

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS ALVARENGA HESPANHOL

**EFEITO DO EXERCÍCIO RESISTIDO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO
DE PEIXE SOBRE CAPACIDADE DE FORÇA E PARÂMETROS
MORFOFUNCIONAIS DOS MÚSCULOS SÓLEO E EXTENSOR DIGITAL
LONGO DE RATOS WISTAR**

CURITIBA

2018

LUCAS ALVARENGA HESPANHOL

**EFEITO DO EXERCÍCIO RESISTIDO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO
DE PEIXE SOBRE CAPACIDADE DE FORÇA E PARÂMETROS
MORFOFUNCIONAIS DOS MÚSCULOS SÓLEO E EXTENSOR DIGITAL
LONGO DE RATOS WISTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Biomedicina da Universidade
Federal do Paraná como requisito à obtenção
do título de grau Bacharel.

Orientadora: Profa. Dra. Katya Naliwaiko

CURITIBA

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

LUCAS ALVARENGA HESPANHOL

EFEITO DO EXERCÍCIO RESISTIDO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE CAPACIDADE DE FORÇA E PARÂMETROS MORFOFUNCIONAIS DOS MÚSCULOS SÓLEO E EXTENSOR DIGITAL LONGO DE RATOS WISTAR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Prof(a). Dr(a). Fabíola I Agher
Departamento Fisiologia, UFPR

M.Sc. Bruna Comotti de Oliveira
PPG Biologia Celular e Molecular - UFPR

Prof(a). Dr(a). Katya Naliwaiko
Orientador - Departamento Biologia Celular - UFPR

Curitiba, 16 de Dezembro de 2018

RESUMO

O envelhecimento muscular é caracterizado pela perda de massa muscular gradativa que pode evoluir para sarcopenia, condição que acomete de 30% a 50% de pessoas com mais de 60 anos de idade. Progressivamente compromete a movimentação, postura e equilíbrio, tornando idosos suscetíveis à quedas, fraturas e lesões. Devido a mecanismos multifatoriais, como hábito alimentar, nível de atividades físicas e predisposições genéticas, a sarcopenia precisa ser controlada para ganho de qualidade de vida. Estudos indicam que a concentração de proteína muscular nessas pessoas é inferior ao de não idosos, motivo pelo qual busca-se uma abordagem terapêutica que possa normalizar a síntese proteica. A prática de exercício físico agudo e crônico é capaz não só de auxiliar na prevenção da sarcopenia, mas também de melhorar a condição dos indivíduos. Acredita-se que a via de sinalização intracelular mTOR esteja envolvida neste processo, uma vez que ela é responsável pelo balanço entre síntese e degradação proteica muscular. Considerando estes aspectos, os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, representam uma alternativa promissora para o tratamento da sarcopenia, uma vez que também age sobre os eventos inflamatório envolvidos na sarcopenia e podem auxiliar no reparo, crescimento e hipertrofia do músculo. Especula-se que possa estar envolvido na ativação de células satélites, que são fundamentais para a manutenção do ambiente muscular. Neste trabalho, ratos de 9 meses foram divididos em 3 grupos – controle (GC), suplementados (GS) e exercitados (GE) – e submetidos a uma rotina específica de suplementação ou exercício resistido por 8 semanas. Após esse período, foram ortotanasiados e tiveram o sangue, músculo extensor digital longo (EDL) e músculo sóleo coletados para análise dos parâmetros séricos e morfofuncionais. Tanto o protocolo de exercício físico quanto a suplementação com óleo de peixe foram hábeis em promover ganho de força pelos animais, assim como alterações na estruturação de novos sarcômeros, sugerindo ação sobre a síntese proteica. Neste sentido, o emprego do óleo de peixe no cenário da sarcopenia, representa uma estratégia importante em substituição à prática de exercício físico, em especial para indivíduos com baixa adesão a prática de atividade física ou nos casos onde há impossibilidade da prática.

ABSTRACT

The loss of muscular mass is a condition that happens with the physiological process of muscular aging. However, in 30% to 50% of individual with more than 60 years the condition could evolve to sarcopeny, affecting the health and lifestyle by compromising movement, posture and balance. Due to multifactorials mechanisms, like eating and exercise habits and genetic propensity, the condition must be in control to assure quality in life for the patient. Some authors point a lesser concentration in muscular protein in individual with the condition leading to treatments aiming to regulate the protein synthesis. Muscular exercise, both acute and chronic, is shown to be able to prevent sarcopeny and improve the health of whom already have the condition. The mTOR extracellular pathway plays a major role in this process once it regulates muscular protein synthesis and degradation. Knowing this, omega-3 polyunsaturated fatty acids have become an alternative to sarcopeny treatment because of it's anti-inflammatory properties and abilities in muscular tissue like growth, repair and hypertrophy. It's also believe that these fatty acids could be associated with satellites cells activation with promotes cell environment maintenance. In this paper, we divided 9 month rats in 3 different groups – control, supplemented and exercised – and submit them in supplement and exercise routines for 8 weeks. Then we collected blood samples, the sole muscle and the extensor digitorum longus muscle to further analyses. Both exercise and supplementation were able to promote strength gain and sarcomere reorganization, suggesting some action over muscular synthesis. In this scenario, the fish oil supplementation represents a significant strategy in sarcopeny treatment, specially in whose unable to make exercise.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos familiares por todo o suporte, carinho e confiança depositado em mim, permitindo que este trabalho pudesse ser feito; aos amigos de classe e futuros companheiro de profissão que percorreram este longo caminho comigo; à todo o corpo docente do curso de Biomedicina da Universidade Federal do Parná, que me guiou até aqui; à futura Dr(a). Malu Montoro, que idealizou e cedeu parte deste projeto a mim, e com dedicação, paciência e entusiasmo esteve lado a lado nesta etapa comigo; à toda a equipe do Laboratório de Metabolismo Celular, por ceder espaço, me acolher e orientar nas tarefas deste projeto; ao CNPQ, por apoiar este projeto e muitos outros através; ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, pelo suporte concedido a este trabalho; e em especial, à orientadora Prof(a). Dr(a). Katya Naliwaiko, pelo difícil, mas excelente trabalho de me guiar durante toda esta etapa e idealizar passo a passo deste trabalho

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MATERIAL UTILIZADO NO TREINAMENTO DOS ANIMAIS.....	18
FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EMPREGADA 1.....	20
FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EMPREGADA 2.....	21

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL.....	24
GRÁFICO 2 – TESTE DE FORÇA CARREGADA MÁXIMA PRÉ E PÓS INTERVENÇÃO.....	26
GRÁFICO 3 – AVALIAÇÃO DA GLICEMIA.....	27
GRÁFICO 4 – AVALIAÇÃO DA LIPIDEMIA: TAXA DE HDL (LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE), COLESTEROL TOTAL E TRIACILGLICEROL.....	28
GRÁFICO 5 – AVALIAÇÃO DA LACTDEMIA.....	29
GRÁFICO 6 – COMPRIMENTO MUSCULAR (MILÍMETROS) DOS MÚSCULOS SÓLEO E EXTENSOR DIGITAL LONGO DOS DEDOS.....	30
GRÁFICO 7 – MASSA MUSCULAR (GRAMAS) DOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL.....	31
GRÁFICO 8 – NÚMERO DE SARCÔMEROS NOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL.....	32
GRÁFICO 9 – COMPRIMENTO DO SARCÔMERO (MICRÔMETROS) DOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
	1.1 O EXERCÍCIO FÍSICO.....	10
	1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS N-3 (AGPIS).....	13
2	JUSTIFICATIVA	16
3	OBJETIVOS	17
	3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
	3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
	4.1 ANIMAIS.....	18
	4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	18
	4.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE.....	18
	4.4 EXERCÍCIO FÍSICO – O TREINAMENTO RESISTIDO.....	19
	4.4.1 ADAPTAÇÃO À ESCADA	20
	4.4.2 TESTE DE FORÇA CARREGADA MÁXIMA.....	21
	4.4.3 TREINAMENTO RESISTIDO.....	21
	4.5 OBTENÇÃO DE SANGUE E MÚSCULOS	22
	4.6 PARÂMETROS SÉRICOS	23
	4.6.1 GLICEMIA.....	23
	4.6.2 COLTESTEROL TOTAL.....	23
	4.6.3 HDL.....	23
	4.6.4 TRIACILGLICERÓS (TAG'S)	23
	4.6.5 LATICIDEMIA.....	24
	4.7 PARÂMETRO MORFOMÉTRICO MUSCULAR.....	24
	4.7.1 CONTAGEM DOS SARCÔMEROS EM SÉRIE.....	24
	4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
	5.1 MASSA CORPORAL.....	26
	5.2 TESTE DE FORÇA CARREGADA MÁXIMA	27
	5.3 PARÂMETROS SÉRICOS.....	29
	5.4 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DOS MÚSCULOS DE INTERESSE.....	32
6	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético constitui 40% da massa corporal humana e é responsável pela realização de diversas funções vitais para o ser humano, como a manutenção da postura, movimentação e realização de atividades diárias (REID & FIELDING, 2012). Se caracteriza como tecido de grande plasticidade e capacidade adaptativa, podendo responder e adaptar-se às variações na homeostase do organismo (DUNCAN, 1998).

Por sua elevada capacidade adaptativa, o tecido muscular é bastante susceptível às variações impostas pelos hábitos de vida, podendo ter sua funcionalidade alterada pela dieta, nível de atividade física e pelo envelhecimento (SILVA et al., 2009; MITCHELL et. al, 2012; FRANCHI,2016).

O declínio funcional decorrente do processo de envelhecimento reflete em modificações do sistema musculoesquelético e neuromuscular, produzindo alterações da capacidade funcional na força, movimentação e equilíbrio (GALLON et al, 2011; FERNANDES et al ,2012).

Esse processo contínuo de perda de massa muscular sem que exista um quadro patológico, foi chamado de sarcopenia (ROSENBERG, 1989). Estima-se que um homem perca cerca de 1% de massa muscular a partir dos 50 anos enquanto as mulheres apresentam perda de 0,5% (MITCHELL et. al, 2012).

Muitos fatores podem participar da etiologia da sarcopenia, podendo ser relacionada ao desequilíbrio hormonal, à inflamação crônica, à neurodegeneração, obesidade e predisposições genéticas (BROOK et al, 2015). Estudos apontam diferentes idades para o início desse processo: para alguns autores o processo pode iniciar-se aos 27 anos (SILVA et al., 2009), para outros aos 45 anos (JANSSEN et al., 2000) ou até mesmo aos 60 anos (KYLE et al., 2001). Na população norte-americana, 50% dos homens e 72% das mulheres da mesma idade apresentavam sarcopenia (JANSSEN et al., 2002).

Dentre os fatores relacionados às modificações do sistema musculoesquelético e neuromuscular, estão a redução de força muscular devido a uma diminuição de massa muscular e o aumento de tecidos não contrateis, como tecido adiposo e conjuntivo (GUCCIONE, 2002). A

patofisiologia da sarcopenia inclui disfunções endócrinas, condições inflamatórias, alterações metabólicas da glicose, glicogênio e dos lipídios, alterações na síntese proteica e regeneração, com o aumento paralelo da apoptose e degradação proteica (CURCIO et al., 2016).

Somado a esses fatores, observa-se também uma grande diferença no metabolismo proteico entre indivíduos jovens e adultos: adultos tendem a apresentar uma diminuição na síntese proteica coligada a um aumento do catabolismo proteico quando comparados aos jovens (CURTHBERTSON, 2005). Desta forma, modernamente, a prática de exercício físico e dietas personalizadas, têm representado estratégias não farmacológicas para refrear a perda de massa muscular que se estabelece com o curso da idade.

1.1 O Exercício Físico

O aumento da massa muscular pode ser promovido pela prática de treinamento resistido, graças ao seu potente efeito em estimular a síntese proteica muscular, resultando na hipertrofia do músculo. Foi demonstrado que mesmo baixas cargas de treinamento são capazes de estimular a síntese proteica muscular, desde que o exercício seja feito até a fadiga do músculo (MITCHELL, 1985). A manutenção desse treinamento durante um longo período pode levar a um balanço proteico favorável, onde a síntese proteica muscular consegue exceder a degradação proteica muscular (BURD, 2009).

Acredita-se que o período de treinamento seja decisivo para melhorar a síntese proteica. MAYHEW (2009) e MITCHELL (2014) demonstraram que a síntese proteica muscular avaliada 6 horas após uma sessão de treinamento resistido era inferior à observada em indivíduos que foram submetidos a sessões de treinamento resistido por 16 semanas. Isso indica que o exercício agudo não é capaz de assegurar a longo prazo a plasticidade muscular e capacidade de síntese proteica.

A inflamação aguda desempenha um importante papel no processo de regeneração muscular após o exercício (MCKAY, 2009; ZHANG, 2013). Entretanto, falhas na resolução da inflamação podem gerar quadro crônico associado à resistência à insulina, obesidade e perda de massa muscular

(HOTAMISLIGIL, 1993; SINDHU, 2015). Por sua capacidade de secreção de moléculas bioativas semelhantes a hormônios, chamadas *miocinas*, o músculo esquelético é tido como órgão endócrino capaz participar da regulação de vários processos fisiológicos (SCHNYDER & HANDSCHIN, 2015). As miocinas secretadas pelo músculo durante o exercício parecem conferir propriedades protetivas e anti-inflamatórias que podem estar relacionadas à prevenção da degeneração muscular (WALSH, 2009). Dentre elas, a IL-6 (Interleucina 6) é capaz de promover a regeneração e proliferação celular, estimulando células satélites a proliferar-se e se diferenciar em um processo chamado miogênese (MUÑOZ CÁNOVES, 2013).

O papel das células satélites na regeneração muscular foi demonstrado por FRY (2014) em um estudo usando camundongos, onde a depleção de células satélites promoveu a desregulação do ambiente muscular, gerando aumento de fibrose e redução de massa muscular. Estudos concomitantes identificaram a importância dessas células na manutenção da massa muscular, uma vez que regulam a produção de matriz extracelular e a regeneração muscular durante a hipertrofia (MURPHY, 2011; FRY 2017).

De maneira semelhante, o metabolismo proteico desempenha papel determinante na regulação da massa do músculo esquelético. Estudos recentes sugerem que estes efeitos sejam modulados via sinalização intracelular da *Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos* (mTOR) e que esta via é capaz de regular tanto a síntese quanto a degradação de proteínas musculares (LAPLANTE & SABATINI, 2012). Acredita-se que a mTOR seja necessária para a hipertrofia muscular, uma vez que ela permanece ativada por um longo período de tempo após a realização do exercício físico de longa duração, como no treinamento resistido (WILKINSON et al., 2008).

Recentemente, observou-se que a inibição da via mTOR bloqueia a biogênese ribossomal em ratos submetidos ao exercício físico agudo, mas apenas impediu parcialmente a síntese proteica. Já em ratos submetidos ao exercício crônico, a inibição da via mTOR foi capaz de bloquear uma pequena parte dos efeitos hipertróficos além de permitir a expressão da PGC-1 α , proteína fundamental para a biogênese mitocondrial (OGASAWARA et al., 2016).

Com base nestes resultados tem sido postulado que a modulação

desta via de sinalização celular, pode promover síntese proteica e a manutenção da função muscular, seja pelo exercício físico ou por alterações hormonais e dietéticas.

Com o avanço da idade e o aumento dos níveis de inflamação crônica, há um significativo incremento dos níveis de TNF- α (Fator Alfa de Necrose Tumoral) e IL-6 sistemicamente. Esse processo impacta negativamente o ambiente muscular, reduzindo o padrão de ativação de células satélites e contribuindo para a perda de massa e a atrofia muscular (MERRITT, 2013; WAHLIN-LARSSON, 2014; DOMINGUES-FARIA, 2016). Estudos em células humana e animal mostraram que o TNF- α e a IL-6 são capazes de ligarem-se a receptores e ativar o NF- κ B (Fator Nuclear Kappa B). Essa ativação aumenta a expressão de MuRF1 (Muscle RING-finger protein 1), uma proteína da família das ubiquitinas responsável pela degradação proteica no músculo que conseqüentemente leva a perda de massa muscular. Alguns ácidos graxos são capazes de inibir a ativação do NF- κ B, preservando o músculo (CAI, 2004; WHANG, 2013). Fatores de crescimento como o GDF11 (Fator de Diferenciação e Crescimento Celular 11) e a miostatina, e citocinas como o TNF- α e o IL-6, aumentam com a idade e são capazes de prejudicar a homeostasia muscular (VISSER, 2010; EGERMAN, 2015).

Esse efeito paradoxal da IL-6, onde hora é capaz de estimular a hipertrofia e hora induzir a atrofia muscular foi explicado por MUÑOZ CÁNOVES (2013). Exposições pontuais e esporádicas em ratos submetidos ao exercício físico demonstraram que a IL-6 é capaz de estimular a hipertrofia muscular, entretanto, quando os ratos eram geneticamente modificados para superexpressar a IL-6 sistemicamente, observou-se um quadro de atrofia muscular a partir da décima semana de nascimento.

Estudos demonstram que o envelhecimento reduz a ativação dessas células satélites devido à desregulação dessas moléculas; entretanto, quando expostas a um ambiente controlado com características de uma célula mais nova, essas células satélites podem manter sua atividade mesmo com o envelhecimento (CONBOY, 2005; CALDER, 2017).

1.2 Ácidos Graxos Poli-insaturados n-3 (AGPIs)

OS AGPIs são componentes vitais para a membrana celular de todas as células do corpo humano. Apesar de serem sintetizados no corpo humano a partir do ácido α -linolênico, sua taxa de conversão é insuficiente para atender as necessidades do organismo, de forma que a dieta passa a ser a principal fonte destes (LEMAITRE et al, 2003). Dentre os AGPIs n-3 de grande relevância para a fisiologia do organismo humano, cita-se o ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) e o ácido graxo docosahexaenóico (DHA), facilmente encontrados nos suplementos de óleo de peixe (CALDER, 2009).

Uma vez ingeridos, estes AGPIs são efetivamente transferidos aos tecidos e incorporados às membranas celulares. Tem sido postulado que uma vez incorporados às membranas sejam capazes de regular fluidez de membrana, comunicação celular, transcrição gênica, expressão de receptores e enzimas transdutoras e síntese de mediadores celulares (GRAY & DA BOIT, 2013)

Alterações no perfil da dieta podem refletir em parâmetros musculares, alterando positivamente ou negativamente a função muscular em vários aspectos, uma vez que podem regular parâmetros celulares em diferentes níveis, desde características de membrana até expressão gênica (FRANCHI, 2016). A suplementação com AGPIs n-3, particularmente EPA, promove regulação e manutenção do equilíbrio de proteínas totais, representando importante método não farmacológico para controle da redução de massa muscular (JEROMSON et al., 2015).

Além de suas propriedades anti-inflamatórias amplamente discutidas, esses ácidos graxos possuem abrangentes efeitos sistêmicos, como alteração da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose (ALBERT, 2014), além da diminuição dos níveis de triacilgliceróis no plasma sanguíneo (FETTERMAN, 2009). Acredita-se também que estejam relacionados a aumento da síntese proteica pela manutenção de moléculas de sinalização intracelular e pela ativação de células satélites (SMITH, 2011; MCGLORY, 2016).

Assim, acredita-se que a suplementação com óleo de peixe rico em ômega-3 combinado ao exercício físico possa balancear o metabolismo

proteico, aumentando a síntese proteica muscular, além de estimular as células satélites e melhorar o ambiente celular muscular, favorecendo assim a hipertrofia muscular.

O ácido graxo araquidônico (AA) é predominantemente o ácido graxo mais abundante nas membranas celulares e também o responsável por formar eicosanoides pró-inflamatórios, como a prostaglandina E2 (CALDER, 2009). O aumento da incorporação de EPA na membrana celular faz com que ele seja preferencialmente usado como substrato na produção de eicosanoides, resultando na produção de mediadores celulares como a prostaglandina E3 com potencial inflamatório muito inferior àqueles provenientes do AA, contribuindo assim para a atividade anti-inflamatória. (CALDER, 2009)

Além disso, a resolvina e protectina, produtos metabólicos do EPA e DHA, possuem um grande potencial anti-inflamatório e desempenham um importante papel na solução de inflamações (SERHAN, 2008). Atualmente, AGPIs n-3 têm sido apontados como atores na modulação de vias inflamatórias, podendo de certa forma favorecer o ganho proteico em detrimento da degradação.

A combinação de treinamento resistido com a ingestão proteica é capaz de aumentar a síntese proteica muscular e a atividade das células satélites (HULMI, 2008). Em 2011, SMITH demonstrou que associado a uma suplementação com óleo de peixe, esses efeitos são ainda maiores em indivíduos novos e idosos, onde observou-se uma hiperaminoacidemia, hiperinsulinemia e um aumento da síntese proteica muscular. Acredita-se que os ácidos graxos ômega-3 sejam capazes de atenuar a resistência anabólica e aumentar a síntese proteica muscular através de um aumento na ativação da via de sinalização celular mTOR-p70s6K.

Estudos em senhoras idosas demonstraram que a união entre treinos de força e uma suplementação com óleo de peixe rico em ômega-3 (2 g por dia, por 90 dias) aumentaram significativamente a força e capacidade funcional muscular, quando comparado ao grupo de idosas que apenas realizava os treinos de força. Mesmo na ausência do treino de força, apenas suplementação com o óleo de peixe aumentou a força e o volume muscular (RODACKI, 2012). Outro estudo demonstrou que uma suplementação de 4g

por dia aumentou a área e força muscular, além da força isocinética (SMITH, 2015).

Conforme descrito, hormônios e marcadores inflamatórios podem influenciar negativamente ou positivamente a ativação de células satélites. Fatores de crescimento como o GDF11 (Fator de Diferenciação e Crescimento Celular 11) e a miostatina, e citocinas como o TNF- α e o IL-6, aumentam com a idade e são capazes de prejudicar essa ativação (VISSER, 2010; EGERMAN, 2015).

Estudos demonstram que o envelhecimento reduz a ativação dessas células satélites devido à desregulação dessas moléculas; entretanto, quando expostas a um ambiente controlado com características de uma célula mais nova, essas células satélites podem manter sua atividade mesmo com o envelhecimento (CONBOY, 2005; CALDER, 2017). Acredita-se que o óleo de peixe seja capaz de promover a manutenção dos diversos fatores descritos, preservando dessa forma o ambiente celular muscular.

2 JUSTIFICATIVA

A sarcopenia é um processo gradual caracterizado pela perda de força física, morbidade e mortalidade. É uma condição que afeta principalmente indivíduos mais velhos e que é agravada devido a um déficit na absorção de nutrientes, a uma dieta desbalanceada e à ausência de uma rotina que inclua exercícios físicos. Associado a uma dieta equilibrada, o exercício físico é capaz de promover efeitos sistêmicos que melhoram o desempenho muscular e melhoram a qualidade de vida de idosos. Devido a seus efeitos anti-inflamatórios, cardiovascular, ósseo e muscular, os ácidos graxos poli-insaturados têm sido amplamente estudados na preservação do tecido muscular.

Assim, acredita-se que a suplementação com óleo de peixe rico em ômega-3, associada ou não ao exercício, possa balancear o metabolismo proteico, aumentando a síntese proteica muscular, além de estimular as células satélites e melhorar o ambiente celular muscular, favorecendo a hipertrofia muscular, caracterizando uma alternativa não farmacológica para a modulação da sarcopenia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com óleo de peixe e do exercício resistido sobre parâmetros morfofuncionais na musculatura esquelética em ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

Para alcançar este objetivo as seguintes variáveis foram analisadas

- I. massa corporal do animal e a massa dos músculos sóleo e extensor digital longo dos dedos.
- II. força máxima do animal.
- III. comprimento muscular dos músculos sóleo, extensor digital longo dos dedos.
- IV. Número e comprimento de sarcômeros em série.
- V. Parâmetros séricos de glicemia, laticidemia e lipemia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratos Wistar foram obtidos e mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob ciclo invertido claro/escuro (12/12 horas) e ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C), recebendo água e ração comercial para ratos *ad libitum*. Todos os procedimentos utilizando os animais foram submetidos à apreciação e aprovados pelo Comissão de Ética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEUA 1067).

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n = 79 animais) após completarem 9 meses de idade, conforme descrito abaixo:

- 1) Grupo Sedentário: os animais receberam apenas ração e água (25 animais).
- 2) Grupo Suplementado: além de receber ração e água, os animais foram suplementados diariamente por via oral com 1,0 g/kg de óleo de peixe rico em ômega-3 (27 animais).
- 3) Grupo Exercitado: além de receber ração e água, os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento resistido descrito por HARRIS et. al (2010) (27 animais).

O regime de suplementação e o programa de exercício foi desenvolvido durante 8 semanas, finalizando quantos os animais tinham 11 meses. Ao fim deste período, os animais foram ortotanasiados para coleta e análise dos dados através de 3 experimentos independentes.

4.3 Suplementação com Óleo de Peixe

As cápsulas de óleo de peixe foram obtidas do laboratório Sundown Naturals® (The Natures Bounty Co – USA) contendo 180 mg de EPA e 120 mg de DHA por mL. A suplementação foi fornecida diariamente com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável durante 8 semanas.

4.4 Exercício Físico – O Treinamento Resistido

Os animais foram submetidos ao treinamento resistido conforme descrito por HARRIS et al. (2010). Para realização do protocolo de exercícios foi utilizada uma escada com 110 cm de comprimento por 18 cm de largura, um espaçamento de 2 centímetros entre os degraus e com uma inclinação de 80 graus, com uma câmara de descanso no topo. O protocolo de exercícios resistido consistiu de subidas repetidas com o emprego progressivo de carga (peso atado à cauda do animal), onde o aparato com a carga foi fixado através de esparadrapo.

FIG. 1: MATERIAL UTILIZADO PARA TREINAMENTO DOS ANIMAIS. A) ESCADA DE 110 CM COM INCLINAÇÃO DE 80 GRAUS; B) PESOS DE VARIADOS VALORES E MOSQUETÃO PARA ANEXAÇÃO DOS PESOS



4.4.1 Adaptação à Escada

Uma semana antes dos animais completarem 9 meses, foi iniciado o processo diário de adaptação à escada. Durante 5 dias (de segunda à sexta), os animais foram incentivados a subir a escada por 4 repetições, em distâncias crescentes em relação ao topo (15 cm, 30 cm, 55 cm e 110 cm). Após finalizar cada subida, eles deveriam descansar por 1 minuto na câmara de repouso. Para assegurar que os animais conseguissem subir, pequenos estímulos de toque foram feitos na cauda.

4.4.2 Teste de Força Carregada Máxima (TCCM)

Na semana seguinte à adaptação e familiarização à escada, os animais foram submetidos ao teste de força carregada máxima descrito por HORNBERGER & FARRAR (2004), a fim de determinar a carga do teste de resistência equivalente à força máxima do animal. O Teste de Carga Carregada máxima 1 (TCCM1) ocorreu 48h após o período de adaptação

(segunda-feira), seguido de outro TCCM feito 48h após o TCCM 1 (quinta-feira). A necessidade de repetir-se o TCCM ocorre para que os animais tenham uma adaptação ao aparato de pesos preso a suas caudas, visto que na semana de adaptação à escada eles subiam apenas com o peso do corpo. Dessa forma, acredita-se que no segundo TCCM, o animal esteja habituado ao teste e o seu desempenho esteja livre de interferências comportamentais.

O teste começa com uma subida completa para aquecimento com 1 minuto de descanso. Em seguida, os animais foram submetidos a uma sobrecarga equivalente a 50% da sua massa corporal com acréscimos subsequentes de 10% de sua massa corporal para cada subida completa, com intervalos de 2 minutos de descanso (KRAUSE NETO et. al, 2017) entre cada subida. A maior carga carregada no TCCM 2 foi usada como a carga inicial daquele animal no Treinamento Resistido e serviu como parâmetro para futuras análises.

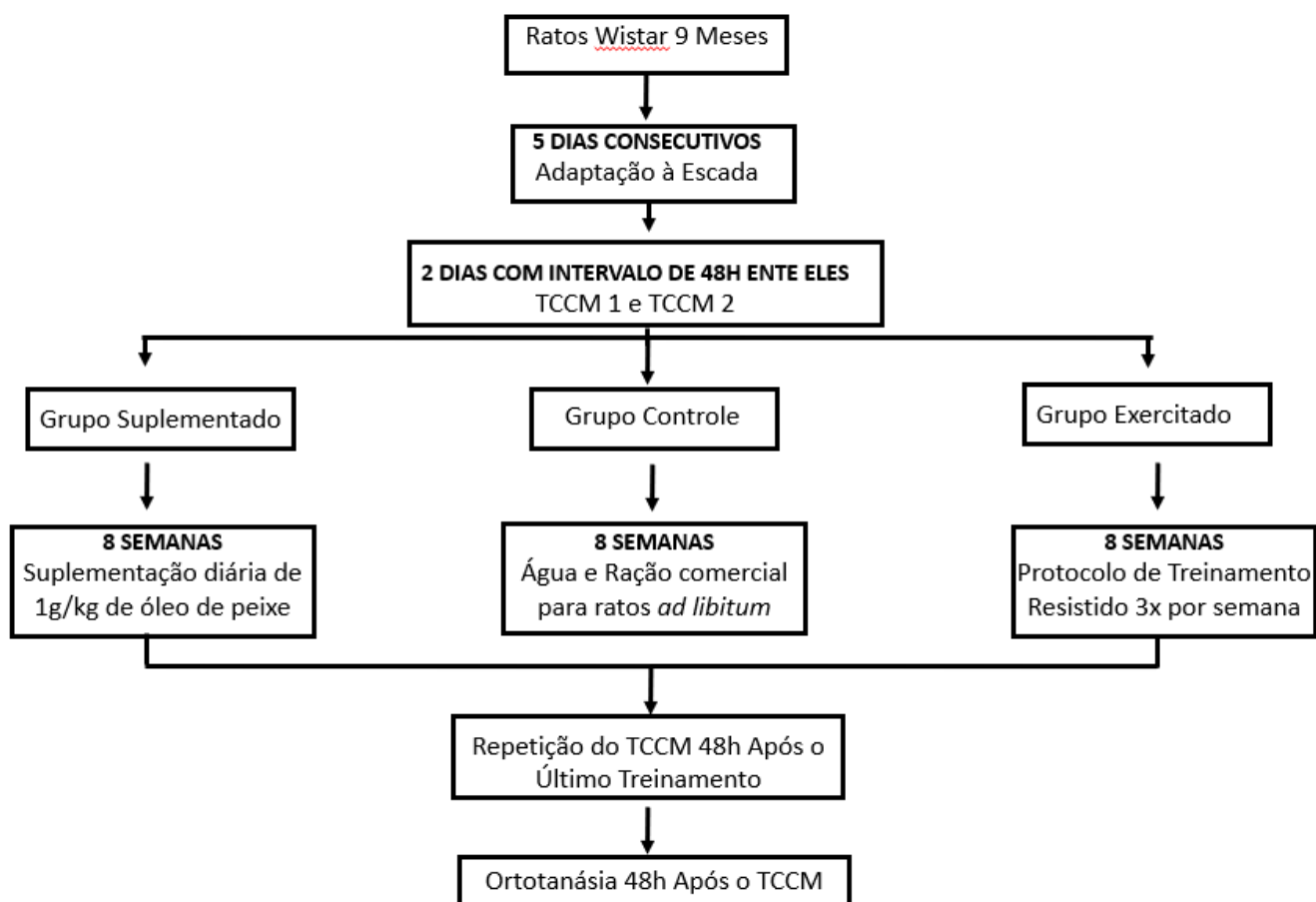
Após 8 semanas e a conclusão das rotinas de treinamento e suplementação, os animais de todos os grupos foram novamente submetidos ao TCCM, para avaliar o efeito das intervenções sobre a capacidade de força dos animais.

4.4.3 Treinamento Resistido

O treinamento resistido deu-se início na semana seguinte ao TCCM. O protocolo prevê que o animal seja submetido a 2 escaladas com 50% da carga máxima obtida no TCCM, seguida de mais 2 escaladas com 75% e por fim mais 2 escaladas com 100% da carga. Caso conseguisse concluir essas 6 escaladas, o animal deveria tentar subir mais 2 vezes com uma sobrecarga de 30 g. Caso conseguisse completar as 8 escaladas, a carga adicional de 30 g era integrada e tornava-se sua nova carga máxima; caso não conseguisse completar as 8 escaladas, o animal deveria repetir o treinamento com a mesma carga do treinamento anterior.

O treinamento ocorreu 3 vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira) durante 8 semanas, totalizando 24 sessões de treinamento.

FIG. 2: FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EMPREGADA. FONTE: O AUTOR.



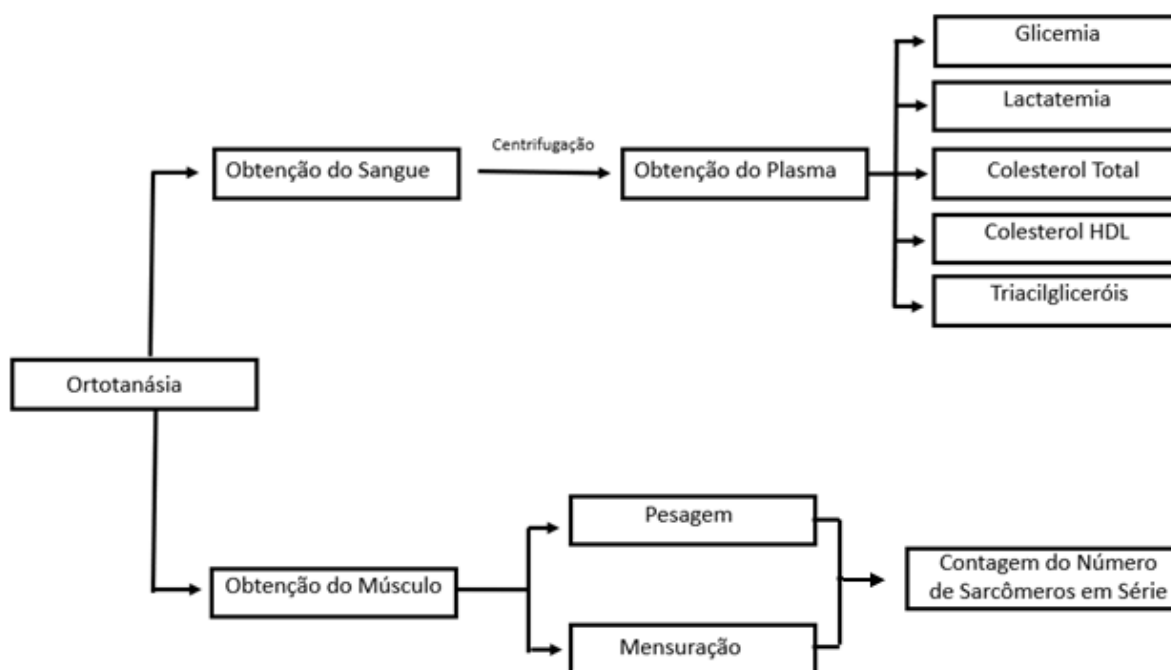
4.5 Obtenção do Sangue e dos Músculos

O sangue foi destinado para análise dos parâmetros séricos, enquanto os músculos foram dissecados e preservados para contagem de sarcômeros em série e do número de fibras na análise da área de secção transversal.

Após 48h da realização do último TCCM, os animais foram ortotaniados em jejum e tiveram seu sangue e músculos coletados. O sangue foi coletado na presença de heparina, centrifugado a 300 g por 15 minutos para obtenção do plasma e em seguida congelado.

Os músculos sóleo e extensor digital longo dos dedos, de ambas as patas, foram dissecados, pesados em balança de precisão analítica e em seguida estendidos e mensurados de tendão a tendão com o auxílio de um paquímetro eletrônico digital.

FIG. 3: FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EMPREGADA. FONTE: O AUTOR



4.6 Parâmetros Séricos

4.6.1 Glicemia

A glicemia foi avaliada através do método colorimétrico com a utilização do reagente comercial Glicose e Enzimática (LABTEST), conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 505 nm. A concentração de glicose foi expressa em mg/dL.

4.6.2 Colesterol Total

O colesterol total foi avaliado através do método enzimático com a utilização do reagente comercial Colesterol COD-ANA (LABTEST), conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a leitura em

espectrofotômetro sob comprimento de onda de 500 nm. A concentração de colesterol total foi expressa em mg/dL.

4.6.3 HDL

A concentração de HDL foi avaliada através da obtenção do sobrenadante (HDL) após centrifugação (300g por 15min) e precipitação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL e VLDL), utilizando-se o reagente comercial Colesterol HDL COD-ANA (LABTEST), conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 500 nm. A concentração de HDL foi expressa em mg/dL.

4.6.4 Triacilgliceróis (TAGs)

A concentração de triacilgliceróis foi avaliada através do método enzimático colorimétrico com a utilização do reagente comercial Triglicérides GPO-ANA (LABTEST), conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 540 nm. A concentração de triacilgliceróis foi expressa em mg/dL.

4.6.5 Laticidemia

A laticidemia foi avaliada através do método enzimático com a utilização do reagente comercial Lactato Teste Enzimático UV (BIOCLIN), conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 340 nm. A concentração de lactato foi expressa em mg/dL.

4.7 Parâmetros Morfométricos Musculares

4.7.1 Contagem de Sarcômeros em Série

Após a dissecação, pesagem e mensuração, os músculos sóleo e extensor digital longo dos dedos (EDL) foram fixados em formol (10%) por 3 horas e em seguida fixados em ácido nítrico (30%) por 48h. Após esse período, foram mantidos em glicerol (50%), conforme descrito por GOLDSPINK (1968). Esse protocolo possibilitou a hidrólise do tecido conjuntivo, permitindo a preservação apenas das fibras musculares.

Com o auxílio de uma lupa estereoscópica e pinças ultrafinas, foram preparadas lâminas de 10 fibras musculares isoladas de cada músculo. As lâminas foram visualizadas em microscópio de luz em objetiva de 100x com o auxílio do óleo de imersão. Foi realizada a contagem do número de sarcômeros em série ao longo de 300 μm da fibra muscular, conforme descrito por WILLIAMS e GOLDSPINK (1971).

4.8 Tratamento estatístico

A normalidade dos dados foi verificada pelo Teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo teste de Levene. Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média. Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de uma vias e pós teste de Tukey. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis nos casos onde apresentou-se distribuição normal e heterogênea. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$. A composição dos gráficos e tratamento estatístico dos resultados foi feito através do software Prisma *GraphPad* versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, EUA.)

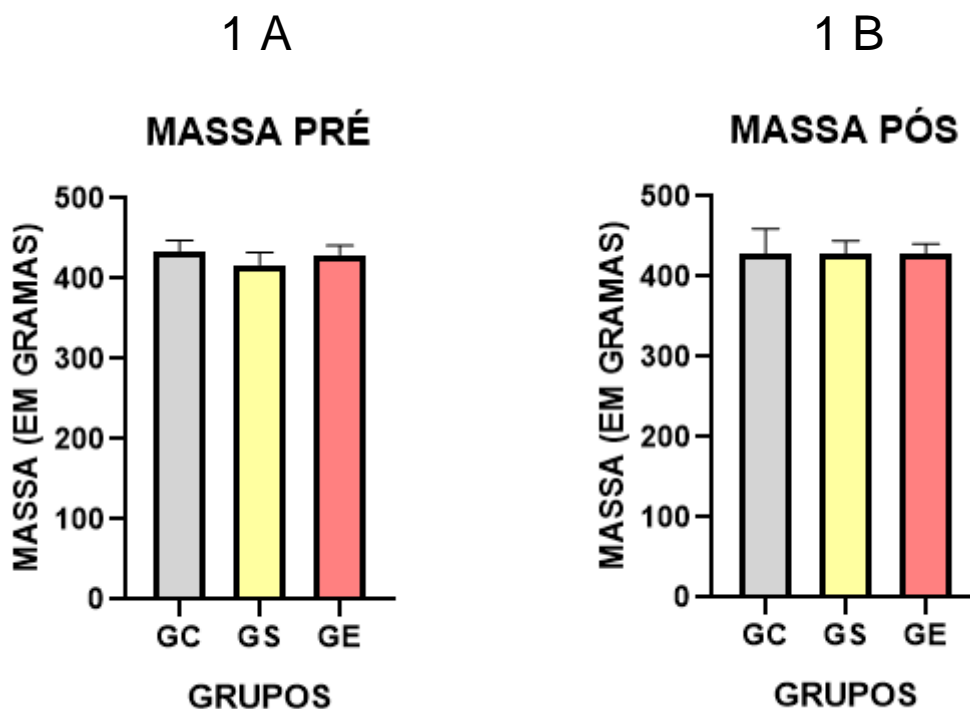
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Massa Corporal

Uma vez que desempenho e força muscular podem ser influenciados pelo peso do animal e sua proporção de massa magra, a massa corporal dos animais foi avaliada antes (9 meses) e depois das 8 semanas de treino ou suplementação (11 meses)

Os dados apresentados no gráfico 1, demonstram que ao início dos protocolos, os animais com 9 meses não apresentavam diferença significativa de massa corporal (gráfico 1 A). A avaliação deste parâmetro após as oito semanas de intervenção mostra que nem o exercício ou a suplementação produziram alteração na massa dos animais já com 11 meses (gráfico 1 B).

GRÁFICO 1: MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS DOS 3 GRUPOS. GC: GRUPO CONTROLE; GS: GRUPO SUPLEMENTADO; GE: GRUPO EXERCITADO. DADOS REPRESENTAM MÉDIA \pm SD, DE 10 ANIMAIS POR GRUPO EXPERIMENTAL (ANOVA).



O efeito do exercício resistido sobre o músculo é a premissa pela qual esta modalidade de exercício representa a principal estratégia para hipertrofia. Entretanto, são muito variados os protocolos de exercício resistido, produzido diversos resultados. Os dados encontrados neste trabalho, entretanto, sugerem que em um período de apenas 8 semanas não é possível um aumento da massa muscular, seja através do exercício resistido ou da suplementação. Apesar de saber-se que o exercício promove a hipertrofia muscular e conseqüentemente leva a um ganho de massa muscular, autores como DUNCAN et al. (1998), FARRELL et al. (1999) e TAMAKI et al. (1992) calculam a massa muscular junto a massa corporal do animal para conseguirem obter dados significativos. Como dado isolado, KLITGAARD (1988) e GONYEA E ERICSON (1976) apontam como necessárias de 36 a 41 semanas de treino em ratos para se observar uma hipertrofia significativa e, conseqüentemente, um ganho de massa muscular

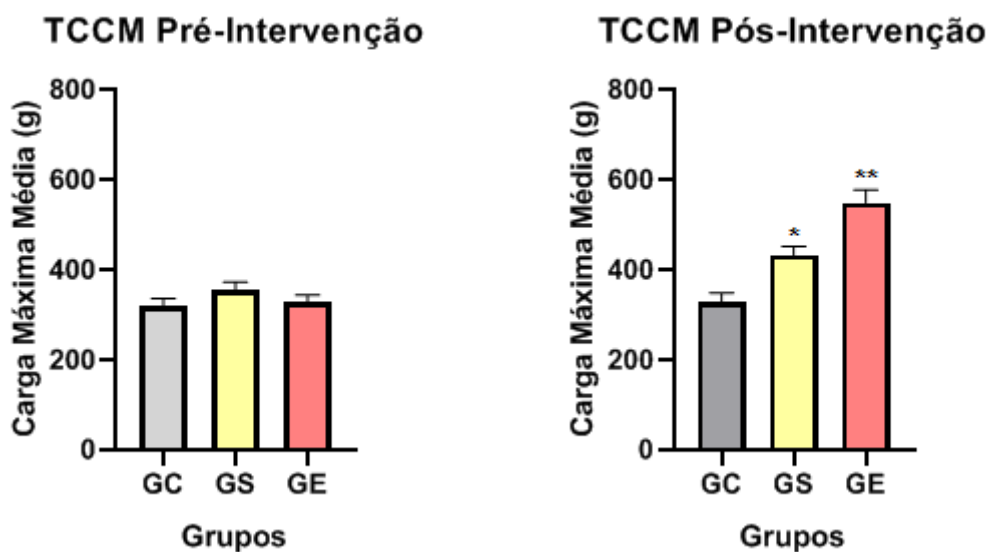
5.2 Teste de Força Carregada Máxima

O Teste de Força Carregada Máxima permite avaliar a carga máxima que cada animal é capaz de carregar e pode sugerir como cada intervenção é capaz de alterar esta capacidade de força máxima. Os dados obtidos do teste de força carregado máximo podem ser observados no Gráfico 2, onde são apresentados os dados prévios ao início das intervenções e os dados após 8 semanas de treino ou suplementação.

Antes da intervenção, não foram identificadas diferenças significativas entre os 3 grupos. Estes dados já eram esperados, uma vez que os animais não haviam passado por nenhum procedimento que pudesse resultar em diferenças, e foi fundamental para a randomização dos animais. Desta maneira, podemos certificar que antes da randomização nos grupos experimentais, todos os animais, independente do grupo, partiram do mesmo patamar de funcionalidade.

Passadas as 8 semanas de intervenção, os animais foram novamente submetidos ao TCCM para identificar o efeito do exercício e da suplementação sobre a capacidade de força. Conforme apresentado no gráfico 5B, a exposição dos animais ao protocolo de treino ($p < 0,0001$) e a suplementação ($p \leq 0,05$) foram capazes de aumentar a capacidade de força dos animais quando comparados ao grupo controle.

GRÁFICO 2: TESTE DE FORÇA CARREGA MÁXIMA PRÉ E PÓS INTERVENÇÃO DOS ANIMAIS DOS 3 GRUPOS. GC: GRUPO CONTROLE; GS: GRUPO SUPLEMENTADO; GE: GRUPO EXERCITADO. DADOS REPRESENTAM MÉDIA \pm SD, DE 10 ANIMAIS POR GRUPO EXPERIMENTAL. *DIFERENÇA SIGNIFICATIVA $< 0,001$. **DIFERENÇA SIGNIFICATIVA $< 0,05$ (ANOVA).



O efeito do exercício sobre parâmetros de força muscular tem sido demonstrado por alguns autores. Os dados obtidos da exposição ao protocolo de exercício corroboram nossos achados que o emprego de exercício resistido melhora a força muscular, pois consiste na melhor estratégia para melhorar a funcionalidade muscular e consequentemente força (LAW & CLARK, 2016; DESCHENES, 2016).

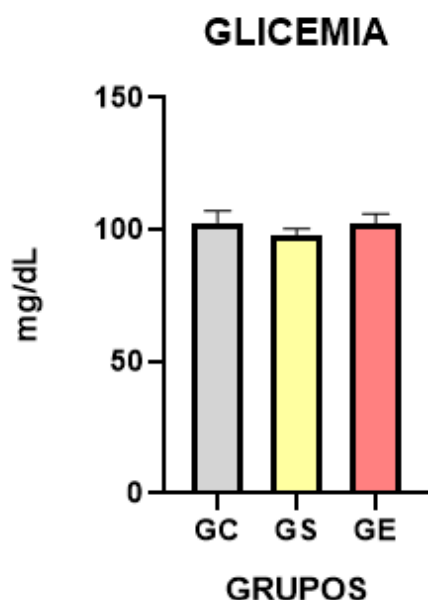
De maneira menos pujante, a suplementação com óleo de peixe também foi hábil em melhorar a capacidade de força dos animais após 8 semanas de suplementação. O efeito de AGPIs n-3 sobre força muscular tem demonstrado aumento de força muscular de flexores e extensores de joelho e da força de preensão quando comparado ao grupo controle, após 6 meses de suplementação (SMITH et al., 2015). Em outro estudo semelhante, o ganho de força muscular também foi identificado após 3 meses de suplementação (RODACKI et al., 2012), sugerindo que mesmo em um tempo menor de suplementação foi possível promover ganho de força, corroborando os achados da abordagem deste trabalho.

5.3 Parâmetros séricos

O suprimento nutricional adequado permite regular a disponibilidade de fontes energéticas para o musculo e, de maneira indireta, seu metabolismo e capacidade de adaptação (YAMAZAKI et al., 2011)

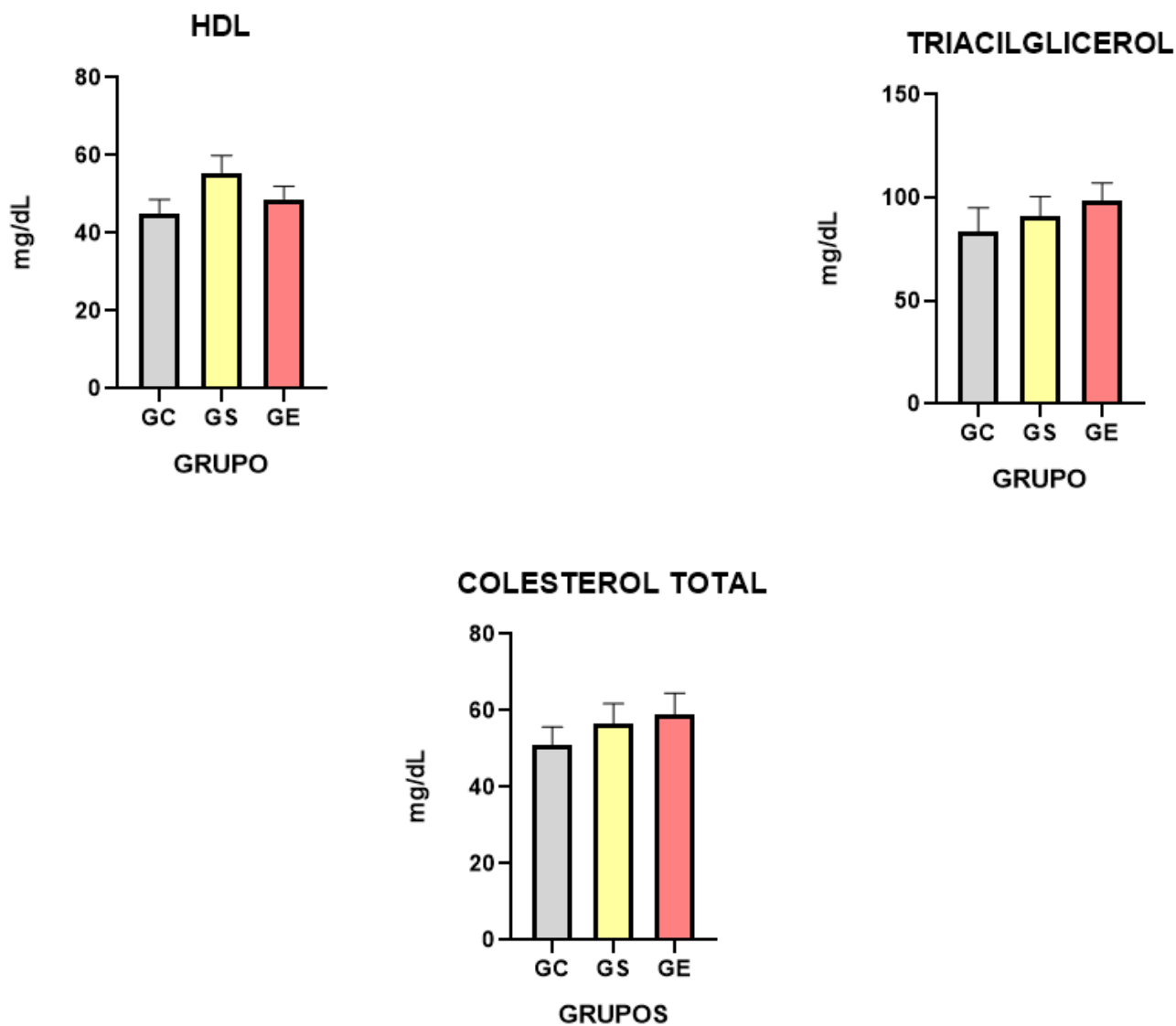
Assim a avaliação de parâmetros séricos representa importante ferramenta para estabelecer um perfil da saúde geral dos animais. No gráfico 3, estão apresentados os dados de glicemia dos animais. É possível verificar, como esperado, que não houve diferença significativa entre os grupos, sugerindo que em um período de 8 semanas, o exercício e a suplementação com óleo de peixe não foram capazes de provocar uma alteração metabólica que pudesse refletir num aumento ou diminuição dos níveis glicêmicos nesses animais.

GRÁFICO 3: GLICEMIA DOS ANIMAIS DOS 3 GRUPOS. GC: GRUPO CONTROLE; GS: GRUPO SUPLEMENTADO; GE: GRUPO EXERCITADO. DADOS REPRESENTAM MÉDIA±SD, DE 10 ANIMAIS POR GRUPO EXPERIMENTAL (ANOVA).



De maneira semelhante, os dados obtidos da análise do lipidograma, mostram que as duas estratégias (exercício e suplementação) não produziram alteração dos valores de colesterol e triaciglicerois nos grupos experimentais (Gráfico 4).

GRÁFICO 4: LIPIDEMIA -TAXA DE HDL (LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE), COLESTEROL TOTAL E TRIACILGLICEROL DOS ANIMAIS DOS 3 GRUPOS. GC: GRUPO CONTROLE; GS: GRUPO SUPLEMENTADO; GE: GRUPO EXERCITADO. DADOS REPRESENTAM MÉDIA±EPM, DE 10 ANIMAIS POR GRUPO EXPERIMENTAL (ANOVA).



Apesar da ausência de significância, uma singela elevação dos valores de HDL é percebida no grupo suplementado com óleo de peixe sugerindo que a manutenção da suplementação por um tempo superior às oito semanas do estudo poderia corroborar os achados da literatura, que mostram que suplementos ricos em ácidos graxos n-3 tem potente efeito na modulação das concentrações de colesterol HDL (YAMAZAKI et al., 2011; RODACKI et al., 2015;).

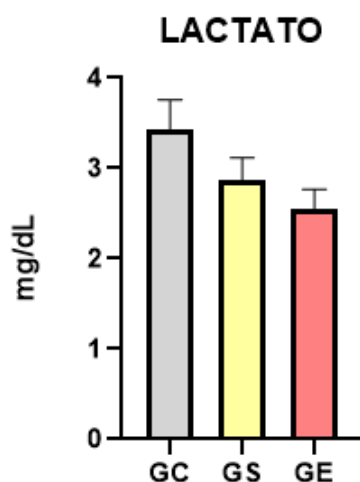
O emprego de suplementos de origem lipídica sempre provoca preocupação, por tratar-se de uma fonte de gordura. Essa uniformidade dos valores do lipidograma é importante pois demonstram principalmente que a suplementação com óleo de peixe não representa risco de aumento de lipídios circulantes, corroborando outros trabalhos envolvendo o emprego de óleo de peixe como uma estratégia segura (PIZATTO et al., 2005; SCHIESSEL, 2015).

Durante a avaliação dos parâmetros séricos, esperava-se que os animais dos três grupos tivessem valores de glicemia, lipidemia e lactatemia semelhantes. Isso porque uma rotina de 8 semanas não seria suficiente para alterar drasticamente esses valores. Realmente os dados obtidos sugerem que no intervalo de oito semanas, nenhuma das intervenções são capazes de causar efeitos metabólicos nesses animais. Dados da literatura demonstram que tanto ácidos graxos quanto o exercício são hábeis em reduzir a glicemia e colesterol somente depois 12 semanas (YAMAZAKI et al., 2011). Em adição estes efeitos são identificados em cenários que envolvem modelos de diabetes ou obesidade (ROCHA et al., 2013; KIM et al., 2018). Em ratos ditos saudáveis, mesmo depois de 12 semanas o efeito sobre estas variáveis é bastante sutil (PIZATTO et al., 2005; HLAVATÝ et al., 2008; SANTANA et al., 2015)

A avaliação da laticidemia tem por objetivo confirmar que 48 horas após da última seção de exercício o ambiente metabólico do musculo havia sido recuperado e os valores de lactato no sangue, haviam retornado aos valores basais. No gráfico 5 estão representados os dados da laticidemia de animais experimentais e controle.

GRÁFICO 5: LATICIDEMIA DOS ANIMAIS DOS 3 GRUPOS. GC: GRUPO CONTROLE; GS: GRUPO SUPLEMENTADO; GE: GRUPO EXERCITADO. DADOS REPRESENTAM MÉDIA \pm EPM, DE 10 ANIMAIS POR EXPERIMENTAL.

GRUPO
(ANOVA)



10 ANIMAIS POR
EXPERIMENTAL.

É possível observar que apesar dos valores aumentados no grupo controle, após 48 horas do término do treinamento, as concentrações de lactato não eram diferentes nos grupos experimentais. Estes achados corroboram com o que é postulado na literatura (LIMA et al., 2011; YAMAZAKI, 2011).

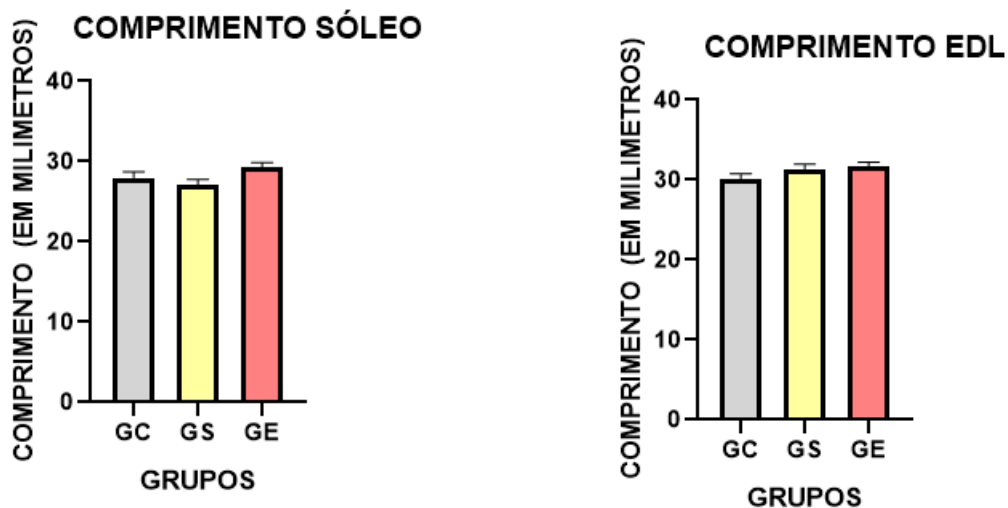
Partindo desta premissa, pode-se inferir que o lactato não é capaz de interferir em parâmetros morfofuncionais da célula muscular, como a transdução de sinais, um aumento na regulação de síntese proteica ou quaisquer outros efeitos que podem ser observados provenientes do exercício ou suplementação.

5.4 Parâmetros morfométricos dos músculos de interesse

O ganho de força muscular é uma variável que sugere a ocorrência de adaptações celulares que propiciem maior resistência e força. Para avaliar as alterações celulares com efeito morfofuncionais, foram feitas 4 análises: comprimento muscular, massa muscular, comprimento do sarcômero e número de sarcômeros em série.

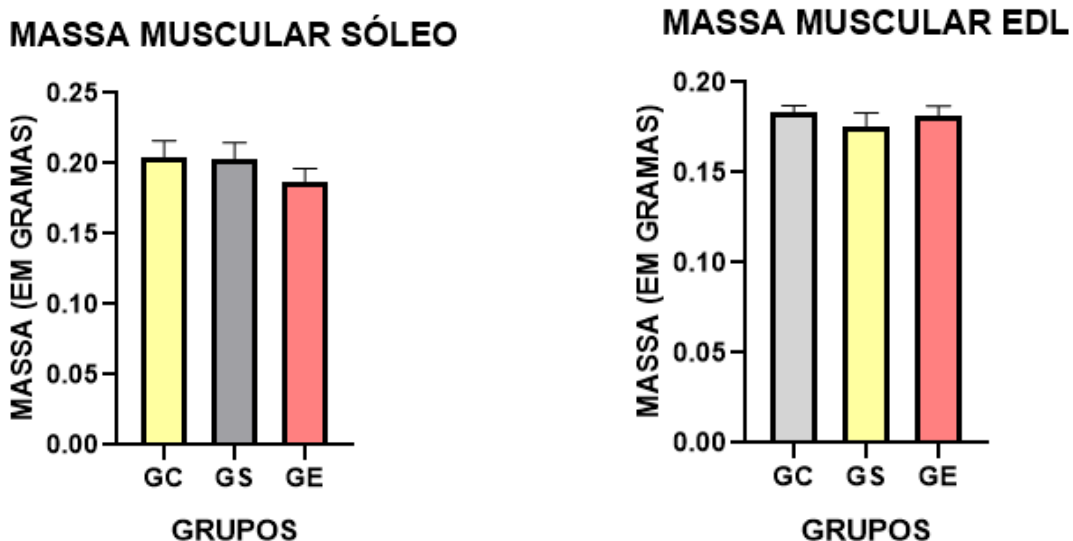
Os dados referentes ao comprimento dos músculos sóleo e EDL estão apresentados no Gráfico 6. A avaliação do comprimento muscular dos músculos sóleo e EDL mostrou que as duas estratégias empregadas não foram eficazes em produzir diferença significativa, sobre este parâmetro.

GRÁFICO 6: COMPRIMENTO MUSCULAR (MM) DOS MÚSCULOS SÓLEO E EXTENSOR DIGITAL LONGO DOS DEDOS (EDL) DOS ANIMAIS DOS 3 GRUPOS EXPERIMENTAIS. GC: GRUPO CONTROLE; GS: GRUPO SUPLEMENTADO; GE: GRUPO EXERCITADO. DADOS REPRESENTAM MÉDIA±EPM, DE 10 ANIMAIS POR GRUPO EXPERIMENTAL (ANOVA).



Da mesma forma, a avaliação da massa muscular absoluta mostrou que tanto o exercício como a suplementação não foram hábeis em modificar a massa muscular dos animais em apenas 8 semanas (gráfico 7).

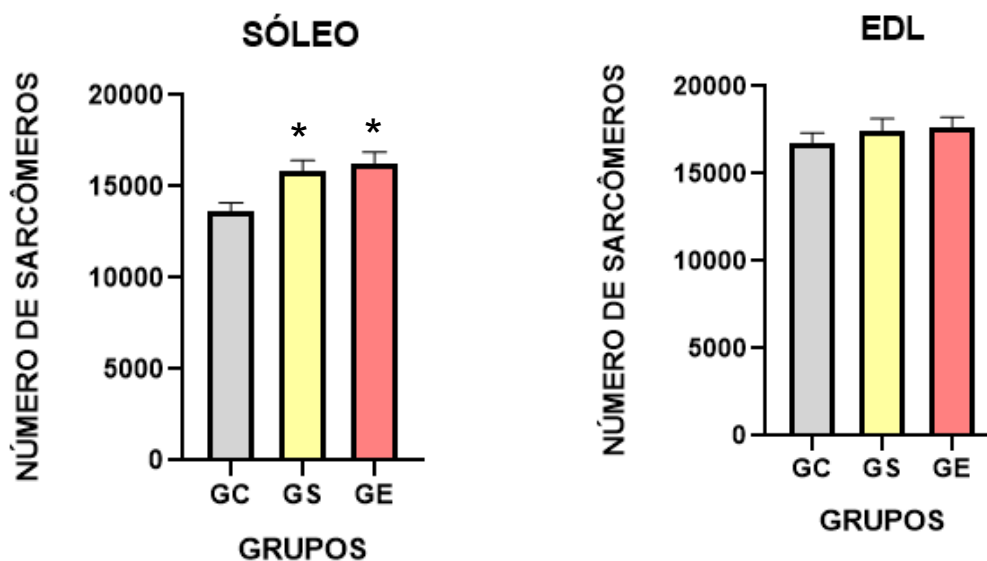
GRÁFICO 7: MASSA MUSCULAR (G) DOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL DOS ANIMAIS DOS 3 GRUPOS EXPERIMENTAIS. GC: GRUPO CONTROLE; GS: GRUPO SUPLEMENTADO; GE: GRUPO EXERCITADO. DADOS REPRESENTAM MÉDIA±EPM, DE 10 ANIMAIS POR GRUPO EXPERIMENTAL (ANOVA).



A partir do comprimento e massa muscular, podemos pressupor que esse aumento de força no grupo exercitado não aconteceu necessariamente devido à uma hipertrofia muscular, uma vez que tanto o comprimento dos sarcômeros quanto a massa do músculos mantiveram-se inalteradas em todos os grupos Assim a avaliação de parâmetros antropométricos de maneira pura e isolada não representa uma estratégia interessante para se avaliar adaptações musculares, pois por vezes o ganho de funcionalidade é regulado por mecanismos celulares (WILKINSON et al., 2007; HARTMAN et al., 2007).

Por este motivo optou-se por estender a avaliação às fibras musculares, analisando os sarcômeros. O número de sarcômeros estimado em cada célula muscular está apresentado no gráfico 8. Dados obtidos da contagem de sarcômeros indicam que o exercício e a suplementação foram capazes de produzir aumento do número de sarcômeros nas fibras musculares do sóleo ($p \leq 0,05$), mas não nas fibras do EDL.

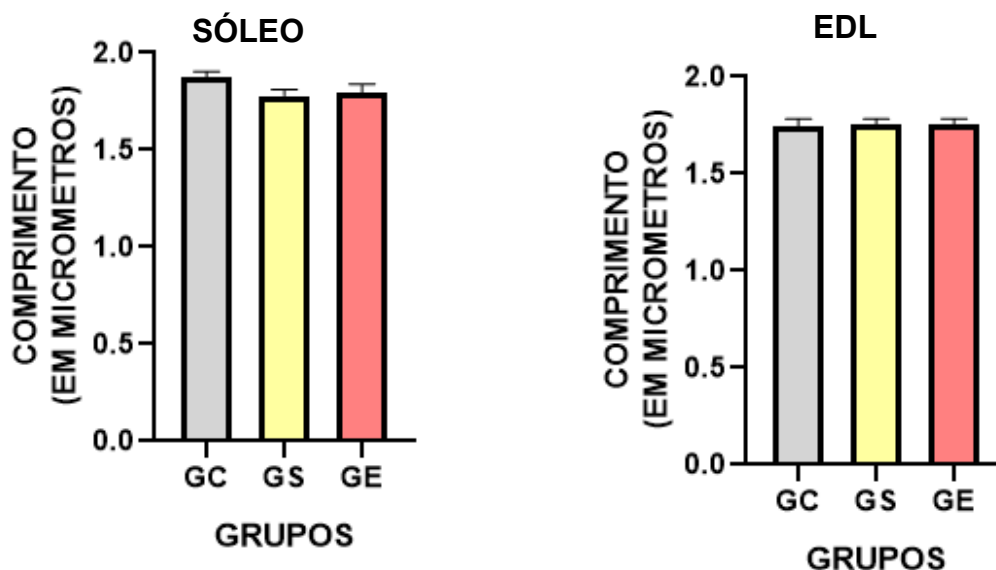
GRÁFICO 8: NÚMERO DE SARCÔMEROS NOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL DOS ANIMAIS DOS 3 GRUPOS EXPERIMENTAIS. GC: GRUPO CONTROLE; GS: GRUPO SUPLEMENTADO; GE: GRUPO EXERCITADO. DADOS REPRESENTAM MÉDIA±EPM, DE 10 ANIMAIS POR GRUPO EXPERIMENTAL * $P \leq 0,05$ (ANOVA).



Este resultado demonstra que além da suplementação ser capaz de provocar alteração na força máxima desses animais, ela é capaz de influenciar parâmetros celulares que levaram a esse aumento do número de sarcômeros, de forma muito semelhante ao que o estímulo do exercício provoca.

Alterações no número de sarcômeros muitas vezes apresentam-se acompanhadas do rearranjo de miofilamentos e filamentos de citoesqueleto, que podem permitir reorganização do sarcômeros, produzido alteração do tamanho das unidades funcionais (MINOZZO E LIRA, 2013). Para identificar a ocorrência deste fenômeno, foi avaliado o comprimento dos sarcômeros em cada grupo experimental. Os dados do comprimento dos sarcômeros estão apresentados no gráfico 9.

GRÁFICO 9: COMPRIMENTO DO SARCÔMEROS (μM) DOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL DOS ANIMAIS DOS 3 GRUPOS. GC: GRUPO CONTROLE; GS: GRUPO SUPLEMENTADO; GE: GRUPO EXERCITADO. DADOS REPRESENTAM MÉDIA \pm EPM, DE 10 ANIMAIS POR GRUPO EXPERIMENTAL (ANOVA).



Este resultado demonstra que apesar de a suplementação não ser capaz de provocar alteração na força máxima desses animais, ela é capaz de influenciar parâmetros celulares que levaram a um aumento do número de sarcômeros, de forma muito semelhante ao que o estímulo do exercício provoca (COUTINHO E GOMES, 2004)

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos neste trabalho, é possível concluir que o exercício resistido no intervalo de 8 semanas apresenta efeito modulador do ganho de força muscular nos animais submetidos ao protocolo de exercício resistido.

Corroborando a hipótese estabelecida para este estudo, foi identificado que a suplementação com óleo de peixe também foi capaz de promover ganho de força após o período de suplementação de oito semanas. Sugerindo assim que em situações onde a prática de exercício físico não é factível, a suplementação com óleo de peixe pode representar uma alternativa para manutenção da funcionalidade muscular.

Por fim, podemos concluir que o ganho de força produzido pelas estratégias de exercício e suplementação foi decorrente das alterações morfológicas detectadas no músculo sóleo, principal músculo envolvido com a funcionalidade dos membros posteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. P. Abreu, J. H. Leal-Cardoso, V. M. Ceccatto. **Adaptação do músculo esquelético ao exercício físico: Considerações moleculares e energéticas**. Revista Brasileira de Medicina do Esporte. (2017).
2. Albert, B.B.; Derraik, J.G.; Brennan, C.M.; Biggs, J.B.; Smith, G.C.; Garg, M.L.; Cameron-Smith, D.; Hofman, P.L.; Cutfield, W.S. **Higher omega-3 index is associated with increased insulin sensitivity and more favourable metabolic profile in middle-aged overweight men**. Sci. Rep. (2014)
3. A. Bacurau. **Contribuição da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR na atrofia muscular desencadeada pela insuficiência cardíaca: influência do treinamento físico aeróbico**. Teses.Usp.Br (2013)
4. R. N. Baumgartner et al. **Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico**. American Journal of Epidemiology. (1998).
5. Da Boit, M.; Sibson, R.; Sivasubramaniam, S.; Meakin, J.R.; Greig, C.A.; Aspden, R.M.; Thies, F.; Jeromson, S.; Hamilton, D.L.; Speakman, J.R.; et al. **Sex differences in the effect of fish-oil supplementation on the adaptive response to resistance exercise training in older people: A randomized controlled trial**. Am. J. Clin. Nutr. (2017)
6. A. O. Brady, C. R. Straight, E. M. Evans. **Body composition, muscle capacity, and physical function in older adults: An integrated conceptual model**. Journal of Aging and Physical Activity. (2014).
7. Gleisson AP Brito, Isabela Coelho, Danielle CT Pequitto, Adriana A Yamaguchi, Gina Borghetti, Dalton Luiz Schiessel, Marcelo Kryczyk, Juliano Machado, Ricelli ER Rocha, Julia Aikawa, Fabiola Iagher, Katya Naliwaiko, Ricardo A Tanhoffer, Everson A Nunes and Luiz Claudio Fernandes. **Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats**. Lipids in Health and Disease. (2011)
8. M. S. Brook, et al. **Skeletal muscle homeostasis and plasticity in youth and ageing: Impact of nutrition and exercise**. Acta

- Physiologica. (2016)
9. Burd NA, Tang JE, Moore DR, et al. **Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences.** J Appl Physiol. (2009)
 10. Calder, P.C.; Bosco, N.; Bourdet-Sicard, R.; Capuron, L.; Delzenne, N.; Dore, J.; Franceschi, C.; Lehtinen, M.J.; Recker, T.; Salvioli, S.; et al. **Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition.** Ageing Res. Rev. (2017)
 11. P. C. Calder. **Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale.** Biochimie. (2009)
 12. Conboy, I.M.; Conboy, M.J.; Wagers, A.J.; Girma, E.R.; Weissman, I.L.; Rando, T.A. **Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment.** Nature. (2005)
 13. E. Coutinho, CN França, J Polônio. **Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. (2004)
 14. D. Cuthbertson. **Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle.** The FASEB Journal (2004)
 15. R. M. R. Dias, et al. **Influência do processo de familiarização para avaliação da força muscular em testes de 1-RM.** Revista Brasileira de Medicina do Esporte. (2005).
 16. Duncan, N.D., Williams, D.A., and Lynch, G.S. **Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training.** Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol. (1998)
 17. Egerman, M.A.; Cadena, S.M.; Gilbert, J.A.; Meyer, A.; Nelson, H.N.; Swalley, S.E.; Mallozzi, C.; Jacobi, C.; Jennings, L.L.; Clay, I.; et al.

- Gdf11 increases with age and inhibits skeletal muscle regeneration.** Cell Metab. (2015)
18. Farrell, P.A., Fedele, M.J., Hernandez, J., Fluckey, J.D., Miller, J.L., 3rd, Lang, C.H., Vary, T.C., Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. **Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise.** J. Appl. Physiol. (1998)
19. Fetterman JW Jr, Zdanowicz MM. **Therapeutic potential of n23 polyunsaturated fatty acids in disease.** Am J Health Syst Pharm. (2009)
20. Fry, C.S.; Lee, J.D.; Jackson, J.R.; Kirby, T.J.; Stasko, S.A.; Liu, H.; Dupont-Versteegden, E.E.; McCarthy, J.J.; Peterson, C.A. **Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy.** FASEB J. (2014)
21. Fry, C.S.; Kirby, T.J.; Kosmac, K.; McCarthy, J.J.; Peterson, C.A. **Myogenic progenitor cells control extracellular matrix production by fibroblasts during skeletal muscle hypertrophy.** Cell Stem Cell. (2017)
22. M. Gautel et al. **The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion.** The Journal of experimental biology. 219, 135–45 (2016).
23. G. Goldspink. **Sarcomere length during post natal growth of mammalian muscle fibres.** J. Cell Sci. (1968)
24. G. Goldspink. **Longitudinal growth of striated muscle fibres.** J. Cell Sci. (1971)
25. S. Gray, M. D. Boit, S. R. Gray, M. D. A. Boit. **Fish oils and their potential in the treatment of sarcopenia.** (2015).
26. M. Harris. **Resistance training improves femoral artery endothelial dysfunction in aged rats.** European Journal of Applied Physiology, (2009)

27. Hlavatý P1, Kunesová M, Gojová M, Tvrzická E, Vecka M, Roubal P, Hill M, Hlavatá K, Kalousková P, Hainer V, Zák A, Drbohlav J. **Change in fatty acid composition of serum lipids in obese females after short-term weight-reducing regimen with the addition of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in comparison to controls.** *Physio Res.* (2013)
28. T. A. Hornberger Jr., R. P. Farrar. **Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat.** *Canadian Journal of Applied Physiology.* (2004)
29. Hotamisligil, G.S.; Shargill, N.S.; Spiegelman, B.M. **Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: Direct role in obesity-linked insulin resistance.** *Science.* (1993)
30. I. Janssen et al. **Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18 – 88 yr.** 81–88 (2014).
31. S. Jeromson, I. J. Gallagher, S. D. R. Galloway, D. L. Hamilton. **Omega-3 Fatty Acids and Skeletal Muscle Health.** *Marine drugs.* (2015).
32. M. Laplante, D. M. Sabatini. **mTOR signaling in growth control and disease.** *Cell.* (2013).
33. Kim KY, Park JS. **Impact of fish consumption by subjects with prediabetes on the metabolic risk factors: using data in the 2015 (6th) Korea National Health and Nutrition Examination Surveys.** *Nutr Res Pract.* (2018)
34. T. N. Kim, K. M. Choi. **Sarcopenia: Definition, Epidemiology, and Pathophysiology.** *Journal of Bone Metabolism.* (2013).
35. W. Krause Neto et al. **Total training load may explain similar strength gains and muscle hypertrophy seen in aged rats submitted to resistance training and anabolic steroids.** *The Aging Male.* (2017)

36. S. Lee. **Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats.** Journal of Applied Physiology. (2003)
37. Carina de Lima, Luciana Alves, Fabíola Iagher, Andressa Franzoi Machado, Marcelo Kryczyk, Ricardo Key Yamazaki, Gleisson Alisson Pereira Brito, Everson Araújo Nunes, Katya Naliwaiko, Luiz Cláudio Fernandes. **Tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats performing anaerobic exercise: participation of Bcl-2, Bax apoptosis and peroxidation.** Physiology, Nutrition and Metabolism. (2011)
38. Litman, B.J.; Niu, S.L.; Polozova, A.; Mitchell, D.C. **The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: Visual transduction.** J. Mol. Neurosci. (2001)
39. Mayhew DL, Kim JS, Cross JM, et al. **Translational signaling responses preceding resistance training-mediated myofiber hypertrophy in young and old humans.** J Appl Physiol. (2009)
40. McGlory, C.; Wardle, S.L.; Macnaughton, L.S.; Witard, O.C.; Scott, F.; Dick, J.; Bell, J.G.; Phillips, S.M.; Galloway, S.D.; Hamilton, D.L.; et al. **Fish oil supplementation suppresses resistance exercise and feeding-induced increases in anabolic signaling without affecting myofibrillar protein synthesis in Young men.** Physiol. Rep. (2016)
41. McKay, B.R.; De Lisio, M.; Johnston, A.P.; O'Reilly, C.E.; Phillips, S.M.; Tarnopolsky, M.A.; Parise, G. **Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following muscle-lengthening contractions in humans.** PLoS ONE. (2009)
42. S. Mintz. **Summary Comments. Culture & Agriculture.** 31, 19–23 (2009).
43. W. K. Mitchell et al. **Sarcopenia, dynapenia, and the impact of**

- advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review.** *Frontiers in Physiology.* (2012)
44. Mitchell CJ, Churchward-Venne TA, West DW, et al. **Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men.** *J Appl Physiol.* (2012)
45. Mitchell CJ, Churchward-Venne TA, Parise G, et al. **Acute postexercise myofibrillar protein synthesis is not correlated with resistance training-induced muscle hypertrophy in young men.** *PLoS One.* (2014).
46. Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. **Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword?** *FEBS J.* (2013)
47. Murphy, M.M.; Lawson, J.A.; Mathew, S.J.; Hutcheson, D.A.; Kardon, G. **Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration.** *Development.* (2011)
48. R. Ogasawara et al. **The role of mTOR signalling in the regulation of skeletal muscle mass in a rodent model of resistance exercise.** *Scientific Reports.* (2016)
49. B. K. Pedersen, Edward F. Adolph. **Muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines.** *Journal of Applied Physiology.* (2009).
50. C. R. Rech, R. A. Dellagrana, M. de F. N. Marucci, E. L. Petroski. **Validade de equações antropométricas para estimar a massa muscular em idosos.** *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano.* 14, 23–31 (2012).
51. K. F. Reid, R. A. Fielding. **Skeletal Muscle Power: A Critical Determinant of Physical Functioning in Older Adults.** *Exercise & Sport Sciences Reviews.* **40**, 4–12 (2012).
52. Rodacki, C.L.; Rodacki, A.L.; Pereira, G.; Naliwaiko, K.; Coelho, I.; Pequito, D.; Fernandes, L.C. **Fish-oil supplementation enhances the**

- effects of strength training in elderly women.** *Am. J. Clin. Nutr.* (2012)
53. I. H. Rosenberg. **Sarcopenia: Diagnosis and Mechanisms; Sarcopenia: Origins and Clinical Relevance.** American Society for Nutritional Sciences, 990–991 (1997).
54. S. Schnyder, C. Handschin. **Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise.** *Bone.* 80:115 – 125 (2015).
55. C. N. Serhan, N. Chiang, T. E. Van Dyke. **Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators.** *Nature Reviews Immunology.* (2008)
56. Sindhu, S.; Thomas, R.; Shihab, P.; Sriraman, D.; Behbehani, K.; Ahmad, R. **Obesity is a positive modulator of IL-6R and IL-6 expression in the subcutaneous adipose tissue: Significance for metabolic inflammation.** *PLoS ONE.* (2015)
57. Shindou, H.; Koso, H.; Sasaki, J.; Nakanishi, H.; Sagara, H.; Nakagawa, K.M.; Takahashi, Y.; Hishikawa, D.; Iizuka-Hishikawa, Y.; Tokumasu, F.; et al. **Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells.** *J. Biol. Chem.* (2017)
58. G. Smith, S. Julliard. **Fish oil-derived n-3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults.** *The American journal of clinical nutrition.* (2015).
59. Smith, G.I.; Atherton, P.; Reeds, D.N.; Mohammed, B.S.; Rankin, D.; Rennie, M.J.; Mittendorfer, B. **Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: A randomized controlled trial.** *Am. J. Clin. Nutr.* (2011)
60. H. Study. **n-3 Polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease and nonfatal myocardial infarction in older adults: the cardiovascular.** (2003)
61. Tamaki, T., Uchiyama, S., and Nakano, S. **A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats.** *Med. Sci. Sports Exerc.* (1992)

62. D. D. Thompson. **Aging and sarcopenia**. Journal of musculoskeletal & neuronal interactions. (2007).
63. Visser, M.; Pahor, M.; Taaffe, D.R.; Goodpaster, B.H.; Simonsick, E.M.; Newman, A.B.; Nevitt, M.; Harris, T.B. **Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: The health abc study**. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. (2002)
64. K. Walsh. **Adipokines, myokines and cardiovascular disease**. (2009).
65. S. B. Wilkinson et al. **Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle**. Journal of Physiology. (2008).
66. Zhang, C.; Li, Y.; Wu, Y.; Wang, L.; Wang, X.; Du, J. **Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration**. J. Biol. Chem. (2013)
- 67.