, D. S.; LANGEVIN, H. M. Tissue Stretch Decreases Soluble TGF-β1 and Type-1 Procollagen in Mouse Subcutaneous Connective Tissue: Evidence From Ex Vivo and In Vivo Models. **J Cell Physiol.** 214(2): 389–395, 2008 doi:10.1002/jcp.21209.

BRASIL. Lei no 11.794. Regulamentada o inciso VII do §1º, do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para uso científico de animais; revoga a lei no 6.638/1979; e dá outras providências. DOU de 9.10.2008.

BRUUNSGAARD, H; PEDERSEN, B.K. Effects of exercise on the immune system in the elderly population. **Immunology and Cell Biology**, 2000; 78, 523–531

BUFORD, T.W; LOTT, D.J; MARZETTI, E; WOHLGEMUTH, S.E; VANDENBORNE, K; PAHOR, M; LEEUWENBURGH, C; MANIN, T. M. Age-related differences in lower extremity tissue compartments and associations with physical function in older adults. **Exp Gerontol** 2012; 47 (1), 38-44.

BURKS, T.N; COHN, R.D. Role of TGF-β signaling in inherited and acquired myopathies. **Skelet Muscle**, 2011; 4 (1),1-19.

BUTTERFIELD, T, A; LEONARD, T, R., HERZOG, W. Differential serial sarcomere number adaptations in knee extensor muscles of rats is contraction type dependent. **J Appl Physiol**, 2005; 99 (4) 1352–1358.

BUTTERFIELD, T.A; BEST, T.M; MERRICK, M.A. The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation: A Critical Balance Between Tissue Damage and Repair. **Journal of Athletic Training** 2006;41(4):457–465.

CAÇÃO-BENEDINI L.O, RIBEIRO P,G; GOMES, A.R; YWAZAKI, J.L; MONTE-RASO, V.V; PRADO, C.M; MATTIELLO-SVERZUT, A. C.Remobilization through stretching improves gait recovery in the rat. **Acta Histochem.** 2013; 115(5):460-9.

CAÇÃO-BENEDINI,L.O; RIBEIRO,P.G; PRADO, C.M; CHESCA, D.L; MATTIELLO-SVERZUT, A.C. Immobilization and therapeutic passive stretching generate thickening and increase the expression of laminin and dystrophin in skeletal muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2014; 47(6): 483-491.

CALDOW,M. K.; CAMERON-SMITH,D.; LEVINGER, P.; McKENNA, M.J.; LEVINGER, I.Inflammatory markers in skeletal muscle of older adults. **Eur J Appl Physiol.** 2013; 113(2); 509-17. doi: 10.1007/s00421-012-2458-x

CALLISAYA, M.L.; BLIZZARD, L.; SCHMIDT, M. D.; MCGINLEY, J.L.; LORD, S.R.; SRIKANTH, V.K. A population-based study of sensorimotor factors affecting gait in older people. **Age and Ageing**, 2009; 38, 290-295.

CALVI, E.N.C; NAHAS, F. X; BARBOSA, M.V.; CALIL, J.A.; IHARA, S. S. M; SILVA, M. S; FRANCO, M.F.; FERREIRA, L.M. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 2012; 27 (10): 681.

CALVO, D.G, NEITZERT, K; FERNÁNDEZ, M., VEGA-NAREDO, I. CABALLERO, B., GARCÍA-MACÍA, M., SUÁREZ, F. M. RODRÍGUEZ-COLUNGA,M. J. SOLANO, J.J; MONTES, A.C. Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF- α and IL-6 as possible biomarkers. **Free Radical Biology & Medicine**; 2010; 49 733–737.

CARMELI, E; MOAS M; REZNICK, A.Z; COLEMAN, R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, 2004; 29: 191–197.

CARMELI,E; MAOR,M; KODESH,E. Expression of superoxide dismutase and matrix metalloproteinase type 2 in 2009diaphragm muscles of young rats. **J Physiol Pharmacol.** 2009; 60:5, 31-6.

CHAMBERS, M.A; MOYLAN, J.S; SMITH, J.D; GOODYEAR, L.J; REID, M.B. Stretch-stimulated glucose uptake in skeletal muscle is mediated by reactive oxygen species and p38 MAP-kinase. **J Physiol** 2009; 1(13), 3363–3373.

CHAMPLE, C.P; HARVEY, R. **A bioquímica ilustrada**. 2 ed. Porto Alegre,1996.

CLARK, B.C.; MANINI, T.M. Functional consequences of sarcopenia and dynapenia in the elderly. **Current Opinion Clinical Nutrition**, 2010; 13 (3) 271-276.

CASEROTTI, P. Strength Training in Older Adults: Changes in Mechanical Muscle Function and Functional Performance. **The Open Sports Sciences Journal**, 2010. v.3, p.62-66,

CHEN, X., & LI, Y. (2009). Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: Migration, differentiation, regeneration and fibrosis. **Cell Adh Migr**. 2009;3(4):337-41.

CHIQUET, M; GELMAN,L; LUTZ, R; MAIER, S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts.**Biochimica et Biophysica Acta**; 2009; 1793 (5); 911–920.

COFFEY, V.G; HAWLEY, J.A.The Molecular Bases of Training Adaptation. **Sports Med**, 2007; 37 (9): 737-763.

COLLINS, R. A.; GROUNDS, M. D. The Role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in Skeletal Muscle Regeneration: Studies in TNF- α (-/-) and TNF- α (-/-) LT- α (-/-) Mice. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. 2001; 49(8): 989–1001.

COUTINHO, E.L; DeLICA, C; SALVINI, T.F; VIDAL, B.C. Bouts of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. **Connect Tissue Res**. 2006, 47:5, 278–86.

COUTINHO,E.L; GOMES,A.R.S; FRANÇA,C.N; OISHI,J; SALVINI,T.F. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology.**Braz J Med Biol Res**. 2004, 37:12, 1853-61.

CRISTOPOLISKI, F; BARELA, J. A; LEITE, N; FOWLER, N. E; RODACKI, A.L. Stretching exercise program improves gait in the elderly. **Gerontology**, 2009; 55 (6) 614-620.

DEMONTIS, F; PICCIRILLO, R; GOLDBERG, A.L; PERRIMON, N. Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from Drosophila and mammalian models. **Dis Model Mech**. 2013; 6 (6);1339-52. doi:10.1242/dmm.012559

DE DEYNE PG. Application of passive stretch and its implications for muscle fibers. **Phys Ther**, 2001; 81:819–827.

DENNIS, R.A; PRZYBYLA,B; GURLEY,C; KORTEBEIN,P.M; SIMPSON,P; SULLIVAN,D.H; PETERSON, C.A. Aging alters gene expression of growth and remodeling factors in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. **Physiol Genomics**, 2008 32: 393–400,

FELAND J.B; MYRER J.W; SCHULTHIES S.S; FELLINGHAM G. W; MEASOM G. W. The effect of duration of stretching of the hamstring muscle group for increasing range of motion in people age 65 years or older. **Phys. Ther**, 2001; 81: 1110-1117.

FOWLES,J.R; MacDOULL,J.D; TARNOPOLSKY,M.A; SALE, D.G; ROY, B.D; YARASHESKI,K.E. The effects of acute passive stretch on muscle protein synthesis in humans.**Can. J. Appl. Physiology**. 2000; 25(3);165-180.

GALLO, L.H; GONÇALVES,R; GURJÃO,A.L.D; PRADO, A.K.G; CECCATO, M; FILHO, J.C.J; GOBBI, J.C. Efeito de diferentes volumes de alongamento na capacidade funcional de idosas.**Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, 2013. 15 (1):103-112.

GALLO, L.H; GURJÃO, A.L.D; GOBBI, S; CECCATO, M; GARCIA, A.K;P; JAMBASSI FILHO, J.C; GOMES, A.R.S. Effects of Static Stretching on Functional Capacity in Older Women: Randomized Controlled Trial. **Journal of Exercise Physiology Online**;2015, 18 (5); 13.

GALLON D; RODACKI A.L.F; HERNANDEZ S. G; DRABOVSKI B; OUTI T; BITTENCOURT L. R; GOMES A. R. S. The Effects of stretching on the flexibility, muscle performance and functionality of institutionalized older women. **Braz J Med Biol Res**, 2011; 44(3), 229-235.

GAO, Y. X., KOSTROMINOVA, T. Y., FAULKNER, J. A., & WINEMAN, A. S. Age-related changes in the mechanical properties of the epimysium in skeletal muscles of rats. **Journal of Biomechanics**, 2008; 41(2), 465-469.

GARBER CE, BLISSMER B, DESCHENES MR, FRANKLIN BA, LAMONTE MJ, LEE IM, 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**, 2011;43(7):1334-59.

GILLIES, A. R; LIEBER, R.L. Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. **Muscle Nerve**, 2011; 44(3) 318–331.

GILLIES, A.R; RICHARD L. LIEBER, R.L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve**, 2011, 44(3):318-31.

GOISSER,S; KEMMLER,W; PORZEL,S; VOLKERT,D; SIEBER,C.C; BOLLHEIMER,L.C; FREIBERGER, E. Sarcopenic obesity and complex interventions with nutrition and exercise in community-dwelling older persons – a narrative review. **Clin Interv Aging**, 2015; 10: 1267–1282.

GOLDSPINK G, WILLIAMS P, SIMPSON H. Gene expression in response to muscle stretch. **Clin Orthop Relat Res.** 2002; 1:S146-52.

GOMES, A.R. S; SOARES, A.G; PEVIANI, S; NASCIMENTO, R.B; MORISCOT, A.S; SALVINI, T.F. The Effect of 30 Minutes of Passive Stretch of the Rat Soleus Muscle on the Myogenic Differentiation, Myostatin, and Atrogin-1 Gene Expressions. **Arch Phys Med Rehabil.** 2006; 87 (2), 241-6.

GOMES,A.R.S; CORNACHIONE,A; SALVINI,T.F; MATTIELLO-SVERZUT,A.C. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. **J. Anat,** 2007; 210 (3), 328:335.

GOMES,A.R.S; COUTINHO,E.L; FRANÇA,C.N; POLONIO,J; SALVINI,T.F. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Braz J Med Biol Res,** 2004; 37(10), 1473-1480.

GOSSELIN, L. E., ADAMS, C., COTTER, T. A., MCCORMICK, R. J., & THOMAS, D. P. Effect of exercise training on passive stiffness in locomotor skeletal muscle: Role of extracellular matrix. **Journal of Applied Physiology,** 1998; 85(3), 1011-1016.

GREENWEL,P; TANAKA,S; PENKOV,D; ZHANG,W; OLIVE,M; MOLL,J; VINSON,C; LIBERTO,M; RAMIREZ, F. Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibits Type I Collagen Synthesis through Repressive CCAAT/Enhancer-Binding Proteins. **Molecular and cellular biology,** 2000, 912–918.

GREIWE, J.F; CHENG,B; RUBIN,D.C; YARASHESKI,K.E; SEMENKOVICH, C.F. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor α in frail elderly humans. **FASEB J.** 2001;15(2):475-82

GUNN, M.J.S; LEWANDOWSKI,P.A. Elevated hydrogen peroxide and decreased catalase and glutathione peroxidase protection are associated with aging sarcopenia. **BMC Geriatrics,** 2013; 13 (104), <http://www.biomedcentral.com/1471-2318/13/104>.

GURJÃO, A.L.D; CARNEIRO, N.H; GONÇALVES, R; MOURA, R.F; GOBBI, S. Efeito agudo do alongamento estático na força muscular de mulheres idosas. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum** 2010, 12(3):195-201

HAMADA,K; VANNIER,E; SACHECK,J.M; WITSELL, A.L; ROUBENOFF, R. Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise. **FASEB J.** 2005;19(2):264-6.

HAN X.Y; WANG W; KOMULAINEN J; KOSKINEN S. O; KOVANEN V; VIHKO V; TRACKMAN P. C; TAKALA T.E. Increased mRNAs for procollagens and key regulating enzymes in rat skeletal muscle following downhill running. **Pflugers Arch,** 1999; 437 (6), 857-64.

HAUS, J.M; CARRITHERS, J.A; TRAPPE, S.W; TRAPPE, T.A. Collagen, Cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, 2007; 103: 2068-2076.

HEINEMEIER, K.M; OLESEN, J.L; HADDAD, H; LANGBERG, M; KJAER, M; BALDWIN, K.M; SCHJERLING, P. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. **J Physiol** 2007; 582 (3);1303–1316.

HINDLE A.G; HORNING M; MELLISH J.A; LAWLER J. M. Diving into old age: muscular senescence in a large-bodied , long-lived mammal, the Weddell seal (*Leptonychotes weddellii*). **J Exp Biol**, 2009; 212: 790-796.

HIROSE,T., NAKAZATO, K., SONG, H; ISHII, N. TGF-1 and TNF- α are involved in the transcription of type I collagen α_2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading. **J Appl Physiol**, 2008; 104: 170–177.

HSIEH, A.H; SAH, R.L; PAUL SUNG, K.L.Biomechanical regulation of type I collagen gene expression in ACLs in organ culture. **J Orthop Res**. 2002; 20(2):325-31.

JACKMAN, R.W; KANDARIAN, S.C.The molecular basis of skeletal muscle atrophy.**Am J Physiol Cell Physiol**, 2004; 287:834-843. doi:10.1152/ajpcell.00579.2003.

JACKSON, M.J; McARDLE,A. Age-related changes in skeletal muscle reactive oxygen species generation and adaptive responses to reactive oxygen species. **J Physiol**, 2011; 589 (9) 2139–2145,.

JÄRVINEN, T.A.H; JOZSA, L; KANNUS, P; JÄRVINEN, T.L.N; JÄRVINEN, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized muscles. **J Muscle Res Cell Mot** 2002; 23: 245-254.

JOZSI,A.C;DUPONT-VERSTEEGDEN,E.E;TAYLOR-JONES,J.M; EVANS,W.J; TRAPPE, T.A; CAMPBELL, W.W; PETERSON, C.A. Molecular Characteristics of Aged Muscle Reflect an Altered Ability to Respond to Exercise.**International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, 2001, 11, S9-S15

KAMIKAWA Y; IKEDA S; HARADA K; OHWATASHI A; YOSHIDA A. Passive Repetitive stretching for a short duration within a week increases myogenic regulatory factors and myosin heavy chain mRNA in rats' skeletal muscle.**The Scientific World Journal**, 2013; 1-6.

KANEKO, D; SASAZAKI,Y; KIKUCHI, T; ONO, T; MATSUMOTO, K.N.H; TOYAMA,Y. Temporal effects of cyclic stretching on distribution and gene expression of integrin and cytoskeleton by ligament fibroblasts in vitro.**Connect Tissue Res**. 2009; 50(4), 263-9.

KARASIK, D; COHEN-ZINDER, M. The genetic pleiotropy of musculo skeletal aging. **Front Physiol.** 2012; 8 (3), 303.

KERRIGAN, D.C; XENOPOULOS-ODDSSON A, SULLIVAN; M.J; LELAS, J.J; RILEY, P.O. Effect of a hip flexor-stretching program on gait in the elderly. **Arch Phys Med Rehabil**, 2003; 84 (1), 1-6.

KJAER M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. **Physiol Rev**, 2004; 84:649-698.

KOH, T.J; PETERSON, J.M; PIZZA, F.X; BROOKS, S.V. Passive Stretches Protect Skeletal Muscle of Adult and Old Mice From Lengthening Contraction-Induced Injury. **Journal of Gerontology: Biological Sciences**, 2003; 58 (7), 592–597.

KOOPMAN, R; LONN, L.J.C. Aging, exercise, and muscle protein metabolism. **J Appl Physiol**, 2009. 106: 2040–2048,. doi:10.1152/jappphysiol.91551.2008.

KOUBA, D.J; CHUNG, K.Y; NISHIYAMA, T; VINDEVOGHEL, L; KON, A; JOHN F. KLEMENT, J.F; UITTO, J; MAUVIEL, A. Nuclear Factor- κ B Mediates TNF- α Inhibitory Effect on α 2(I) Collagen (COL1A2) Gene Transcription in Human Dermal Fibroblasts. **J Immunol** 1999; 162:4226-4234;

KRAGSTRUP, T.W; KJAER, M; MACKEY, A.L. Structural, biochemical, cellular, and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with aging. **Scand J Med Sci Sports**, 2011: 21: 749–757.

LACRAZ, G; ROULEAU, A.J; COUTURE, V; SÖLLRÄLD, T; DROUIN, G; VEILLETTE, N; GRANDBOIS, M; GRENIER, G. Increased Stiffness in Aged Skeletal Muscle Impairs Muscle Progenitor Cell Proliferative Activity. **PLoS One**. 2015; 10(8):e0136217. doi: 10.1371/journal.pone.0136217.

LANG, T.; STREEPER, T.; CAWTHON, P.; BALDWIN, K.; TAAFFE, D.R.; HARRIS, T.B. Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment. **Osteoporosis International**, 2010. v.21, p.543-559.

LOFFEK, S; SCHILLING, O; FRANZKE, C.W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 2011; 38: 191–208 DOI: 10.1183/09031936.00146510

LIU, R.M; PRAVIA, K.A. Oxidative stress and glutathione in TGF- β -mediated fibrogenesis. **Free Radic Biol Med**, 2010; 48 (1), 1-15.

LIU, X. Matrix Metalloproteinase-2 in Muscle Atrophy. **Clin Orthop Relat Res** 469:1797–1799, 2011. DOI 10.1007/s11999-010-1726-5

LIU.X. Emerging Ideas Matrix Metalloproteinase-2 in Muscle Atrophy. **Clin Orthop Relat Res**; 2011; 469:1797–1799

LYNN R, MORGAN, D. L. Decline running produces more sarcomeres in rat vastus intermedius muscle fibers than does incline running. **J Appl Physiol**, 1994; 77 (3) 1439-44.

MACHADO,J; KRINSKI, K; ELSANGEDY,H.M; CIESLAK, F; LOPES, G; GOMES, A.R.S. Intracellular pathways signaling in muscle atrophy and resistance training. **Fisioter. Mov.**, 2009, 22 (3) 383-393.

McGREGOR, R.A; SMITH,D.C; POPPITT, S.D. It is not just muscle mass: a review of muscle quality, composition and metabolism during ageing as determinants of muscle function and mobility in later life. *Longev Healthspan*. 2014; 3 (9) doi: 10.1186/2046-2395-3-9

MAMMOTO, A; MAMMOTO, T; INGBE, D.E. Mechanosensitive mechanisms in transcriptional regulation. **J Cell Sci**; 2012 . 1;125(13):3061-73

MANN, C.J; PERDIGUERO,E; KHARRAZ, Y; AGUILAR,S; PESSINA, P; SERRANO, A.L; MUÑOZ-CÁNOVES, P. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skeletal Muscle**, 2011, 1:21.

MARINI, M; VEICSTEINAS,A. The exercised skeletal muscle: a review. **European Journal Translational Myology - Myology Reviews** 2010; 20 (3): 105-120.

MARTIM,R.B; BURR,D.B; SHARKEY, N.A; FYHRE, D.P. **Skeletal tissue mechanisms**.(e-Book) Springer Science Business Media New York,2015.

MARTINIS, M; FRANCESCHI, C; MONTI, D; GINALDI, L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. **Experimental and Molecular Pathology**; 2006; 80, 219–227.

MARTINS,W.R; CARVALHO, M.M; MOTA, M.R; CIPRIANO, G.F.B; MENDES, F.A.S; DINIZ L.R. Diacutaneous fibrolysis versus passive stretching after articular immobilisation: muscle recovery and extracellular matrix remodelling. **OA Medical Hypothesis**, 2013; 1(2):17-21.

MARTINEAU,L.C; GARDINER, P.F. Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension. **J Appl Physiol**, 2001 91(2) 693–702.

MARZETTI, E.; PRIVITERA, G.; SIMILI, V.;WOHLGEMUTH, S.E.;AULISA, L.;PAHOR, M.;LEEUEWENBURGH,C. Multiple Pathways to the Same End: Mechanisms of Myonuclear Apoptosis in Sarcopenia of Aging. *Scientific World Journal*, 2010, 19 (10), 340-9.

MATTIELO-SVERZUT,A.C; PETERSEN, S. G; KJAER M, MACKEY, A.L. Morphological adaptation of muscle collagen and receptor of advanced glycation end product (RAGE) in osteoarthritis patients with 12 weeks of resistance training: influence of anti-inflammatory or glucosamine treatment. **Rheumatol Int.** 2013; 33, 2215-2224.

MCDERMOTT, A.Y; MERNITZ, H. Exercise and Older Patients: Prescribing Guidelines. **Am Fam Physician.** 2006; 1;74(3):437-44,.

McKOY, G; ASHLEY, W; MANDER, J; YANG, S.Y; WILLIAMS, N; RUSSEL, B; GOLDSPINK, G. Expression of insulin growth factor-1 splice variants and structural genes in rabbit skeletal muscle induced by stretch and stimulation. **Jour Physiol** 1999; 516 (2), 583-592.

MENDIAS, C.L; GUMUCIO, J.P; DAVIS, M.E; BROMLEY, C.W; DAVIS, C.S; AND BROOKS,S.V. Transforming Growth Factor-beta Induces Skeletal Muscle Atrophy and Fibrosis Through the Induction of Atrogin-1 and Scleraxis. **Muscle Nerve**, 2012; 45(1): 55–59.

MENG, S.J; YU, L.J. Oxidative Stress, Molecular Inflammation and Sarcopenia. **Int. J. Mol. Sci.**, 2010; 11, 1509-1526.

MILLER, T.A; LESNIEWSKI,L.A; MULLER-DELP,J.M; MAJORS,A.K; SCALISE,D; DELP, M.D. Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2001; 281: 5, 1710-7.

MONTORO, M.V; MONTILLA, J.A; AGUILERA, E; CHECA, M. Sarcopenia intervention with progressive resistance training and protein nutritional supplements. **Nutr Hosp.** 2015; 31(4), 1481-90.

MURPHY, G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. **Genome Biology**, 2011; 12:233.

MUSSARO, A; FELLE,S; FANO, G. Oxidative stress and muscle homeostasis. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** 2010; 13(3), 236-42.

NAGASE, H; VISSE R; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, 2006; 69 562 – 573

NAIR, S.K. Aging muscle. **Am J Clin Nutr**, 2005; 81:953–63.

NARICI MV, MAFFULLI N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. **Br Med Bull**, 2010: 95: 139–159

NAROLA, J; PANDEY, S.N; GLICK, A; CHEN, Y.W. Conditional Expression of TGF- β 1 in Skeletal Muscles Causes Endomysial Fibrosis and Myofibers Atrophy. **PLoS ONE**, 2013; 8(11).

NICKLAS, B.J.; BRINKLEY, T.E. Exercise Training as a Treatment for Chronic Inflammation in the Elderly. **Exerc Sport Sci Rev**.2009; 37(4), 165–170.

NILWIK, R; SNIJDERS, T; LEENDERS, M; GROEN, R.B.L; KRANENBURG, J.A. The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. **Exp Gerontol**. 2013;48(5), 492-8. doi: 10.1016/j.exger.2013.02.012

OGAWA, K.; SANADA, K.; MACHIDA,S.; OKUTSU, M.;SUZUKI, K. Resistance Exercise Training-Induced Muscle Hypertrophy Was Associated with Reduction of Inflammatory Markers in Elderly Women. **Mediators of Inflammation**, 2010. Article ID 171023, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2010/171023>

OWINO, V; YANG, S.Y.; GOLDSPINK,G. Age-related loss of skeletal muscle function and the inability to express the autocrine form of insulin-like growth factor-1 (MGF) in response to mechanical overload. **FEBS Lett**. 2001; 505(2), 259-63.

PARK, S.K; PROLLA. T. A. Gene expression profiling studies of aging in cardiac and skeletal muscles. **Cardiovasc Res**, 2005 ;66(2):205-12,.

PASSEY, S; MARTIN, N; PLAYER, D; LEWIS, M.P.Stretching skeletal muscle in vitro: does it replicate in vivo physiology? **Biotechnol Lett**. 2011 ;33(8), 1513-21.

PATEL, H.P; AL-SHANTI, N; DAVIES, L.C; BARTON, S.J; GROUNDS, M.D; TELLAM, R.L; STEWART, C.E; COOPER, C; SAYER, A.A. Lean mass, muscle strength and gene expression in community dwelling older men: findings from the Hertfordshire Sarcopenia Study (HSS). **Calcif Tissue Int**. 2014;95(4):308-16. doi: 10.1007/s00223-014-9894-z

PEAKE, J.; GATTA, P.D.; CAMERON-SMITH, D. Aging and its effects on inflammation in skeletal muscle at rest and following exercise-induced muscle injury. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2010; 298(6), 1485-95.

PEREIRA, D.S; CUEVA MATEO, E.C; QUEIROZ, B.Z; ASSUMPÇÃO, A.M; MIRANDA, A.S; FELÍCIO, D.C; ROCHA, N.P; ANJOS, D.M.C; PEREIRA, D.A.G; TEIXEIRA, A.L; PEREIRA, L.S.M. TNF- α , IL6, and IL10 polymorphisms and the effect of physical exercise on inflammatory parameters and physical performance in elderly women. **Age (Dordr)**. 2013; 35(6),2455-63.

PETERSEN, A.M.W; PEDERSEN, B.K.The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 2006; 57(10), 43–51.

PEVIANI, S.M; GOMES, A.R.S; SELISTRE de ARAUJO, H.S. SALVINI, T.F. MMP-2 is not Altered By Stretching in Skeletal Muscle. **Int J Sports Med**, 2009; 30: 550 – 554.

PEVIANI,S.M; GOMES, A.R.S; MOREIRA, R.F.C; MORISCOT,A.S; SALVINI,T. Short bouts of stretching increase myo-d, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. **Muscle Nerve**, 2007; 35: 363–370.

PHILIPPOU, A; MARIDAKI, M; HALAPAS, A; KOUTSILIERIS, M. The Role of the Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) in Skeletal Muscle Physiology. **In vivo**, 2007 21: 45-54

PHILIPPOU, A; PAPAGEORGIU, E; BOGDANIS, G; HALAPAS, A. SOURLA, A; MARIDAKI, M; PISSIMISSIONIS, N; KOUTSILIERIS, M. Expression of IGF-1 Isoforms after Exercise-induced Muscle Damage in Humans: Characterization of the MGF E Peptide Actions In Vitro. **In vivo**, 2009; 23: 567-576

PIETROANGELO,T; PUGLIELLI,C; MANCINELLI,R; BECCAFICO,S; FANO,G; FULLE.S Molecular basis of the myogenic profile of aged human skeletal muscle satellite cells during differentiation. **Experimental Gerontology**, 2009; 44 (8), 523., DOI : 10.1016/j.exger.2009.05.002

PIZZA, F.X; KOH, T; McGREGOR, S.J; BROOKS, S.V. Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. **J Appl Physiol**, 2002; 92:1873-1878.

POEL, C.V.D; GOSSELIN,L; SCHERTZER, J.D; RYALL, J.G; SWIDERSKI, K; WONDEMAGHEN, M; LYNCH, G.S. Ageing prolongs inflammatory marker expression in regenerating rat skeletal muscles after injury. **J Inflamm (Lond)**. 2011, 29;8(1):41

PHU,S; BOERSMA,D; DUQUE, G. Exercise and Sarcopenia. **Journal of Clinical Densitometry**, 2015. 18 (4); 488 – 492.

RASO, V., PO, M. D., GREVE;, J. M. D., PEVIANI Messa, S., GOMES, A. R. S. **Fundamentos em flexibilidade** In: Pollock: fisiologia clínica do exercício.1 ed.Barueri : Manole, 2012, v.1, p. 71-85.

RAUE, U; SLIVKA, D; JEMIOLO,B; HOLLON,C; TRAPPE, S. Proteolytic Gene Expression Differs At Rest and After Resistance Exercise Between Young and Old Women. **Journal of Gerontology** 2007, 62(12), 1407–1412.

RECHERT-FARIA A; JUNG J. E; MORESCHI NETO V; SILVA DE CASTRO C. C; MIRA M. T; NORONHA L. Reduced immunohistochemical expression of Discoidin

Domain Receptor 1(DDR1) in vitiligo skin. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, 2012; 1-2.

RIEU, I.; MAGNE, H.; SAVARY-AUZELOUX, I.; AVEROUS, J.; BOS, C.; PEYRON, M.A.; COMBARET, L.; DARDEVET, D. Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. **J Physiol**, 2009; 587(22) 5483–5492.

ROCHA, N.P.; REIS, H.J.; TEIXEIRA, A.L. Inflammaging: um novo paradigma para as ciências gerontológicas. **Geriatrics & Gerontologia**, 2010; 4:4, 224-228.

RODACKI, A.L.F; SOUZA, R.M; UGRINOWITSCH, C; CROSTOPOLISKI, F; FOWLER, N. Transient effects of stretching exercises on gait parameters of elderly women. **Manual Therapy**, 2009; 14, 167-172.

RUWER, S.L.; ROSSI, A.G.; SIMON, L.F. Equilíbrio no Idoso. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, 2005; v.71, n.3, p.298-303.

SAKAMOTO,K; ASCHENBACH,W.G; HIRSHMAN,M.F; GOODYEAR,L.J Akt signaling in skeletal muscle: regulation by exercise and passive stretch. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2003, 285 (5), 1081–1088.

SAKUMA, K.; YAMAGUCHI, A. Molecular and Cellular Mechanism of Muscle Regeneration, Skeletal Muscle - From Myogenesis to Clinical Relations, Dr. Julianna Cseri (Ed.), ISBN: 978-953-51-0712-5, InTech. 2012. DOI: 10.5772/48229. Available from: <http://www.intechopen.com/books/skeletal-muscle-from-myogenesis-to-clinical-relations/molecular-and-cellular-mechanism-of-muscle-regeneration>

SALVINI,T.F; COUTINHO,E.L; RUSSO, T.L; DeLUCA,C. One-minute bouts of passive stretching after immobilization increase sarcomerogenesis in rat soleus muscle. **Braz. J. morphol.Sci.** 2006; 23 (2); 271-277.

SALVINI, T.F; DURIGAN, J.L.Q; PEVIANI, S.M; RUSSO, T.L. Effects of electrical stimulation and stretching on the adaptation of denervated skeletal muscle - implications for physical therapy. **Rev. Bras. Fisiot**, 2012; 16(3) :175-83.

SANDRI, M. Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology* (Bethesda). 2008; 23 (1)160-70. doi: 10.1152/physiol.00041.2007.

SARKAR,S.K; MARMER,B; GOLDBERG,G; NEUMAN,K.C. Single-Molecule Tracking of Collagenase on Native Type I Collagen Fibrils Reveals Degradation Mechanism. **Current Biology** 2012; 22, 1047–1056.

SECCHI, K.V; MORAIS, C.P; CIMATTI, F.F; TOKARS, E. GOMES, A.R.S.Effect of stretching and resistive exercise on skeletal muscles in rats.**Rev Bras Fisioter**, 2008, 12 (3), 228-34.

SEENE, T.; KAASIK, P.; MARIA-RISO, E. Review on aging, unloading and reloading: Changes in skeletal muscle quantity and quality. **Arch Gerontol Geriatr** 2012; 54:374–380.

SHAI, B.M; CARMELI, E.; LJUBUNCIC, P; REZNICK, A.Z. Exercise and immobilization in aging animals: the involvement of oxidative stress and NF-kappaB activation. **Free Radic Biol Med**, 2008; 44(2):202-14.

SILVA,T.F; PENNA,A.L.B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 2012; 71(3): 530-9

SIMPSON, R.J.; LOWDER, T.W.; SPIELMAN, G.; BIGLEY, A.B.; LaVOY, E.C. Exercise and the aging immune system. **Ageing Res Rev**. 2012;11(3):404-20. doi: 10.1016/j.arr.2012.03.003.

SIWIK,D.A; PAGANO, P.J; COLUCCI, W.S Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2001; 280: 53–60.

SNEDEKER, J.G; GAUTIERI, A. The role of collagen crosslinks in ageing and diabetes - the good, the bad, and the ugly. **Muscles Ligaments Tendons J**. 2014 Jul-Sep; 4(3): 303–308.

SQUECCO,R; KERN,H; BIRAL, D; ADAMI, N.L; FRANCINI,F. Mechano-sensitivity of normal and long-term denervated soleus muscle of the rat. **Neurol Res**. 2008 ;30(2), 155-9.

SRIRAM, S; SUBRAMANIAN,S; SATHIAKUMAR,D; VENKATESH, R; SALERNO, M.S; McFARLANE,C.D; KAMBADUR,R; SHARMA, M. Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF- κB. **Ageing Cell**, 2011; 10(6):931-48. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00734.x.

STANZIANO, D.C; ROOS, B.A; PERRY, A.C; LAI, S; SIGNORILE, J. The effects of an active-assisted stretching program on functional performance in elderly persons: A pilot study. **Clin Interv Aging**, 2009; 4, 115–120.

STATHOKOSTAS, L; LITTLE, R.M.D; VANDERVOORT, A.A; PATERSON, D.H. Flexibility Training and Functional Ability in Older Adults: A Systematic Review. **J Aging Researc** 2012, 30 pages.

STAUBER W. T; WILLEMS M. E. T.Prevention of histopathologic changes from 30 repeated stretches of active rat skeletal muscle by long inter-stretch rest times. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 2002; 88, 94-99.

TAKALA TE, VIRTANEN P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. **Scand J Med Sci Sports**, 10(6):321-325, 2000.

TAMAKI, T; HIRATA,M; UCHIYAMA, Y. Qualitative alteration of peripheral motor system begins prior to appearance of typical sarcopenia syndrome in middle-aged rats. **Frontiers in aging neuroscience**, 2014 ; 6: 296.

TATSUMI, R; LIU, X; PULIDO, A; MORALES, M; SAKATA, T; DIAL, S; HATTORI, A; IKEUCHI, Y; ALLEN, R.E. Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. **Am J Physiol Cell Physiol**, 2006; 290 (6), 1487–1494.

TAYLOR, D.C; DALTON, J. D; SEABER, A. V; GARRETT W.E. Viscoelastic properties of muscle-tendon units. The biomechanical effects of stretching. **Am J Sports Med** 1990; 18, 300-9.

TEIXEIRA, V.O.N.; FILIPPIN, L.I.; XAVIER, R.M. Mecanismos de perda muscular da sarcopenia. **Rev Bras Reumatol**, 2012; 52(2), 247-259.

THOMAS, J.L. Helpful or harmful? Potential effects of exercise on select inflammatory conditions. **Phys Sportsmed**. 2013, 41(4):93-100

TOIGO,M; BOUTELLIER, U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. **Eur J Appl Physiol**, 2006; 97: 643–663.

VERRECCHIA, F; MAUVIEL, A.TGF- β and TNF α : antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. **Cellular Signalling**, 2004; 16, 873–880.

VERRECCHIA, F; MAUVIEL, A. Transforming Growth Factor- β Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation. **J Invest Dermatol**. 2002; 118(2):211-5

VISSE, R; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. **Circ Res**. 2003; 92:827-839

VOLTARELLI, F.A.; MELLO, M.A.R.; DUARTE, J.A.R. Apoptose e sarcopenia do músculo esquelético no envelhecimento. **Motriz**, 2007; 13 (2), 137-144.

VU, T.H; WERB,Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev**, 2000; 14: 2123-2133.

VOET,D; VOET, J.G; PRATT, C.W. **Fundamentos da bioquímica: a vida em nível molecular**. 2 ed. Porto Alegre:Artmed,2008.

Wang,P; You,X; Yanab,Y; Singhab,G.K; Liab,X; Zhouab, W; Liuab, W; Zhangab,F; Lvab, Y; Yang, L. Cyclic mechanical stretch downregulates IL-1 β -induced COX-2 expression and PGE2 production in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Connective Tissue Research**, 2011; 52 (3); 190–197.

WANG, Y;WEHLING-HENRICKS, M; SAMENGO, G;TIDBALL, J.G. Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide. **Ageing Cell**, 2015; 14(4):678-88. doi: 10.1111/ace.12350.

WALSTON,J; HADLEY,E.C; FERRUCCI,L; GURALNIK,J.M;NEWMAN,A.B; STUDENSKI,S.A; ERSHLER,W.B; HARRIS, T; FRIED,L.P Research Agenda for Frailty in Older Adults: Toward a Better Understanding of Physiology and Etiology: Summary from the American Geriatrics Society/National Institute on Aging Research Conference on Frailty in Older Adults. **The American Geriatrics Society**, 2006; 54 (6). DOI:10.1111/j.1532-5415.2006.00745.x

WATT JR, JACKSON K, FRANZ JR, DICHARRY J, EVANS J,KERRIGAN DC. Effect of a supervised hip flexor stretching program on gait in elderly individuals.**PMR**, 2011; 3 (4), 324-9.

WELLE, S. Cellular and molecular basis of aged-related sarcopenia. **Can.J. Appl. Physiol**, 2002; 27 (1), 19-41.

WOOD, L.K; KAYUPOV, E; GUMUCIO, J.P; MENDIAS, C.L; CLAFLIN, D.R; BROOKS, S.V. Intrinsic stiffness of extracellular matrix increases with age in skeletal muscles of mice. **J Appl Physiol**, 2014; 15;117(4):363-9.

WU M; FANNIN J, RICE KM,WANG B, BLOUGH ER. Effect of aging on cellular mechanotransduction. **Ageing Res Rev**, 2011; 10 (1):1-15.

YANG, G; IM, H.J; WANG, J.H.C. Repetitive mechanical stretching modulates IL-1 β induced COX-2, MMP-1 expression, and PGE2 production in human patellar tendon fibroblasts. **Gene**. 2005; 19 (363) 166–172.

YANG,S; ALNAQEEB,M; SIMPSON, H; GOLDSPINK,G. Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. **J. Anat**. 1997; 190, 613-622.

ZAKAS,A; BALASKA,P; GRAMMATIKOPOULOU, M.G; ZAKAS,N; VERGOU,A. Acute effects of elderly women. **Journal of Bodywork and moviment therapies**, 2005; 9 (4), 270-276.

ZHAN, M; JIN, B; CHEN, S; REECY, J; LI, Y.P. TACE release of TNF- α mediates mechanotransduction-induced activation of p38 MAPK and myogenesis. **J Cell Sci**, 2007; 120 (4), 692-701.

ZOTZ, T.G. Desenvolvimento de aparato de alongamento e seus efeitos no músculo esquelético de ratas idosas: avaliação histomorfométrica e molecular. Curitiba, 12 de setembro de 2014. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Educação Física da UFPR.

ZOTZ, T.G.G; LOUREIRO, A.P.C; VALDERRAMAS, S.R; GOMES, A.R.S. Stretching - An Important Strategy to Prevent Musculoskeletal Aging: A Systematic Review and Meta-analysis. **Topics in Geriatric Rehabilitation**, 2014; 30 (4); 246–255.

ANEXOS

ANEXO 01



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

PUCPR

Curitiba, 20 de setembro de 2012.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 732 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Efeito do alongamento no músculo esquelético de ratas: Avaliação morfológica e molecular

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Talita Gianello Gnoato Zotz

EQUIPE DE PESQUISA:

Talita Gianello Gnoato Zotz, Anna Raquel Silveira Gomes, Sabrina Peviani Messa, Ana Paula Cunha Loureiro, Rafael Zotz, Eduard Goossen, Luiz Guilherme Achcar Capriglione, Luis Cláudio Fernandes, Lucia Noronha, Paulo Roberto Slud Brofman, Edvaldo Trindade, Emanuel Souza, Mario Navarro, Tania Salvini

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Saúde e Biociências / Fisioterapia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Ratos Wistar</i>	Fêmea	3 meses / 230g	B	10
<i>Ratos Wistar</i>	Fêmea	24 meses / 350g	B	20

O colegiado do CEUA em reunião no dia 20/09/2012, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o



ANEXO 02



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais



Curitiba, 24 de Setembro de 2015.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 0987/2015

TÍTULO DO PROJETO: Efeitos agudos do alongamento muscular na histomorfometria e expressão gênica no músculo sóleo de ratas idosas

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Hilana Rickli Fiuza Martins

EQUIPE DE PESQUISA: Hilana Rickli Fiuza Martins

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Saúde e Biociências / Programa de Pós Graduação em Educação Física UFPR

VIGÊNCIA DO PROJETO	10/2015 a 10/2016	QUANTIDADE DE ANIMAIS	Amostras já coletadas
ESPECIE/LINHAGEM	Porção de músculo sóleo / Laminas histológicas / Porção lateral do musculo sóleo	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Não se aplica	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Não se aplica	ESPECIÉ – GRUPO TAXONÔMICOS (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Laboratório de patologia PUCPR / Lab. de Entomologia Medica e Veterinária UFPR	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelos CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCPR em reunião de **24.09.2015**.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Marta Luciane Fischer

Coordenadora - Comitê de Ética no Uso de Animais

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP: 80.215-900 Curitiba Paraná Brasil

