

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MALU CRISTINA DE ARAUJO MONTORO LIMA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E DO EXERCÍCIO
RESISTIDO NA MODULAÇÃO DE ALTERAÇÕES CELULARES DECORRENTES
DO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO MUSCULOESQUELÉTICO EM RATOS
WISTAR

CURITIBA

2021

MALU CRISTINA DE ARAUJO MONTORO LIMA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E DO EXERCÍCIO
RESISTIDO NA MODULAÇÃO DE ALTERAÇÕES CELULARES DECORRENTES
DO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO MUSCULOESQUELÉTICO EM RATOS
WISTAR

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial para a obtenção do título de Doutor
em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Katya Naliwaiko
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Lima, Malu Cristina de Araujo Montoro.

Efeito da suplementação com óleo de peixe e do exercício resistido na modulação de alterações celulares decorrentes do processo de envelhecimento musculoesquelético em ratos Wistar. / Malu Cristina de Araujo Montoro Lima. – Curitiba, 2021.

135 f. : il.

Orientadora: Katya Naliwaiko.

Coorientador: Luiz Claudio Fernandes.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Envelhecimento. 2. Treinamento. 3. Ácidos graxos Ômega-3. 4. Sistema musculoesquelético. 5. Velhice. I. Título. II. Naliwaiko, Katya. III. Fernandes, Luiz Claudio. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.372



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MALU CRISTINA DE ARAUJO MONTORO LIMA** intitulada: **Efeito da suplementação com óleo de peixe e do exercício resistido na modulação de alterações celulares decorrentes do processo de envelhecimento musculoesquelético em ratos Wistar.**, sob orientação da Profa. Dra. **KATYA NALIWAICO**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita a homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 02 de Julho de 2021.

Assinatura Eletrônica

20/07/2021 19:57:21.0

KATYA NALIWAICO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/08/2021 13:32:33.0

MARITANA MELA PRODUCIMO

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

20/07/2021 20:19:23.0

EVERSON A. NUNES

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

20/07/2021 11:11:36.0

LUCELIA DONATTI

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

20/07/2021 16:37:31.0

TALITA GIANELLO GNOATO ZOTZ

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 101837

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 101837

Dedico esta tese aos meus pais, **Sergio e Maria Luiza**. Companheiros inseparáveis das minhas batalhas e conquistas. Amo muito, meus “filhos grandes”!

AGRADECIMENTOS

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES-MEC pelo fornecimento da bolsa de estudos.

Mesmo ele (Marcos Aurélio de Lima, meu esposo) não estando mais aqui comigo desde 2003, de uma forma indireta tem contribuído para que a minha formação acadêmica se concretizasse pois a minha pensão como viúva complementou a minha bolsa de estudos.

Ao CNPq e a Fundação Araucária pelo incentivo ao desenvolvimento científico através dos editais de fomento à pesquisa.

À UFPR pelo oferecimento de toda a estrutura física e de pessoal para a realização deste doutorado, bem como aos recursos financeiros para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao programa de Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pois ofereceu todo o suporte técnico-administrativo, bem como os professores que compartilharam seus conhecimentos e conselhos durante a minha trajetória na BioCelMol.

Ao Nino, técnico de histologia pelas conversas sobre os processamentos histológicos e materiais compartilhados comigo.

Aos técnicos do CTAF, Israel Bini e Alessandra dos Santos pelo atendimento, sempre cordiais e profissionais. Ao CTAF pela estrutura oferecida para aquisição de imagens para todo o procedimento de análise morfométrica dos músculos estudados nesta pesquisa, bem como a FINEP e a CAPES.

Aos técnicos de laboratório do departamento de Fisiologia-UFPR: Débora Coutinho, Hely Moraes e Fábio Caetano que sempre me auxiliaram gentilmente nas minhas solicitações durante o uso dos laboratórios multiusuários deste departamento.

À equipe do biotério da UFPR: Luana Mazepa, Gilmara Polak, Iselen Ivanoski, Ana Novack, Sirlei Swirkovski., Felipe Ponchielli, Murilo Velozo, Alvaro de Almeida, Douglas dos Santos, Eliel Sepulveda, Antonio Marcos Carrilho e Bruno Bastos Teixeira. Eles foram muito importantes pois me auxiliaram em tudo o que precisei no biotério e nos cuidados dos animais durante quase 2 anos na fase de experimentação animal.

Aos meus colegas da BioCelMol que estivemos juntos nas disciplinas, nos eventos dos doutorandos, no Simpósio Araucária. Agradeço o compartilhamento dos seus conhecimentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Metabolismo Celular que convivemos durante este período com as ajudas nos dias de coletas de materiais, nos seminários e nas festas de aniversário. Também às professoras Fabíola Iagher e Márcia Appel pelas palavras de incentivo e ânimo que sempre tinham para mim em nossas conversas. Estas palavras foram de grande valia.

A todos os discentes que colaboraram com esta pesquisa: Lucas Alvarenga, Luiza Loyola, Lucas Farias, Marina Wolff Branco, Sophia Bileski, Giulia Alves, Gabriele Cordeiro, Eloíse Otto, Letícia Ramalho, Daniel Perilo, Fernanda de Souza, Guilherme de Oliveira. Jovens comprometidos comigo e consequentemente com o projeto. Nos divertimos juntos e ramos muito nos cuidados e treinos com os animais.

Ao pesquisador Walter Krause Neto que concedeu todo o suporte técnico e científico para o uso do modelo de escada. Acabou virando meu amigo. Só tem um defeito: é corintiano.

A minha amiga e irmã de coração, Renata Campos. Mesmo longe fisicamente, sempre me acompanhou de perto durante todos estes anos sempre com palavras sábias, com amor e cuidado comigo.

A Bruna Comotti de Oliveira, se tornou minha amiga de forma gradativa. Mesmo sendo diferentes em muitos aspectos, aprendemos a nos respeitar e unir forças! Meus agradecimentos do fundo do meu coração neste último 1 ano e 4 meses.

A recém mamãe Stephanie Carvalhal, já nos demos bem na nossa primeira conversa quando entrei no laboratório antes do doutorado. Também embora sejamos diferentes, acabamos sempre nos entendendo e como os nossos cafés eram bons! Agora terá que levar trufas de menta na minha casa!

Ao meu amado filho Lucas Lima, fruto de um grande amor (Marcos) que nos deixou tão cedo e que nos fez ficarmos sempre muito juntos e cúmplices da vida. Sempre atento ao desenvolvimento do doutorado. Pacientemente me ouvia falar da minha pesquisa e sempre tinha palavras de ânimo e sempre orando pela minha vitória acadêmica. I love you so much!

A minha nora Gabrielle Lima que há 1 ano e 6 meses tem feito parte deste time de 3! Obrigada pelas orações e palavras de ânimo! E para completar, este casal

me dará um presente maravilhoso de 50 anos: Um neto a caminho para 2022. Amo vocês!

Aos meus familiares que me acompanharam com as minhas histórias no grupo da família, mesmo eu tentando traduzir em uma linguagem acessível sobre a minha pesquisa, sempre havia dúvidas e sempre diziam que eu era meio maluca de tanto estudar.

Aos meus irmãos da Igreja Cristã Maranata que oraram junto comigo ao longo de todo este doutorado, em especial deixo o meu agradecimento para a Dorotea Winter, Julia Ribeiro, Priscila Freitas, Claudia Manfrim, Normando Ribeiro, Jonatas Winter, Flavia Meireles, Fernando Meireles, Mario Mendes Jr e Daniele Winter Mendes.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha orientadora Katya Naliwaiko, pois aprendi com ela a vencer as minhas dificuldades acadêmicas e o medo em trabalhar com experimentação animal.

Ao meu coorientador Luiz Claudio Fernandes que me fazia pensar em sempre buscar respostas para os desafios da pesquisa. O seu bom humor sendo a sua marca registrada. What's up? Esta frase sempre me lembrará você, prof. LC.

Ao colega de laboratório Matheus Felipe Zazula que me ensinou muito sobre músculo esquelético, técnicas histológicas e muito mais. Aprendi com ele a dissecar o músculo plantar, que alegria o dia em que ele me ensinou! Menino ligado nos 220 V! Desejo todo o sucesso a você em sua trajetória acadêmica e profissional.

Ao discente Luiz Fernando Martins, decidido em suas ações e me lembro até hoje como foi a entrevista para entrar como PVA e depois como IC. Um jovem totalmente diferenciado, pois, ele soube entender as necessidades técnicas do desenvolvimento da pesquisa e me auxiliou em tudo o que pode e como as nossas conversas sobre músculo e assuntos da vida cotidiana foram muito proveitosas. Um parceiro de trabalho fundamental neste período de pandemia. Desejo que você seja muito próspero em sua carreira profissional.

Nesta pandemia foi fundamental a união destas pessoas comigo para que estratégias fossem montadas e colocadas em prática pois muitas coisas aconteceram nestes últimos tempos. A professora Katya conduziu tudo com maestria e a sensibilidade que precisava para este momento tão delicado que o mundo está

vivendo mas em especial no nosso Brasil! O meu profundo agradecimento e desejo que vocês sejam felizes!

E por fim, a Deus! A Ele toda honra, toda glória e todo o louvor porque a minha vida pertence a Ele e todos os dias tenho escolhido servi-Lo e Ele me sustentou com mão forte!

Não to mandei eu? Esforça-te e tem bom ânimo; não pases, nem te espantes, porque o Senhor, teu Deus, é contigo, por onde quer que andares.
(Josué 1:9)

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde reportou em 2019 que a população mundial de pessoas com idade superior a 65 anos era superior a 700 milhões. Estima-se que esta parcela da população tenha crescido de 6% em 1990 para 9% em 2019 e que possa chegar a 16% da população mundial em 2050. O processo de envelhecimento provoca alterações morfofuncionais em vários tecidos, entretanto seus efeitos sobre a musculatura esquelética são perceptíveis, pois se refletem em perda da massa e função muscular. Na busca por melhorar a qualidade de vida da população idosa, assim como sua autonomia, diversas estratégias têm sido empregadas para minimizar o declínio muscular esquelético. Neste sentido estratégias não farmacológicas como o treinamento resistido e a suplementação com ácido graxo ômega-3 têm sido utilizadas para prevenir ou controlar as alterações na musculatura esquelética decorrentes do envelhecimento. Neste trabalho investigamos como o envelhecimento afeta os parâmetros bioquímicos, celulares dos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL) e suas relações com a função muscular, em ratos Wistar de 9, 13 e 17 meses. Avaliamos o efeito de 8 semanas de exercício resistido (ER), 8 semanas de suplementação com óleo de peixe, rico em omega-3 (OP) e a associação de ambos sobre estes parâmetros. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: grupo sedentário (S), grupo suplementado (OP), grupo exercitado (EX) e, grupo exercitado suplementado com OP (EOP). O treinamento resistido foi realizado 3 vezes por semana e a suplementação diária com 1,0 g/kg de OP. Após estes procedimentos, estes grupos foram eutanasiados e foram determinados os marcadores bioquímicos de danos celulares, parâmetros morfofuncionais pelo emprego de citoquímica e microscopia de luz, da massa e comprimento muscular, massa corporal e força de resistência máxima. Os resultados mostram que durante o envelhecimento, no grupo sedentário houve aumento das concentrações de marcadores de danos celulares, que se refletiram em alterações bioquímicas e metabólicas nos músculos estudados, bem como na redução da força de resistência máxima. Nos grupos EX, OP e EOP encontramos que o exercício e a suplementação foram capazes de melhorar a força de resistência máxima, entretanto seus efeitos, em nível celular, são diferentes. Nenhuma das estratégias foi capaz de gerar hipertrofia, mas foi capaz de recuperar a força dos animais. No grupo EX encontramos aumento de danos celulares e modificação das características metabólicas das fibras do EDL. No grupo OP houve redução de danos bioquímicos e preservação das características metabólicas das fibras. A associação das duas estratégias (EOP) permitiu identificar efeitos semelhantes, entretanto o comportamento das variáveis manteve-se mais próximo do grupo OP. Os resultados sugerem que exercício resistido e suplementação atuam por mecanismo distintos no controle do processo de envelhecimento musculoesquelético.

Palavras-chave: Envelhecimento. Treinamento resistido. Omega-3. Danos Oxidativos. Músculo esquelético.

ABSTRACT

World Health Organization reported in 2019 that 700 million people worldwide were 65 years old. In 1990 grew from 6% to 9% e it has been estimated will be 16% in 2050. Ageing process causes morpho functional alterations in several tissues, however its effects on skeletal muscle are more pronounced due to muscle mass loss and function. Seeking better improvement in quality of life some strategies have been used to delay skeletal muscle decline. To do so non-pharmacological strategies such as resistance training (RT) and n-3 omega fatty acids have been used to prevent or control alterations in the skeletal muscle in ageing. Here we investigate the effect of ageing on biochemical parameters, cell and function of soleus and EDL muscles and their relations with loss of functionality in rats 9, 13 and 17 months old. We investigate the effect of 8 weeks of RT, 8 weeks under fish oil (FO) supplementation and both strategies associated on these parameters. The animals were set into 4 groups named sedentary (S), FO supplemented (FO), exercised (EX) and exercised and FO supplemented (EFO). RT was done 3 times per week; FO supplementation daily with 1.0 g/day. At the end of 8 weeks the animals were killed and we determined biochemical markers of cell damage, morpho functional parameters by using cytochemical and optical microscopy, muscle length and mass, body weight and maximal resistance force (MRF). In the S group we found increase in the concentration of damage cell biomarkers leading to biochemical and metabolic alterations in both muscles studied, as well as reduction in the MRF. In the EX, OP and EOP groups we found that exercise and FO improved MRF, however their effects, at cellular level, are quite different. None of strategies cause hypertrophy but were able to restore force in both groups. In the EX group there were increase in the cellular damages and modification in the metabolic characteristic of EDL fibers. In the OP group there was a reduction in the biochemical damages and the metabolic characteristics of EDL fibers were preserved. Association of both strategies (EOP) caused similar effects of those isolated however they were more similar to OP supplementation. The results suggest that resistance exercise and supplementation act by different mechanisms to control the musculoskeletal aging process.

Keywords: Aging. Resistance Training. Omega-3. Oxidative Damage. Skeletal muscle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESTRUTURA CONDENSADA LINEAR DOS PRINCIPAIS AGs n-3 E n-6	25
FIGURA 2 – BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS, MONOINSATURADOS E POLIINSATURADOS	26
FIGURA 3 – REDUÇÃO TETRAVALENTE DO OXIGÊNIO MOLECULAR NA MITOCÔNDRIA ATÉ A FORMAÇÃO DE ÁGUA.....	32
FIGURA 4 – CAMINHOS PARA A FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DO METABOLISMO DO OXIGÊNIO	34
FIGURA 5 – APARATO PARA TESTE DE CARGA CARREGADA MÁXIMO E TREINAMENTO RESISTIDO	48
TABELA 1 – EXEMPLIFICAÇÃO DA SESSÃO DE TREINAMENTO RESISTIDO ...	50
FIGURA 6 – FOTOMICROGRAFIA ILUSTRATIVA DO MÚSCULO ESTRIADO DE RATO	53
FIGURA 7 – TIPO DE FIBRAS MUSCULARES EVIDENCIADAS PELA TÉCNICA HISTOENZIMOLÓGICA DE NADH-TR.....	54
FIGURA 8 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO EDL.....	59
FIGURA 9 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO EDL	60
FIGURA 10 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO SÓLEO	61
FIGURA 11 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO SÓLEO	62
FIGURA 12 – PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS DOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL	63
FIGURA 13 – VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL E FUNÇÃO MUSCULAR	64
FIGURA 14 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DOS MODELOS: BIOQUÍMICA, CARACTERÍSTICAS CELULARES E TAMANHO MUSCULAR PARA OS MÚSCULOS EDL E SOL.....	66
FIGURA 15 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS.....	67

FIGURA 16 – CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS A PARTIR DE REGRESSÕES MULTIVARIADAS	68
FIGURA 17 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO EDL EM ANIMAIS COM 9 MESES DE IDADE	69
FIGURA 18 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO SÓLEO EM ANIMAIS COM 9 MESES ..	70
FIGURA 19 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO EDL EM ANIMAIS COM 9 MESES	71
FIGURA 20 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO SÓLEO EM ANIMAIS COM 9 MESES	72
FIGURA 21 – AVALIAÇÃO DE PESO E COMPRIMENTO DOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL EM ANIMAIS COM 9 MESES.....	73
FIGURA 22 – VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL E DA FUNÇÃO MUSCULAR EM ANIMAIS DE 9 MESES.....	74
FIGURA 23 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO EDL EM ANIMAIS COM 13 MESES	75
FIGURA 24 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO SOLEO EM ANIMAIS COM 13 MESES	76
FIGURA 25 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO DO EDL EM ANIMAIS COM 13 MESES	77
FIGURA 26– AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO SÓLEO EM ANIMAIS COM 13 MESES	78
FIGURA 27 – AVALIAÇÃO DE PESO E COMPRIMENTO DOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL EM ANIMAIS COM 13 MESES.....	79
FIGURA 28 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL E FUNÇÃO MUSCULAR EM ANIMAIS COM 13 MESES	80
FIGURA 29 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO EDL EM ANIMAIS COM 17 MESES	81
FIGURA 30 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO SÓLEO EM ANIMAIS COM 17 MESES	82
FIGURA 31 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO DO EDL EM ANIMAIS COM 17 MESES	83

FIGURA 32 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO DO EDL EM ANIMAIS COM 17 MESES	84
FIGURA 33 – AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DO EDL E SOL EM ANIMAIS DE 17 MESES	85
FIGURA 34 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL E FUNÇÃO MUSCULAR EM ANIMAIS COM 17 MESES	86
FIGURA 35 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS PARA O MÚSCULO EDL	87
FIGURA 36 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS PARA O MÚSCULO SÓLEO	88
FIGURA 37– ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO CARACTERÍSTICAS CELULARES PARA O MÚSCULO EDL	89
FIGURA 38 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO CARACTERÍSTICAS CELULARES PARA O MÚSCULO EDL	90
FIGURA 39 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO TAMANHO MUSCULAR PARA O MÚSCULO EDL	91
FIGURA 40 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO TAMANHO MUSCULAR PARA O MÚSCULO SÓLEO	92
FIGURA 41 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS	93

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

AGPIs – Ácidos Graxos Poliinsaturados
AGPIs n-3 – Ácidos Graxos Poliinsaturados Ômega-3
AGs – Ácidos Graxos
Akt – Protein kinase B
BIA – Impedância bioelétrica
CAT – Catalase
Cu – Cobre
DHA – Ácido Docosaexaenoico
DXA – Densitometria de Composição corporal
EDL – Extensor Digital Longo
EPA – Ácido Eicosapentaenoico
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
EWGSPO – The European Working Group on Sarcopenia in Older People
FOXO3a – Forkhead box O 3a
G6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx – Glutational peroxidase
GSH – Glutathione
GSSG – Glutathione oxidada
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HO₂ – Hidroperoxila
LPO – Peroxidação lipídica
Mn – Manganês
mTOR – Mammalian Target of Rapamycin
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
O₂ – Oxigênio
O₂^{•-} - Superóxido
OH – Hidroxila
p70s6k – Ribosomal Protein 70-kDa S6 Kinase
PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase
Se – Selênio
SOD – Superóxido Dismutase
SOD-Cu/Zn – SOD dependente de cobre e zinco

SOD-Mn – SOD dependente de manganês

SOL – Sóleo

SPPB – Short Physical Performance Battery

TCCM – Teste de Carga Carregada Máximo

TR – Treinamento Resistido

TRP – Treinamento Resistido Progressivo

Zn – Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO E PROBLEMA	19
1.2	JUSTIFICATIVA.....	21
1.3	OBJETIVOS	22
1.3.1	Objetivo geral	22
1.3.2	Objetivos específicos.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	LIPÍDEOS, DIETA E SAÚDE HUMANA.....	24
2.1.1	Lipídeos e ácidos graxos	24
2.1.2	Dieta moderna	27
2.1.3	Ácidos graxos poliinsaturados omega-3 e seus benefícios	28
2.2	ENVELHECIMENTO.....	30
2.2.1	Danos oxidativos	31
2.2.2	Envelhecimento e a musculatura esquelética	35
2.2.3	Sarcopenia	36
2.3	ESTRATÉGIAS NÃO FARMACOLÓGICAS PARA CONTROLE DA SARCOPENIA	39
2.3.1	Exercício físico	40
2.3.2	Treinamento resistido no controle de massa muscular	41
2.3.3	Ação do ômega-3 no controle da massa muscular	42
2.3.4	Relação entre ômega-3 e treinamento resistido no controle da sarcopenia.....	44
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	46
3.2	LOCAL DA PESQUISA.....	46
3.3	ANIMAIS	46
3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	46
3.5	SUPLEMENTAÇÃO	47
3.6	TREINAMENTO RESISTIDO.....	47
3.6.1	Adaptação a escada.....	47
3.6.2	Teste de carga carregada máximo	49
3.6.3	Protocolo de treinamento resistido progressivo.....	50
3.7	OBTENÇÃO DOS MÚSCULOS.....	50

3.8	PARÂMETROS FENOTÍPICOS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	51
3.8.1	Contagem de sarcômeros em série	51
3.8.2	Preparação histológica	51
3.8.3	Contagem de fibras musculares	52
3.8.4	Área de secção transversa	52
3.8.5	Tipos de fibras musculares	53
3.8.6	Danos oxidativos	54
3.9	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	55
4	RESULTADOS	58
4.1	ALTERAÇÕES CELULARES NOS MÚSCULOS EDL E SÓLEO, DECORRENTES DO TEMPO	58
4.2	O EFEITO DAS INTERVENÇÕES PROPOSTAS SOBRE PROCESSO DE ENVELHECIMENTO MUSCULOESQUELÉTICO	68
4.2.1	Alterações musculares aos 9 meses de idade	68
4.2.2	Alterações musculares aos 13 meses de idade	74
4.4.3	Alterações musculares aos 17 meses de idade	80
4.4	ANÁLISE DE COORDENADAS PRINCIPAIS (PCoA)	86
5	DISCUSSÃO	94
6	CONCLUSÕES	114
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA PELA CEUA	134

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E PROBLEMA

O envelhecimento da população mundial tem feito com que pesquisadores de diversas áreas do saber busquem compreender as características deste processo, no intuito de identificar estratégias para um envelhecimento ativo. O processo de otimização das oportunidades de saúde, participação social e segurança tem como objetivo melhorar a qualidade de vida à medida que as pessoas envelhecem. Neste sentido para que a implementação e manutenção do envelhecimento ativo, diversas estratégias têm sido aplicadas para manter a independência do idoso na realização de suas atividades de vida diária de forma funcional e segura (CENTRO INTERNACIONAL DE LONGEVIDADE BRASIL, 2015).

Dentre os fatores determinantes para o envelhecimento ativo, alguns padrões de comportamento individual estão diretamente relacionados ao sucesso do ganho de autonomia, onde a adoção de estilo saudável de vida e participação ativa no cuidado da própria saúde ganham destaque. A escolha da prática de atividade física regular, uma dieta saudável e convívio social podem determinar a manutenção da independência do indivíduo para as suas atividades cotidianas durante o processo de envelhecimento (MARZETTI et al., 2017).

Durante o processo de envelhecimento algumas mudanças nas características corporais (aumento da gordura corporal e diminuição da massa muscular e óssea) em conjunto com o declínio na função cognitiva, produzem alterações motoras e de vigor físico que conduzem ao declínio na função física. Este declínio na função física aumenta significativamente o risco de incapacidade e perda de independência. Distúrbios do sono, depressão, aumento da fadiga, perda de acuidade visual e auditiva, também podem participar do agravamento deste cenário (BRADY; STRAIT; EVANS, 2014).

Com o envelhecimento, há perda progressiva de massa muscular esquelética, fator que pode contribuir para diminuição da função muscular (força e desempenho). A partir dos 30 anos, estima-se que ocorra redução de cerca de 0,1 a 0,5% da massa muscular esquelética a cada ano de vida, com aceleração acentuada deste processo depois dos 65 anos (CURCIO et al., 2016).

Segundo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (2015), o exercício físico tem sido postulado como a principal estratégia para prevenção do declínio da capacidade funcional em idosos. Neste sentido, o exercício físico representa a principal estratégia não farmacológica para controle das mudanças no músculo esquelético produzidas pelo envelhecimento (BROOK et al., 2015).

Está bastante esclarecido que o exercício físico regular é uma ferramenta importante para aumentar qualidade de vida e funcionalidade durante o envelhecimento. Além disso, o exercício é a intervenção mais acessível, eficaz e com diversos efeitos sobre o organismo. A partir da intensidade do exercício e de seus efeitos sobre o organismo, podemos identificar diversas modalidades de exercício, dentre elas o exercício resistido que caracteriza uma modalidade capaz de produzir aumento no tamanho e força do músculo esquelético, em especial nos indivíduos em processo de envelhecimento (RADER et al., 2016).

O exercício resistido tem sido postulado como o modelo primário para o estudo da hipertrofia músculo esquelético, a partir do uso de sobrecarga progressiva. A prescrição do exercício resistido envolve o tipo de exercício, volume da sessão do exercício, duração do período de repouso entre as séries e exercícios, frequência do treinamento e intensidade do exercício (KRAEMER; FLECK; DESCHENES, 2016).

Embora a literatura aponte o exercício físico regular como a melhor estratégia para combater e reverter o declínio físico, é preciso considerar que a adesão à prática de atividade física pode variar de acordo com as características físicas e hábitos de vida dos indivíduos, além disso condições desabilitantes podem representar um impedimento à prática de atividade física regular. Portanto, torna-se imprescindível identificar outras estratégias que possam ajudar na prevenção e controle do envelhecimento muscular. Neste sentido, a suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (AGPIs n-3), por seu efeito anti-inflamatório e por participar da regulação de processos de transdução de sinal, pode representar uma alternativa em especial para indivíduos portadores de condições incapacitantes ou àqueles com resistência à prática regular de atividade física (CALDER; YAQOOB, 2009).

O papel dos AGPIs n-3 na saúde muscular é um tema emergente, pois a partir de suas propriedades tem sido descrito como moléculas capazes de melhorar processos celulares que melhoram a fisiologia da célula muscular. O músculo esquelético se caracteriza como tecido de grande plasticidade e capacidade adaptativa, podendo responder de maneira rápida a variações na homeostase do

organismo. Alterações no perfil da dieta podem refletir nos parâmetros musculares, alterando positiva ou negativamente a função muscular em vários aspectos (NARICI; FRANCHI; MAGANARIS, 2016). Tem sido sugerido que os AGPIs n-3 podem regular parâmetros celulares em diferentes níveis, desde características de membrana até expressão gênica, e desta forma promover regulação e manutenção do equilíbrio de proteínas totais, sugerindo seu potencial efeito para controle da redução de massa muscular (JEROMSON et al., 2015).

Ainda, é sabido que durante o processo de envelhecimento há facilitação do quadro de estresse oxidativo, uma vez que alterações no equilíbrio entre o sistema antioxidante e oxidante do organismo se estabelecem com o curso da idade. O estresse oxidativo tem sido reconhecido como um dos principais contribuintes para o envelhecimento ou para o surgimento de doenças relacionadas à idade, também tem sido sugerido seu envolvimento no desenvolvimento da sarcopenia (SULLIVAN-GUNN; LEWANDOWSKI, 2013).

Desta forma, a prevenção e controle das mudanças musculares no curso do envelhecimento representa a principal estratégia para melhorar a autonomia e qualidade de vida do idoso. Cenários que contribuam para redução da frequência de danos oxidativos ou ainda que otimizem a resposta muscular fisiológica, aumentando a síntese de proteínas e a sensibilidade muscular, podem produzir melhor força e resistência, melhorando por conseguinte a qualidade de vida (BARBIERI; SESTILI, 2012; FULLE et al., 2004).

Neste sentido, a identificação de possíveis estratégias que sejam complementares ou substitutivas ao exercício físico, em especial aquelas não farmacológicas, pode ser de grande relevância em termos de saúde pública se considerarmos a pirâmide etária em diversos lugares do mundo, bem como compreender os mecanismos que desaceleram o envelhecimento e suas repercussões no músculo esquelético.

1.2 JUSTIFICATIVA

É sabido que durante o envelhecimento, a perda de força muscular não apenas decorre da redução na síntese proteica, mas também pela refratariedade dos músculos a determinados sinais hormonais, fato que torna a prática regular de exercício físico fundamental para estimular o anabolismo muscular e reduzir a perda

de massa muscular relacionada ao envelhecimento. A nutrição adequada é um fator importante para o envelhecimento saudável pois pode reduzir o risco de incapacidades, favorecendo a manutenção das funções físicas e mentais, bem como a melhora da qualidade de vida durante o processo de envelhecimento. A ação de diversos nutrientes, entre eles, os AGPIs n-3, tem sido objeto de diversos estudos nas últimas décadas. O interesse terapêutico sobre estas moléculas, decorre da capacidade de ação destas sobre a função cerebral, sistema cardiovascular, função imunitária, estresse oxidativo, saúde óssea e função muscular. Associado aos hábitos alimentares, o exercício físico regular tem representado importante ferramenta para melhoria da qualidade de vida e da saúde em idosos, devido a seu amplo efeito sobre os sistemas fisiológicos.

Embora, os efeitos de AGPIs n-3 e do exercício como moduladores da funcionalidade celular estejam bem descritos na literatura, ainda restam muitos questionamentos sobre os mecanismos de ação pelos quais estes efeitos se estabelecem. A população humana caracteriza o principal objeto de estudo, o que caracteriza um fator limitante em especial para avaliações de processos celulares e moleculares. Este fato, torna imprescindível o emprego de modelos animais que permitam elucidar estes processos.

Assim, entendemos que o emprego de animais de diferentes idades possa mimetizar o curso de envelhecimento do músculo esquelético, permitindo entender: se AGPIs n-3 e exercício resistido são estratégias equivalentes, como estabelecem seus efeitos durante o processo de envelhecimento musculoesquelético sobre o controle de danos celulares e função muscular.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da suplementação com óleo de peixe e exercício resistido sobre marcadores de danos celulares e características musculares de ratos Wistar no processo de envelhecimento.

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as concentrações de marcadores bioquímicos de danos celulares nos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL);
- Identificar alterações histomorfométricas nos músculos sóleo e EDL, pela avaliação do número de fibras, área de secção transversal e sarcômeros em série;
- Identificar alterações nas proporções de fibras musculares tipo I, IIA e IIB no músculo EDL;
- Avaliar alterações de massa e comprimento muscular;
- Estimar a capacidade de resistência de força máxima;
- Relacionar alterações musculares encontradas com a capacidade de resistência de força máxima.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LIPÍDEOS, DIETA E SAÚDE HUMANA

2.1.1 Lipídeos e ácidos graxos

Os lipídeos são um grupo heterogêneo de moléculas que compartilham propriedades comuns como hidrofobicidade e alta solubilidade em solventes orgânicos. Nesta classe de compostos hidrocarbônicos podemos encontrar substâncias como gorduras, ceras, óleos, esteroides, terpenos, sabões, detergentes e sais biliares (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002). A variabilidade nos tipos de lipídeos, se deve às características de suas cadeias carbônicas, que diferem entre si em número de átomos de carbono e ligações entre eles, bem como na ramificação das cadeias hidrocarbônicas (BURDGE; CALDER, 2015). São a principal forma de armazenamento de energia na maioria dos organismos, por isso representam importantes componentes da dieta dos animais homeotérmicos, são fontes de ácidos graxos essenciais e podem participar da regulação de uma variedade de funções celulares, como a síntese de hormônios, transporte de vitaminas lipossolúveis e comunicação celular (SIMOPOULOS, 2003).

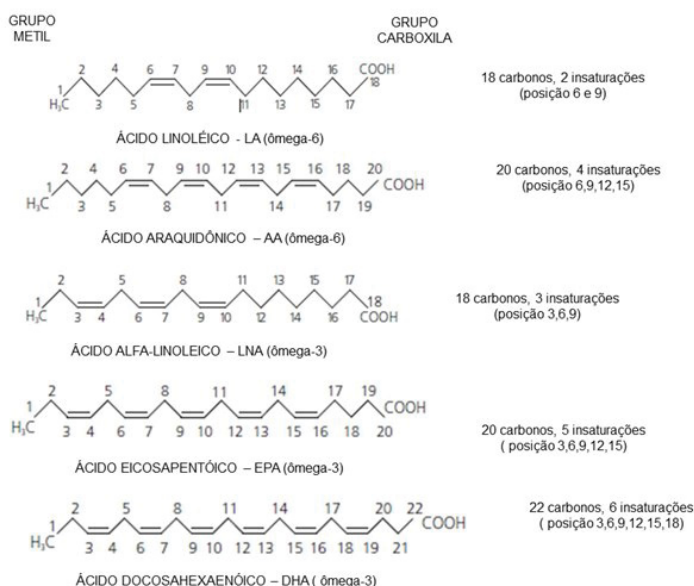
Os ácidos graxos (AGs), principais constituintes lipídicos, se encontram distribuídos em todos os tecidos dos organismos animais, uma vez que respondem pela estrutura das membranas celulares. Tem papel importante na regulação de processos metabólicos, na produção de eicosanoides e em processos de transdução de sinal (CALDER, 2015). Ácidos graxos são cadeias hidrocarbônicas com um grupo carboxila em uma extremidade e um metil grupo no outro, que podem apresentar comprimento variável entre 2 e 30 carbonos. Além disso, as moléculas de AGs podem apresentar diferentes graus de insaturação (a presença de duplas ligações) e que pertencem à classe dos ácidos carboxílicos. Características da cadeia hidrocarbônica, como comprimento, grau de insaturação e estrutura conformacional, determinam a estrutura e as propriedades físico-químicas dos AGs (ABDULKADER, 2015).

De acordo com o tamanho da cadeia carbônica, os AGs são classificados em: AGs de cadeia curta têm até 6 carbonos, os AGs de cadeia média têm 8-12 carbonos e os AGs de cadeia longa têm mais de 14 carbonos. Os carbonos são geralmente numerados a partir do grupo carboxila para o grupo metil. Os ácidos graxos mais

abundantes têm números pares de carbonos, arranjados em uma cadeia linear conforme demonstrado na figura 1 (BURDGE; CALDER, 2015).

De acordo com a presença ou ausência de duplas ligações ao longo da cadeia carbônica, os AGs podem ser classificados como saturados ou insaturados. O número de insaturações subdivide os AGs em: monoinsaturados que contêm apenas uma dupla ligação, e poliinsaturados que apresentam 2 ou mais insaturações. Conforme demonstrado na figura 1, a sequência das duplas ligações nos AGPIs é alternada por uma simples ligação ao longo da cadeia hidrocarbônica (CHOLEWSKI; TOMCZYKOWA; TOMCZYK, 2018).

FIGURA 1 – ESTRUTURA CONDENSADA LINEAR DOS PRINCIPAIS AGs n-3 E n-6



FONTE: Adaptado de Perini et al. (2010).

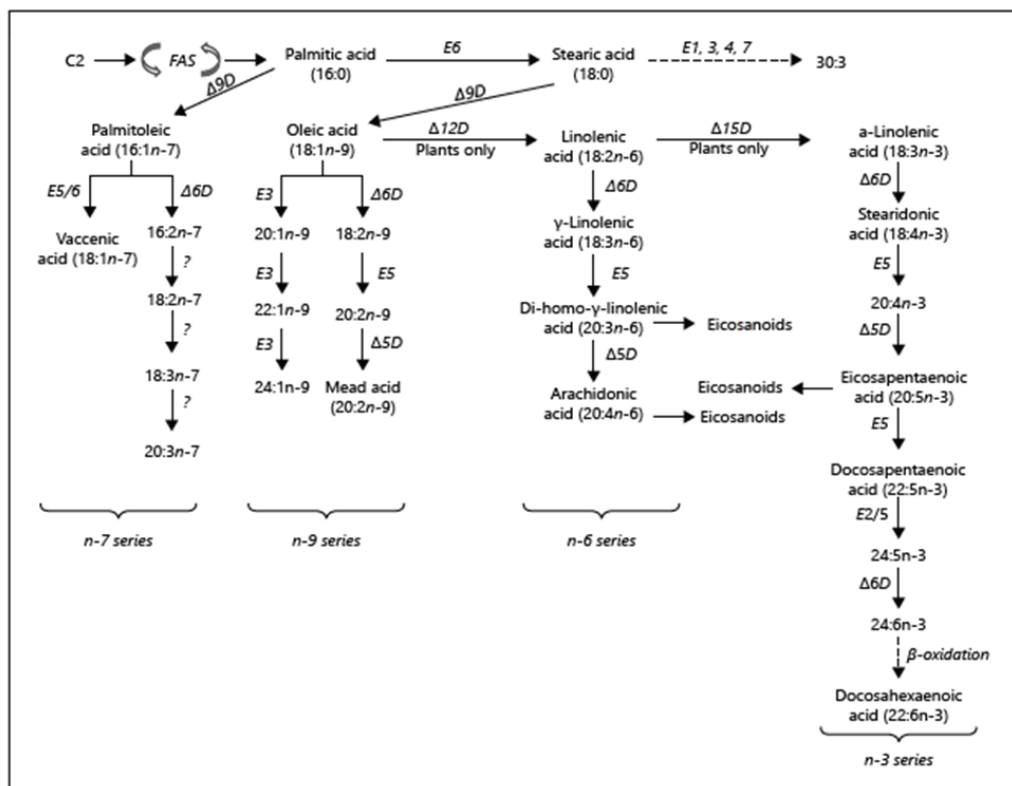
Considerando a estrutura dos ácidos carboxílicos foram desenvolvidos dois sistemas de nomenclatura para AGPIs. O sistema delta que se refere aos carbonos numerando-os a partir do carbono do grupo carboxila e o sistema ômega, mais comumente empregado, se refere aos carbonos numerando-os a partir do radical metila (CH_3 ; carbono ω) (CHOLEWSKI; TOMCZYKOWA; TOMCZYK, 2018).

O número, posição e orientação das duplas ligações ao longo da cadeia carbônica produzem pontos de inflexão na cadeia carbônica, alterando assim seu empacotamento quando os AGPIs estão inseridos nas membranas biológicas. Esta característica reduz a interação entre as cadeias carbônicas colocadas lado a lado e torna as membranas mais fluidas (ABDULKADER, 2015; BURDGE; CALDER, 2015).

Os AGs instaurados de origem biológica apresentam duplas ligações do tipo *cis*, ligações que ocorrem entre carbonos que estão do mesmo lado da cadeia em relação ao eixo da dupla ligação, o que confere dobras à cadeia. Estas modificações na estrutura conformacional, alteram as propriedades biofísicas dos AGs e refletem em alterações na fluidez das membranas (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018).

De acordo com a posição da primeira instauração, a contar do carbono ω , duas famílias de AGPIs podem ser identificadas: família ω -3 ou n-3 e ω -6. Na família n-3 os diferentes AGPIs são produzidos a partir do ácido α -linolênico (18:3 n-3, LNA), onde elongações e insaturações da cadeia parental, produzem os ácidos eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) e docosaexaenoico (22:6 n-3, DHA). De maneira semelhante, a família n-6, tem como precursor o ácido linoleico (18:2 n-6, LA), onde pelo mesmo processo de metabolização é obtido o ácido araquidônico (AA, 20:4 n-6) conforme demonstrado na figura 2 (BURDGE; CALDER, 2015).

FIGURA 2 – BIOSSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS, MONOINSATURADOS E POLIINSATURADOS



FONTE: Burdge e Calder (2015).

LEGENDA: E 1-7= Elongases; FAS: Síntese de ácido graxo, Δ = dessaturases.

Os organismos mamíferos são incapazes de sintetizar ALA (18:3 n-3) e LA (18:2 n-6) a partir da adição de insaturações à molécula do ácido oléico, pois não possuem as enzimas Δ -12 e Δ -15 dessaturase (LEE et al., 2016). Por este motivo ALA e LA são considerados essenciais e a dieta representa, obrigatoriamente, a única fonte de obtenção destes AGs para a síntese dos demais AGs de ambas as famílias (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018; INNIS, 2014).

2.1.2 Dieta moderna

Uma vez absorvidos pela mucosa intestinal, os lipídeos da dieta são transportados até o fígado, onde são metabolizados e então redistribuídos aos tecidos. Lá serão captados e empregados na biossíntese de membranas, na montagem de lipídeos de reserva (tecido adiposo), ou na síntese de moléculas de origem lipídica. Desta forma o perfil lipídico da dieta é um importante preditor das famílias de AGPIs que serão incorporadas em membranas ou armazenadas (BENATTI et al., 2004).

A dieta humana vem sofrendo importantes transformações ao longo da história. Variações nos hábitos de vida ou na localização geográfica das diferentes populações, produziram mudanças dramáticas em determinados momentos da trajetória humana (SIMOPOULOS; DINICOLANTONIO, 2016).

Em especial após a industrialização dos alimentos, a ingestão de alimentos com alto teor de ácidos graxos ômega-6 aumentou, acompanhada de redução no consumo de alimentos ricos em ácido graxo ômega-3 e antioxidantes. Estas mudanças resultaram em elevação da razão ômega-6 / ômega-3 sendo na dieta ocidental esta razão de 15-30:1, podendo alcançar valores ainda maiores em populações altamente industrializadas (SIMOPOULOS, 2002). Estudos prévios sugerem que a razão n-6/n-3 de 3:1 a 5:1 parecem ser a ideal para diminuir risco de câncer de mama, próstata, cólon e rins. Em outros casos, a razão de n-6/n-3 de 2:1 para 3:1 minimiza inflamação em pacientes com artrite reumatoide e uma razão n-6/n-3 de 5:1 mostrou ser efetiva em pacientes com asma (CANDELA; LÓPEZ; KOHEN, 2011).

As populações modernas passaram por drásticas alterações no estilo de vida, que incluem fatores como a dieta inadequada, inatividade física, estresse aumentado e que favorecem ao aparecimento de diversas doenças crônicas não transmissíveis

(DCNTs). Estas DCNTs tem como características epidemiológicas alguns fatores de risco que envolvem alterações mitocondriais, estresse oxidativo, inflamação, entre outros (KAUR; ALLAHBADIA; SINGH, 2018).

Dieta e nutrição são fatores importantes na promoção e manutenção de uma boa saúde ao longo de todo o curso de vida e desta forma, seus papéis como determinantes das DCNTs está bem estabelecido na literatura. A carga de doenças crônicas está aumentando rapidamente em todo o mundo. Em 2001, as doenças crônicas contribuíram com aproximadamente 60% do total de 56,5 milhões de mortes relatadas no mundo e aproximadamente 46% da carga global de doenças. Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que esta proporção da carga de DCNTs deve aumentar para 57% até 2020 (WHO, 2003).

Fatores de risco comportamentais, incluindo uso de tabaco, fatores físicos, inatividade e dieta pouco saudável são responsáveis por cerca de 80% das doenças coronarianas e doenças cerebrovasculares. Mais de 80% das mortes por complicações cardiovasculares e diabetes, e quase 90% das mortes por doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ocorreram em países de baixa e média renda, onde há significativo prejuízo alimentar (WHO, 2011).

O relatório da Organização Mundial da Saúde (2015) levantou dados gerais sobre DCNTs em diversos países do mundo sendo que no Brasil, a porcentagem de mortes advindas de DCNTs foi de 74%, totalizando 978 mil mortes e a probabilidade de mortalidade prematura devido a DCNTs foi de 19%. Neste sentido, estratégias de adequação da dieta podem representar importante cenário na promoção da saúde e prevenção de doenças (LOCKE; SCHNEIDERHAN; ZICK, 2018)

2.1.3 Ácidos graxos poliinsaturados omega-3 e seus benefícios

As propriedades terapêuticas dos AGPIs n-3 tem sido objeto de investigação em diversas abordagens que envolvem doenças como câncer, diabetes, obesidade, asma e doenças cardiovasculares (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018).

Diversos autores têm sugerido efeitos benéficos dos AGPIs n-3 sobre a saúde humana, demonstrando seus efeitos sobre fluidez da membrana, inibição de processos inflamatórios, modulação da secreção de citocinas por macrófagos e linfócitos, diminuição da suscetibilidade de desordens no ritmo ventricular do coração, inibição da agregação plaquetária e diminuição de síntese de triacilgliceróis pelo fígado

(WIKTOROWSKA; BEREZINSKA; NOVAK, 2015). Além disso, a metabolização de AGPIs por lipoxigenases e cicloxigenases, leva à produção de eicosanoides: moléculas bioativas derivadas de ácidos graxos com vinte átomos de carbono, e uma vez que os eicosanoides derivados da família ômega-3 apresentam ação anti-inflamatória, AGPIs n-3 podem exercer papel importante sobre o sistema imunitário e sobre parâmetros da resposta inflamatória (BAKER et al., 2016).

As alterações decorrentes do envelhecimento que ocorrem na absorção de nutrientes e mudanças de hábitos alimentares podem alterar a ingestão dietética, representando risco à saúde do idoso. Nutrientes específicos em particular os AGPIs n-3, podem apresentar efeito preventivo e atenuante das comorbidades em indivíduos idosos. Tais afirmações têm sido comprovadas em estudos realizados em idosos. Estes estudos revelam que AGPIs n-3 apresentam efeito amplo sobre os sistemas fisiológicos e podem ser percebidos pela melhora da função cognitiva, da função cardiovascular, por alterações no padrão imunitário e por melhora significativa do desempenho muscular e saúde óssea de idosos (MOLFINO et al., 2014).

Neste sentido, Logan e Spriet (2015) avaliaram o efeito do óleo de peixe rico em ômega 3 na força muscular e função física de idosas saudáveis da comunidade. A suplementação ocorreu por 12 semanas e foi identificado aumento de 4% de massa magra e 7% na capacidade funcional, demonstrando que a suplementação com óleo de peixe rico em ômega 3 pode ser uma estratégia para melhorar as condições físicas e metabólicas relacionadas à idade.

Tem sido demonstrado que a suplementação com AGPIs n-3, por 6 meses, promoveu aumento na síntese proteica muscular, associado ao aumento da expressão de mTOR e fosforilação da p70s6k, sugerindo uma possível via de ação destes lipídeos sobre o músculo. Estes achados também se relacionam com atenuação da resistência anabólica na captação de aminoácidos circulantes, parâmetro importante para avaliar a perda muscular em idosos (MANGANO et al., 2013).

Um estudo conduzido por 6 meses com idosas suplementadas com 4 cápsulas diárias mostrou aumento da massa muscular magra, força de preensão manual e aumento de força muscular de flexores e extensores de joelho quando comparado ao grupo controle (SMITH et al., 2011).

Tem sido sugerido que o mecanismo potencial de AGPIs n-3 para aumento da função contrátil esteja relacionado ao aumento da sensibilidade do músculo à

acetilcolina, para manter a função neuromuscular, o que se reflete em melhora da capacidade muscular e representa um fator importante para a compensação da perda de massa muscular esquelética (JEROMSON et al., 2015). Entretanto é sabido que AGPIs n-3 podem atuar em vários outros sítios celulares e regular eventos importantes para capacidade músculo esquelética, como expressão de proteínas, proliferação celular e transdução de sinal (ÚBEDA; ACHON; VARELA-MOREIRAS, 2012; GRAY; DA BOIT, 2013).

2 2 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento da população é um fenômeno global. Praticamente todos os países do mundo estão experimentando crescimento tanto do tamanho quanto da proporção de pessoas idosas na população. Em 2019, havia 703 milhões de pessoas com 65 anos ou mais na população global. Este número está projetado para dobrar para 1,5 bilhão em 2050. Globalmente, a parcela da população com 65 anos ou mais aumentou de 6% em 1990 para 9% em 2019. Tem sido projetado que essa proporção deve aumentar ainda mais, alcançando para 16 % em 2050, quando se espera que uma em cada seis pessoas em todo o mundo terá idade 65 anos ou mais (WHO, 2015).

O envelhecimento pode ser definido como declínio funcional dependente do tempo, que afeta todos os organismos vivos. É caracterizado pela perda progressiva da integridade fisiológica de diversos sistemas e tecidos, que acarretam disfunções em graus variados (BRATIC; LARSSON, 2013). Esta degeneração progressiva de diversos tecidos tem sido considerada, em especial para a população idosa, como fator de risco primário para o desenvolvimento de doenças crônico degenerativas não transmissíveis, tais como: doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, doenças neurodegenerativas, entre outras condições (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; NICCOLI; PARTRIDGE, 2012).

O processo de envelhecimento humano é complexo e individualizado pois compreende aspectos biológicos, psicológicos e sociais. O código genético é considerado o mecanismo básico etiológico-patológico do envelhecimento sendo influenciado por fatores internos tanto biológicos como psicológicos e por fatores externos como o ambiente social (DZIECHCIAŻ; FILIP, 2014).

Desta forma, considerando o aumento da expectativa de vida da população humana, o processo de envelhecimento populacional tornou-se objeto de estudo em diversos cenários nas áreas das ciências da saúde, humanas e sociais (ROS; CARRASCOSA, 2020). Acredita-se que devido ao contínuo aumento da expectativa de vida mundial, haja nos próximos anos, uma sobrecarga socioeconômica sobre os sistemas de saúde, uma vez que a fração da população idosa e longeva vem aumentando (CARRERA-HUESO, 2014). Desta forma, a procura por determinantes do envelhecimento e longevidade bem-sucedidos, tem crescido continuamente nas últimas décadas, com intuito de garantir à esta população autonomia e qualidade de vida (ANTON et al., 2015).

A busca por bases genética e moleculares do envelhecimento levou à identificação de genes relacionados com a manutenção da célula e de seu metabolismo, sugerindo o envolvimento de fatores genéticos na variação individual do fenótipo do envelhecimento. Pesquisas recentes demonstram que modificações epigenéticas, moduladas tanto pelo histórico genético quanto pelo estilo de vida, são muito sensíveis ao processo de envelhecimento (PASSARINO; DE RANGO; MONTESANTO, 2016).

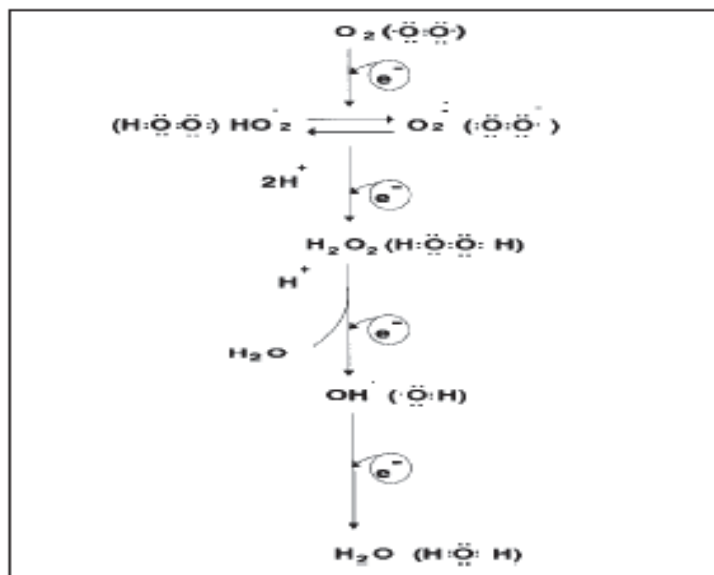
Embora os mecanismos pelos quais o envelhecimento se estabeleça ainda sejam pouco entendidos, tem sido proposto que a perda de capacidade vital esteja relacionada à falência de processos celulares importantes, que envolvem síntese de macromoléculas, conversão de energia, comunicação celular, reparo de DNA e membranas (WAGNER et al., 2016). Neste sentido, alterações do equilíbrio redox e no metabolismo oxidativo, podem representar importante fator para o acúmulo temporal de danos celulares, tais como peroxidação de lipídeos, danos em membrana, falência mitocondrial e do retículo endoplasmático (CALCINOTTO et al., 2019).

2.2.1 Danos oxidativos

As espécies reativas do oxigênio (EROs) são encontradas em todos os sistemas biológicos e em condições fisiológicas do metabolismo aeróbio. Tais moléculas são consideradas intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio (O_2), que se formam durante a redução tetravalente do O_2 (FIGURA 3). Neste processo podem ser formados por meio de reações inter-relacionadas os radicais: superóxido

($O_2^{\bullet-}$), hidroperoxila (HO_2), hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ZELICKSON et al., 2013).

FIGURA 3 – REDUÇÃO TETRAVALENTE DO OXIGÊNIO MOLECULAR NA MITOCÔNDRIA ATÉ A FORMAÇÃO DE ÁGUA



FONTE: Ferreira e Matsubara (1997).

Os mecanismos de geração de EROs ocorrem normalmente nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma, sendo a mitocôndria a principal fonte de geradora de EROs, devido à cadeia transportadora de elétrons (CADENAS; DAVIES, 2000). Em sistemas aeróbios, o equilíbrio entre os agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante é essencial. Em condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema antioxidante, existe um significativo risco do surgimento de danos celulares que podem atingir, macromoléculas, membranas e organelas celulares (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

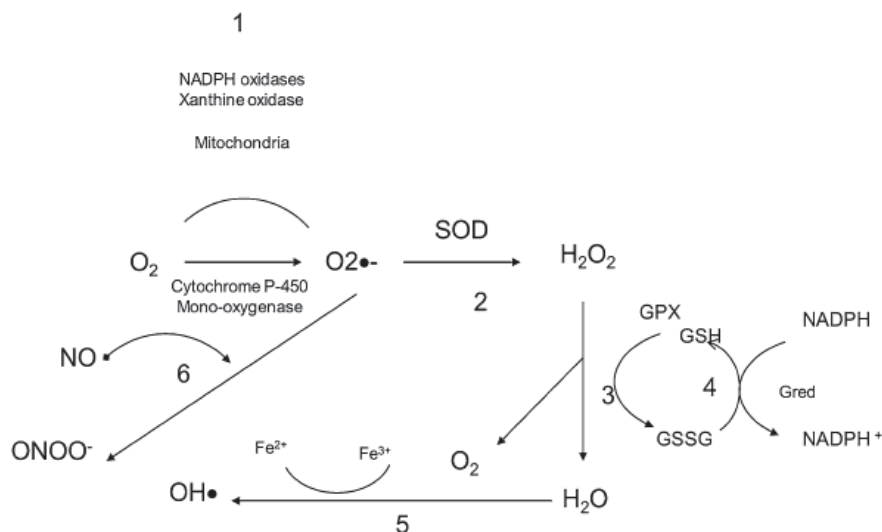
O sistema de defesa antioxidante tem a função controlar a ocorrência de danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas. As ações do sistema antioxidante podem ser conduzidas por diferentes mecanismos de ação: controlando a formação dos radicais livres ou das espécies radicalares, impedindo a ação destes ou favorecendo o reparo e a constituição das estruturas biológicas lesadas (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

De uma forma geral, o sistema antioxidante é dividido em enzimático e não-enzimático. O sistema antioxidante enzimático é constituído pelas enzimas:

Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx). O sistema não enzimático compreende: vitamina A (β -caroteno), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e selênio (Se), carotenoides, entre outros (DAVIES, 2000).

A SOD é responsável por catalisar a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As enzimas CAT e GPx atuam para impedir o acúmulo de H_2O_2 . Esta ação integrada é importante pois o H_2O_2 , por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediadas por ferro e cobre, favorece a formação do radical OH. Este radical é o principal iniciador da peroxidação lipídica, sendo capaz de agir também sobre as proteínas, alterando a estrutura e função biológica. A GPx está incluída no ciclo redox da glutathione por isso este ciclo precisa funcionar de maneira adequada para que a ação da GPx ocorra neste sistema de defesa antioxidante. Ainda tem a enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) que também participa deste ciclo com a responsabilidade de fornecimento da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) necessário para a ação da glutathione redutase que regenera a GSH a partir da GSSG (FIGURA 4). Além disso, a atividade destas enzimas depende da participação de cofatores enzimáticos, desta forma: SOD é dependente de cobre e zinco no citoplasma (SOD-Cu/Zn) e na mitocôndria necessita do manganês (SOD-Mn). A GPx pode apresentar-se no citoplasma ou mitocôndria e depender ou não do selênio (BOUZID et al., 2015).

FIGURA 4 – CAMINHOS PARA A FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DO METABOLISMO DO OXIGÊNIO



FONTE: Bouzid et al. (2015)

LEGENDA: Reação 1: radical superóxido é formado pelo processo de redução do oxigênio molecular, mediado por diversas vias, tais como envolvendo a NADPH oxidase e xantina oxidase. Reação 2: o radical superóxido é desmutado pela SOD para H₂O₂. Reação 3: O H₂O₂ é degradado pela GPx, que requer GSH, como doador de elétron. Reação 4: a glutatona oxidada (GSSG) é reduzido de volta a GSH pela enzima glutatona redutase (Gred), que usa o NADPH como doador de elétrons. Reação 5: alguns metais de transição (por exemplo, Fe²⁺) podem quebrar o peróxido de hidrogênio em um radical hidroxila reativo (OH•; reação de Fenton). Reação 6: a radical ânion superóxido pode combinar com óxido nítrico (NO) para produzir peroxinitrito (ONOO•).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas do metabolismo do O₂, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica (LPO). A LPO acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, acarretando perda na seletividade na troca iônica e liberação de conteúdo de organelas. Além disso, a LPO pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (NIKI et al., 2005).

As EROs também estão envolvidas na regulação de vias celulares (sinalização redox), sendo assim a definição mais adequada para estresse oxidativo seria o rompimento da sinalização redox e controle celular porque estudos demonstraram que há um desequilíbrio redox em compartimentos celulares e via de sinalizações que podem levar a alterações celulares, sem estar ocorrendo desbalanço entre pró-oxidantes e antioxidantes. Portanto, o estresse redox/estresse oxidativo é um processo complexo. O impacto no organismo depende do tipo de oxidação, o sítio

e a intensidade desta produção, na composição e atividades dos vários antioxidantes e a habilidade em reparar este sistema (RAHAL et al., 2014).

As EROs podem danificar proteínas através da reação direta com elas ou por meio indireto, através de seus produtos secundários gerados por reações com outras moléculas. Essas reações de oxidação promovem modificações que podem acarretar a perda da função estrutural ou catalítica da proteína, além de torná-las mais susceptíveis a degradação proteolítica. O estresse oxidativo e a carbonilação de proteínas musculares tem atraído a atenção em diversos estudos devido à alta amplitude das mudanças redox durante os ciclos de repouso-contração (FEDOROVA; BOLLINENI; HOFFMANN, 2013).

Diversas teorias são estudadas para entender o processo de envelhecimento e Harman (1956) defendia que o envelhecimento está ligado aos radicais livres. A teoria sustenta a ideia de que o envelhecimento normal seja desencadeado e acelerado pelos radicais livres, moléculas instáveis e reativas capazes de reagir com os constituintes do organismo em busca de maior estabilidade. Os radicais livres provavelmente surgem principalmente por meio de reações envolvendo oxigênio molecular catalisado na célula pelas enzimas oxidativas e no tecido conectivo por traços de metais como ferro, cobalto e manganês. Esta teoria dos radicais livres do envelhecimento proposta por Harman tem sido estudada e aperfeiçoada ao longo dos anos, pois ela postula um papel causal das EROs no processo de envelhecimento no que diz à senescência que não quer dizer que o envelhecimento global do organismo. Portanto, o direcionamento das pesquisas deve preconizar a resolução sobre a biologia básica das células no envelhecimento e o controle redox desses mecanismos para gerar estratégias terapêuticas para melhorar a saúde humana e a longevidade (CHANDRASEKARAN; IDELCHIK; MELENDEZ, 2017).

Uma vez que no curso de vida, alterações celulares se refletem em perda de qualidade de vida e autonomia, uma série de condições humanas tem sido consideradas decorrentes do processo de envelhecimento (WAGNER et al., 2016; BYUN et al., 2015).

2.2.2 Envelhecimento e a musculatura esquelética

Com o envelhecimento, ocorre significativo declínio funcional do sistema musculoesquelético e neuromuscular, com modificações que produzem alterações da

capacidade funcional do idoso (HUNTER; PEREIRA; KEENAN, 2016). Estes sistemas têm sido objeto de estudos, cujos resultados práticos apoiaram o desenvolvimento de políticas públicas que visam diminuir as limitações funcionais geradas pelo envelhecimento (GALLON et al., 2011; FERNANDES et al., 2012). Tem sido demonstrado que o envelhecimento também predispõe o músculo esquelético a níveis aumentados de estresse oxidativo, sendo assim alvo de estudos que visam compreender o papel do estresse oxidativo na mediação do declínio muscular induzida por desuso e perda muscular associada à sarcopenia, e a partir disso desenvolver estratégias farmacológicas e não farmacológicas para modular os mediadores desta cascata que envolve o equilíbrio redox (MENG; YU, 2010).

A mobilidade é uma habilidade física importante que uma vez afetada pode comprometer a qualidade de vida, com forte valor prognóstico para incapacidade e sobrevida nos indivíduos, em especial durante o processo de envelhecimento. Uma vez, o sistema neuromuscular estando comprometido isto refletirá sobre a autonomia e no âmbito psicossocial dos idosos. O envelhecimento é cercado pela complexa interação entre fatores biológicos, psicológicos e sociais que afetam o estado de saúde de um indivíduo e o risco de doenças. Dentro das alterações fisiológicas, o sistema músculo esquelético sofre alterações que se não controladas podem indicar um cenário de comprometimento gradativo da função corporal relacionada às atividades gerais do cotidiano do idoso refletindo em sua independência funcional (ANTON et al., 2015; FERRUCCI et al., 2016).

Neste sentido, com o intuito desenvolver e aprimorar a capacidade do idoso para o enfrentamento das mudanças ocorridas durante este estágio da vida, diversas abordagens têm buscado identificar estratégias que possam atenuar os efeitos deletérios do envelhecimento e por consequência melhorar a qualidade de vida da população idosa (MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016).

2.2.3 Sarcopenia

O agravamento das alterações impostas pelo envelhecimento à musculatura esquelética, pode culminar com a perda progressiva de massa muscular e, por conseguinte, de função muscular (BEAUDART et al., 2016). Este processo, conhecido como sarcopenia, pode ser caracterizado pela redução do tamanho ou do número de fibras em decorrência da degradação celular e proteólise, que produz a atrofia e perda

de desempenho muscular ao longo do tempo. Dentre as fibras musculares com diferentes metabolismos, tem sido sugerido que fibras musculares de contração rápida apresentem maior tendência à degeneração (SAYER et al., 2013; PITHON-CURI, 2013).

Para o diagnóstico de sarcopenia, segundo *The European Working Group on Sarcopenia in Older People* (EWGSPO), recomenda-se a identificação obrigatória de diminuição de massa em conjunto com diminuição de função muscular (força ou desempenho). O uso dos dois critérios para o diagnóstico, justifica-se pelo fato que a força muscular não depende unicamente da massa muscular, uma vez que a relação entre força e massa muscular não é linear (CRUZ-JENTOFT et al., 2019; CRUZ-JENTOFT et al., 2010; SAYER et al., 2013).

A definição de sarcopenia primária se dá pelas alterações neuromusculares relacionadas à idade definidas pela alteração de massa muscular, estimada pelo emprego de densitometria de composição corporal (DXA), ressonância magnética, tomografia computadorizada ou por impedância bioelétrica (BIA) e pela alteração de força muscular, através da avaliação de força de preensão palmar e o teste de sentar-levantar da cadeira (SHAFIEE et al., 2017; CRUZ-JENTOFT et al., 2019). O desempenho muscular pode ser avaliado através do teste de velocidade da marcha, *Short Physical Performance Battery* (SPPB), *Time up and go test* ou teste de caminhada de 400 metros (BEAUDART et al., 2016; BAUER et al., 2019).

A composição corporal dos animais utilizados em modelos experimentais pode ser feita pelo emprego da DXA desta forma avaliando percentual de massa magra (AHTIAINEN et al., 2018). Em estudos que investigam o índice de sarcopenia (mg/g) em modelos animais com uso de camundongos revelaram que a progressão da sarcopenia acontece entre 18 e 30 meses de vida podendo iniciar aos 15 meses com evidente aos 24 meses e pronunciado em 29 meses de vida (SHAVLAKADZE; MCGEACHIE; GROUNDS, 2010). Um estudo piloto com camundongos com idades de 13 e 23 meses mostrou que a ressonância magnética nuclear de alta resolução é capaz de detectar mudanças nos metabólitos do músculo esquelético, abrindo caminho para futuras investigações metabólicas detalhadas na sarcopenia do envelhecimento (SOBOLEV et al., 2017).

Em modelos animais utilizando ratos que testam a função muscular podemos destacar: teste de campo aberto cujo objetivo é avaliar a atividade locomotora (TATEM et al., 2014), teste de preensão que tem como objetivo avaliar força em músculos do

membro anterior (BERTELLI; MIRA, 1995), o teste de carga carregada máximo que objetiva mensurar a capacidade do animal em carregar de forma voluntária com estímulo externo ou não, uma carga determinada carga pré-determinada até a falha (HORNBERGER; FARRAR, 2004; KRAUSE NETO et al., 2017) e por fim, encontramos o teste de levantamento de peso (LOCHYNSKI et al., 2016).

Em um estudo sobre envelhecimento e músculo esquelético utilizando ratos Wistar de 2, 6, 13 e 24 meses, expostos ao teste de carga carregada máximo como um teste de função muscular, foi possível detectar importantes marcadores de sarcopenia a partir de 13 meses de idade nos roedores (SIQUEIRA FILHO, 2012).

Uma terceira possibilidade de investigação aliada aos estudos de perda de massa muscular e ativação neural diminuída é a transferência de força no conjunto das proteínas que estabilizam e ancoram as proteínas contrateis do músculo esquelético que também estão alteradas no processo de envelhecimento musculoesquelético (HUGHES; WALLACE; BAAR, 2015). Portanto, podemos identificar biomarcadores de sarcopenia a partir de diferentes sítios fisiopatológicos: junção neuromuscular, sistema endócrino, fator de crescimento, turnover proteico, fatores mediados pelo comportamento (nível de atividade física, obesidade, estado nutricional, vias mediadas por inflamação e fatores relacionados ao balanço redox) (CURCIO et al., 2016).

Em 2018, O EWGSPPO reuniu trabalhos relevantes que envolviam prevenção, diagnóstico e tratamento da sarcopenia, bem como elencou as condições clínicas que se relacionavam ao quadro de sarcopenia, nos voluntários das pesquisas. A partir deste ano, a sarcopenia tornou-se reconhecida como uma doença muscular na Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID-10) (CRUZ-JENTOFT et al., 2019).

De acordo com estatísticas epidemiológicas, estima-se que há alta prevalência de sarcopenia na população idosa. Em geral, a prevalência em homens são cerca de 25% e em mulheres na média de 20%. Globalmente, a prevalência da sarcopenia em idosos varia entre 3,6-50% dependendo do país, etnia, critérios de diagnóstico e disponibilidade de estabelecimentos/serviços de saúde à população idosa. Com o número crescente de pessoas com sarcopenia, a doença é associada ao declínio funcional que podem resultar em quedas, fraturas e outras incapacidades, desta maneira aumentando a mortalidade e o aumento com gastos com diversos profissionais da saúde (LEE et al., 2018).

A sarcopenia não é um processo exclusivo da senescência, podendo ser identificada em determinadas patologias crônicas degenerativas que podem ou não coexistir com o envelhecimento (MARTY et al., 2017). Este processo não inclui apenas perda de tecido e disfunção contrátil, mas também disfunções endócrinas e metabólicas, que conduzem a um quadro de inflamação sistêmica de baixo grau relacionada à idade. Doenças como o câncer, a doença de Parkinson, as distrofias musculares, a esclerose múltipla e a síndrome da imunodeficiência adquirida, produzem severa redução de massa muscular, provocando disfunções importantes (BORBA et al., 2019; CARDA; CISARI; INVERNIZZI, 2013). Uma vez que o músculo esquelético representa importante *pool* de aminoácidos que participam em várias funções, tais como: alanina para gliconeogênese; glutamina como fonte de bases púricas e pirimídicas, importantes para proliferação celular e regulação do equilíbrio ácido-base; entre outras, a prevenção da sarcopenia apresenta-se como importante fator de promoção da saúde em indivíduos sob condições degenerativas e também em idosos (MIYAJIMA, 2020; THALACKER-MERCER; RIDDLE; BARRE, 2020).

Neste sentido, tem sido sugerido que nutrientes e drogas podem regular atividade de estimulação no aumento da massa e/ou função muscular em humanos ou em modelo animal. Dentre elas podemos citar: suplemento proteico ou de aminoácidos (BCAAs), creatina, antioxidantes (vitamina E, vitamina C, carotenoides e resveratrol), vitamina D, AGPIs n-3, testosterona, hormônio do crescimento e estrogênio (RONDANELLI et al., 2015).

2.3 ESTRATÉGIAS NÃO FARMACOLÓGICAS PARA CONTROLE DA SARCOPENIA

O aumento da expectativa de vida da população humana, nem sempre está acompanhado de qualidade de vida e desta forma o envelhecimento é um processo que se reflete não apenas no cenário de saúde pública, mas também no contexto socioeconômico e cultural, representando um grande desafio a ser equacionado modernamente (FLATT; PARTRIDGE, 2018; CARRERA-HUESO, 2014).

Assim, com base nas observações acerca do papel do músculo esquelético, para além da capacidade física, o emprego de estratégias que previnam o avanço do declínio muscular, bem como o curso da sarcopenia têm sido propostos, em especial para a população idosa e ativa (LANDI et al., 2018).

2.3.1 Exercício físico

A atividade física pode ajudar na prevenção e manejo de certas condições e doenças crônicas. Os exercícios resistidos e aeróbios são comumente relacionados como benéficos para saúde funcional em idosos, enquanto exercícios de fortalecimento muscular, alongamento e equilíbrio são estratégias efetivas para prevenção de quedas (BRADY; STRAIT, EVANS, 2014).

Há um impacto positivo da prática de atividade física regular no desempenho físico ao longo da vida que foi demonstrado em uma pesquisa com 6242 adultos com idade entre 18 e 98 anos pois ao fazerem um teste de força muscular de membros inferiores, a resposta foi similar entre 18 e 44 anos, com declínio progressivo nas idades subsequentes, bem como melhor em indivíduos ativos quando comparados aos sedentários. Ainda nesta pesquisa mostrou que os maiores benefícios ao sistema musculoesquelético envolveram atividades mais vigorosas como o treinamento resistido (LANDI et al., 2018).

Assim, a prática de atividade física regular é de extrema importância para o envelhecimento saudável, pois além de contribuir para diminuir o risco de diversas doenças, contribui com resultados benéficos para o equilíbrio, flexibilidade, mobilidade, convívio social e autonomia para atividades da vida diárias, produzindo o envelhecimento com independência funcional (CASEROTTI, 2010).

O exercício físico regular é um fator de estímulo que induz a uma série de adaptações no músculo esquelético. Os benefícios promovidos pelo exercício físico regular já são bastante conhecidos e as pesquisas vem explorando a vasta rede de vias de sinalização e moléculas reguladoras que coordenam as respostas adaptativas do músculo esquelético ao exercício físico. A maleabilidade de adaptação funcional à atividade contrátil do músculo é refletida por mudanças na expressão de proteínas contráteis e modificações na função contrátil. Ainda, estes estímulos gerados pelo exercício físico regular, produzem adaptação mitocondrial, regulação molecular e metabólica, mudanças no conteúdo de sinalizadores intracelulares e modificações na resposta transcricional (ABREU; LEAL-CARDOSO; CECCATTO, 2017).

A busca no entendimento sobre o impacto da atividade física e o tipo de exercício no desempenho físico ao longo das idades tem sido alvo de estudos sobre longevidade. Landi et al. (2018) pesquisaram entre 6242 participantes, o desempenho físico através do teste de sentar e levantar e o estudo revelou que há declínio

progressivo nas idades subsequentes a partir de 44 anos. Desta forma, torna-se evidente a necessidade de esforços por parte das autoridades de saúde para promover a adoção em larga escala de um estilo de vida ativo ao longo da vida.

Um estudo piloto com idosos para investigar o impacto da sarcopenia como limitador na prática de atividade física regular concluiu que idosos sarcopênicos são capazes de responder positivamente a uma atividade física proposta e que a sarcopenia não afetou o perfil de segurança ou adesão dos sujeitos à intervenção. Além disso, houve melhorias de desempenho físico destes indivíduos após 12 meses de um programa de atividade física que incluiu exercícios aeróbios, de flexibilidade, de força e equilíbrio (LIU et al., 2014). Portanto, a prática de atividade física deve ser encorajada entre os idosos.

2.3.2 Treinamento resistido no controle de massa muscular

O exercício resistido designado para hipertrofia muscular tem como objetivo promover a ativação máxima dos mecanismos anabólicos e miogênicos que resultam no acréscimo de proteína necessária para suportar o aumento da fibra muscular. O estímulo mecânico ativa a principal via de sinalização celular para síntese proteica: PI3K/Akt/mTOR. Esta resposta é importante para o aumento de síntese proteica e hipertrofia muscular (FOSCHINI et al., 2016). Além disso, o estresse mecânico causado pela contração muscular estimula também respostas mediadas por hormônios (fator de crescimento semelhante à insulina – IGF-1, hormônio do crescimento, testosterona e cortisol) e repostas imunitárias de maneira que os benefícios desta prática se ampliam para o organismo todo (PITHON-CURI, 2013).

Há 3 fatores principais responsáveis pelo início da resposta hipertrófica ao treinamento resistido: tensão mecânica, danos musculares e estresse metabólico. Cada um destes fatores pode estar associados na ativação de vias sinalizadoras para o controle de massa muscular durante o processo de plasticidade muscular frente ao desafio imposto pelo treinamento resistido (SCHOENFELD, 2010).

Há diversos modelos não voluntários e voluntários em animais para o desenvolvimento de hipertrofia no músculo esquelético. Dentre os modelos animais voluntários desenvolvidos encontramos o modelo de escalada utilizando a escada com variações em seu comprimento e inclinação. No desenvolvimento de um protocolo de treino neste tipo de aparato é importante levar em conta o período de

adaptação e familiarização ao equipamento e a realização de um teste de carga carregada máximo. Os músculos utilizados para verificação do desfecho hipertrofia são de acordo com a demanda da tarefa e a composição dos tipos de fibras musculares, sendo os músculos com alta proporção de fibras do tipo II sendo escolhido para avaliar hipertrofia ou sinalização de moléculas para a síntese proteica (CHOLEWA et al., 2014; KRAUSE NETO et al., 2016).

O uso do modelo animal para a aplicação do treinamento resistido progressivo (TRP) pode simular protocolos de treino aplicado em humanos. A intensidade, volume e duração do TRP podem ser controlados em laboratório assim como em treino com humanos. Embora possam ser empregados diversos estímulos que o animal realize o TRP, tais como desde pequenos choques na cauda, privação de alimento ou uso de recompensas (alimento no topo da escada), quando o animal é capaz de realizar o TRP de forma voluntária, realmente tem-se a configuração de um treino similar ao aplicado em humanos, realizado sob condições de estresse externo mínimo à sessão de treino (LOWE; ALWAYS, 2002; CASSILHAS et al., 2013).

O modelo de TRP em modelos animais com a utilização da escada para o controle da obesidade (SPERETTA et al., 2012), hipertrofia muscular com uso de testosterona associado ao TRP (KRAUSE NETO et al., 2013), hipertrofia muscular em tríceps braquial (NASCIMENTO et al., 2013), remodelação na matriz extracelular (GUZZONI et al., 2018), estresse oxidativo (SCHEFFER et al., 2012), caquexia relacionada ao câncer (DONATTO et al., 2013), aprendizagem e memória espacial (CASSILHAS et al., 2012).

Além de características funcionais e estruturais, o emprego de protocolos de TR pode permitir a identificação de alterações musculares metabólicas e moleculares. Luo et al. (2013) investigaram treino resistido de 9 meses com uso da escada em ratos de 18-20 meses de idade e concluíram que o TR crônico induz autofagia e inibe a apoptose em músculos esqueléticos envelhecidos e ainda sugerem que a modulação de sinalização de Akt/mTOR e Akt/FOXO3a está implicada na regulação da autofagia por TR crônico.

2.3.3 Ação do ômega-3 no controle da massa muscular

Algumas condições humanas, em especial aquelas que acarretam declínio cognitivo, podem impossibilitar a adesão a um programa de atividade física regular.

Neste sentido, a identificação de outras possíveis estratégias que não envolvam atividade física se faz necessária. Dentre as estratégias não farmacológicas emergentes usadas para otimizar o controle da perda de massa muscular durante o processo de envelhecimento, encontramos a suplementação com AGPIs (JAFARINASABIAN et al., 2017).

Diversos autores têm se dedicado a compreender os mecanismos pelos quais estas moléculas participam da modulação de diversos processos biológicos e, com isso, são capazes de atuar em cenários patológicos. Tachtsis, Camera e Lacham-Kaplan (2018) discutiram em revisões a potencial participação dos AGPIs n-3 durante o crescimento e regeneração no músculo esquelético mostrando seus efeitos na redução da inflamação (LAURENTIUS et al., 2019), regulação do metabolismo proteico (RUSS et al., 2020). Ainda pesquisas buscam entender o comportamento o papel dos AGPIs na síntese proteica e efeito agudo do treinamento resistido (McGLORY et al., 2016).

Além disso, estudos desenvolvidos pelo emprego de modelos animais demonstram o potencial papel dos AGPIs n-3 no músculo, como co-reguladores da cascata de sinalização da insulina, sugerindo sua participação na preservação da massa muscular e sensibilidade sistêmica e muscular (YAMAZAKI et al., 2011; GALMICHE et al., 2016).

A suplementação com óleo de peixe rico em ômega-3 durante 6 meses foi capaz de diminuir a velocidade do declínio normal da massa e função muscular em idosos. Estes idosos receberam um total diário de 1,86g de EPA e 1,50g de DHA que é equivalente a ingestão de 200-400g de peixes ricos em ômega-3. Os ganhos na massa e função muscular deste idosos quando comparados com o grupo controle sugerem que seis meses desta intervenção pode prevenir 2 a 3 anos de perda na massa muscular decorrente do processo de envelhecimento musculoesquelético (SMITH et al., 2015).

2.3.4 Relação entre ômega-3 e treinamento resistido no controle da sarcopenia

Os efeitos do treinamento resistido na massa muscular de idosos saudáveis pode ser otimizada pela associação da prescrição de uma dieta saudável com a inclusão de peixes ricos em ômega-3 ($\geq 500\text{g/semana}$) (STRANDBERG et al., 2015).

O efeito crônico da suplementação de óleo de peixe rico em ômega-3 associado ao treinamento de força muscular em idosos saudáveis submetidas a esta combinação de estratégias não farmacológicas em um período de 12 semanas com 3 treinos semanais e com o consumo diário de 2g/dia de óleo de peixe rico em ômega-3 foi capaz de potencializar a resposta do sistema neuromuscular, melhorando a força muscular e capacidade funcional em idosos (RODACKI et al., 2012).

Em um estudo longitudinal pioneiro com idosos foi encontrada associação positiva entre força de preensão palmar e concentração plasmática de AGPIs n-3 e DHA e EPA foi positivamente associado a força de preensão palmar e força de extensores de joelho. Os autores do estudo reforçam a necessidade estudos longitudinais que investiguem a associação entre AGPIs e mudanças em parâmetros musculares em diferentes populações de estudo (REINDERS et al., 2015).

Estudos de revisão mostram que há diferença entre os gêneros masculino e feminino quanto ao efeito da suplementação de óleo de peixe na adaptação resposta ao treinamento de exercícios de resistência em idosos. Da Boit, Hunter e Gray (2017) encontrou em sua pesquisa que a suplementação com AGPIs n-3 aumentou massa muscular e função muscular em idosos mas não em homens após o treino resistido de músculos de membros inferiores com uma frequência de 2 vezes por semana durante 18 semanas.

Garcia et al. (2010) utilizaram um protocolo de natação de 4 semanas em ratos Wistar associado à suplementação com ômega-3 e concluíram que a ocorrência de alterações histológicas induzidas pelo exercício foi atenuada no grupo com suplementação, sugerindo, neste âmbito, um efeito protetor da dieta com ômega-3. Do ponto de vista morfométrico foi observado o aumento do diâmetro das fibras para os grupos expostos ao exercício, e as análises mostraram que este aumento está relacionado ao efeito do treinamento e não da suplementação.

Há evidências crescentes que a suplementação com AGPIs parece promissoras para o controle da sarcopenia, e sua combinação com o treinamento resistido pode aumentar massa muscular e melhorar função muscular sendo um

promissor potenciador dos efeitos do treinamento resistido. No entanto, a dosagem exata, frequência e uso (sozinho ou combinado) no tratamento e prevenção de sarcopenia ainda precisa de mais exploração, pois os protocolos de treinamento resistido e as dosagens de suplementação com ômega-3 usados em estudos controlados aleatorizados diferem muito e acabam dificultando o processo de comparação de resultados em estudos de revisão sistemática com metanálise (DUPONT et al., 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo do tipo experimental, randomizado, controlado de caráter longitudinal.

3.2 LOCAL DA PESQUISA

O isolamento e processamento do material biológico, assim como as análises foram realizadas nos laboratórios da Plasticidade Morfofuncional, de Metabolismo Celular e da Fisiologia da Performance, no Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

3.3 ANIMAIS

Os procedimentos experimentais deste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais do Setor de Ciências Biológicas (CEUA-BIO) conforme o certificado número 1067 (ANEXO A).

Os animais foram obtidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR com 60 dias e mantidos neste biotério em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C, sob ciclo claro/escuro invertido (12/12 horas), até a idade pretendida para o desenvolvimento da abordagem experimental. Neste período tiveram livre acesso à água e ração para alimentação animal Nuvilab CR1 (Nuvital nutrientes S/A). Neste estudo foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com idades de 9, 13 e 17 meses em 3 experimentos independentes.

A massa corporal dos animais foi avaliada em balança digital modelo GEHAKA-350, na frequência de 2 vezes por semana (terças e quintas) para determinação do volume diário de óleo de peixe a ser fornecido na suplementação, assim como para a determinação da carga inicial empregada no teste de carga carregada máximo pré-intervenção (TCCM pré).

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para cada idade de interesse, a cada experimento desenvolvido, os animais passavam por um período de adaptação à escada por 5 dias consecutivos e dois dias

após o término da adaptação ao aparato, os animais eram submetidos à familiarização ao teste de carga carregada máximo (TCCM) e 72 horas após à familiarização ao TCCM era realizado o TCCM pré-intervenção, sendo que a partir deste momento os animais foram randomizados por sorteio em 4 grupos:

- Grupo Sedentário (GS): Animais sedentários que não receberam nenhum suplemento.
- Grupo Suplementado (GOP): Animais suplementados com 1,0 g/kg/dia de óleo de peixe.
- Grupo Exercitado (GEX): Animais submetidos ao protocolo de exercício resistido progressivo descrito por Krause Neto et al. (2017).
- Grupo Exercitado e Suplementado (GEOP): Animais suplementados diariamente com 1,0 g/kg/dia de óleo de peixe e submetidos, concomitantemente, ao protocolo de exercício resistido progressivo descrito por Krause Neto et al. (2017).

O cronograma de trabalho da pesquisa foi desenvolvido conforme a data de nascimento dos animais e de forma que não houvesse a sobreposição de experimentos.

3.5 SUPLEMENTAÇÃO

Uma vez alcançada a idade de interesse, iniciou-se a suplementação com o óleo de peixe. A suplementação oral foi realizada diariamente com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável, durante 8 semanas. As cápsulas de óleo de peixe contendo 300mg de ômega-3 foram obtidas do laboratório Sundown Naturals.

3.6 TREINAMENTO RESISTIDO

3.6.1 Adaptação a escada

O aparato empregado para a realização do treinamento resistido consiste em uma escada com 110 cm de comprimento por 18 cm de largura com espaçamento de 2cm entre os degraus e com inclinação de 80°. No topo da escada há uma câmara

medindo 20x20x20cm que serve de abrigo para o animal entre as repetições. Na base da escada há uma estrutura fixada para garantir uma distância segura para evitar qualquer contato da cauda do animal ou do sistema de sobrecarga com o solo (HORNBERGER; FARRAR, 2004). O sistema de sobrecarga foi atado à região proximal da cauda do animal através de uma fita adesiva presa ao mosquete contendo as cargas (pesos de chumbo) (FIGURA 5).

Os animais passaram por um período de adaptação ao aparato utilizado para o teste e treinamento resistido. Esta adaptação aconteceu através de quatro tentativas diárias de escalada, em cinco dias consecutivos. No início da atividade, o animal permaneceu por dois minutos na câmara de abrigo para reconhecimento. Na primeira tentativa, o animal foi colocado a 15cm da entrada do abrigo. Nas tentativas subsequentes, a distância de início da escalada foi aumentada gradativamente (30 e 55cm). Na quarta tentativa, o animal foi colocado no início da escada (110cm). Quando necessário, o animal foi estimulado a completar a tarefa, através de leve toque na cauda (FIGURA 5).

FIGURA 5 – APARATO PARA TESTE DE CARGA CARREGADA MÁXIMO E TREINAMENTO RESISTIDO



FONTE: A autora (2017).

3.6.2 Teste de carga carregada máximo

O teste de carga carregada máximo foi inicialmente proposto por Hornberger e Farrar (2004). Na presente abordagem utilizamos o protocolo modificado por Krause Neto et al. (2017) que preconiza que a manifestação de força muscular se dá pela habilidade em manter a produção de força durante as repetições e séries durante o TCCM, chamada de resistência de força (FOSCHINI et al., 2016).

Dois dias após a conclusão da adaptação ao aparato de treinamento, a determinação da carga de resistência de força máxima do animal foi realizada através do teste de carga carregada máximo (TCCM). O aquecimento consistiu em uma escalada sem carga com 1 minuto de descanso para o início do treino. Na primeira escalada foi aplicada uma sobrecarga referente a 50% da massa corporal do animal. Nas demais tentativas foram acrescentados 10% da massa corporal do animal como sobrecarga até o animal não conseguir subir mais completamente a escada. A falha foi determinada quando o animal não escalou mesmo após receber três estímulos sucessivos na cauda. A carga máxima foi definida como aquela em que o animal foi capaz de realizar a última escalada completa. O tempo de dois minutos foi utilizado como intervalo de descanso entre as tentativas do teste (KRAUSE NETO et al., 2017).

Dias et al. (2005) demonstraram que a familiarização prévia com testes de 1-RM é de extrema importância para a análise da força muscular, também, em indivíduos com experiência prévia em exercícios com pesos. Embora não se tenha registro deste tipo de observação voltada para modelos animais, sabemos que o animal também passa por um período de aprendizagem e isto reflete no desempenho do TCCM. Por isso, considerando as evidências que a familiarização ao TCCM se faz necessário, o TCCM foi realizado em dois tempos. O primeiro momento foi composto pelo teste de familiarização (TCCM 1). O segundo momento (TCCM 2) aconteceu após 72h. O TCCM 2 foi chamado de TCCM-pré, uma vez que foi realizado sempre antes do início do treinamento resistido progressivo ou suplementação. Após a aplicação do treino resistido progressivo e suplementação (8 semanas), os animais foram submetidos novamente ao teste de determinação da carga de resistência de força máxima e este foi chamado de TCCM-pós. Os três testes foram aplicados com o uso da mesma metodologia.

3.6.3 Protocolo de treinamento resistido progressivo

O programa de treinamento foi realizado três vezes por semana em dias alternados durante 8 semanas, totalizando 24 sessões de treinamento resistido progressivo.

A primeira sessão de treinamento aconteceu da seguinte forma: 2 escaladas sem carga como forma de aquecimento, duas escaladas em cada uma das seguintes cargas de trabalho: 50, 75 e 100% da carga final do TCCM. Caso o animal conseguisse escalar a escada duas vezes com 100%, um acréscimo de 30 gramas foi feito sobre a última carga escalada. O animal, pode então, escalar por mais duas tentativas, totalizando ao final oito escaladas (TABELA 1). A carga final de cada sessão foi utilizada para as sessões de treinamento subsequentes. Entre cada escalada foi permitido aos animais descansar no abrigo durante dois minutos e então era novamente colocado no início da escada para uma nova tentativa (LEE et al., 2004; HARRIS et al., 2010, KRAUSE NETO et al., 2017).

TABELA 1 – EXEMPLIFICAÇÃO DA SESSÃO DE TREINAMENTO RESISTIDO

Data:	% de carga	Escaladas	
Animal:	50%	150	150
Grupo:	75%	225	225
	100%	300	300
	Adicional (30g)	330	330

FONTE: A autora (2018).

Após 48 horas da finalização do treinamento resistido, os animais foram submetidos ao teste de determinação da carga de resistência de força máxima do animal (TCCM pós-intervenção).

3.7 OBTENÇÃO DOS MÚSCULOS

Após 48h da realização do TCCM pós-intervenção, os animais foram eutanasiados por decapitação para a coleta dos tecidos de interesse. Os músculos sóleo e extensor digital longo dos dedos (EDL) de ambas as patas foram dissecados e pesados isoladamente, em balança analítica de precisão. Em seguida, os músculos de uma das patas foram estendidos em uma superfície plana (cortiça), para a

mensuração do comprimento muscular pelo uso de paquímetro eletrônico digital. Após a tomada de valores de massa e comprimento dos músculos, os músculos foram seccionados longitudinalmente e uma metade foi destinada para contagem de sarcômeros em série e a outra congelada em nitrogênio para posterior análise bioquímica. Os outros músculos da outra pata foram criopreservados em talco, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C , para posterior análise histológica e morfométrica.

3.8 PARÂMETROS FENOTÍPICOS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

3.8.1 Contagem de sarcômeros em série

Os músculos sóleo e extensor digital longo dos dedos foram seccionados longitudinalmente, uma fração foi estendida sobre cortiça para fixação em formol (10%) durante 3 horas, em seguida foram incubados em ácido nítrico (30%) por 40 horas para digestão dos tecidos conjuntivos. Posteriormente os músculos foram armazenados em solução de glicerol (50%) para obtenção de fibras musculares isoladas e avaliação do número de sarcômeros em série (GOMES et al., 2004; LEITE et al., 2017).

Oito fibras musculares do ventre de cada músculo, sóleo e EDL, foram isoladas em lupa estereoscópica, fixadas em lâmina histológica com uso de adesivo e posteriormente cobertas por lamínula. As lâminas foram fotografadas no microscópio de luz, em objetiva de imersão. O número de sarcômeros em série ao longo de $300\mu\text{m}$ em cada fibra muscular foi contado com auxílio do software ImageJ. O número total de sarcômeros e o comprimento dos sarcômeros em cada fibra muscular isolada foram estimados pela correlação entre o número de sarcômeros identificados ao longo de $300\mu\text{m}$ da fibra e o comprimento total do músculo (GRIFFIN; WILLIAMS; GOLDSPINK, 1971).

3.8.2 Preparação histológica

Dos músculos sóleo e extensor digital longo dos dedos, secções de $10\mu\text{m}$ foram obtidas em criostato (Leica CM1850). Os cortes foram fixados em formol-cálcio de Baker por 5 minutos, seguidos de lavagem em água destilada. As lâminas foram

submetidas à coloração por Hematoxilina-Eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), desidratadas em série crescente de álcool e montadas com Entellan®.

3.8.3 Contagem de fibras musculares

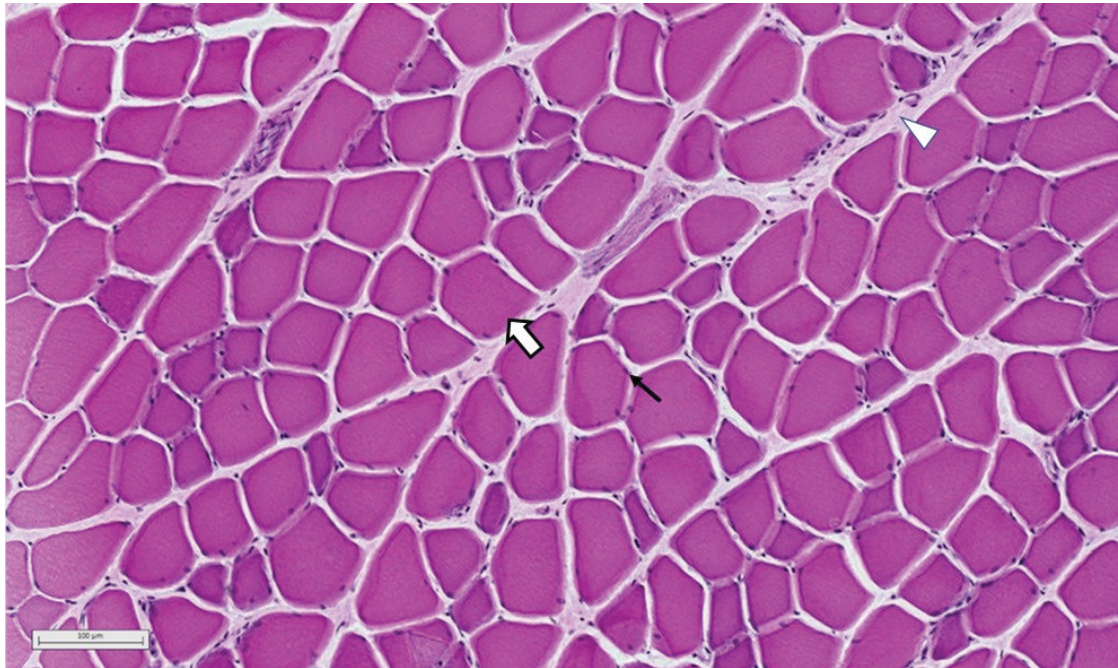
Fotomicrografias foram obtidas das lâminas utilizando o microscópio Axiolmager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/VSlide (Metasystems, Altlussheim, DE), no Centro de Tecnologias Avançadas da UFPR (CETAF).

As lâminas foram divididas em campos de 150.000 μm^2 , randomicamente dispostos sobre a fotomicrografia por meio do programa ImageJ (versão 1.53c). Dos campos criados para a imagem, 15 deles foram sorteados através de um programa de sorteio para matriz (disponível em <https://github.com/moniquesch/random-sampling-matrix.git>) e selecionados para a contagem do número de fibras musculares. Apenas fibras com 2/3 de sua área total dentro do campo sorteado foram contabilizadas. Para o valor final, uma média foi aferida a partir dos valores dos 15 campos.

3.8.4 Área de secção transversa

Para realizar a morfometria da área de secção transversal, as fotomicrografias obtidas foram analisadas pelo emprego do Programa VSViewer (versão 2.1.102), empregando a função Polygon. Uma vez delimitado o perímetro da fibra, o software fornecia a área da figura. Foram mensuradas 120 fibras/ animal e os valores obtidos da mensuração das áreas de cada polígono foram utilizados e apresentados para as análises em mm^2 (FIGURA 6).

FIGURA 6 – FOTOMICROGRAFIA ILUSTRATIVA DO MÚSCULO ESTRIADO DE RATO



FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Seta preta: núcleo periférico. Seta branca: fibra muscular. Cabeça de seta: septo conjuntivo. Coloração HE.

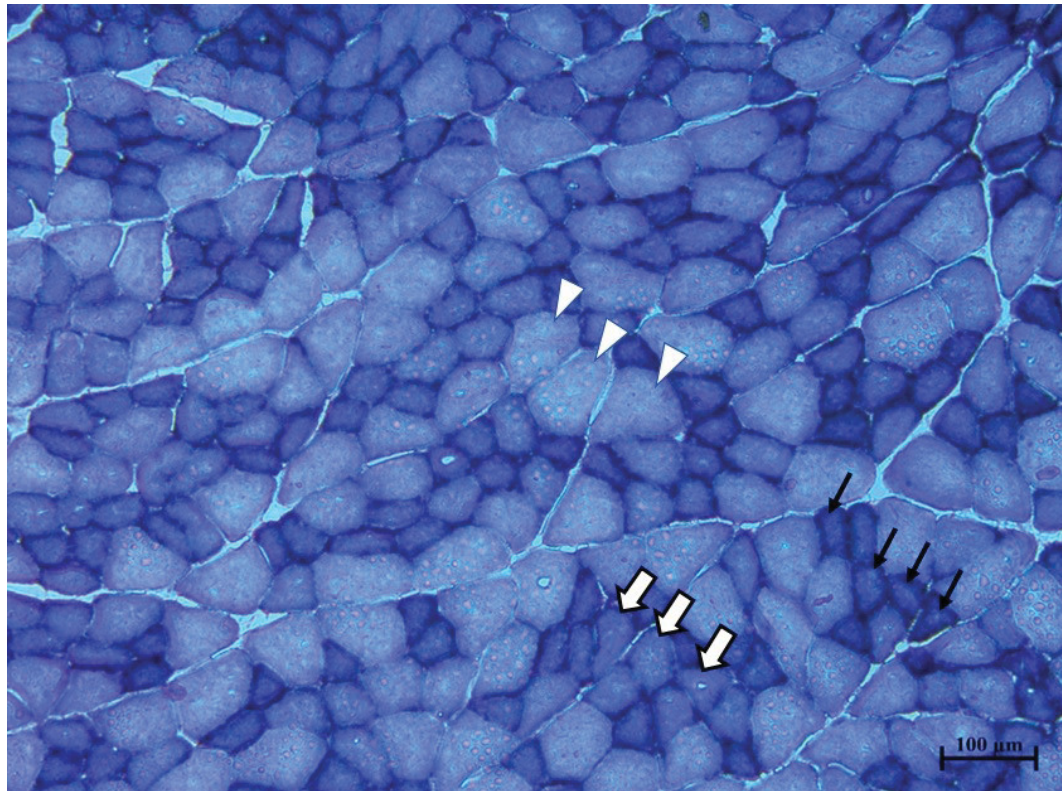
3.8.5 Tipos de fibras musculares

Para análise dos tipos de fibras musculares, foi empregado a técnica histoenzimológica de NADH-TR para a tipagem de fibras (DUBOWITZ; BROOKE, 1973). Secções transversais dos músculos Sóleo e EDL, com 10μm de espessura, foram obtidas em criostato (Leica CM1850) e incubadas em solução de NADH-TR (X molar) por 30 minutos a 37°C. Após incubação as lâminas foram lavadas, fixadas em formol tamponado (10% v/v) por 15 minutos, desidratadas em série alcoólica crescente e montadas com Entellan®.

As imagens das secções transversais dos músculos Sóleo e EDL, obtidas em fotomicroscópio (Carl Zeiss™ Primo Star™) com câmera acoplada (Carl Zeiss™ AxioCam ERc 5s) no programa ZEN 3.1 (Carl Zeiss™), foram analisadas pelo programa ImageJ (versão 1.53c) em sua distribuição Fiji. A diferenciação dos tipos de fibras musculares em tipo I, tipo IIA e tipo IIB, baseado no metabolismo das fibras, foi determinada de acordo com a literatura (FIGURA 7) (DUBOWITZ; BROOKE, 1973). As fotomicrografias foram divididas em campos de 80.000 μm², randomicamente dispostos sobre a imagem por meio do programa Image J. Dos campos criados para

a imagem, 8 foram sorteados através do programa de sorteio para matriz e foram selecionados para a quantificação dos tipos de fibra. Apenas fibras com 2/3 de sua área total dentro do campo sorteado foram contabilizadas. Para o valor final, uma média foi aferida a partir dos valores dos 8 campos.

FIGURA 7 – TIPO DE FIBRAS MUSCULARES EVIDENCIADAS PELA TÉCNICA HISTOENZIMOLÓGICA DE NADH-TR



FONTE: A autora (2020)

Legenda: Seta preta: Fibra oxidativa – Tipo I. Seta branca: fibra de metabolismo intermediário – Tipo IIA. Cabeça de seta: Fibra glicolítica – Tipo IIB.

3.8.6 Danos oxidativos

Os músculos sóleo e extensor digital longo dos dedos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 em banho de gelo e centrifugados a 12.000 RCF (g) a 4°C durante 20 min, o sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação das atividades enzimáticas. Para padronização, foi realizada a dosagem de proteínas solúveis pelo método de Bradford com curva padrão de albumina de soro bovino (BRADFORD, 1976), posteriormente todas as amostras foram padronizadas para 1 mg de proteína.

A concentração de GSH e de outros tióis não proteicos foram determinadas através da interação dos tióis de natureza não proteica com o DTNB e formação de um cromóforo amarelado. Para a realização do ensaio foi necessária a precipitação das proteínas da amostra pela adição de TCA 30% (1:5 v/v) e centrifugação a 7000 RCF (g) a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação dos tióis com a adição de 250 μ M de DTNB e a absorbância pela geração do cromóforo foi medida a 415 nm. Os valores foram expressos em nM de tióis x mg proteína⁻¹ (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

O índice de peroxidação lipídica (LPO) foi determinado pela geração de complexos entre Fe⁺² e xilenol laranja e formação de um cromóforo estabilizado por hidroxitolueno butilado. A absorbância pela geração do cromóforo foi medida a 560 nm. Os valores foram expressos em nM hidroperóxidos x mg de proteína⁻¹ (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991).

A atividade enzimática da colinesterase total (ChE – EC) foi determinada pela geração do 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina a partir da interação da tiocolina e do DTNB, o aumento da absorbância pela formação do cromóforo foi acompanhado a 405nm (SR: 487 μ M de DTNB; 2,25 mM de iodeto de acetiltiocolina). Os valores foram expressos em nM de acetiltiocolina hidrolizados x min⁻¹ x mg proteína⁻¹ (ELLMANN et al., 1961).

3.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados por meio de estatística descritiva e inferencial no programa R versão 4.0.3 (R Core Team, 2020). Para a análise dos dados relacionados ao TCCM, os valores brutos foram percentualizados em relação ao peso corporal e logaritmizados para minimizar o efeito da variação comportamental de cada animal. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo da função integral de área sob a curva, os valores brutos foram considerados como valor pré e pós, e a área sob a curva total como o delta de treinamento. Para a escolha dos testes estatísticos relacionados às variáveis quantitativas, os dados foram avaliados quanto à normalidade (teste de *Shapiro-Wilk*) e homocedasticidade (teste de *Bartlett*). Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA *One-way* com teste *post hoc* de *Tukey-HSD*. No caso de dados não paramétricos, o teste utilizado foi o *Kruskal-*

Wallis com pós-teste de *Dunn*. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

Os animais sedentários foram avaliados em função das idades experimentais, a fim de verificar o efeito do tempo sobre o surgimento de alterações musculares relacionadas ao envelhecimento. Já os demais grupos foram comparados aos sedentários dentro das idades, para a comparação do efeito dos tratamentos sobre as características musculares em cada idade.

Todos os dados foram usados para criar um modelo multivariado e foram padronizados para distribuição *z*. A partir dessas matrizes, a Análise Multivariada Permutacional de Variância (PERMANOVA) foi escolhida com a utilização das respectivas matrizes de distância euclidiana, estabelecendo os tratamentos (Idades 9, 13 e 17 meses) como fatores fixos, usando o pacote “vegan” e a função “adonis2”. As comparações entre pares para todos os níveis dos fatores fixos foram realizadas usando o PERMANOVA com o método de correção de “Bonferroni”. Os grupos experimentais dentro de cada idade foram comparados individualmente nos modelos multivariados, a fim de estabelecer os padrões de respostas individuais de cada tratamento sobre as alterações decorrentes do processo de envelhecimento.

Após verificar a diferença entre os tratamentos do modelo, novas matrizes foram construídas: Bioquímica EDL (PTNAS, LPO, SH-NP, ChE), Características celulares EDL (Proporção de fibras do tipo I, IIA, IIB, área de secção transversa, número de fibras e sarcômeros em série), Tamanho muscular EDL (massa do músculo e comprimento muscular), Bioquímica SOL (PTNAS, LPO, SH-NP, ChE), Características celulares SOL (área de secção transversa, número de fibras e sarcômeros em série), Tamanho muscular SOL (massa do músculo e comprimento muscular) e Comportamento (TCCM-pré, TCCM-pós, Δ TCCM e variação da massa corporal).

As comparações pareadas para todos os pares de níveis de fator fixo foram realizadas usando PERMANOVA com o método de correção de Bonferroni (pacote “EcolUtils”, função *adonis.pair*). As representações gráficas dos resultados foram realizadas pelo biplot resultante da Análise das Coordenadas Principais (pacote “monkey”, função “pcoa”).

As correlações entre matrizes multivariadas foram avaliadas a partir da criação de modelos lineares multivariados gerais, por meio de regressões lineares

multivariadas (pacote "rms", função fastbw). Apenas as coordenadas significativas foram avaliadas em cada modelo para os animais sedentários.

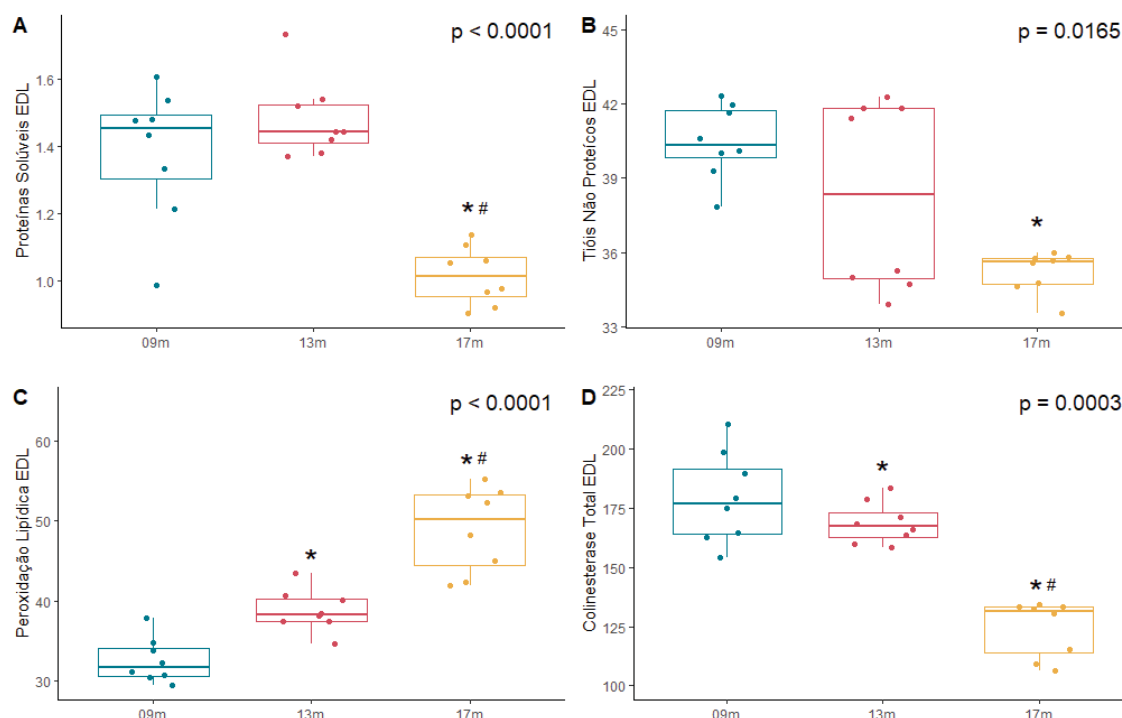
4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados de forma agrupada, como capítulos no sentido de construir uma sequência para os achados.

4.1 ALTERAÇÕES CELULARES NOS MÚSCULOS EDL E SÓLEO, DECORRENTES DO TEMPO

Ao avaliar os marcadores bioquímicos de danos celulares, foi possível identificar que o tempo atua de forma distinta nas diferentes moléculas no músculo EDL. Com relação às proteínas solúveis, houve redução da concentração nos animais de 17 meses quando comparados aos de 9 e 13 meses (PTNAS, $F_{2,21}=23,57$, $p<0,0001$, $CV=11,13\%$, FIGURA 8 A). Também houve redução na concentração tióis não proteicos nos animais de 17 meses, mas apenas quando comparados aos de 9 meses (SH-NP, $\chi^2=8,21$, $df=2$, $p=0,016$, FIGURA 8 B), enquanto nos animais de 13 meses apesar da redução, não houve diferença significativa. De forma contrária, foi possível identificar aumento na taxa de peroxidação lipídica nos animais de 17 meses quando comparados aos animais de 13 meses e, de forma semelhante, nos animais de 13 meses quando comparados aos de 9 meses (LPO, $F_{2,21}=38,25$, $p<0,0001$, $CV=9,48\%$, FIGURA 8 C). Com relação à atividade de colinesterases totais, foi possível identificar redução da atividade nos animais de 17 meses quando comparados aos animais de 9 e 13 meses ($\chi^2=15,86$, $df=2$, $p=0,0003$, FIGURA 8 D). Nos animais de 13 meses, apesar de identificada redução da atividade, esta não foi significativa.

FIGURA 8 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO EDL

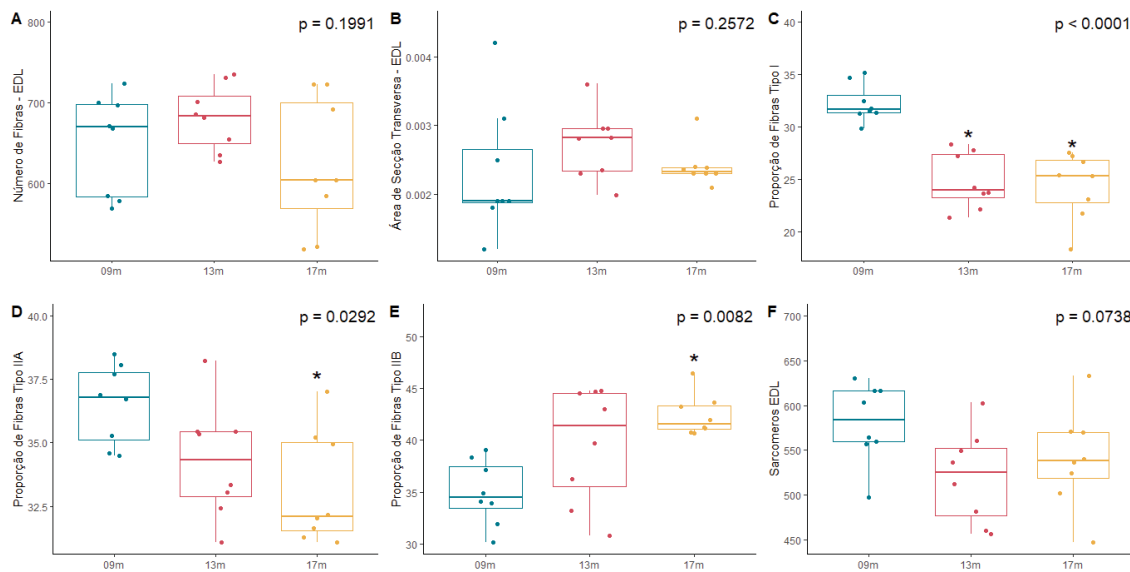


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores de marcadores bioquímicos de danos celular: A: Proteínas solúveis (PTNAS); B: Tióis não proteicos (SH-NP); C: Peroxidação Lipídica; D: Colinesterase total (ChE). * vs. animais de 9 meses, # vs. animais de 13 meses.

As análises envolvendo alterações das fibras musculares, permitiram identificar redução na proporção de fibras tipo I no músculo EDL dos animais de 13 e 17 meses quando comparados aos de 9 meses ($F_{2,21} = 23,05$, $p < 0,0001$, $CV = 9,58\%$, FIGURA 9 C). Com relação às fibras tipo II, identificou-se redução na proporção de fibras tipo IIA ($\chi^2 = 7,065$, $df=2$, $p = 0,0292$, FIGURA 9 D) e aumento da proporção de fibras tipo IIB nos animais de 17 meses quando comparados aos de 9 meses. Já nos animais de 13 meses, apesar da redução na proporção de fibras tipo IIA, esta não foi estatisticamente diferente dos demais grupos. Por outro lado, identificou-se aumento na proporção de fibras tipo IIB nos animais de 13 meses quando comparados aos de 9 meses ($\chi^2 = 9,62$, $df = 2$, $p < 0,0082$, FIGURA 9 E). Não foram identificadas diferenças na densidade de fibras ($F_{2,21} = 1,7451$, $p = 0,1991$, $CV = 9,92\%$, FIGURA 9 A), na área de secção transversa ($\chi^2 = 2,71$, $df = 2$, $p = 0,2572$, FIGURA 9 B) e no número de sarcômeros em série ($F_{2,21} = 2,95$, $p = 0,073$, $CV = 19,21\%$, FIGURA 9 F) no músculo EDL.

FIGURA 9 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO EDL

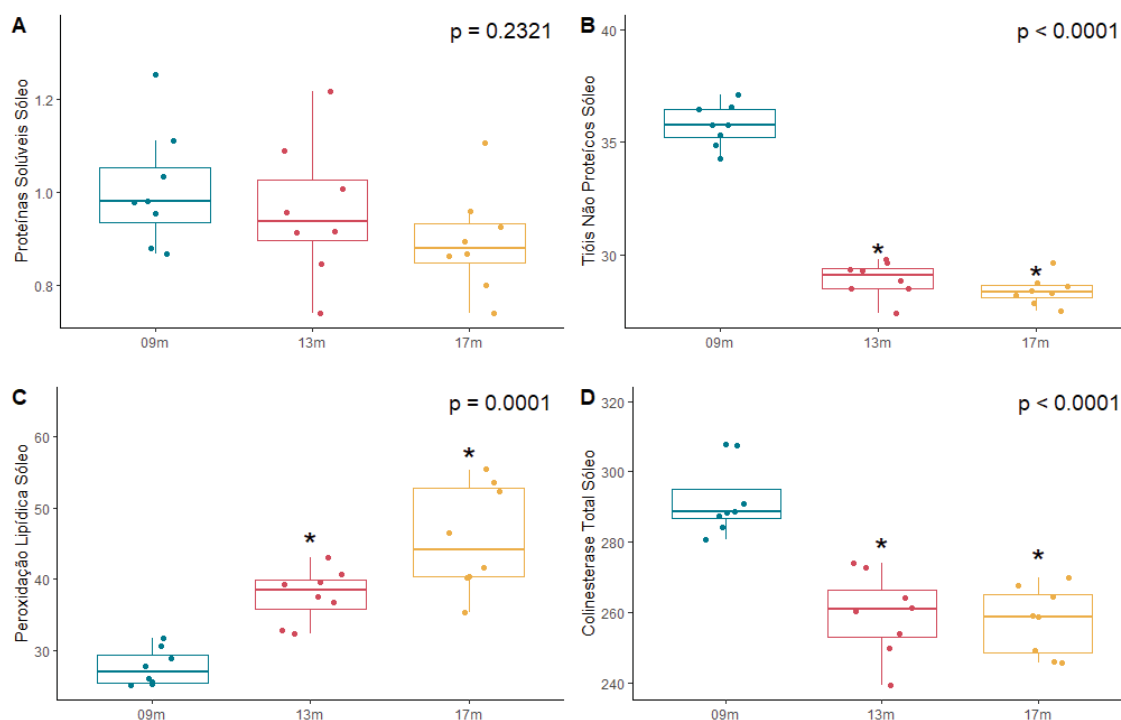


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores para características das fibras musculares do EDL: A: Número de fibras; B: Área de secção transversa; C: Proporção de fibras do tipo I; D: Proporção de fibras do tipo IIA; E: Proporção de fibras do tipo IIB; F: Sarcômeros em série. * vs. animais de 9 meses.

A avaliação dos marcadores bioquímicos de danos celulares no músculo SOL, revelou efeitos diferentes dos encontrados no músculo EDL. Não foi encontrada diferença entre os grupos na concentração de proteínas solúveis do músculo SOL ($F_{2,21} = 1,56$, $p = 0,2321$, $CV = 13,44\%$, FIGURA 10 A). Com relação à concentração de tióis não proteicos, houve significativa redução nas concentrações tanto em animais de 17 meses, quanto de 13 meses quando comparados aos animais de 9 meses ($F_{2,21} = 212,31$, $p < 0,0001$, $CV = 2,57\%$, FIGURA 10 B). Em relação à peroxidação lipídica identificou-se aumento da concentração nos animais de 17 meses quando comparados aos de 9 meses ($\chi^2 = 17,56$, $df = 2$, $p = 0,0001$, FIGURA 10 C), enquanto os animais de 13 meses apresentaram valores intermediários. Também se identificou redução na atividade das colinesterases totais nos animais de 17 e 13 meses quando comparados aos de 9 meses ($F_{2,21} = 27,13$, $p < 0,0001$, $CV = 3,88\%$, FIGURA 10 D).

FIGURA 10 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO SÓLEO

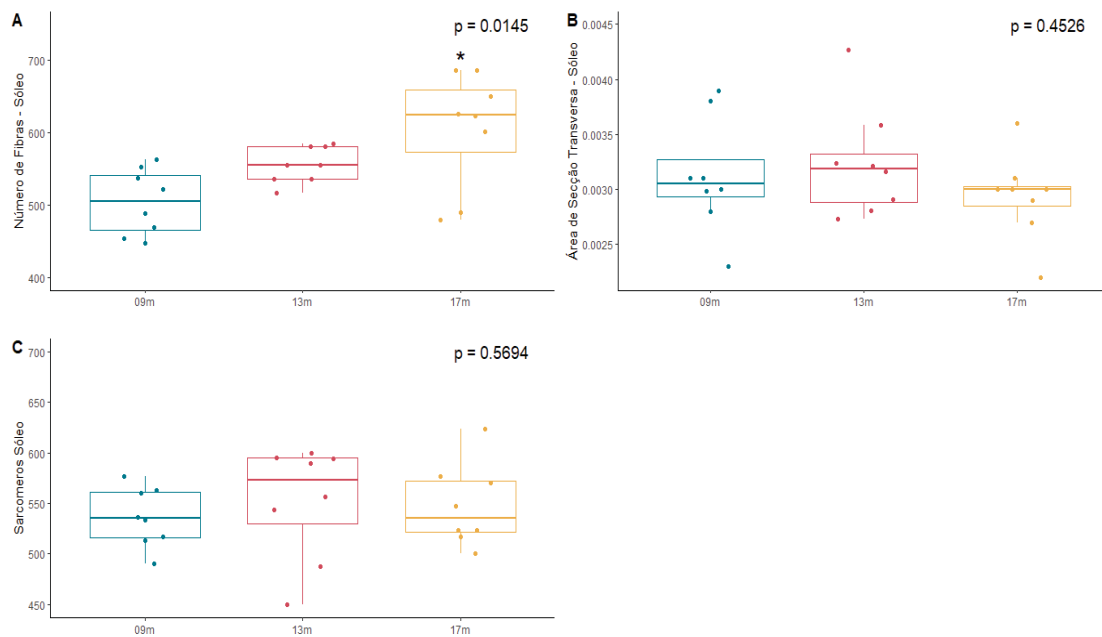


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores de marcadores bioquímicos de danos celular: A: Proteínas solúveis (PTNASS); B: Tióis não proteicos (SH-NP); C: Peroxidação Lipídica (LPO); D: Colinesterase (ChE) total. * vs. animais de 9 meses, # vs. animais de 13 meses.

A avaliação das características das fibras musculares permitiu identificar o aumento do número de fibras nos campos histológicos observados, apenas nos animais de 17 meses quando comparados aos de 9 meses ($\chi^2 = 8,4687$, $df = 2$, $p = 0,0145$, FIGURA 11 A). Em contrapartida, a avaliação da área de secção de transversal ($F_{2,21} = 0,82$, $p = 0,45$, $CV = 15,25\%$, FIGURA 11 B) e o número de sarcômeros em série do músculo SOL ($\chi^2 = 1,21$, $df = 2$, $p = 0,56$, FIGURA 11 C) não foram diferentes entre as três idades.

FIGURA 11 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO SÓLEO

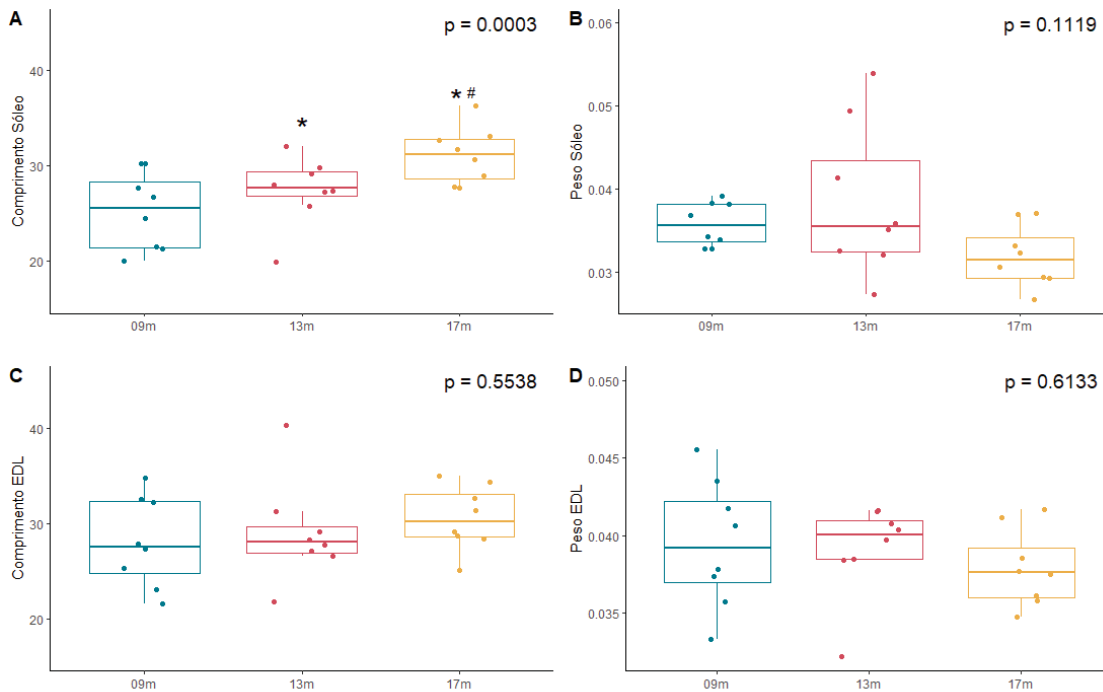


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores referentes às fibras do músculo SÓLEO para os seguintes parâmetros: A: Número de fibras; B: Área de secção transversa; C: sarcômeros em série. * vs. animais de 9 meses.

A avaliação de parâmetros murinométricos dos músculos, demonstrou que o envelhecimento foi capaz de aumentar o comprimento do SOL nos animais de 17 meses, quando comparados aos animais de 13 e aos de 9 meses, e nos animais de 13 meses quando comparados aos de 9 meses ($F_{2,21} = 5,46$, $p = 0,0003$, $CV = 12,8\%$, FIGURA 12 A), entretanto o peso do músculo SOL não sofreu influência do envelhecimento ($\chi^2 = 4,38$, $df = 2$, $p = 0,1119$, FIGURA 12 B). Em relação ao músculo EDL, identificou-se que nenhuma das duas características foi alterada pelo envelhecimento ($F_{2,21} = 0,61$, $p = 0,5538$, $CV = 15,54\%$, FIGURA 12 C; $F_{2,21} = 0,51$, $p = 0,6133$, $CV = 8,49\%$, FIGURA 12 D).

FIGURA 12 – PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS DOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL

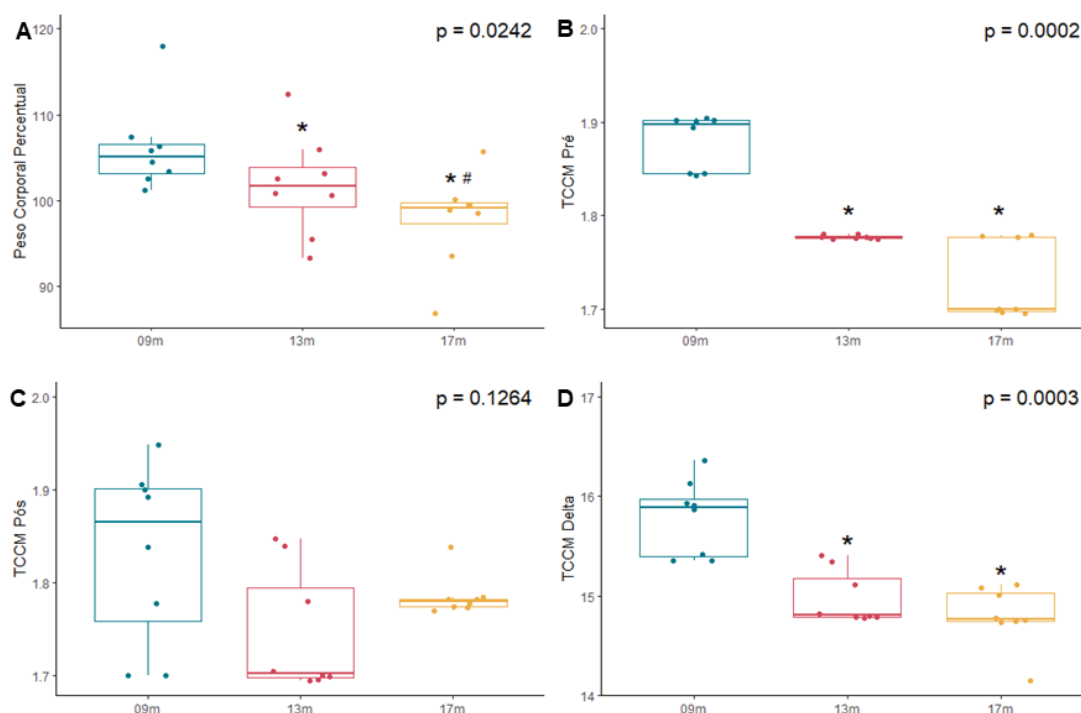


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores para os parâmetros: A: Comprimento Sóleo ; B: Peso Sóleo; C: Comprimento EDL; D: Peso EDL. * vs. animais de 9 meses., # vs. animais de 13 meses.

A avaliação da massa corporal, evidenciou que ocorreu redução da massa corporal de maneira que os animais de 17 meses apresentaram os menores valores nesta variável, quando comparados aos animais de 9 e de 13 meses e de maneira semelhante, os animais de 13 meses apresentaram redução da massa quando comparados aos animais de 9 meses ($F_{2,21} = 4,46$, $p = 0,024$, $CV = 5,45\%$, FIGURA 13 A). Com relação ao desempenho dos animais no TCCM, foi possível identificar que, no TCCM-pré animais de 17 e 13 meses apresentaram menor desempenho quando comparados aos de 9 meses ($\chi^2 = 16,49$, $df = 2$, $p = 0,002$, FIGURA 13 B). Entretanto, ao final do período de experimental não foi possível identificar diferenças entre as idades ($\chi^2 = 4,13$, $df = 2$, $p = 0,12$, FIGURA 13 C). Devido às diferenças presentes no TCCM-pré, a análise da variação de desempenho ($\Delta TCCM$) também foi menor nos animais de 17 e 13 meses quando comparado aos animais de 9 meses ($\chi^2 = 16,04$, $df = 2$, $p = 0,0003$, FIGURA 13 D).

FIGURA 13 – VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL E FUNÇÃO MUSCULAR



FONTE: A autora (2020)

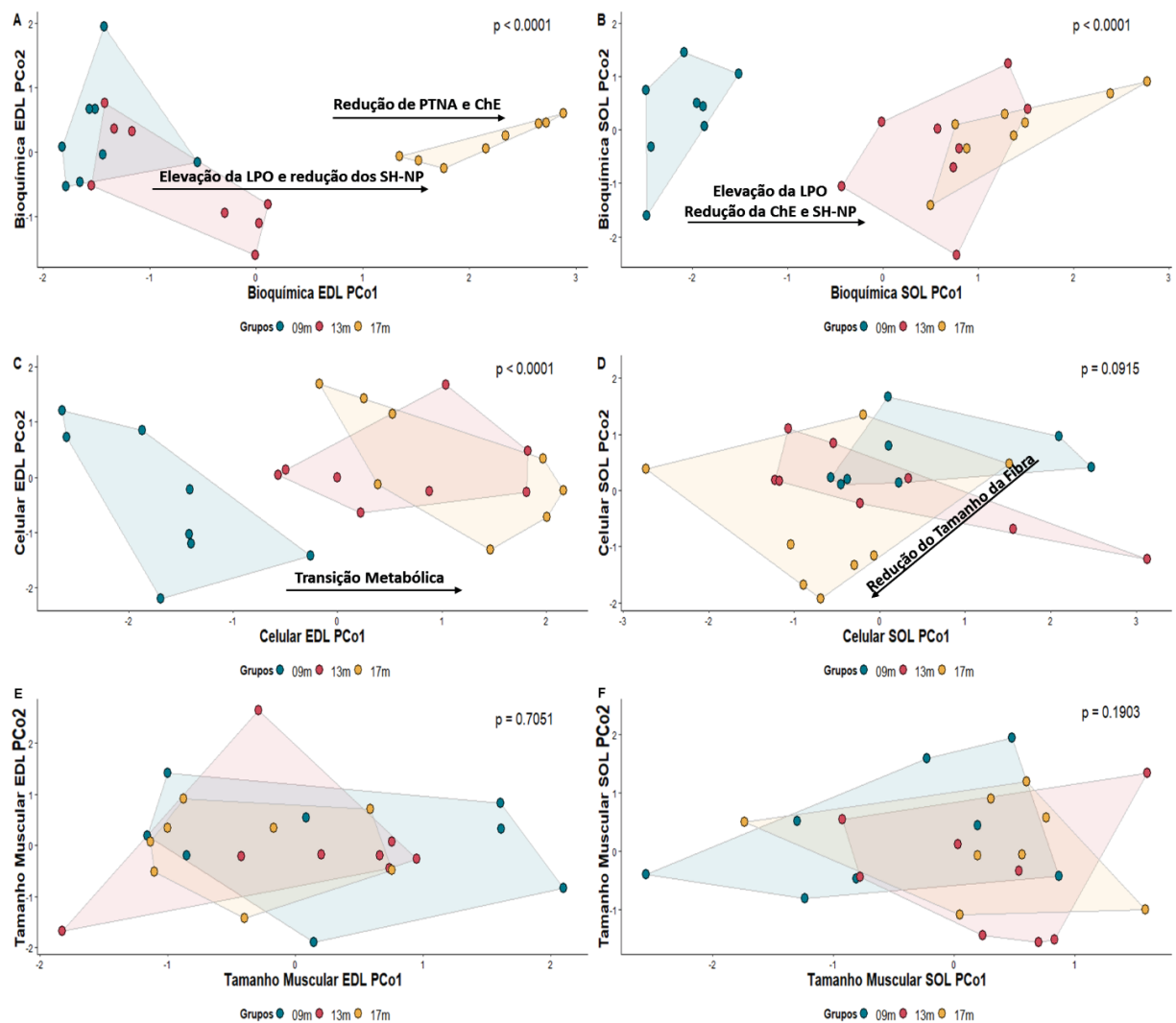
LEGENDA: Boxplot dos valores para: A: Percentual de Peso corporal; B: TCCM TCCM-PRÉ; C: TCCM TCCM-PÓS; D: Δ TCCM. * vs. animais de 9 meses., # vs. animais de 13 meses.

A análise multivariada para o EDL permitiu identificar que no modelo denominado *Bioquímica EDL*, as alterações das variáveis (PTNAS, LPO, SH-NP e ChE) foram significativas no modelo ($F_{2,21} = 22,27$; $R^2 = 0,67$; $p < 0,0001$; FIGURA 14 A), sendo possível observar que aos 17 meses os animais apresentaram maiores valores de LPO, acompanhados de menores concentrações de SH-NP, proteínas e atividade da ChE, quando comparados aos animais de 09 e 13 meses. Ao analisar o mesmo cenário, envolvendo os animais de 13 meses, foi possível observar que apesar das alterações identificadas nas análises bioquímicas, percebe-se que não há significância para o modelo quando comparados aos animais de 09 meses. As análises no modelo denominado *Características Celulares EDL* (Área de Secção Transversa, Número de Fibras, Proporção de Fibras Tipo I, IIA e IIB e Sarcômeros em Série), demonstram que houve significância no modelo ($F_{2,21} = 4,8516$; $R^2 = 0,26437$; $p = 0,0001$; FIGURA 14 C), sendo possível observar que os animais de 13 e 17 meses apresentaram modificações das variáveis celulares (redução da proporção de fibras tipo I e IIA) quando comparados aos animais de 9 meses, não havendo diferença entre os animais de 13 e 17 meses. No modelo denominado *Tamanho Muscular do EDL*

(massa e comprimento), não houve significância no modelo ($F_{2,21} = 0,71$; $R^2 = 0,05$; $p = 0,71$; FIGURA 14 E).

Ao avaliar o modelo denominado *Bioquímica SOL* (PTNAS, LPO, SH-NP e ChE), é possível identificar que há significância no modelo ($F_{2,21} = 17,82$; $R^2 = 0,62$; $p < 0,0001$; Figura 14 B), uma vez que os animais de 13 e 17 meses apresentaram maiores valores de LPO, seguidos de menores concentrações de SH-NP, Proteínas e atividade da ChE, quando comparados aos animais de 9 meses. Também foi identificado que não há diferença entre os animais de 13 e 17 meses. A análise do modelo denominado *Características Celulares SOL* (Área de Secção Transversa, Número de Fibras e Sarcômeros em Série), não houve significância no modelo ($F_{2,21} = 2,045$; $R^2 = 0,16301$; $p = 0,0915$; Figura 14 B), assim como não houve diferença no *Tamanho Muscular SOL* (massa e comprimento), não houve significância no modelo ($F_{2,27} = 1,6057$; $R^2 = 0,13264$; $p = 0,1898$; FIGURA 14 F).

FIGURA 14 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DOS MODELOS: BIOQUÍMICA, CARACTERÍSTICAS CELULARES E TAMANHO MUSCULAR PARA OS MÚSCULOS EDL E SOL

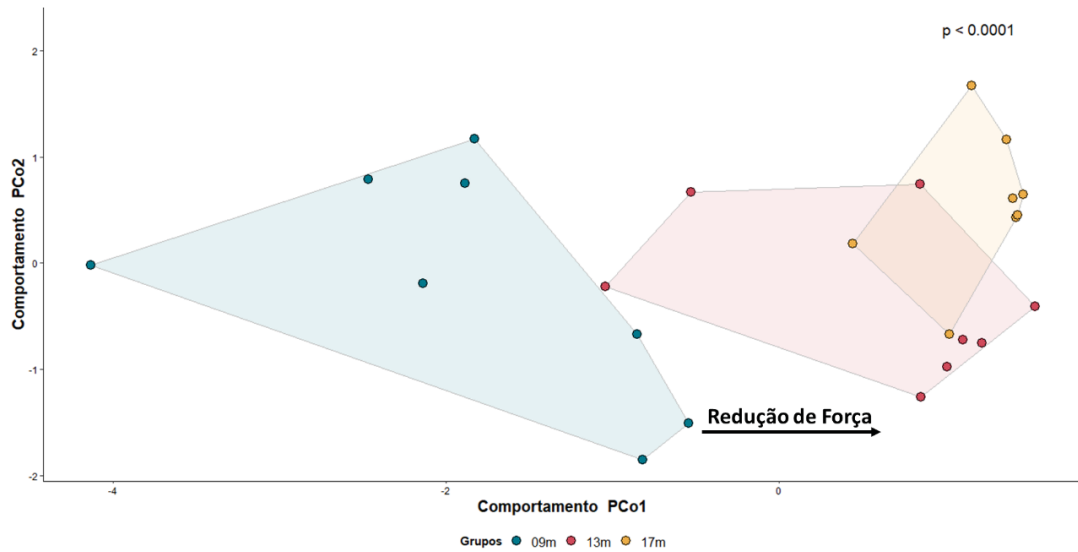


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Características bioquímicas (PTN, ChE, LPO e NP-SH) EDL (A) e SOL (B); Características celulares (número da fibra, área da secção transversal, número de sarcômeros, proporção da fibra tipo I, IIA e IIB) EDL (C) e SOL (D); Tamanho do músculo (peso e comprimento muscular) EDL (E) e SOL (F).

Ao avaliar as interações no modelo *Comportamento* (TCCM-pré, TCCM-pós, Δ TCCM e variação de massa corporal), houve significância no modelo ($F_{2,21} = 11,05$; $R^2 = 0,51$; $p < 0,0001$; FIGURA 15), sendo possível observar redução da força de resistência máxima nos animais de 13 e 17 meses.

FIGURA 15 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS

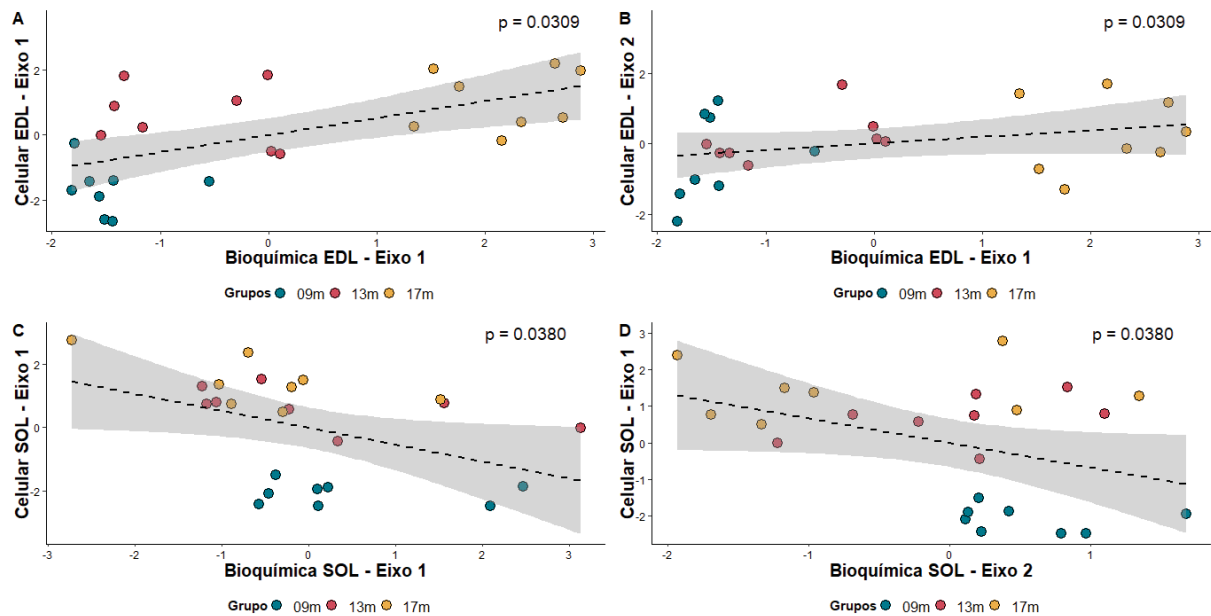


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para comportamento de força (peso corporal e TCCM).

A análise das correlações permite sugerir que as alterações encontradas a nível celular ($F_{1,4} = 2,66$; Partição da Variância = 18,79; $p = 0,0309$; FIGURA 16 A e B) no músculo EDL são influenciadas pelas alterações bioquímicas do tecido ($F_{1,4} = 7,51$; Partição da Variância = 13,28; $p = 0,0073$). Enquanto isso no músculo SOL, as alterações celulares ($F_{1,4} = 5,05$; Partição da Variância = 23,03; $p = 0,0380$; FIGURA 16 C e D) parecem ser decorrentes da alteração bioquímica ($F_{1,4} = 8,18$; Partição da Variância = 9,32; $p = 0,0015$ e $F_{1,4} = 6,53$; Partição da Variância = 7,43; $p = 0,0027$).

FIGURA 16 – CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS A PARTIR DE REGRESSÕES MULTIVARIADAS



FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Biplot da representação das regressões multivariadas para a correlação das alterações bioquímicas com as características celulares do músculo EDL (A e B) e do músculo SOL (C e D).

4.2 O EFEITO DAS INTERVENÇÕES PROPOSTAS SOBRE PROCESSO DE ENVELHECIMENTO MUSCULOESQUELÉTICO

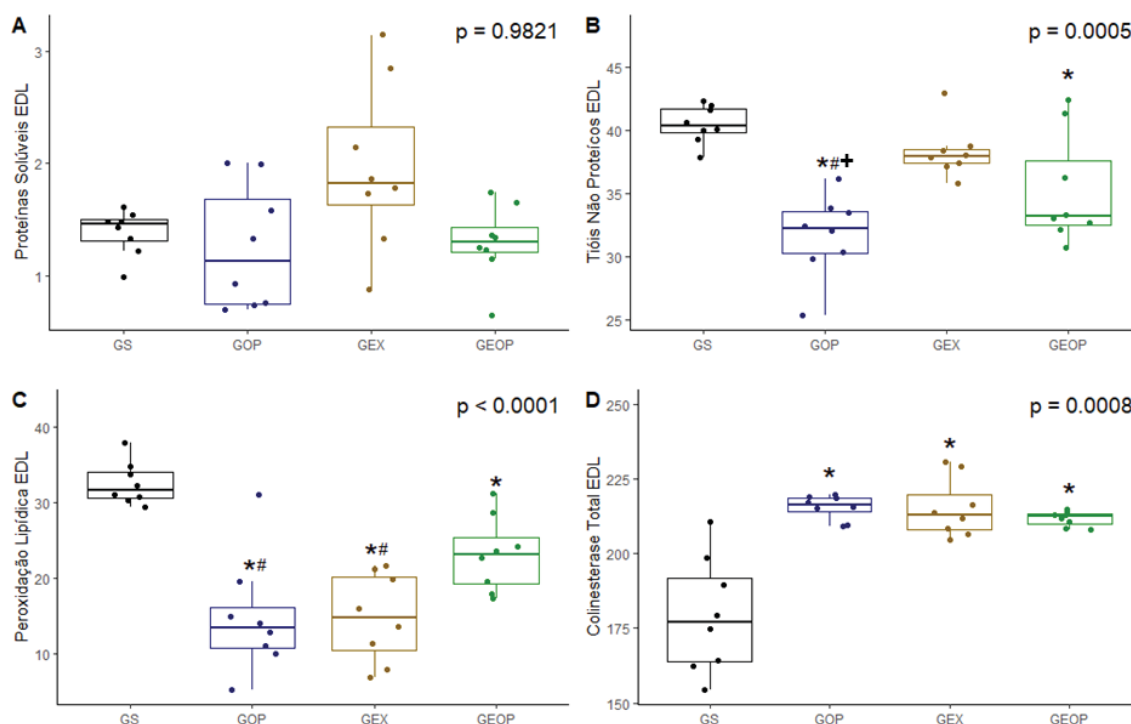
4.2.1 Alterações musculares aos 9 meses de idade

Ao avaliar as características bioquímicas dos músculos obtidos foram encontrados os seguintes resultados: A concentração de proteínas solúveis do EDL não foi diferente entre os grupos ($\chi^2 = 6,2926$, $df = 3$, $p = 0,0982$, FIGURA 17 A). Contudo, foi possível identificar alteração nos valores dos SH-NP ($\chi^2 = 6,2926$, $df = 3$, $p = 0,0005$, FIGURA 17 B), sendo que os animais GOP apresentaram significativa redução da concentração destas moléculas, quando comparados aos demais grupos, enquanto os animais GEOP apresentaram redução das concentrações de SH-NP quando comparados apenas aos animais GS.

Ao avaliar a LPO, foi possível observar que os animais GOP e GEX apresentaram menores níveis de peroxidação lipídica quando comparados aos demais grupos. Ainda, o GEOP apresentou menores concentrações de LPO quando comparado ao GS ($F_{3,28} = 17,145$, $p < 0,0001$; $CV = 26,2\%$, FIGURA 17 C). Ao avaliar

a atividade da ChE foi possível observar maior nível de atividade de todos os grupos quando comparados ao GS ($\chi^2= 16,599$, $df= 3$, $p= 0,0008$, FIGURA 17 D).

FIGURA 17 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO EDL EM ANIMAIS COM 9 MESES DE IDADE



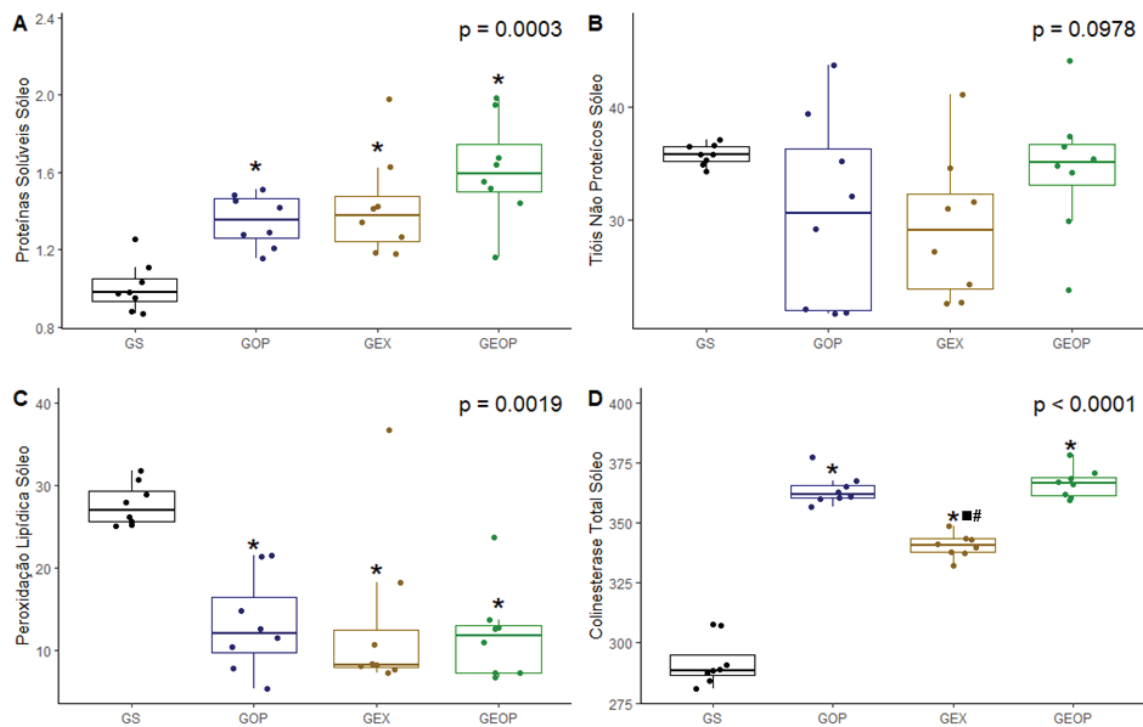
FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores de marcadores bioquímicos de danos celular: A: Proteínas solúveis (PTNASS); B: Tióis não proteicos (SH-NP); C: Peroxidação Lipídica (LPO); D: Colinesterase (ChE) total. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. animais GS; # vs. animais GEOP.

Considerando as mesmas variáveis no músculo SOL, foi possível identificar que tratando-se das proteínas solúveis do SOL, houve aumento das concentrações em todos os grupos quando comparados apenas ao GS ($\chi^2= 18,764$, $df= 3$, $p= 0,0003$, FIGURA 18 A). A avaliação das concentrações de SH-NP demonstrou não existir diferença ($\chi^2= 6,301$, $df= 3$, $p= 0,097$, FIGURA 18 B). Contudo, apesar deste cenário, houve importante redução nas concentrações de LPO em todos os grupos quando comparados ao GS ($\chi^2= 14,806$, $df= 3$, $p= 0,0019$, FIGURA 18 C). Com relação à atividade da ChE, identificou-se significativo aumento da atividade em todos os grupos quando comparados ao GS. Nos animais GOP e GEOP, a elevação também foi

superior à identificada nos animais do GEX ($\chi^2 = 26,599$, $df = 3$, $p = 0,0008$, FIGURA 18 D).

FIGURA 18 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO SÓLEO EM ANIMAIS COM 9 MESES

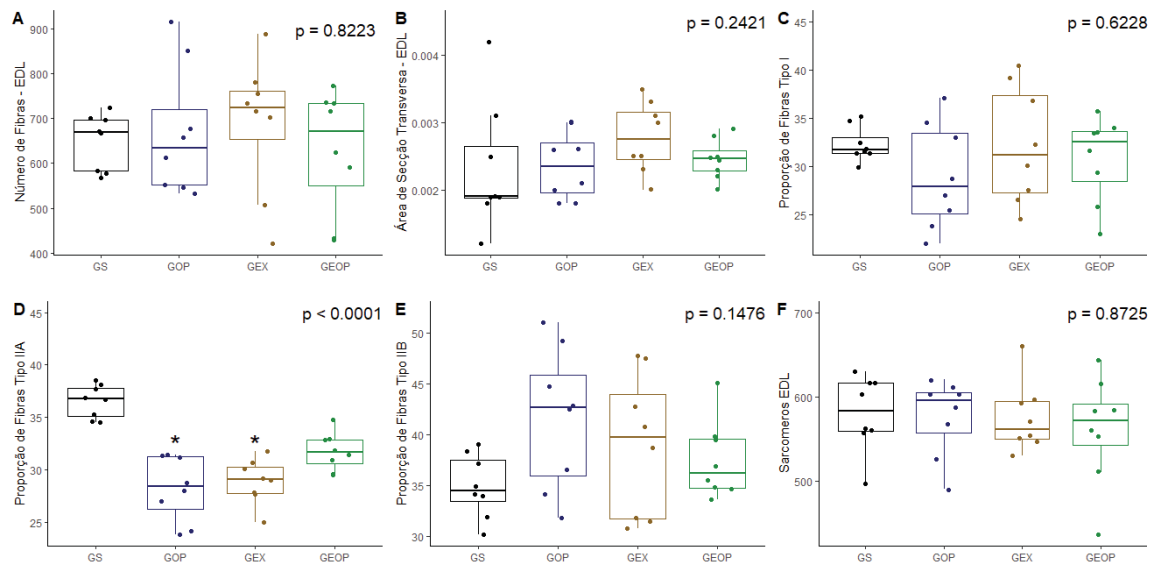


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores de marcadores bioquímicos de danos celular: A: Proteínas solúveis (PTNASS); B: Tióis não proteicos (SH-NP); C: Peroxidação Lipídica (LPO); D: Colinesterase (ChE) total. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. animais GS; ■ vs. GOP; # vs. animais GEOP.

Ao avaliar as características celulares do EDL, não foi observada diferença entre os grupos no número de fibras ($F_{3,28} = 0,304$, $p = 0,8223$; $CV = 19,57\%$, FIGURA 19 A), área de secção transversa ($\chi^2 = 4,187$, $df = 3$, $p = 0,242$, FIGURA 19 B) e sarcômeros em série ($F_{3,28} = 0,233$, $p = 0,872$, $CV = 8,68\%$, FIGURA 19 F). Tratando-se da tipagem de fibras, não houve diferença na proporção de fibras tipo I ($\chi^2 = 1,76$, $df = 3$, $p = 0,628$, FIGURA 19 C) e tipo IIB ($F_{3,28} = 2,034$, $p = 0,1318$, $CV = 14,42\%$, FIGURA 19 E), entretanto foi identificada redução na proporção de fibras tipo IIA nos animais GOP e GEX, quando comparados aos GS ($\chi^2 = 21,53$, $df = 3$, $p < 0,0001$, FIGURA 19 D).

FIGURA 19 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO EDL EM ANIMAIS COM 9 MESES

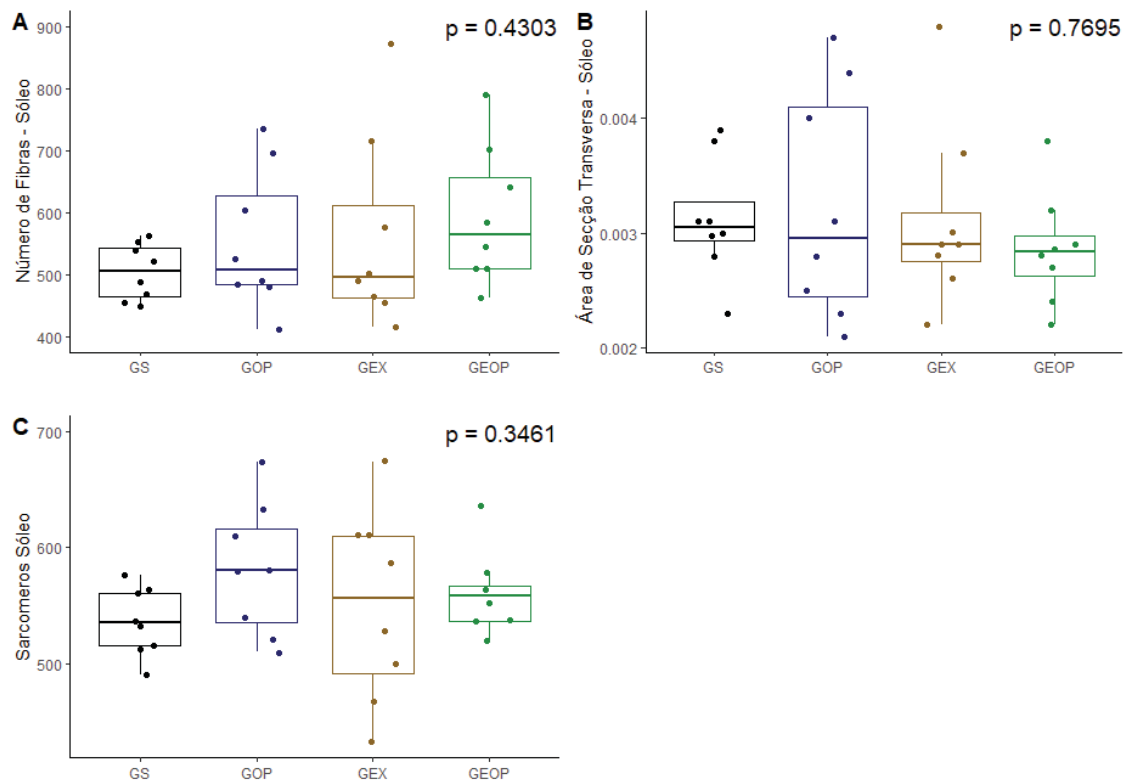


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores: A: Número de fibras; B: Área de secção transversa; C: Proporção de fibras do tipo I; D: Proporção de fibras do tipo IIA; E: Proporção de fibras do tipo IIB; F: Sarcômeros em série. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. animais GS

Com relação às características celulares do SOL, não foram identificadas diferenças entre os grupos no número de fibras ($\chi^2 = 2,758$, $df = 3$, $p = 0,4303$, FIGURA 20 A), área de secção transversa ($F_{3,28} = 0,378$, $p = 0,7695$, $CV = 23,77\%$, FIGURA 20 B) e sarcômeros em série ($\chi^2 = 3,184$, $df = 3$, $p = 0,364$, FIGURA 20 C).

FIGURA 20 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO SÓLEO EM ANIMAIS COM 9 MESES

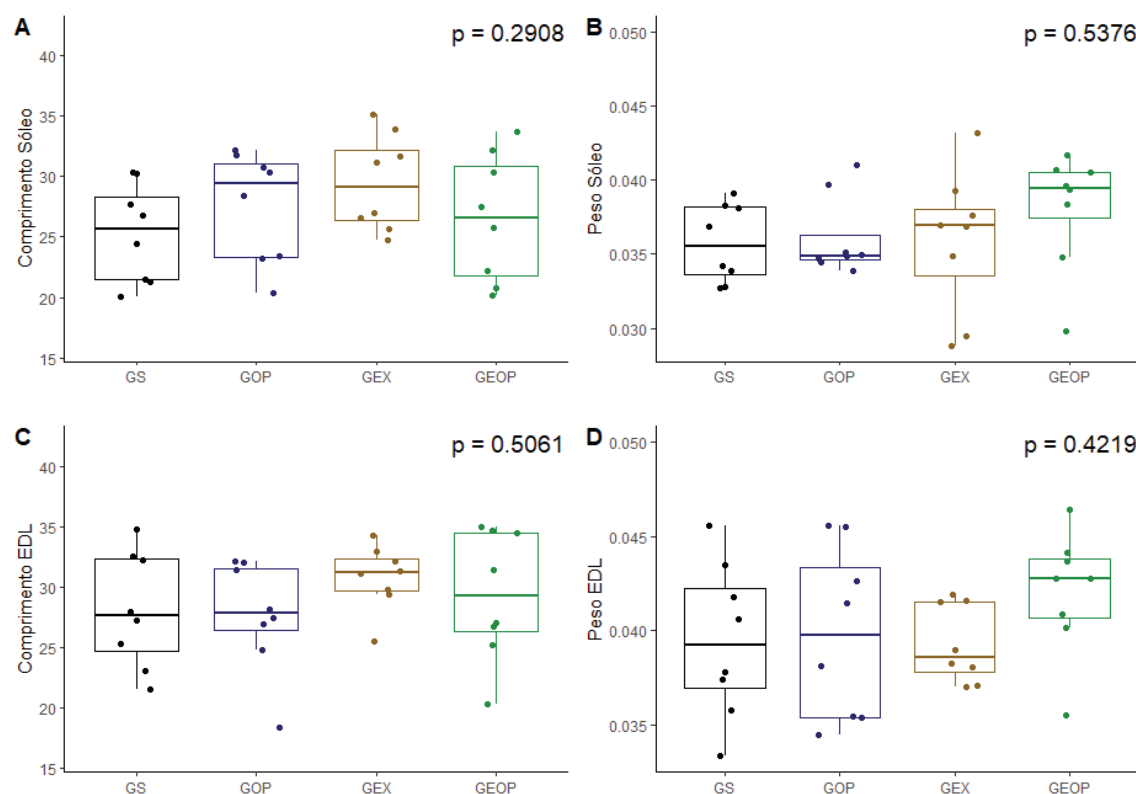


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores: A: Número de fibras; B: Área de secção transversa; C: Sarcômeros em série. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe.

Ao avaliar os músculos SOL e EDL em relação às características de peso ($F_{3,28} = 0,967$, $p = 0,421$, $CV = 9,07\%$ e $F_{3,28} = 0,739$, $p = 0,537$, $CV = 9,97\%$, respectivamente EDL e SOL, FIGURAS 21 D e B) e comprimento ($F_{3,28} = 0,796$, $p = 0,506$, $CV = 15,39\%$ e $\chi^2 = 3,741$, $df = 3$, $p = 0,2908$, respectivamente EDL e SOL, FIGURAS 21 C e A) não foram identificadas diferenças entre os grupos em ambos os músculos.

FIGURA 21 – AVALIAÇÃO DE PESO E COMPRIMENTO DOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL EM ANIMAIS COM 9 MESES

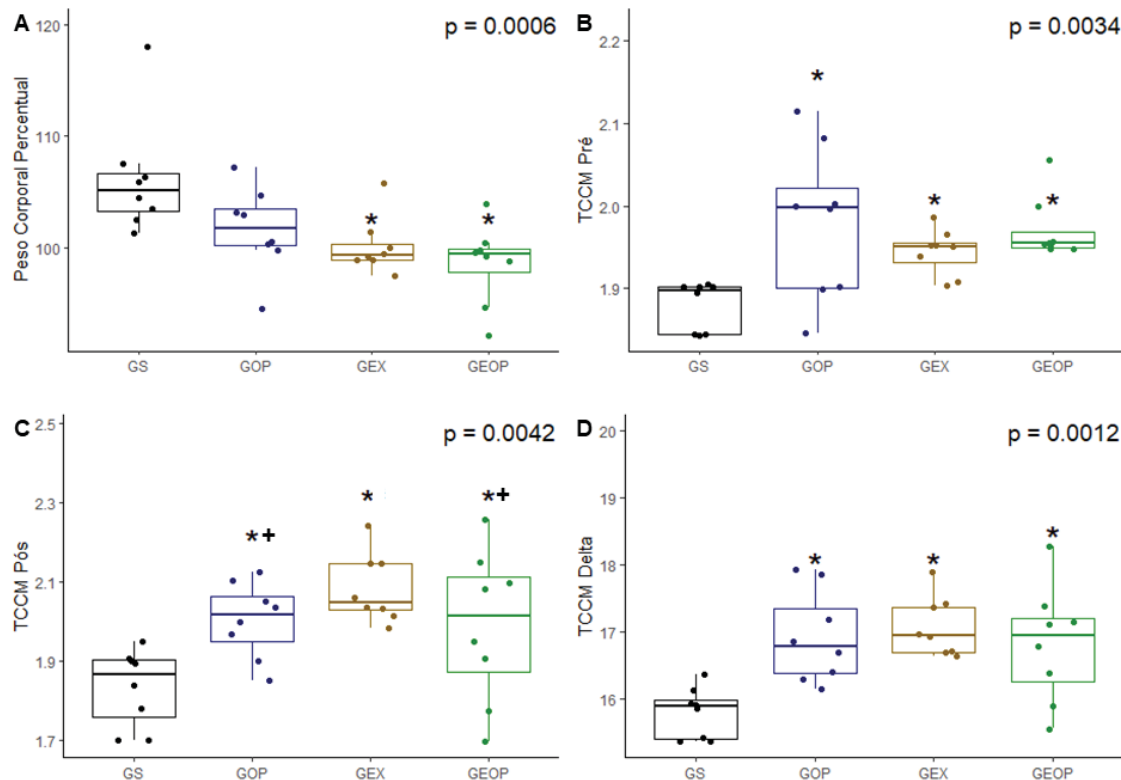


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores de: A: Comprimento Sóleo; B: Peso Sóleo C: Comprimento EDL; D: Peso EDL. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe.

Ao avaliar a variação de massa corporal ($\chi^2 = 13,696$, $df = 3$, $p = 0,0006$, FIGURA 22 A) foi possível observar que os animais GEX e GEOP apresentaram % de massa corporal menor que os animais de GS e GOP. Com relação ao TCCM, foi possível identificar que os animais de todos os grupos experimentais apresentaram desempenho maior quando comparados aos animais GS no TCCM-pré ($\chi^2 = 13,676$, $df = 3$, $p = 0,0034$, FIGURA 22 B) e após 8 semanas de intervenção ($F_{3,28} = 5,496$, $p = 0,0042$, $CV = 6,34\%$, FIGURA 22 C), além disso os animais GEX apresentaram maiores médias quando comparados aos animais GOP e GEOP. Por fim, os valores para o $\Delta TCCM$, os animais de todos os grupos apresentaram valores maiores quando comparados aos animais GS ($F_{3,28} = 6,966$, $p = 0,0012$, $CV = 3,75\%$, FIGURA 22 D).

FIGURA 22 – VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL E DA FUNÇÃO MUSCULAR EM ANIMAIS DE 9 MESES



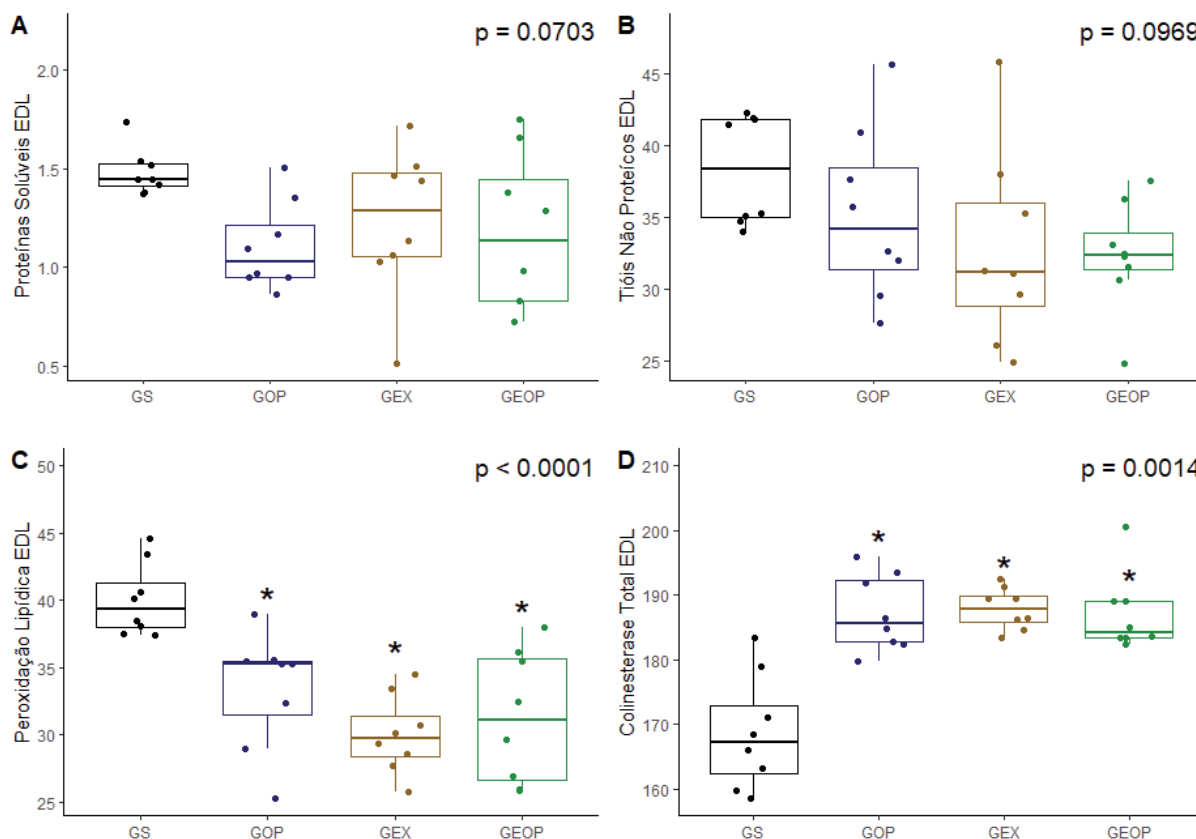
FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores para: A: Percentual de Peso corporal; B: TCCM-pré; C: TCCM-pós; D: Δ TCCM. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. GS; + vs. GEX.

4.2.2 Alterações musculares aos 13 meses de idade

Ao avaliar as características bioquímicas do EDL, não foi possível observar diferença entre os grupos na concentração de proteínas solúveis ($\chi^2 = 7,0483$, $df = 3$, $p = 0,0703$, FIGURA 23 A) e dos SH-NP ($\chi^2 = 6,321$, $df = 3$, $p = 0,096$, FIGURA 23 B). Contudo, foi possível observar que a LPO foi reduzida nos grupos experimentais, quando comparado aos animais GS ($F_{3,28} = 10,804$, $p < 0,0001$, $CV = 11,38\%$, FIGURA 23 C). Com relação à colinesterase, foi possível identificar aumento da atividade da enzima em todos os grupos experimentais, quando comparados aos animais GS ($\chi^2 = 15,551$, $df = 3$, $p = 0,0014$, FIGURA 23 D).

FIGURA 23 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO EDL EM ANIMAIS COM 13 MESES

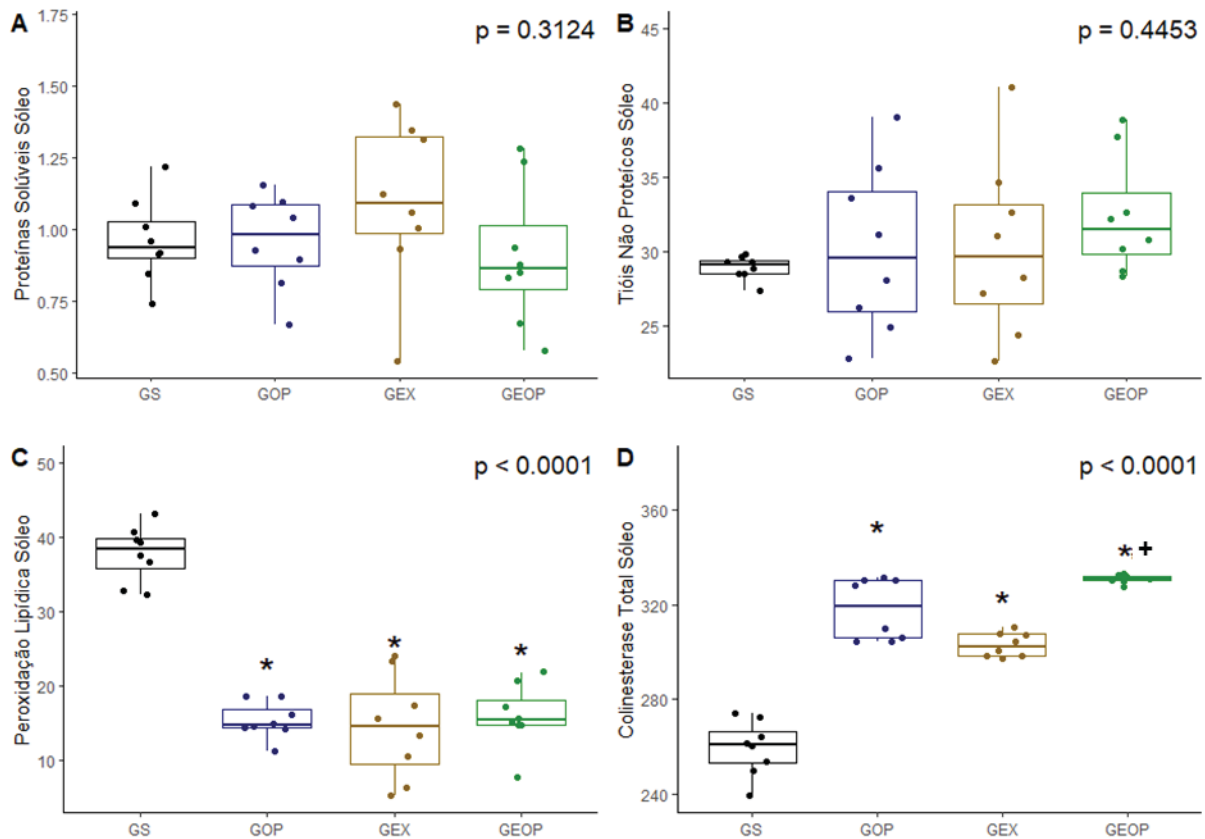


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores de marcadores bioquímicos de danos celular: A: Proteínas solúveis (PTNASS); B: Tióis não proteicos (SH-NP); C: Peroxidação Lipídica (LPO); D: Colinesterase (ChE) total. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. animais GS.

Da mesma forma, ao avaliar as características bioquímicas do SOL, não foi possível observar diferença na concentração de proteínas solúveis ($\chi^2 = 3,565$, $df = 3$, $p = 0,3124$, FIGURA 24 A) e dos SH-NP ($\chi^2 = 2,6705$, $df = 3$, $p = 0,4453$, FIGURA 24 B). No entanto, ao avaliar a LPO, foi possível observar que todos os grupos experimentais apresentaram redução dos valores quando comparados aos animais GS ($F_{3,28} = 45,769$, $p < 0,0001$, $CV = 22,48\%$, FIGURA 24 C). Com relação à atividade da ChE, houve aumento da atividade nos grupos experimentais quando comparados ao grupo GS ($\chi^2 = 25,515$, $df = 3$, $p < 0,0001$, FIGURA 24 D).

FIGURA 24 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO SOLEO EM ANIMAIS COM 13 MESES

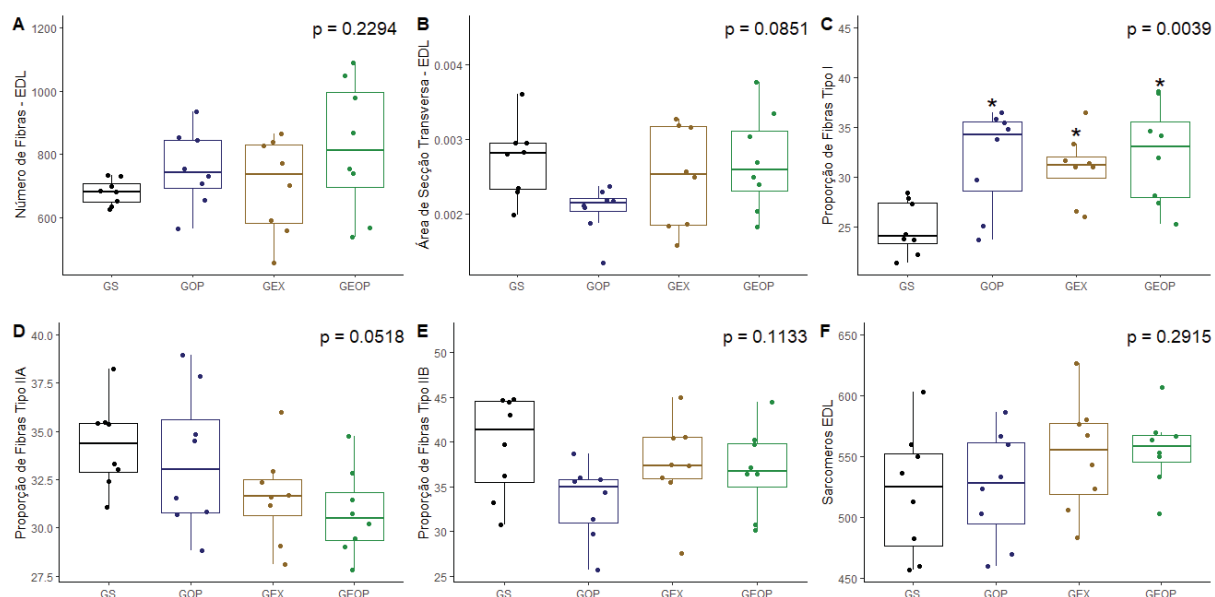


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores de marcadores bioquímicos de danos celular: A: Proteínas solúveis (PTNASS); B: Tióis não proteicos (SH-NP); C: Peroxidação Lipídica (LPO); D: Colinesterase (ChE) total. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. animais GS. + vs. Animais GEX.

Tratando-se das características celulares do EDL, não foi observada diferença no número de fibras ($\chi^2 = 4,315$, $df = 3$, $p = 0,2294$, FIGURA 25 A), na área de secção transversa ($F_{3,28} = 2,441$, $p = 0,0851$, $CV = 22,3\%$, FIGURA 25 B) e no número de sarcômeros em série ($F_{3,28} = 1,307$, $p = 0,2915$, $CV = 8,2\%$, FIGURA 25 F). Ao avaliar a tipagem de fibras, foi possível identificar aumento na proporção de fibras tipo I, em todos os grupos experimentais quando comparado ao GS ($F_{3,28} = 5,567$, $p = 0,0039$, $CV = 13,87\%$, FIGURA 25 C). Não foi possível identificar diferenças na proporção de fibras tipo IIA ($F_{3,28} = 2,912$, $p = 0,0518$, $CV = 8,28\%$, FIGURA 25 D) e tipo IIB ($F_{3,28} = 2,174$, $p = 0,1133$, $CV = 13,38\%$, FIGURA 25 E) entre os grupos.

FIGURA 25 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO DO EDL EM ANIMAIS COM 13 MESES

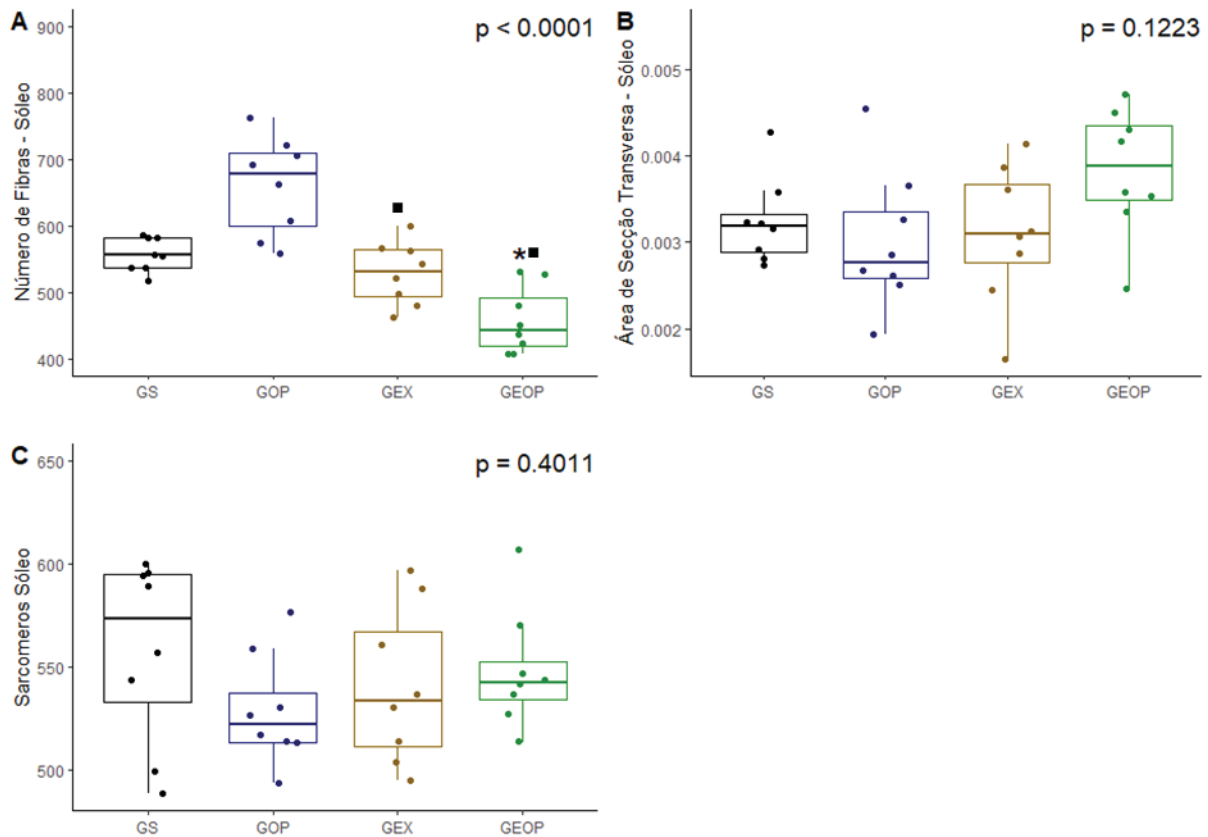


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores: A: Número de fibras; B: Área de secção transversa; C: Proporção de fibras do tipo I; D: Proporção de fibras do tipo IIA; E: Proporção de fibras do tipo IIB; F: Sarcômeros em série. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. animais GS.

Ao avaliar as características celulares do SOL, foi identificada redução no número de fibras para os animais GEOP e GEX quando comparados à GOP, em adição os animais GEOP também apresentaram redução no número de fibras quando comparado ao GS ($\chi^2 = 21,272$, $df = 3$, $p < 0,0001$, FIGURA 26 A). Apesar desta alteração, não foram identificadas diferenças na área de secção transversal ($F_{3,28} = 2,103$, $p = 0,1223$, $CV = 21,92\%$, FIGURA 26 B) e no número de sarcômeros em série ($F_{3,28} = 1,014$, $p = 0,4011$, $CV = 6,5\%$, FIGURA 26 C).

FIGURA 26– AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO SÓLEO EM ANIMAIS COM 13 MESES

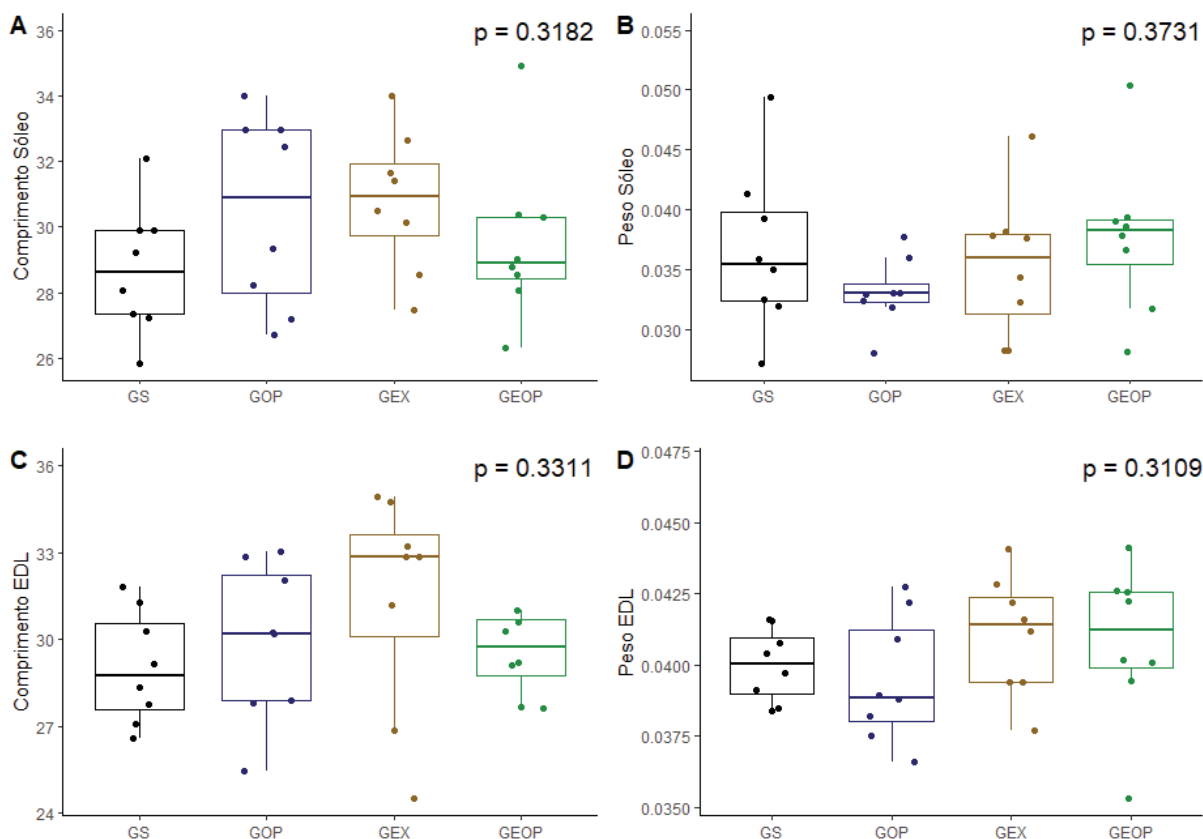


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores: A: Número de fibras; B: Área de secção transversa; C: Sarcômeros em série. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. animais GS; ■ vs. GOP.

Ao avaliar as características macroscópicas do EDL e do SOL, não foi observada diferença no peso ($\chi^2 = 3,576$, $df = 3$, $p = 0,3109$ e $\chi^2 = 3,122$, $df = 3$, $p = 0,3731$, respectivamente EDL e SOL, FIGURAS 27 D e B) e comprimento ($F_{3,28} = 1,191$, $p = 0,3311$, $CV = 15,39\%$ e $F_{3,28} = 1,227$, $p = 0,3182$, respectivamente EDL e SOL, FIGURAS 27 C e A) entre os grupos em ambos os músculos.

FIGURA 27 – AVALIAÇÃO DE PESO E COMPRIMENTO DOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL EM ANIMAIS COM 13 MESES

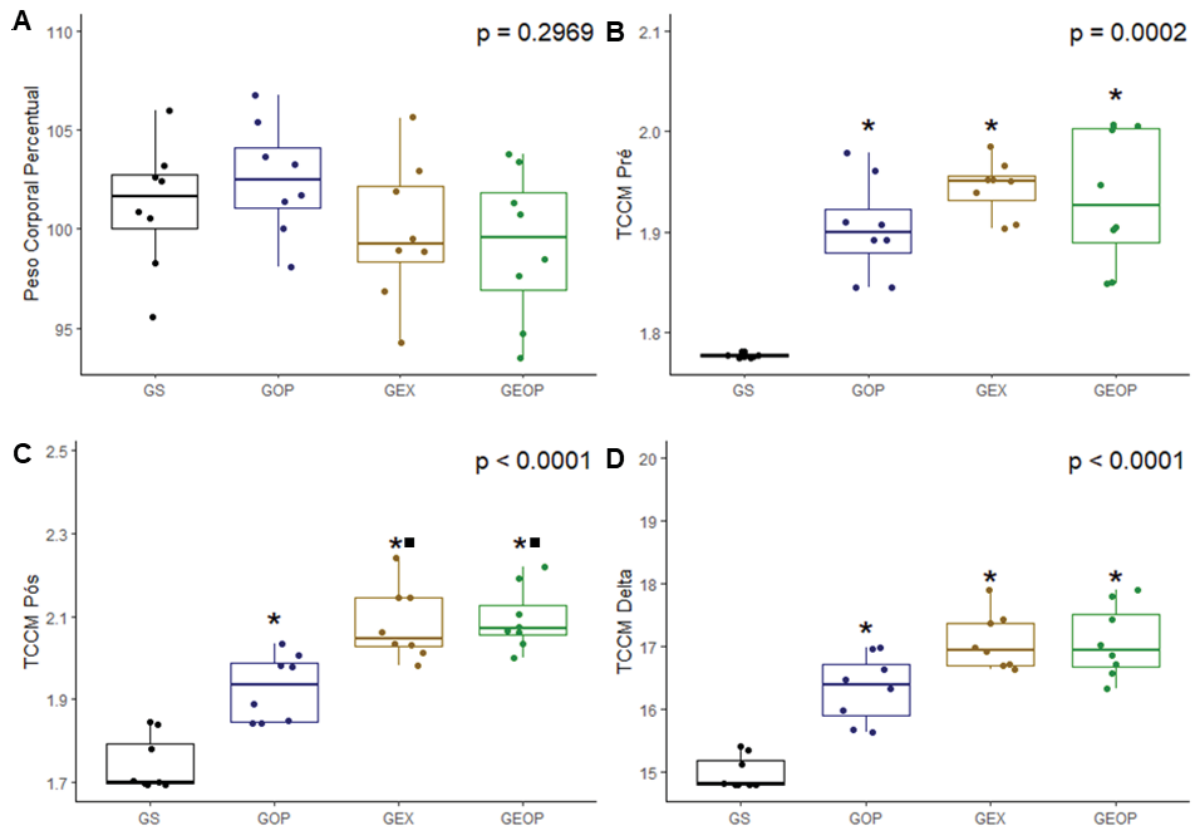


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores de: A: Comprimento Sôleo; B: Peso Sôleo C: Comprimento EDL; D: Peso EDL. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe.

Ao avaliar a variação de massa corporal ($\chi^2 = 3,6903$, $df = 3$, $p = 0,2969$, FIGURA 28 A), não foi observada diferença entre os grupos. Com relação ao desempenho dos animais no TCCM, os animais de todos os grupos experimentais apresentaram maior desempenho quando comparados a GS no TCCM pré ($\chi^2 = 19,041$, $df = 3$, $p = 0,0002$, FIGURA 28 B). Também em TCCM pós houve diferença dos grupos quando comparados ao GS; os grupos GEX e GEOP também apresentaram diferença quando comparados ao GOP ($\chi^2 = 24,375$, $df = 3$, $p < 0,0001$, FIGURA 28 C). Em decorrência dos resultados destas duas tomadas de média, os dados do Δ TCCM foram diferentes entre os grupos quando comparados ao GS ($\chi^2 = 21,395$, $df = 3$, $p < 0,0001$, FIGURA 28 D).

FIGURA 28 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL E FUNÇÃO MUSCULAR EM ANIMAIS COM 13 MESES



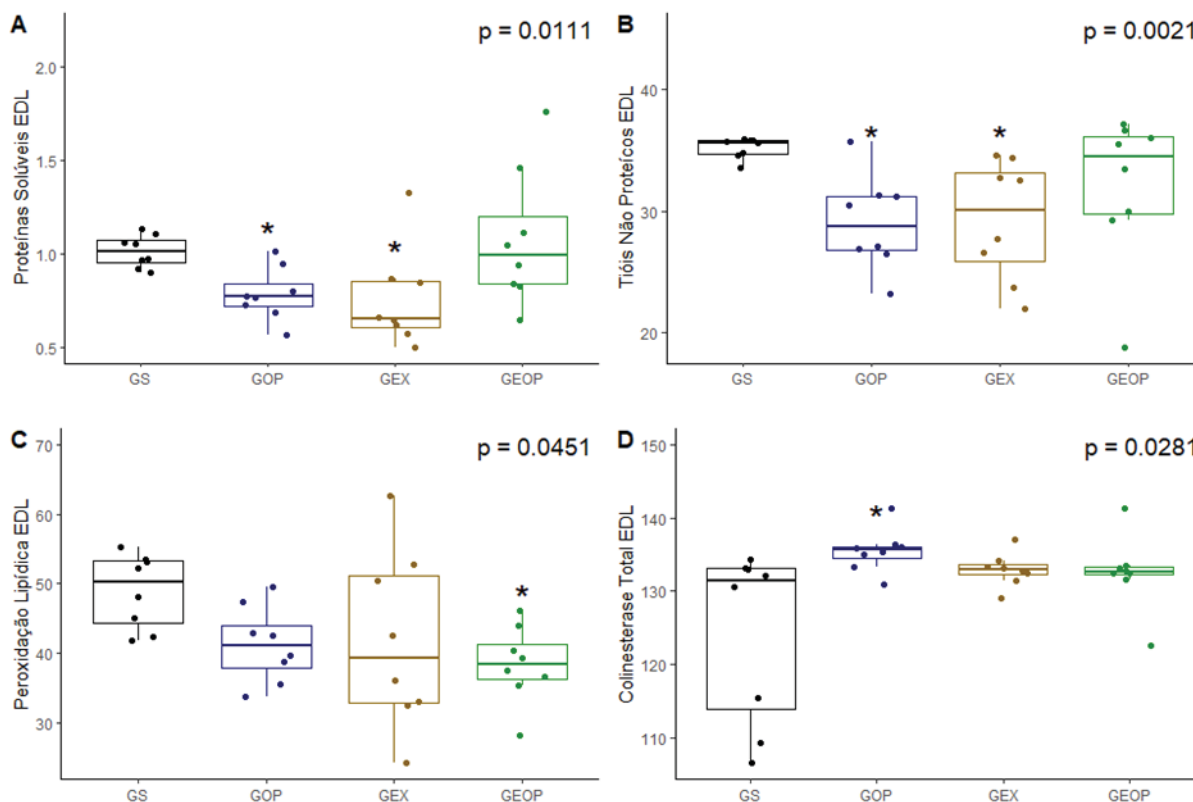
FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores para: A: Percentual de Peso corporal; B: TCCM pré; C: TCCM pós; D: Δ TCCM. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. GS; ■ vs. GEX.

4.4.3 Alterações musculares aos 17 meses de idade

Ao avaliar as características bioquímicas do EDL, foi possível observar redução na concentração de proteínas solúveis nos grupos GOP e GEX quando comparados ao GS ($\chi^2 = 11,128$, $df = 3$, $p = 0,011$, FIGURA 29 A), assim como as concentrações de SH-NP ($\chi^2 = 11,349$, $df = 3$, $p = 0,009$, FIGURA 29 B). A avaliação da concentração de LPO demonstrou que apenas o grupo GEOP foi significativamente diferente quando comparado ao GS apresentando menores valores de peroxidação e os demais grupos não apresentaram alterações na LPO ($\chi^2 = 7,639$, $df = 3$, $p = 0,0451$, FIGURA 29 C). Em relação à atividade da ChE, apenas o GOP foi diferente do GS, apresentando elevação na atividade da enzima ($\chi^2 = 9,096$, $df = 3$, $p = 0,0281$, FIGURA 29 D).

FIGURA 29 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO EDL EM ANIMAIS COM 17 MESES

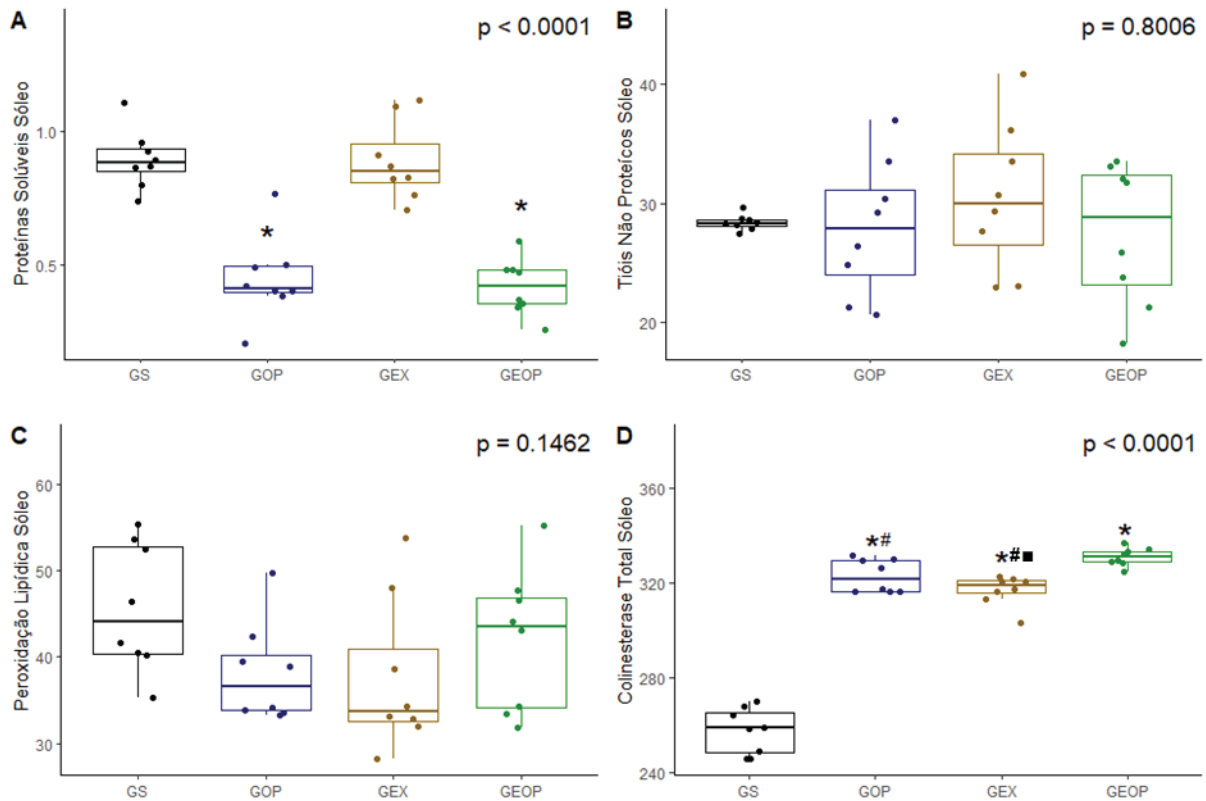


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores de marcadores bioquímicos de danos celular: A: Proteínas solúveis (PTNASS); B: Tióis não proteicos (SH-NP); C: Peroxidação Lipídica (LPO); D: Colinesterase (ChE) total. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. animais GS.

Ao avaliar as características bioquímicas do SOL, foi possível observar diferença na concentração de proteínas solúveis ($F_{3,28} = 32,27$, $p < 0,0001$, $CV = 20\%$, FIGURA 30 A), sendo que os animais GOP e GEOP apresentaram redução da concentração quando comparados a GS e GEX. No entanto, não foram identificadas diferenças na concentração dos SH-NP ($\chi^2 = 1,002$, $df = 3$, $p = 0,8006$, FIGURA 30 B) e de LPO ($F_{3,28} = 1,938$, $p = 0,1462$, $CV = 18,68\%$, FIGURA 30 C). Com relação à atividade de ChE, houve aumento na atividade da enzima em todos os grupos quando comparados ao GS. Ainda, os grupos GOP e GEX foram diferentes de GEOP e diferiram entre si nesta variável ($F_{3,28} = 181,6$, $p < 0,00001$, $CV = 2,29\%$, FIGURA 30 D).

FIGURA 30 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANOS CELULARES NO MÚSCULO SÓLEO EM ANIMAIS COM 17 MESES

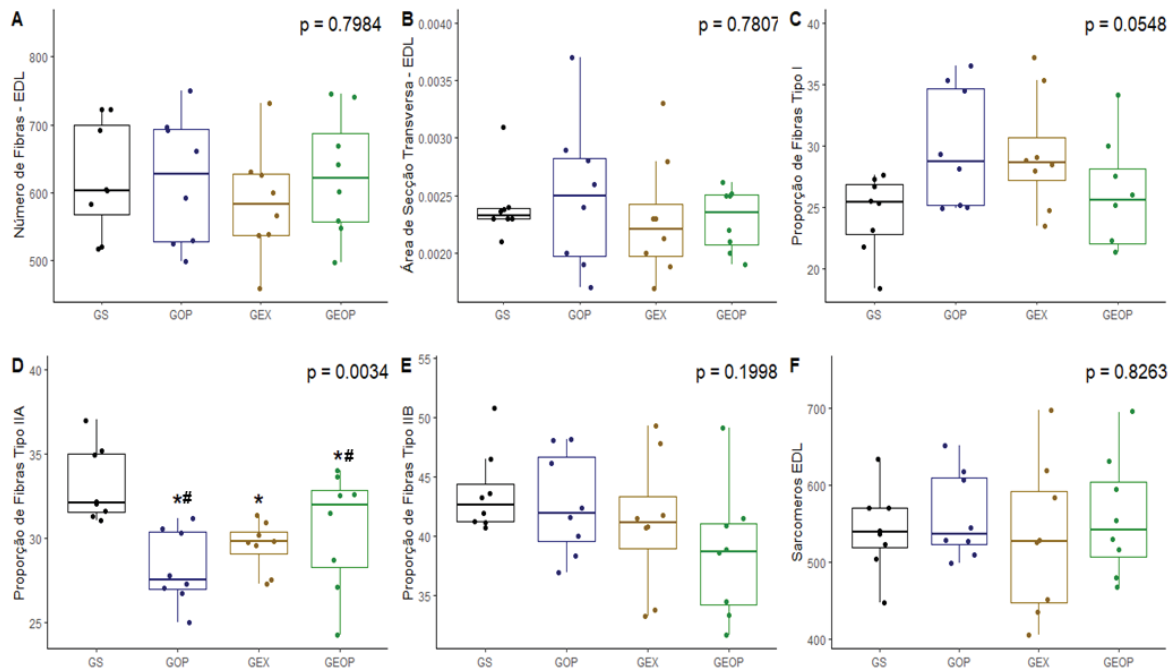


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores de marcadores bioquímicos de danos celular: A: Proteínas solúveis (PTNASS); B: Tíóis não proteicos (SH-NP); C: Peroxidação Lipídica (LPO); D: Colinesterase (ChE) total. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. animais GS; ■ vs. OP; # vs. GEOP.

Ao avaliar as características celulares do EDL, não foi observada diferença entre os grupos com relação ao número de fibras ($F_{3,28} = 0,337$, $p = 0,7984$, $CV = 14,25\%$, FIGURA 31 A), área de secção transversa ($F_{3,28} = 1,224$, $p = 0,3193$, $CV = 20,7\%$, FIGURA 31 B) e número de sarcômeros em série ($F_{3,28} = 0,298$, $p = 0,8263$, $CV = 13,62\%$, FIGURA 31 F). Em relação à tipagem de fibras, não houve diferença na proporção de fibras tipo I ($F_{3,28} = 2,856$, $p = 0,0548$, $CV = 16,02\%$, FIGURA 31 C) e tipo IIB ($F_{3,28} = 1,699$, $p = 0,1898$, $CV = 11,69\%$, FIGURA 31 E). Foi somente possível observar diferença na proporção de fibras tipo IIA, sendo que os animais GOP e GEX apresentaram os menores valores quando comparados aos GS e GEOP, enquanto os animais GEOP diferiram apenas do GS ($F_{3,28} = 5,735$, $p = 0,0034$, $CV = 8,1\%$, FIGURA 31 D).

FIGURA 31 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO DO EDL EM ANIMAIS COM 17 MESES

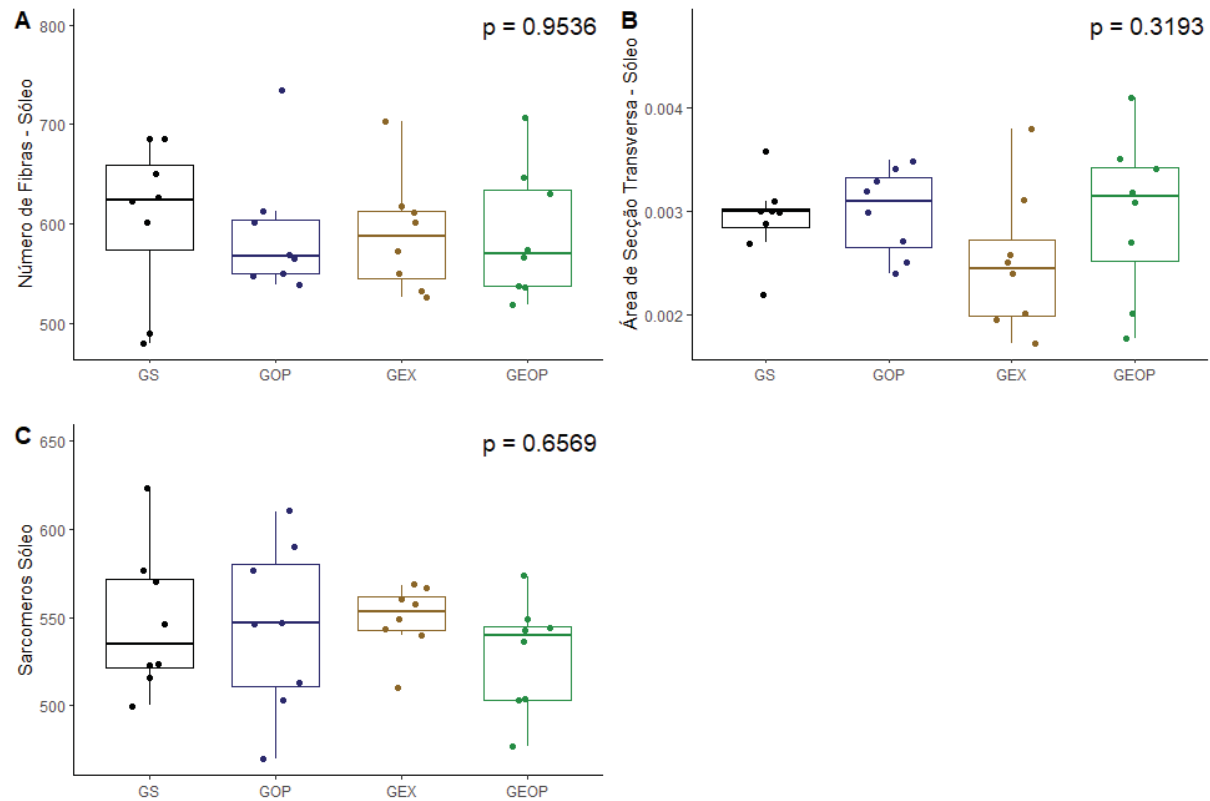


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores: A: Número de fibras; B: Área de secção transversa; C: Proporção de fibras do tipo I; D: Proporção de fibras do tipo IIA; E: Proporção de fibras do tipo IIB; F: Sarcômeros em série. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. animais GS; # vs. GEOP.

Tratando-se das características celulares do SOL, não foi observada diferença entre os grupos no número de fibras ($F_{3,28} = 0,109$, $p = 0,9536$, $CV = 11,34\%$, FIGURA 32 A), na área de secção transversal ($F_{3,28} = 1,224$, $p = 0,3193$, $CV = 20,7\%$, FIGURA 32 B) e no número de sarcômeros em série ($F_{3,28} = 0,542$, $p = 0,6569$, $CV = 6,66\%$, FIGURA 32 C).

FIGURA 32 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CELULARES DAS FIBRAS DO MÚSCULO DO EDL EM ANIMAIS COM 17 MESES

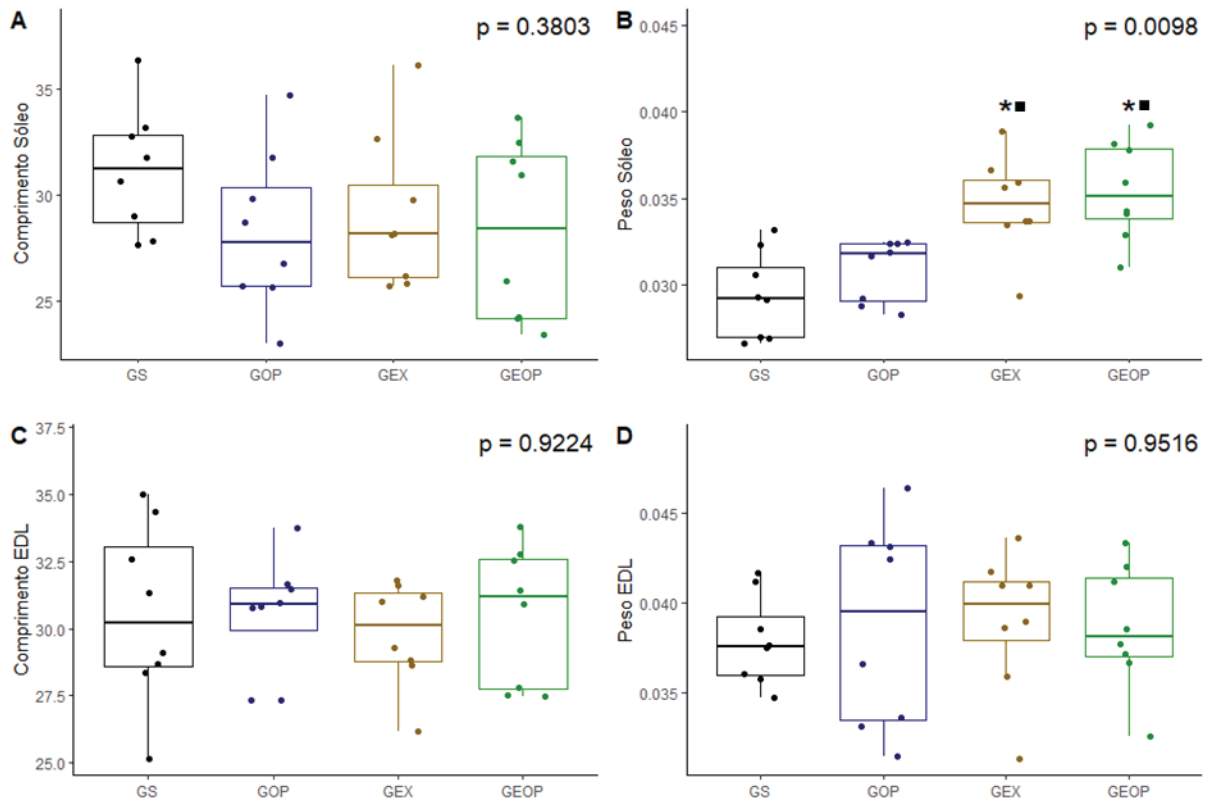


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores: A: Número de fibras; B: Área de secção transversa; C: Sarcômeros em série. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe.

Ao avaliar as características macroscópicas do EDL e SOL, não foi observada diferença no peso do EDL ($F_{3,28} = 0,113$, $p = 0,9516$, $CV = 10,47\%$, FIGURA 33 D) e comprimento de ambos os músculos ($F_{3,28} = 0,159$, $p = 0,9224$, $CV = 8,46\%$ e $F_{3,28} = 1,063$, $p = 0,3803$, respectivamente EDL e SOL, FIGURAS 33 C e A). Contudo, os animais GEX e GEOP apresentaram maior peso do músculo sóleo quando comparados aos GS e GOP ($F_{3,28} = 10,703$, $p < 0,0001$, $CV = 7,73\%$, FIGURA 33 D).

FIGURA 33 – AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DO EDL E SOL EM ANIMAIS DE 17 MESES

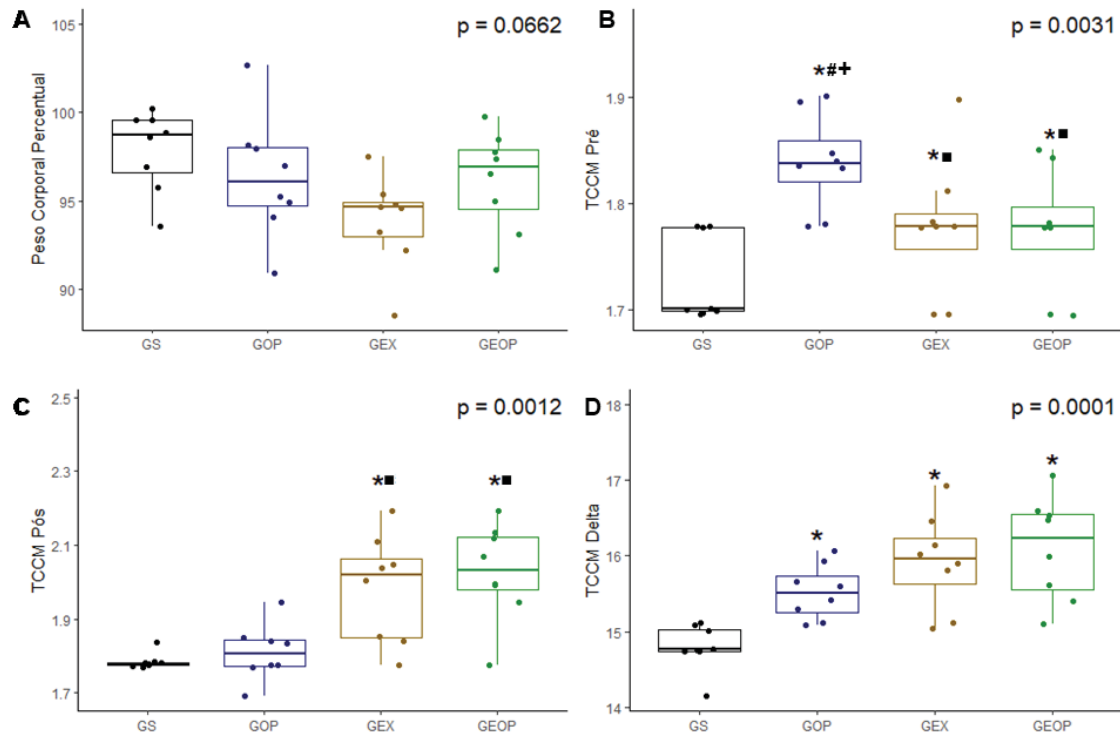


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores de: A: Comprimento SÓleo; B: Peso SÓleo C: Comprimento EDL; D: Peso EDL. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs GS; ■ vs GOP.

Ao avaliar a variação de massa corporal ($F_{3,28} = 2,677$, $p = 0,0662$, $CV = 2,97\%$, FIGURA 34 A), não foi observada diferença entre os grupos. Com relação ao TCCM apesar das diferenças entre grupos identificadas no TCCM-pré ($F_{3,28} = 5,889$, $p = 0,0031$, $CV = 2,99\%$, FIGURA 34 B) e no TCCM-pós ($\chi^2 = 15,832$, $df = 3$, $p = 0,0012$, FIGURA 34 C), considerando o $\Delta TCCM$, foi possível identificar aumento no desempenho dos animais dos grupos experimentais apenas quando comparados ao GS ($F_{3,28} = 9,912$, $p = 0,0001$, $CV = 3,35\%$, FIGURA 34 D).

FIGURA 34 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL E FUNÇÃO MUSCULAR EM ANIMAIS COM 17 MESES



FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Boxplot dos valores para: A: Percentual de Peso corporal; B: TCCM TCCM-PRÉ; C: TCCM TCCM-PÓS; D: Δ TCCM. GS: sedentários; GOP: animais suplementados com óleo de peixe; GEX: animais submetidos ao exercício resistido; GEOP: animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com óleo de peixe. * vs. GS; ■ vs. GEX.

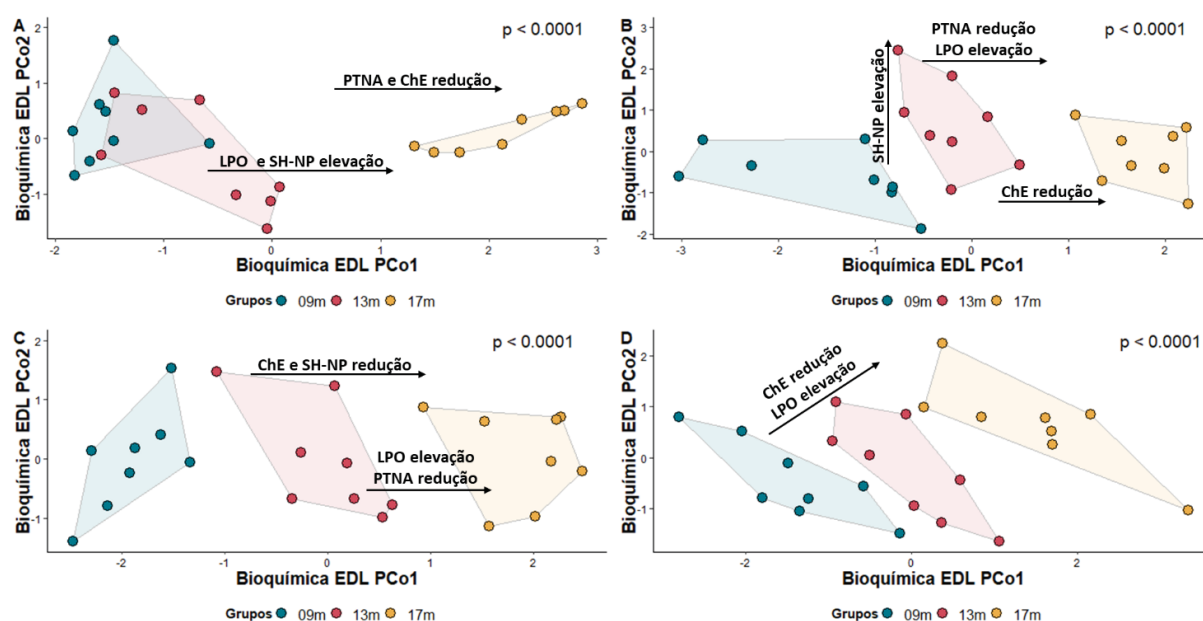
4.4 ANÁLISE DE COORDENADAS PRINCIPAIS (PCoA)

Para melhor compreender o efeito das estratégias empregadas no contexto do envelhecimento, foi empregada a Análise Multivariada Permutacional de Variância (PERMANOVA).

Na análise multivariada do modelo denominado de *Características Bioquímicas do EDL* entre as idades nos animais sedentários ($F_{2,21} = 22,146$; $R^2 = 0,6783$; $p < 0,0001$; FIGURA 35 A), foi observada significância, sendo que os animais apresentaram redução significativa na concentração de SH-NP e elevação na concentração de LPO aos 13 meses de idade, enquanto houve redução na atividade da ChE e na concentração de PTNAS aos 17 meses. Da mesma forma, foi possível identificar significância no modelo entre as idades nos animais GOP ($F_{2,21} = 14,134$; $R^2 = 0,5737$; $p < 0,0001$; FIGURA 35 B), de maneira que foi observar aumento significativo na concentração de SH-NP nos animais de 13 meses, mas também

aumento da LPO e redução das PTNAS, enquanto a redução da ChE se manteve apenas aos 17 meses de vida. Também, foi observada significância no modelo entre as idades para os animais GEX ($F_{2,21}= 18,582$; $R^2= 0,6389$; $p< 0,0001$; FIGURA 35 C), sendo possível observar redução da atividade da ChE e na concentração dos SH-NP aos 13 meses de idade, enquanto a redução de PTNAS e elevação da LPO ocorreu apenas aos 17 meses. Por fim, a análise do modelo proposto para os animais GEOP apresentou significância entre as idades ($F_{2,21}= 8,2773$; $R^2= 0,4408$; $p< 0,0001$; FIGURA 35 D) sendo possível observar redução na atividade da ChE e aumento na concentração de LPO a partir dos 13 meses, porém, sem haver alteração na concentração de PTNAS e de SH-NP entre as idades.

FIGURA 35 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS PARA O MÚSCULO EDL



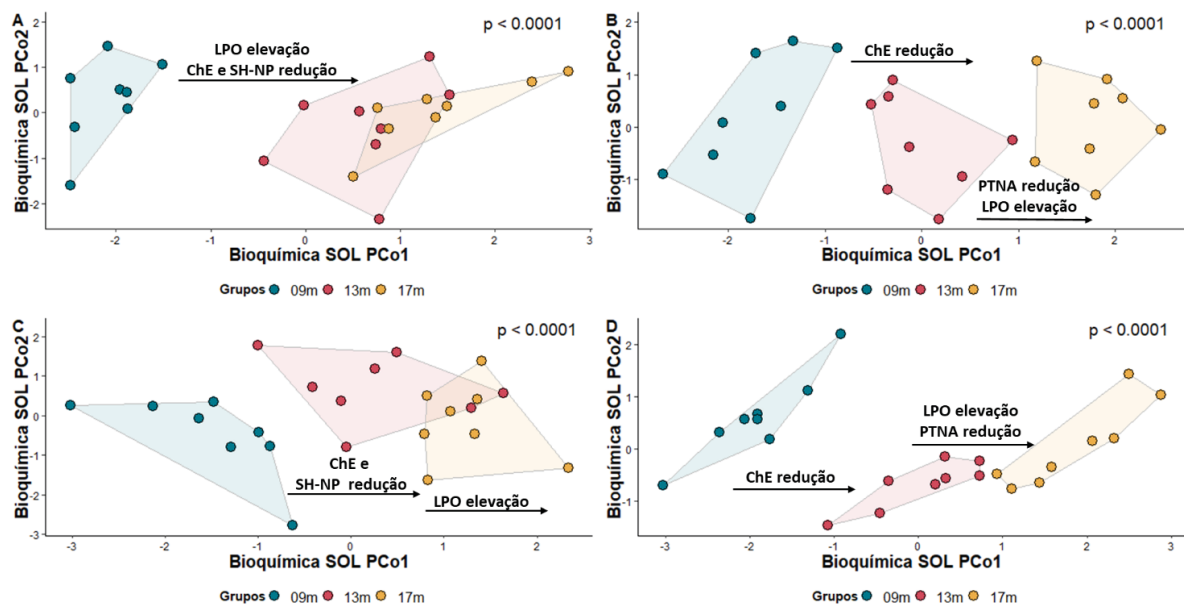
FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Características bioquímicas (PTNAS, ChE, LPO e NP-SH) do EDL. GS (A); GOP (B), GEX (C) e GEOP (D).

Ao comparar o modelo denominado de *Características Bioquímicas* do SOL entre as idades nos animais sedentários ($F_{2,21}= 17,821$; $R^2= 0,62924$; $p< 0,0001$; FIGURA 36 A), foi observada significância, sendo que os animais apresentaram redução significativa na concentração de SH-NP e da atividade da ChE, acompanhada de elevação na concentração de LPO a partir dos 13 meses de idade. Da mesma forma, houve significância no modelo entre as idades nos animais GOP ($F_{2,21}= 19,675$;

$R^2= 0,6521$; $p< 0,0001$; FIGURA 36 B), sendo que foi possível observar redução da ChE aos 13 meses de idade, entretanto a redução das PTNAS e aumento da LPO ocorreu apenas aos 17 meses de vida, sem que houvesse redução da concentração de SH-NP entre as idades. Também, foi observada significância no modelo entre as idades para os animais GEX ($F_{2,21}= 11,021$; $R^2= 0,5121$; $p< 0,0001$; FIGURA 36 C), sendo possível observar redução da atividade da ChE e na concentração dos SH-NP aos 13 meses de idade, enquanto a elevação da LPO ocorreu apenas aos 17 meses. Por fim, o modelo proposto para os animais GEOP apresentou significância entre as idades ($F_{2,21}= 27,538$; $R^2= 0,7239$; $p< 0,0001$; FIGURA 36 D) sendo possível observar redução na atividade da ChE a partir dos 13 meses, enquanto houve redução de PTNAS e elevação da LPO apenas aos 17 meses.

FIGURA 36 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS PARA O MÚSCULO SÓLEO



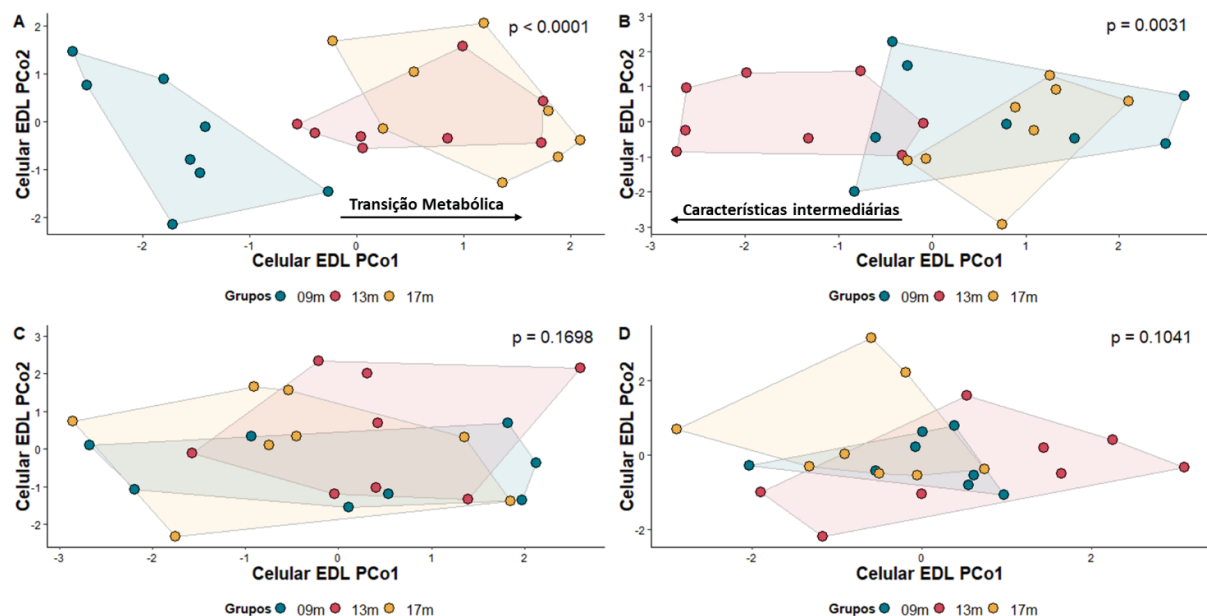
FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Características bioquímicas (PTNAS, ChE, LPO e NP-SH) do Sóleo. GS (A); GOP (B), GEX (C) e GEOP (D).

Pela análise do modelo denominado de *Características Celulares do EDL*, foi possível observar significância para os animais sedentários entre as idades ($F_{2,21}= 4,978$; $R^2= 0,3215$; $p< 0,0001$; FIGURA 37 A), sendo visível a transição metabólica das fibras musculares dos animais a partir dos 13 meses de idade. Enquanto isso, houve significância do modelo para os animais GOP ($F_{2,21}= 3,204$; $R^2= 0,2338$; $p=$

0,0031; FIGURA 37 B), sendo possível observar aumento de características intermediárias nos animais de 13 meses, no entanto perdendo essa variação aos 17 meses quando as fibras voltam a se comportar de forma similar aos animais de 09 meses. Contudo, não houve significância do modelo para os animais GEX ($F_{2,21}=1,471$; $R^2=0,1228$; $p=0,1698$; FIGURA 37 C) e GEOP ($F_{2,21}=1,573$; $R^2=0,1302$; $p=0,1041$; FIGURA 37 D), mostrando que não houve alteração celular entre as idades com os tratamentos propostos.

FIGURA 37– ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO CARACTERÍSTICAS CELULARES PARA O MÚSCULO EDL

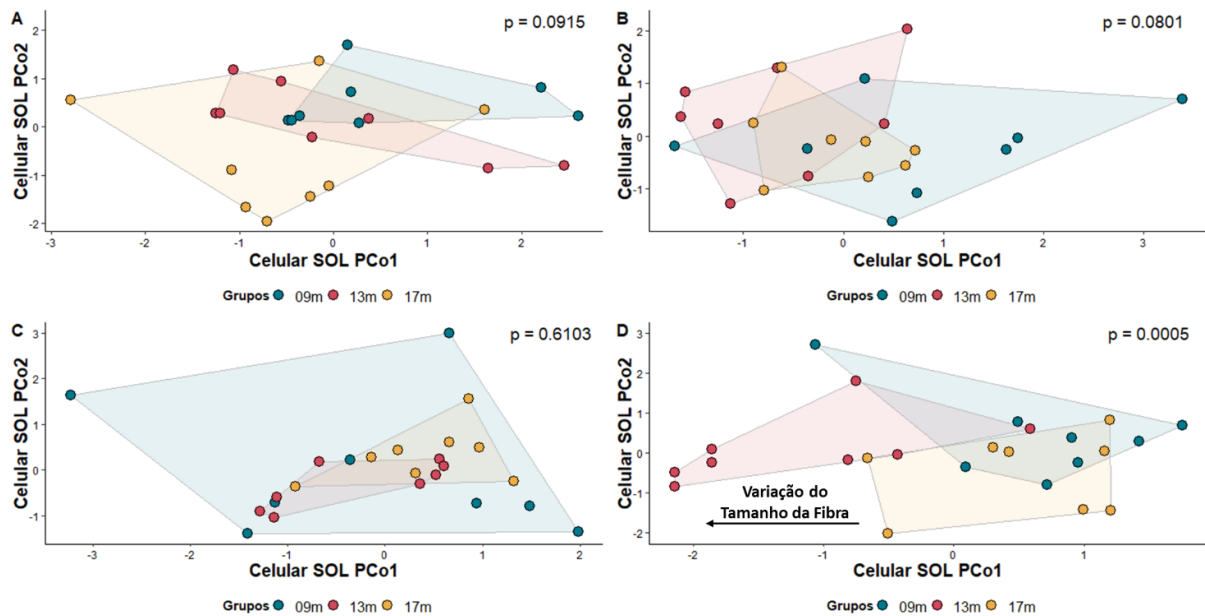


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Características celulares (número da fibra, área da seção transversal, número de sarcômeros, proporção da fibra tipo I, IIA e IIB) do EDL. GS (A); GOP (B), GEX (C) e GEOP (D).

Já o modelo denominado de *Características Celulares do SOL*, não apresentou significância para os animais sedentários entre as idades ($F_{2,21}=2,208$; $R^2=0,1738$; $p=0,00915$; FIGURA 38 A) e de forma semelhante, não houve significância do modelo para os animais GOP ($F_{2,21}=1,925$; $R^2=0,1549$; $p=0,0801$; FIGURA 38 B) e para os animais GEX ($F_{2,21}=0,775$; $R^2=0,0687$; $p=0,6103$; FIGURA 38 C). No entanto, para os animais GEOP houve significância ($F_{2,21}=1,573$; $R^2=0,1302$; $p=0,0005$; FIGURA 38 D), evidenciando padrão de variação do tamanho das fibras nos animais de 13 meses, sendo que perdem essa característica aos 17 meses, retornando a um padrão similar ao dos animais de 9 meses.

FIGURA 38 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO CARACTERÍSTICAS CELULARES PARA O MÚSCULO EDL

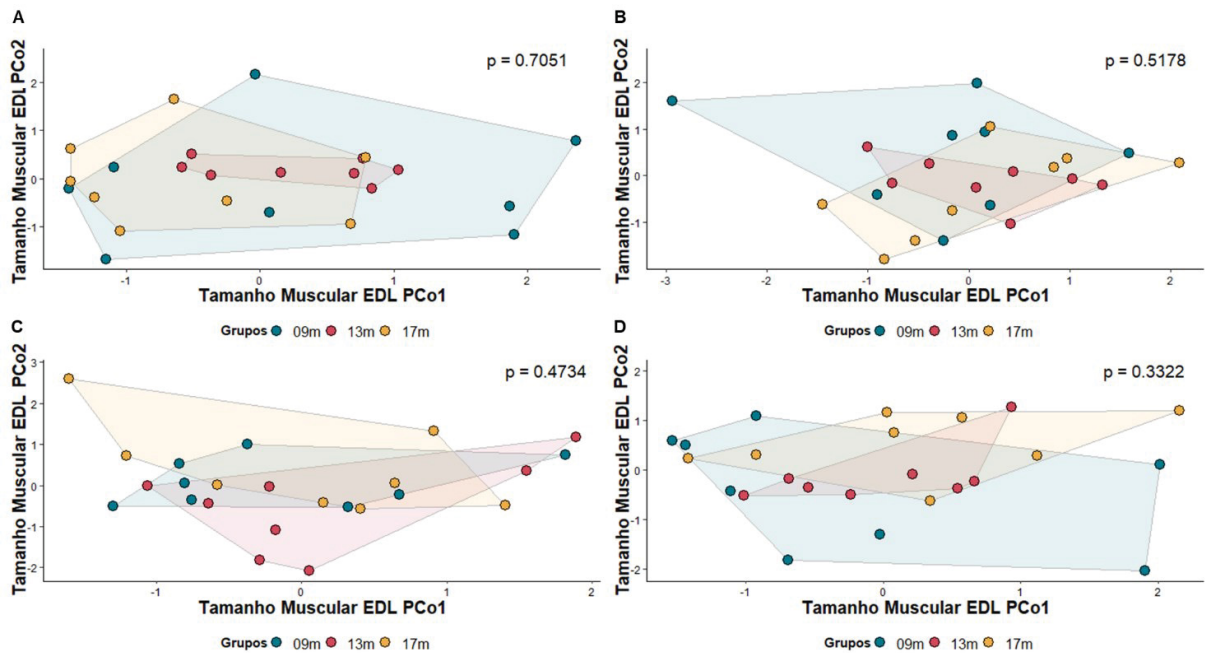


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Características celulares (número da fibra, área da seção transversal, número de sarcômeros,) do SOLEO. GS (A); GOP (B), GEX (C) e GEOP (D).

Tratando-se do modelo denominado de *Tamanho Muscular* do EDL, não houve significância para os animais sedentários entre as idades ($F_{2,21} = 0,749$; $R^2 = 0,0632$; $p = 0,7051$; FIGURA 39 A). Da mesma forma, não houve significância do modelo para os animais GOP ($F_{2,21} = 0,828$; $R^2 = 0,0731$; $p = 0,5178$; FIGURA 39 B), GEX ($F_{2,21} = 0,917$; $R^2 = 0,0803$; $p = 0,4734$; FIGURA 39 C) e para os animais GEOP ($F_{2,21} = 1,202$; $R^2 = 0,0919$; $p = 0,3322$; FIGURA 39 D), mostrando que as idades não promoveram alterações na estrutura macroscópica muscular.

FIGURA 39 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO TAMANHO MUSCULAR PARA O MÚSCULO EDL

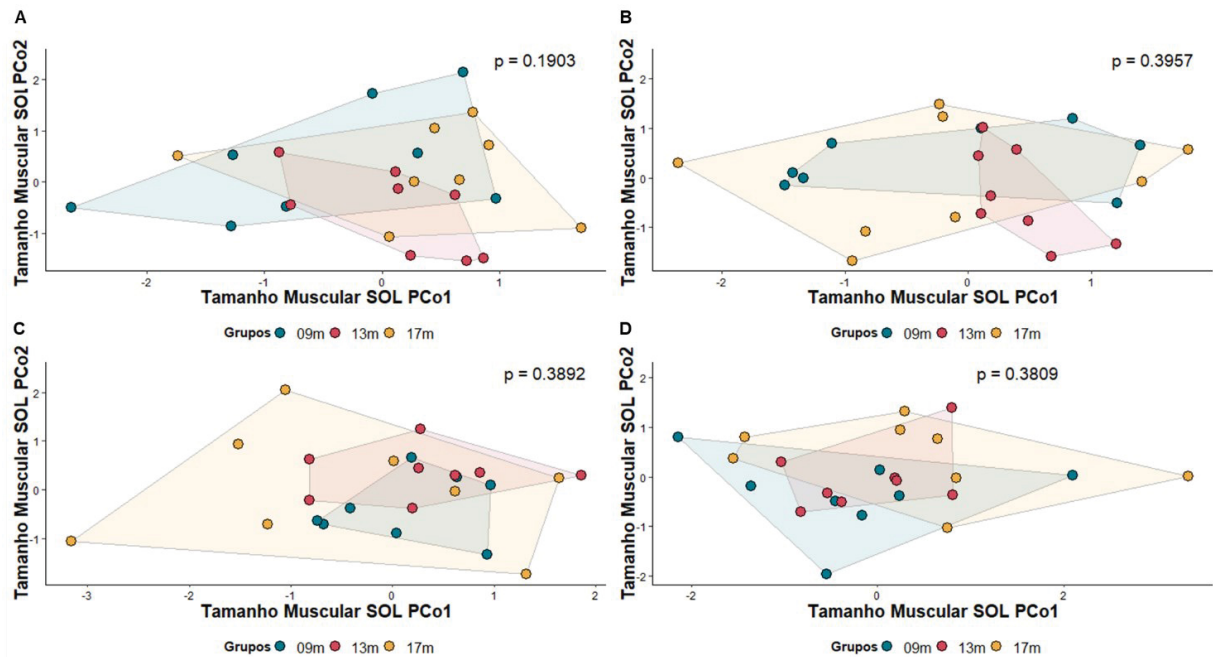


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Tamanho muscular (peso e comprimento) do EDL. GS (A); GOP (B), GEX (C) e GEOP (D).

De forma similar, tratando-se do modelo denominado de *Tamanho Muscular* do SOL, não houve significância para os animais sedentários entre as idades ($F_{2,21} = 1,995$; $R^2 = 0,1596$; $p = 0,1903$; FIGURA 40 A). Da mesma forma, não houve significância do modelo para os animais GOP ($F_{2,21} = 1,047$; $R^2 = 0,0906$; $p = 0,3957$; FIGURA 40 B), GEX ($F_{2,21} = 1,062$; $R^2 = 0,0919$; $p = 0,3982$; FIGURA 40 C) e para os animais GEOP ($F_{2,21} = 1,057$; $R^2 = 0,0914$; $p = 0,3809$; FIGURA 40 D), mostrando que as idades não promoveram alterações na estrutura macroscópica muscular.

FIGURA 40 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO TAMANHO MUSCULAR PARA O MÚSCULO SÓLEO

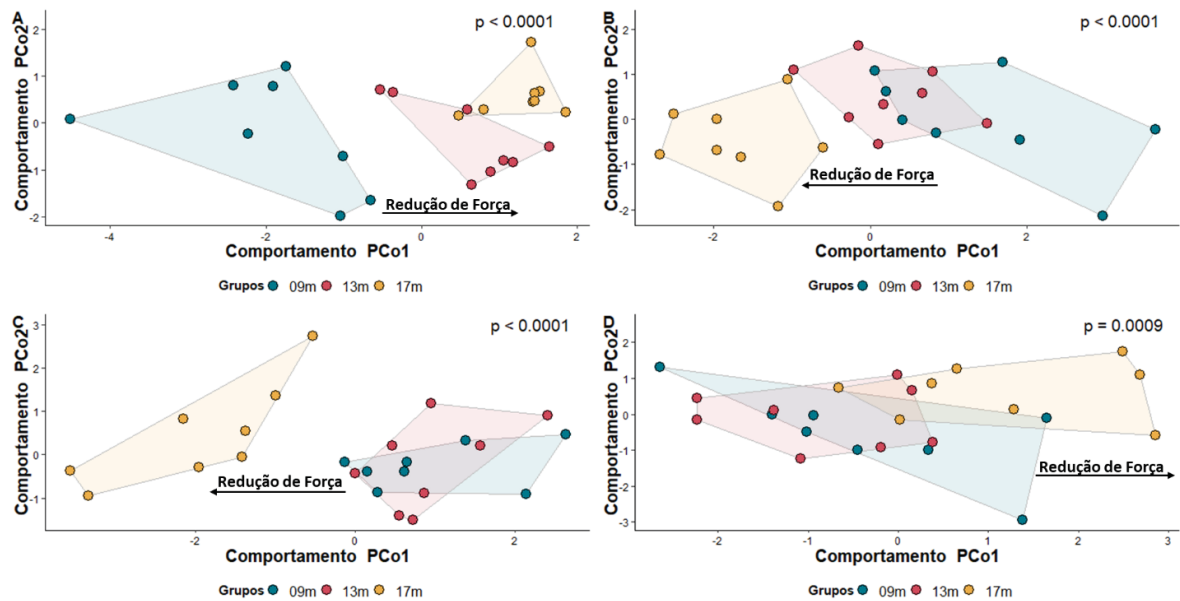


FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Tamanho muscular (peso e comprimento) do Sóleo. GS (A); GOP (B), GEX (C) e GEOP (D).

No entanto, tratando-se do modelo denominado de *Comportamento*, houve significância para os animais sedentários entre as idades ($F_{2,21} = 13,329$; $R^2 = 0,5593$; $p < 0,0001$; FIGURA 41 A), sendo que os animais apresentaram redução de força a partir dos 13 meses, se mantendo em redução até os 17 meses. Da mesma forma, houve significância do modelo para os animais GOP ($F_{2,21} = 10,073$; $R^2 = 0,4896$; $p < 0,0001$; FIGURA 41 B), GEX ($F_{2,21} = 10,918$; $R^2 = 0,5097$; $p < 0,0001$; FIGURA 41 C) e para os animais GEOP ($F_{2,21} = 4,732$; $R^2 = 0,3106$; $p = 0,0009$; FIGURA 41 D), sendo que em todos os grupos a redução de força foi observada apenas nos animais de 17 meses, mostrando que os tratamentos foram eficazes em retardar a redução de força muscular.

FIGURA 41 – ANÁLISE MULTIVARIADA PERMUTACIONAL DE VARIÂNCIA DO MODELO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS



FONTE: A autora (2020)

LEGENDA: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para comportamento de força (peso corporal e MCLT). GS (A); GOP (B), GEX (C) e GEOP (D).

5 DISCUSSÃO

O envelhecimento é um processo multifatorial que se apresenta de forma bastante heterogênea entre a população. A literatura propõe que vários fatores podem contribuir para que o processo de envelhecimento se acentue e promova suas diversas manifestações. A partir da multifatorialidade do envelhecimento, diversas teorias têm sido sugeridas pela literatura para explicar o curso do envelhecimento e dentre os fatores apontados como determinantes deste processo estão o acúmulo de danos oxidativos e alterações no equilíbrio redox (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

Para obter uma melhor compreensão de como o envelhecimento afeta o músculo esquelético, avaliamos os músculos SOL e EDL em ratos para expandir nosso conhecimento sobre os efeitos do envelhecimento, buscando identificar o momento em que os processos deletérios se estabelecem como causa para perda de funcionalidade muscular.

Ao analisarmos os marcadores bioquímicos de danos oxidativos, identificamos que os músculos SOL e EDL apresentaram redução das concentrações de SH-NP, acompanhado da elevação de LPO ao longo do tempo. A literatura sugere durante o envelhecimento há um decaimento das concentrações de SH-NP e que este decaimento é proporcional ao aumento das concentrações de marcadores de danos celulares, como a LPO (ROSSI et al., 2010). Além disso, a redução de moléculas antioxidantes pode ser a principal causa de processos de degradação de macromoléculas celulares, como lipídios e proteínas (FANÒ et al., 2001). Neste contexto, ainda pudemos identificar que a perda de capacidade antioxidante, indicada pela redução na concentração de SH-NP, promoveu resultados distintos dependendo das características de cada músculo. Apesar da identificação de aumento na taxa de LPO tanto no SOL quanto no EDL, apenas este último apresentou degradação de proteínas, sugerindo que as características metabólicas de cada músculo podem contribuir para este processo degenerativo. Em adição, não investigamos se tais alterações foram suficientes para provocar danos funcionais.

É sabido que SOL e EDL apresentam constituição diferente considerando o tipo de fibras musculares, sendo o sóleo formado predominantemente por fibras do Tipo I (81,9%) e o EDL com predomínio de fibras do tipo II (15,5% IIA, 29,9% IIB e fibras do tipos II híbridas) (STARON et al., 1999) e por isso podem se comportar de forma distinta em cenários de degeneração e senescência. As fibras musculares do

tipo I possuem características de contração lenta e metabolismo oxidativo, enquanto as fibras do tipo IIA apresentam contração rápida e metabolismo glicolítico oxidativo e as fibras do tipo IIB possuem características de contração rápida e metabolismo glicolítico (BROOKE, KAISER, 1970).

Neste trabalho investigamos também as alterações estruturais dos músculos sóleo e EDL em três momentos distintos. Nas análises histomorfológicas, foi possível identificar que o músculo EDL apresentou significativa alteração na constituição de fibras, com redução de fibras tipo I e IIA, acompanhado do aumento de fibras tipo IIB, ao longo do tempo. As alterações nas fibras tipo I e tipo IIA podem ser explicadas porque o músculo EDL é predominantemente um músculo de contração rápida, onde as fibras de contração lenta tem pouca participação no desempenho muscular (VERDIJK et al., 2009). Devido às características metabólicas das fibras do tipo I, tem sido sugerido que músculos com predominância de fibras oxidativas apresentem maior concentração de moléculas antioxidantes, por isso mesmo que envelhecimento favoreça um ambiente pró-oxidativo, músculos do tipo I tendem a apresentar menos alterações estruturais que os do tipo II (WANG; PESSIN, 2013). Desta forma atribui-se estes resultados ao fato do músculo SOL, se caracterizar pela predominância de fibras oxidativas, o que significa que em seu ambiente citosólico o sistema antioxidante deve sempre funcionar de maneira equilibrada, para evitar danos permanentes.

O presente trabalho também avaliou características celulares dos músculos SOL e EDL, a partir da análise do número de fibras, área de secção e números de sarcômeros em série. Neste contexto, apesar do aumento da LPO, não foram identificadas alterações estruturais no EDL. A análise do músculo SOL, permitiu identificar aumento no número de fibras, sem modificações na área de secção transversa da fibra.

Durante o envelhecimento, as características celulares são modificadas pela falência de diversos processos biológicos. A redução da capacidade de síntese proteica, alterações na comunicação celular e disfunções da placa motora podem induzir proteólise, o que se reflete em perda de massa e função muscular (HÖHN et al., 2017). Durante o envelhecimento a atrofia das fibras se caracteriza pela diminuição das fibras musculares (redução de tamanho e número), deposição de lipofuscina e lipídios, além da substituição por tecidos conjuntivos (DUMITRU et al., 2018).

Em uma pesquisa que comparou as alterações musculares em ratos com idades de 6 e 24 meses, foi possível identificar que o envelhecimento afetou o tamanho da fibra, as proporções do tipo de fibra e a contração muscular, modificando propriedades do tecido muscular em termos qualitativos e quantitativos em três grupamentos musculares do membro posterior de ratos. Com base nestes achados, os autores sugerem que as alterações relacionadas à idade diferiram entre músculos de contração rápida e lenta (LARSSON; EDSTRÖM, 1986).

Neste modelo de estudo, as alterações celulares que são relacionadas ao avanço da idade não foram identificadas mostrando que no modelo animal estas mudanças podem ocorrer em idade mais avançada neste modelo animal (ARNOLD et al., 2017). Além disso, a literatura neste campo do conhecimento é bastante contraditória e produzem uma gama de resultados, uma vez que o tipo de músculo utilizado, a linhagem de modelos animais e as análises de biópsias em músculos humanos podem produzir resultados distintos (MITCHELL et al., 2015; HU et al., 2017).

Apesar de fibras tipo I e II serem diferentemente afetadas pelo processo de envelhecimento, de maneira que fibras oxidativas parecem ser mais resistentes à degeneração, estes dados não corroboram com o aumento no número de fibras identificadas no músculo SOL.

É sabido que a perda da função muscular associada ao envelhecimento apresenta causas multifatoriais e dentre elas encontramos as alterações na atividade da unidade motora e declínio na eficiência metabólica (LARSSON et al., 2019). Tem sido sugerido que estas alterações no sistema neuromuscular, podem estar relacionadas às transformações metabólicas dos tipos de fibras musculares identificado durante o envelhecimento e que acabam por resultar em alterações de tamanho e número de fibras musculares, ângulo de penetração e comprimento do fascículo, refletindo na redução de força máxima e velocidade de contração muscular (NARICI; FRANCHI; MAGANARIS, 2016).

O efeito do envelhecimento também pode ser identificado em alterações morfofuncionais das junções neuromusculares (JNM). Na porção muscular da JNM, são relatadas redução das dobras de membranas, do número de receptores muscarínicos e da atividade de colinesterases. Tais alterações respondem pela fragmentação e degeneração das JNM (JANG; VAN REMMEN, 2011), que se reflete na redução do tamanho e do número de JNM funcionais (MCMULLEN; ANDRADE,

2009), com consequente mudanças na comunicação celular que se refletem no perfil na geração de força (MANINI, 2011).

As abordagens envolvendo a relação entre o envelhecimento e alterações nas JNMs, são em sua maioria baseadas em análises histoquímicas (DESCHENES et al., 2010; LARSSON et al., 2019; MARTINEZ-PENA Y VALENZUELA; AKAABOUNE, 2007). No modelo de estudo proposto, não foram avaliadas características morfológicas das JNM, mas apenas a atividade da enzima colinesterase (ChE). Os dados demonstram que com o envelhecimento há redução da atividade da enzima, já a partir da idade de 13 meses, tanto no músculo SOL quanto no EDL. Estes achados sugerem que, mesmo antes da identificação de alterações estruturais, o tecido muscular sofre adaptações metabólicas que podem regular a sua capacidade funcional. Nas sinapses colinérgicas, a ação da acetilcolina é modulada principalmente pela atividade da acetilcolinesterase (KATZ; MILEDI, 1973; SOREQ; SEIDMAN, 2001). O emprego de modelos animais permitiu identificar que a redução da disponibilidade ou atividade da ChE nas JNM, podem estar relacionadas ao aumento da transmissão colinérgica, perturbação dos potenciais de membrana e consequente degeneração das junções (KHOSA et al., 2019; SMITH, 1982).

Durante o envelhecimento é possível identificar redução de massa corporal, em especial devido às adaptações metabólicas decorrentes da idade, e esta redução é muitas vezes atribuída à redução de massa muscular. Muitas vezes a perda de massa é correlacionada com perda de função muscular (força e desempenho), caracterizando um quadro conhecido como sarcopenia (PAPADOPOULOU, 2020). Nos animais estudados, também identificamos que a massa corporal dos animais decai ao longo dos meses e que este decaimento é acompanhado de perda de desempenho no TCCM. O modelo de escada serve para estimar a força de resistência máxima do animal, simulando assim um teste de função muscular (CHOLEWA et al., 2014). Nossos achados revelam que a partir de 13 meses já há perda de força de resistência máxima, embora que com o avanço da idade esta perda não se agrave.

Ao analisarmos peso e tamanho dos músculos SOL e EDL, não identificamos alterações decorrentes do envelhecimento, o que sugere que a perda de força pode se estabelecer antes da degeneração muscular alcançar parâmetros estruturais. Neste sentido, acreditamos que a perda de massa corporal deva ser reflexo de alterações sistêmicas e em adição, sugere-se que apesar das alterações encontradas no âmbito metabólico e bioquímico dos músculos investigados, estas não se refletiram

nas características morfométricas, de forma que a identificação de um quadro de sarcopenia não pode ser estabelecido.

Tem sido sugerido que o processo de envelhecimento é consequência do acúmulo de danos celulares decorrentes de processos bioquímicos que não podem ser controlados e da produção de moléculas muitas vezes nocivas ao microambiente celular (CLARKE, 2003). De maneira muito abrangente, os marcadores de envelhecimentos começam a ser identificados a partir da quarta década de vida e com o avanço da idade, a incapacidade do organismo em reparar as alterações sistêmicas se acentuam juntamente com a perda de funções (GOLDBERGER; PENG; LIPSITZ, 2002), entretanto somente com a redução de funções corporais, acompanhada de alterações funcionais em órgãos e sistemas é que o envelhecimento passa a ser identificado, em especial do ponto de vista socioeconômico (SESHAMANI; GRAY, 2004).

Devido ao seu alto nível de consumo de oxigênio, o músculo esquelético tem um potencial para a geração de moléculas oxidativas e, desta forma, torna-se bastante propenso à ocorrência de danos celulares que podem ter importante papel na redução da função muscular no envelhecimento (FULLE et al., 2004). No presente trabalho, propusemos avaliar três idades diferentes para elucidar a relação temporal entre o envelhecimento e seus sinais. O emprego de análise multivariada permutacional de variância (PERMANOVA), permitiu agrupar as variáveis estudadas em modelos matemáticos e identificar a contribuição de cada conjunto de análises no contexto do envelhecimento.

Com base nesta análise, foi possível identificar que as alterações bioquímicas, indicadas pelos marcadores bioquímicos de danos celulares, puderam ser identificadas nos grupamentos musculares estudados, independentemente de suas características metabólicas, mas que as alterações eram influenciadas pela idade dos animais uma vez que em animais mais velhos (17 meses) o acúmulo de danos foi maior. Ao avaliar o modelo *Bioquímica do EDL*, verificamos que as principais alterações (elevação da LPO, redução de SH-NP, redução de proteínas solúveis e menor atividade de colinesterase) se estabelecem aos 17 meses e que o curso destas alterações podem ter influenciado as alterações celulares e de modificação no perfil de tipos de fibras. Em contrapartida, ao avaliar o modelo *Bioquímica do Sóleo* foi possível observar que as alterações encontradas aos 17 meses no EDL, já estavam em partes estabelecidas no SOL desde os 13 meses. Além disso o estabelecimento

de um modelo que agrupou as alterações estruturais do músculo, *modelo Características Celulares EDL e SOL*, permite sugerir que o tipo de fibras do músculo pode contribuir para o agravamento da atrofia muscular induzida pelo envelhecimento. Esta interação tornou-se bastante evidente ao compararmos os dois tipos de músculos estudados. Apesar de apresentar marcadores de danos oxidativos já aos 13 meses, o SOL parece ter sido menos afetado em decorrência dos danos oxidativos. Em contrapartida, pudemos identificar que o envelhecimento promove alterações estruturais mais evidentes em músculo com fibras do tipo II, uma vez que alterações nas proporções de tipos de fibras no EDL puderam ser identificadas tanto aos 13 quanto aos 17 meses.

Além disso, as alterações funcionais identificadas na análise do modelo *Comportamento* parecem ser, de fato, devido às alterações celulares e bioquímicas estabelecidas nos dois músculos, que em conjunto acabam por produzir alterações funcionais, refletidas no menor desempenho dos animais com 13 e 17 meses no TCCM. Em adição, a análise multivariada empregada para o *modelo Tamanho Muscular* demonstrou que o envelhecimento pode produzir alterações que necessitam de métodos mais apurados para serem detectadas uma vez que não refletem sobre os parâmetros morfométricos, tanto no Sóleo quanto no EDL.

Tem sido sugerido que durante o envelhecimento há um aumento na geração de radicais livres devido ao desequilíbrio redox, à disfunção na cadeia respiratória mitocondrial ou ainda por estresse de retículo (CALCINOTO et al., 2019). Estas mudanças produzem um cenário que pode contribuir para uma atrofia muscular, seja por predisposição à eliminação dos motoneurônios e suas JNMs, por perda de capacidade regenerativa a partir de células satélites ou mesmo por morte celular (GONZALEZ-FREIRE et al. 2014; BARREIRO et al., 2006). Neste sentido, podemos sugerir que durante o processo de envelhecimento, ocorre redução nos mecanismos de proteção antioxidante celular, o que acarreta aumento dos danos celulares. Estes danos por sua vez, modificam o ambiente da fibra muscular, produzindo alterações no tipo de fibras e consequentemente no metabolismo do músculo e, em conjunto, tais alterações são refletidas como perda de desempenho.

É sabido que o envelhecimento traz consigo uma série de alterações fisiológicas, que vão gradativamente contribuindo cada uma a seu modo, para a geração da condição de senescência. Estas alterações evoluem de forma muito particular em cada indivíduo dependendo de hábitos alimentares, hábitos de vida e

comorbidades (FORECHI et al., 2018). Dentre as mudanças trazidas pelo envelhecimento encontramos a degeneração lenta e gradual do sistema músculo esquelético, que vem acompanhado de diversas limitações cotidianas (DOHERTY, 2003).

A literatura relata que a perda de massa muscular tem início por volta da quarta década de vida e que progride lentamente durante a vida. Esta degeneração musculoesquelética, que envolve perda de massa e função muscular é classificada como sarcopenia (LARSSON et al., 2019) e sua evolução pode predispor os idosos à fraqueza muscular, debilidades motoras, quedas e fraturas (PAPADOPOULOU, 2020). Neste sentido encontrar estratégias que previnam a degeneração muscular e, por conseguinte, a instalação da sarcopenia é de fundamental importância para o envelhecimento saudável e autônomo (THEOU et al., 2011).

No presente trabalho, propusemos a exposição de animais a um protocolo de exercício resistido, representando uma estratégia de ação já conhecida por seus efeitos positivos na hipertrofia e ganho de força (LOWE; ALWAY, 2002), com o objetivo de modular o incremento da massa muscular e, consequentemente, de função. Identificamos que a exposição ao protocolo proposto não foi eficaz em promover hipertrofia dos músculos estudados, tampouco alterou a massa corporal dos animais ao longo do processo de envelhecimento.

Houve importante preservação da função muscular uma vez que a redução de força de resistência máxima ocorreu somente aos 17 meses e que os animais de 13 meses de idade, apresentando-se muito semelhantes aos de 9 meses. Estes dados sugerem que quando submetidos ao protocolo de exercício resistido estes recuperaram seu perfil funcional demonstrando que o efeito positivo do exercício resistido sobre a função muscular.

A literatura suporta estes achados uma vez que sugere que, frente ao exercício, o músculo esquelético retém parcialmente sua plasticidade durante o envelhecimento e que o exercício resistido pode atenuar significativamente, ou em alguns casos prevenir, os declínios no metabolismo e função muscular (DISTEFANO; GOODPASTE, 2018). Em adição, para justificar estes achados é preciso considerar que a função muscular não depende exclusivamente da massa muscular, mas é modulada por processos metabólicos, bioquímicos e de comunicação celular. Durante o envelhecimento, diversas modificações no ambiente muscular se estabelecem e

podem contribuir para a não linearidade da relação entre massa muscular e função (CRUZ-JENTFOT et al., 2019).

Ao compararmos o efeito do exercício sobre as características bioquímicas do SOL e EDL nas idades propostas, identificamos que o exercício produziu mudanças já conhecidas, como redução do ambiente antioxidante, que identificamos a partir da redução dos SH-NP e elevação da LPO.

Devido a demanda energética, o exercício físico aumenta a necessidade de aporte de O_2 para as células musculares. A atividade contrátil aumenta o conteúdo intracelular ou atividades de superóxido, H_2O_2 e NO no espaço intersticial muscular (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; TSUKIYAMA et al., 2017). Portanto, o exercício aumenta produção de EROs predispondo o músculo e outros tecidos a danos oxidativos e, com isso, é necessário otimizar as defesas antioxidantes para manter o equilíbrio redox e evitar danos oxidativos não sejam irreversíveis (POWERS et al., 2020). Scheffer et al. (2012) propuseram diferentes protocolos de treinamento resistido em ratos, empregando o modelo de escalada com o objetivo de analisar o estresse oxidativo no músculo esquelético. A partir destes achados, os autores concluíram que o treinamento resistido visando hipertrofia muscular, provoca um desequilíbrio do sistema redox, em favor de agentes pró-oxidantes, causando estresse oxidativo no músculo esquelético.

No presente trabalho, o modelo de treino resistido foi proposto como desafio ao músculo esquelético, buscando produzir aumento da massa muscular. Apesar de não termos identificado alterações hipertróficas nos músculos SOL e EDL, de forma semelhante ao proposto na literatura, encontramos um cenário oxidativo a partir da redução de SH-NP. Entretanto somente nos animais de 17 meses este cenário mais oxidativo refletiu em aumento da degradação proteica e aumento da LPO. Sugerindo que apesar da geração de um ambiente oxidativo, a prática de exercícios ainda representa um ganho em determinado momento do envelhecimento.

As alterações bioquímicas encontradas demonstram que há perturbações na homeostase de processos celulares na fibra muscular e é possível que tais alterações extrapolem o âmbito do equilíbrio redox. No sistema antioxidante não-enzimático, a GSH é o tiol de baixo peso molecular predominante em células de mamíferos e desempenha um papel importante nas defesas celulares contra o estresse oxidativo e nitrosativo (GRIFFITH, 1999). As concentrações de GSH no músculo esquelético estão relacionados ao perfil metabólico da fibra muscular; estando mais concentrados

em fibras tipo I do que em fibras do tipo II (JI; FU; MITCHELL, 1992). No presente trabalho identificamos que durante o envelhecimento o músculo SOL apresentou redução de SH-NP já aos 13 meses e, no músculo EDL as alterações oxidativas se relacionam à uma mudança na proporção de fibras tipo I e II. Também identificamos que o protocolo de exercício resistido empregado de certa forma não agravou o cenário de degeneração, apesar de provocar alterações pró-oxidativas e não melhorar as características musculares.

Estudos iniciais sugeriram que o acúmulo de EROs poderiam ser danosos ao músculo em exercício, mas dados contemporâneos indicam que as EROs geradas estão relacionadas à ativação de um número de vias de sinalização redox-regulado que estimulam a expressão de genes associados com miogênese (LE MOAL et al., 2017), catabolismo e biogênese mitocondrial (GROENNEBAEK; VISSING, 2017). De certa forma, estas informações podem ajudar a justificar estes achados, entretanto no modelo proposto, não foram investigadas vias de comunicação celular que possam ser corroborar estas relações.

No modelo proposto, encontramos também que o exercício resistido reduziu a atividade da ChE, desde os 13 meses. Durante a contração muscular a ChE desempenha papel fundamental na interrupção da comunicação celular na placa motora, hidrolisando acetilcolina e propiciando uma etapa importante do ciclo de contração para o restabelecimento dos potenciais de membrana. A redução da atividade de ChE suscita a manutenção da acetilcolina na fenda sináptica por mais tempo, dificultando o repolarização da fibra muscular. Além disso, favorece a manutenção da abertura de canais de Ca^{2+} no retículo, aumentando os riscos de danos celulares (ERMAK; DAVIES, 2002). Assim, a redução da atividade de ChE pode representar um mecanismo de dano adicional, que contribuiu para a não identificação de alterações em nível celular.

Quando observados os resultados obtidos, podemos sugerir que os animais expostos ao protocolo de exercício resistido, apresentaram alterações esperadas no cenário dos marcadores de danos celulares, o que são compatíveis com a literatura. Acreditamos que a ausência de alterações celulares e de hipertrofia, possam ser decorrentes da forma como o modelo de escalada recruta diferentemente os grupamentos musculares anteriores e posteriores dos animais e, que em partes, também possam ser devido ao aumento de danos oxidativos e degradação de proteínas. De toda forma é possível identificar que, apesar destes efeitos, os animais

de 13 meses ainda preservaram sua capacidade física, apresentando desempenho muito semelhante aos de 9 meses e somente aos 17 meses encontramos redução da força. O que torna notória a importância da prática de atividade física em tempo anterior à instalação da sarcopenia, para o envelhecimento saudável e autônomo (THEOU et al., 2011) e corrobora as indicações de que o emprego de estratégias de prevenção deva se iniciar já na fase adulta (CRUZ-JENTOFT, 2017).

Dentre as diversas estratégias para o controle da degeneração muscular, a prática de atividade física e de exercícios físicos regulares tem sido amplamente estimulada entre a população idosa, pois além de prevenir perda muscular e melhorar o desempenho motor, melhora a capacidade cardiorrespiratória, reduz a fragilidade decorrente da idade (THEOU et al., 2011), previne o declínio cognitivo e de transtornos como depressão e ansiedade que tornam-se prevalentes com o avanço da idade (BAUMAN et al., 2016).

Apesar da grande quantidade de informações demonstrando que a prática de exercícios físicos é fundamental para qualidade de vida durante o envelhecimento, com o curso do envelhecimento a adesão dos idosos aos programas de exercícios regulares decai (KNUTH et al., 2010). Além disso, a necessidade de protocolos de exercício resistidos, com pesos e estratégias de força, e a necessidade de uma rotina diária, muitas vezes desencoraja os idosos a persistirem na prática (PATERSON, JONES; RICE, 2007; BRAY et al., 2016). Ainda, indivíduos com menor afinidade à prática de atividade física e que nunca tiveram o hábito da prática de atividade regular, ou tendem a não compreender as vantagens desta prática em termos de saúde e de não a incorporar à sua realidade diária (CARLSON; VARMA, 2015; ANDREWS et al., 2017).

Neste sentido, tem sido investigado o papel de outras estratégias que possam atenuar avanço da degeneração muscular e a instalação da sarcopenia, em especial para indivíduos com refratariedade à prática de atividade física, assim como para aqueles que em decorrência de comorbidades ou situações limitantes, não possam aderir ao exercício. Dentre as possíveis estratégias, intervenções nutricionais tem ganhado espaço entre as terapêuticas para a prevenção do declínio muscular (CRUZ-JENTOFT, 2017; ROM et al., 2012).

De maneira a manter nossa massa muscular adequada e aptidão física ao longo da vida, tanto a dieta adequada quanto a prática de exercícios físicos são de fundamental importância (MAKANAE; FUJITA, 2015). Em relação aos adultos idosos,

a dieta não representa uma barreira, porém a regularidade na prática de exercícios físicos pode ser desafiadora por diferentes razões. Durante o processo de envelhecimento, muitas capacidades individuais são alteradas, em especial pelas mudanças que ocorrem no organismo (KNUTH et al., 2010).

Com o envelhecimento, são identificadas redução em hormônios anabólicos, assim algumas estratégias têm para reduzir os efeitos do envelhecimento, se valem de terapias hormonais com uso de testosterona, GH, DHEA e IGF-1, de forma isolada ou combinada, buscando otimizar a síntese de proteínas no músculo e com isso aumentar a massa e força muscular (DE SPIEGELEER et al., 2018). Contudo, devido aos efeitos colaterais indesejados, seus usos são bastante limitados.

Considerando os fatores mencionados, profissionais da saúde tem procurado novas abordagens para desacelerar a perda de massa e função muscular. E neste cenário a suplementação com AGPIs n-3 tem sugerido alguma eficácia no cenário do envelhecimento, de maneira que os resultados nos últimos anos tem se mostrado promissores (JEROMSON et al., 2015). Dados obtidos de pacientes com câncer, artrite reumatoide ou de pessoas submetidas a exercício de resistência, tem demonstrado que o emprego de óleo de peixe, composto rico em AGPIs n-3, pode melhorar a saúde do músculo esquelético (WITARD; COMBET; GRAY, 2020; NABAVI et al., 2015; KOSTOGLU-ATHANASSIOU; ATHANASSIOU; ATHANASSIOU, 2020).

Neste sentido, buscando identificar os efeitos dos AGPIs sobre parâmetros de massa muscular e funcionalidade, o presente modelo de estudo avaliou características estruturais e celulares dos músculos SOL e EDL de animais em envelhecimento submetidos à suplementação com OP. A análise permutacional dos dados, permitiu identificar que a suplementação não foi hábil em melhorar características como peso úmido e comprimento dos músculos estudados, assim como não foi identificado efeito dos AGPIs n-3 sobre características celulares que permitissem identificar crescimento ou adaptações celulares compatíveis com incremento de massa muscular. Em adição não foi identificado incremento de massa corporal nos animais suplementados em nenhuma das idades.

Entretanto, ao observarmos os dados referentes à função muscular, estes sugerem que a suplementação com óleo de peixe rico em ômega-3 pode melhorar o desempenho dos animais, quando submetidos ao teste de carga carregada, para os animais de 13 meses, sugerindo que a suplementação pode representar uma alternativa às pessoas que não tem aderência ao exercício. Neste sentido, tem sido

sugerido que AGPIs n-3 estimulam ganhos de massa muscular em adultos mais velhos, superando resistência anabólica induzida pelo envelhecimento. A suplementação de com ômega-3 também pode melhorar força e função muscular devido a uma combinação de aumento da massa muscular e potencialmente uma melhora na qualidade muscular (SMITH, 2016). Estudos translacionais interdisciplinares, entre a pesquisa básica e clínica, tem buscado explorar os mecanismos multifatoriais responsáveis pelos efeitos benéficos do ômega- 3 na massa e função muscular (GRAY; MITTENDORFER, 2018).

Mas como justificar o ganho de função, se não há melhoria das características de celulares, nem tampouco hipertrofia? Neste sentido é preciso considerar que AGPIs n-3 exercem efeitos peliotrópicos em alguns tecidos, particularmente no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central, onde se organizam em lipídeos complexos que determinam as propriedades estruturais e funcionais das membranas celulares e acabam por modulam diversos eventos celulares, por mediar processos de transdução de sinal (FAROOQUI; HORROCKS; FAROOQUI, 2000; WU; XU; BALLANTYNE, 2020).

A habilidade do músculo esquelético em gerar torque e a velocidade pela qual este torque é desenvolvido encontram-se reduzidas no envelhecimento (NARICI; FRANCHI; MAGANARIS, 2016). Este fenômeno ocorre devido às mudanças no sistema neuromuscular, que incluem alterações fenotípicas e morfológicas, além de degenerações no sistema nervoso periférico. O constante remodelamento de fibras nervosas, produz modificações nas JNMs e na comunicação neuromuscular, que podem conduzir a mudanças no perfil metabólico de fibras musculares e, conseqüentemente no desempenho funcional (JI; FU; MITCHELL, 1992). Em nossos achados, não foram caracterizadas mudanças no perfil metabólico de fibra do SOL, quando da presença da suplementação. Entretanto no EDL, foi possível identificar que a transição metabólica identificada no grupo sedentário e que acometeu animais de 13 e 17 meses foi refreada uma vez que houve aumento de características intermediárias nos animais de 13 meses, e que aos 17 meses quando as fibras voltam a se comportar de forma similar aos animais de 09 meses quando na presença da suplementação com Óleo de peixe rico em ômega-3. Alguns estudos sugerem o envolvimento de ácidos graxos e metabólitos lipídicos derivados na regulação de processos de crescimento, proliferação e / ou diferenciação de células musculares. Além disso, é possível que a suplementação com AGPIs pode atuar para alterar a

contração muscular e propriedades metabólicas, por exemplo, promovendo uma mudança dos tipos de fibras glicolíticas a oxidativas (LIPINA; HUNDAL, 2017).

Também é preciso considerar que durante o envelhecimento várias alterações se estabelecem no contato neuromuscular (LARSSON et al., 2019), entre elas o remodelamento de JNMs. Neste processo ocorre a disjunção temporária entre o neurônio motor e a fibra muscular (denervação), seguido do estabelecimento de um novo contato a partir do ramo colateral de um axônio (reinervação) (HEPPLE; RICE, 2016). Acredita-se que com o envelhecimento este processo de reinervação seja modificado em partes pela perda de componentes da JNMs, tanto em nível pré-sináptico, quanto pós-sináptico. Acredita-se que alterações na síntese de laminina, na proporção de receptores colinérgicos e na síntese de colinesterase possam participar deste processo (JANG; VAN REMMEN, 2011; CHAI et al., 2011; SAMUEL et al., 2012).

Assim uma possível justificativa para o ganho de função pode residir no fato que AGPIs n-3 modulam canais iônicos, propriedades eletrofisiológicas e fluidez de membrana. Neste sentido é possível que a suplementação com óleo de peixe rico em ômega-3 ajude a melhorar o desempenho muscular, por modular eventos de comunicação na JNM. No modelo proposto, não foram investigadas alterações estruturais ou funcionais das JNMs, apenas avaliamos a atividade da ChE nos músculos SOL e EDL. Neste contexto, identificamos que no músculo EDL de animais suplementados houve declínio na atividade da ChE apenas para os animais de 17 meses. Com relação ao sóleo, identificamos redução da atividade de ChE ao longo do processo de envelhecimento, tanto em animais de 13 e 17 meses. É sabido que a acetilcolina o neurotransmissor excitatório, responsável por disparar o processo de contração muscular e que modular a sensibilidade dos receptores de acetilcolina na JNM, pode refletir na velocidade de despolarização bem como de contração muscular (KUO; EHRLICH, 2015). Além disso, é sabido que fornecimento de AGPIs n-3 modifica a composição lipídica das membranas neurais, afetando processos de exocitose, fusão de vesículas e liberação de neurotransmissores (FAROOQUI; HORROCKS; FAROOQUI, 2000). Assim, é possível que a liberação de acetilcolina esteja melhorada nos neurônios destes animais, entretanto esta hipótese precisa ser confirmada, uma vez que não foi objeto de investigação deste trabalho. Por fim, é preciso considerar que o exato mecanismo pelo qual os AGPIs n-3 ou seus derivados atuam sobre o músculo, produzindo ganho de força e aumentando a massa muscular, não é

completamente conhecido, mas provavelmente envolve o equilíbrio entre as vias anabólicas e catabólicas. É provável, também que a terapia com AGPIs n-3 sobre a função muscular seja mediada através de suas propriedades de excitabilidade neuromotora.

A literatura reporta que durante o envelhecimento há significativo aumento dos danos celulares em razão do estresse oxidativo e aumento de moléculas pró-inflamatórias (VISVANATHAN; CHAPMAN, 2010). Além disso, devido excitabilidade e suas características celulares, o músculo esquelético é especialmente susceptível aos danos oxidativos (POWERS et al., 2011). Durante os ciclos de contração muscular, as mitocôndrias são recrutadas para o processo de conversão de energia, e a partir da cadeia fosforilativa de elétrons geram ânion superóxido, óxido nítrico e várias outras EROs secundárias e espécies reativas de nitrogênio (THIRUPATHI; PINHO; CHANG, 2020). Estas moléculas reativas são também liberadas dentro da fibra muscular ou mesmo no espaço intersticial das fibras, acometendo diversas moléculas no ambiente muscular produzindo danos na fibra muscular e no microambiente do músculo (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006). Com o avanço da idade, é possível identificar maior frequência deleções e mutações mitocondriais e tem sido sugerido que estas alterações mitocondriais podem conduzir ao aumento da taxa de apoptose celular e, em partes, poderiam responder pela perda muscular associada à senescência (HIONA; LEEUWENBURGH, 2008).

Para estimar os efeitos da suplementação sobre o metabolismo oxidativo, foram avaliados os marcadores bioquímicos de danos celulares. Neste cenário, identificamos que no músculo EDL, a suplementação com óleo de peixe aumentou a taxa de LPO e reduziu a concentração de proteínas solúveis, entretanto houve significativo incremento das concentrações de SH-NP nos animais de 13 meses. Já a avaliação do SOL, permitiu identificar que a suplementação melhorou a capacidade de resposta oxidativa do músculo, uma vez que redução de proteínas e do aumento da LPO só foram detectadas aos 17 meses.

Durante o estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio podem causar danos no músculo esquelético por atacar proteínas, lipídios e até mesmo o DNA (VOLKERT, 2011). Desta forma, tecidos excitáveis ou que apresentam elevada atividade redox necessitam de um sistema antioxidante eficiente, para evitar danos. No músculo esquelético, diversos sistemas antioxidantes atuam para manter o equilíbrio redox, entre eles estão Superóxido dismutase (SOD), glutational peroxidase

(GPx) e catalase (CAT). Dentre as moléculas de natureza não enzimáticas, GSH é o principal composto a atuar na modulação do ambiente oxidativo (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006).

A literatura aponta que a elevação da concentração de EROs no ambiente celular não só provoca desequilíbrio do sistema redox, acumulando danos celulares, mas também é capaz de ativar vias pró-inflamatórias relacionadas ao fator nuclear κB (NF- κB), elevando o perfil de citocinas inflamatórias do músculo e produzindo declínio da expressão do fator de transcrição MyoD (BEYFUSS; HOOD, 2018). Estas mudanças todas resultam em sarcopenia e declínio do desempenho. A participação de AGPIs n-3 na modulação desta via regulatória do processo inflamatório tem demonstrado, que a utilização destes compostos pode reduzir o cenário inflamatório, modular a expressão de NF κB e reduzir a taxa de necrose muscular em modelo de distrofia muscular de Duchene (APOLINÁRIO et al., 2015).

Em idosos é possível identificar um decaimento da ingestão de antioxidantes, em especial pelas mudanças de hábitos alimentares (CHAPMAN et al., 2002; VISVANATHAN; CHAPMAN, 2010). O emprego de suplementos alimentares tem representado uma possibilidade interessante para prevenir a sarcopenia e suas consequências, uma vez que com o envelhecimento é comum a redução de absorção de determinados nutrientes e o decaimento da ingestão de antioxidantes pelos idosos (KIM; WILSON; LEE, 2010). Elevar a ingestão de moléculas antioxidantes pode representar uma estratégia para auxiliar a combater a produção aumentada de EROs durante o envelhecimento. Neste cenário diversas moléculas com potencial antioxidantes podem ser empregadas. A elevação das concentrações dietéticas de carotenoides tem demonstrado efeitos positivos na desaceleração da sarcopenia e da fragilidade em idosos (SEMBA et al., 2007). Outra importante estratégia proposta no combate à sarcopenia é a ingestão da vitamina D, que por modular a síntese de TNF- α e IL-6 promove redução da degradação proteica e consequentemente atenua a degeneração muscular (UCHITOMI; OYABU; KAMEI, 2020).

Neste sentido, a suplementação com AGPIs n-3 também tem sido sugerida como importante agente para combater o declínio muscular, pois assim como muitas moléculas antioxidantes, os AGPIs n-3 modulam a síntese de moléculas pró-inflamatória, modulando a resposta inflamatória que é constitutiva no idoso (FRANCESCHI et al., 2018). É sabido que o declínio muscular está associado à produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (BAYLIS et al., 2013). Assim uma vez que AGPIs n-

3 podem ser metabolizados pela cicloxigenase, produzindo moléculas de menor potência inflamatória, a utilização destes lipídeos como moduladores da inflamação crônica, pode representar significativa redução do progresso da sarcopenia (ROBINSON et al., 2018; CALDER, 2006).

Considerando o contexto de células excitáveis, tem sido sugerido que a suplementação com OP, composto rico em AGPIs n-3 seja hábil em aumentar a velocidade de condução nervosa no idoso, modular canais iônicos no sarcolema e melhorar a contratilidade cardíaca (NAVARRO-HORTAL et al., 2019). Neste sentido, uma vez que a suplementação com OP melhora contratilidade muscular cardíaca e velocidade de condução nervosa, é razoável hipotetizar que também possa potencializar os efeitos do exercício sobre o músculo esquelético. Dentre os nutrientes não proteicos, a suplementação com ômega-3 tem sido amplamente estudado no intuito de entender os mecanismos biológicos destes AGPIs na regulação da resistência anabólica no músculo esquelético (McGLORY; CALDER; NUNES, 2019).

Neste modelo de estudo, ratos Wistar foram submetidos ao protocolo de exercício resistido e a suplementação com OP durante oito semanas, para investigar a existência de um efeito aditivo das duas estratégias. Os resultados obtidos demonstram que a associação das abordagens, reproduz mudanças muito semelhantes àquelas encontradas quando do emprego das estratégias isoladamente. Foi possível identificar que o emprego de treinamento resistido e suplementação, quando em conjunto, não produz alterações em características como peso e tamanho muscular e nem ganho de massa corporal ao longo do tempo, uma vez que animais de 13 e 17 meses não apresentaram diferenças nestas variáveis. Entretanto é possível identificar a melhora do cenário bioquímico celular, evidenciando que os músculos SOL e EDL são modulados com alguma particularidade pela associação das estratégias. O músculo SOL a redução da ChE foi identificada aos 13 meses, acompanhada da redução de SH-NP, entretanto as concentrações de proteínas e de LPO não sofrem alteração. Somente nos animais de 17 meses, esta perda de capacidade antioxidante representada pela redução de SH-NP se reflete em redução de proteínas e elevação da LPO, caracterizando um ambiente com maior acúmulo de danos celulares. No músculo EDL, apesar do aumento da LPO já na idade de 13 meses, as concentrações de SH-NP e proteínas foram preservadas ao longo do tempo, sendo que inclusive nos animais de 17 meses houve alteração destas variáveis.

A atividade e função mitocondrial no músculo esquelético é um processo altamente controlado, que sofre influência de uma variedade de elementos nucleares, citosólicos e mitocondriais. Estes fatores que atuam como sensores metabólicos e podem se adaptar a mudanças do estado nutricional e energético celular (HUANG; HOOD, 2009). O aumento de demanda energética na musculatura esquelética durante a realização de exercícios físicos é o principal fator a ativar a produção de ATP, sendo assim o efeito do exercício físico provoca estresse oxidativo, que pode ser evidenciado pelo monitoramento da LPO (POWERS; JACKSON, 2008). Neste sentido, o fato da concentração dos SH-NP não estar alterada nos dois músculos quando se compara as idades investigadas, sugere o papel mediador de AGPIs n-3 no músculo esquelético que tem sido aventado como um possível agente antioxidante.

Os músculos SOL e EDL apresentam constituições celulares bastante particulares, o que pode de certa forma justificar os achados descritos. O músculo SOL é essencialmente oxidativo, com predomínio de fibras tipo I ricas em mioglobinas e mitocôndrias. Desta forma é muito coerente que, devido às características metabólicas deste músculo, a taxa de LPO esteja aumentada e que este aumento na LPO venha acompanhado de redução no sistema antioxidante (CARTER; JUSTICE; THOMPSON, 2019). É importante ressaltar a redução de SH-NP não pode ser avaliada como o único mecanismo de defesa antioxidante no músculo, assim é muito provável que outras moléculas do metabolismo oxidativo estejam compensando a perda de SH-NP e por isso somente em 17 meses identificamos a redução de proteínas acompanhada de aumento da LPO (SIES, 2015). O EDL é considerado um músculo misto, onde coexistem três tipos de fibras com características metabólicas diferentes (STARON et al., 1999). Neste sentido, as alterações decorrentes de danos oxidativos podem se apresentar em amplitude diferente, não apenas pelo sistema antioxidante, mas também porque podem estar sendo produzidas em menores taxas devido a presença de fibras de metabolismo glicolítico (THIRUPATHI; PINHO, 2018).

A função muscular reside em última instância na capacidade de converter energia em movimento a partir do processo de contração muscular. Este processo demanda da funcionalidade orquestradas de eventos mitocondriais, moleculares e de transdução de sinal, para produção de uma resposta satisfatória frente à exigência da tarefa (KUO; EHRLICH, 2015). Falha do suprimento adequado de energia, assim como disfunção mitocondrial e na comunicação neuromuscular, podem conduzir a desabilidade musculoesquelética (ABRIGO et al., 2019). É sabido que baixo nível de

atividade física e mudanças nutricionais podem contribuir para o cenário de fragilidade muscular (ROM et al., 2012). Durante o progresso do envelhecimento da população idosa assume um perfil comportamental que favorece hábitos de vida sedentário e reduzida prática de atividades físicas (FORECHI et al., 2018). Com o avanço da idade, redução de trabalhos diários e a presença de transtornos de humor, a demanda energética do idoso reduz, em especial pelo desuso muscular, e isso acarreta disfunções alimentares que podem culminar com má nutrição (DZIECHCIAŻ; FILIP, 2014). Portanto diferentes estratégias visando reduzir ou reverter o declínio do sistema neuromuscular do idoso são aconselhadas (WHO, 2015).

Alguns estudos relatam que exercício de resistência aumenta o pico de torque e a taxa de desenvolvimento de torque, bem como a capacidade funcional. Em adição a excitabilidade neural é melhorada após um programa de exercício resistido, pois este diminui o retardo eletromecânico (tempo entre o estímulo neural e a ocorrência de contração muscular) (HAKKINEN et al., 1998). Neste cenário, os ganhos iniciais podem ser atribuídos aos ajustes neurais que ocorrem durante as primeiras semanas do treinamento, as quais são seguidas de aumento da área de seção transversal do músculo (SIDDIQUE et al., 2020). No presente estudo, identificamos que o processo de envelhecimento não provoca alterações estruturais ou celulares nos músculos estudados, entretanto ao longo do tempo os animais apresentam perda de desempenho no teste de carga carregada. O envelhecimento está relacionado com a resistência anabólica associada a idade que favorece a perda gradual de massa muscular. Diversas estratégias como o exercício resistido e a nutrição (dieta versus suplementação) tem sido estudadas para verificar o impacto na síntese e degradação proteica sobre a funcionalidade muscular. A exposição à combinação de estratégias, não foi hábil em modificar a área de seção transversa entre as idades investigadas, entretanto foi observada redução de força de resistência máxima apenas nos animais de 17 meses mostrando que o tratamento proposto foi eficaz para retardar a perda de função muscular, uma vez que os animais submetidos ao treinamento resistido em associação à OP passam a desempenho semelhante aos de 9 meses. Estes achados sugerem que tanto o exercício físico como a suplementação com ômega-3 podem estar atuando na recuperação da capacidade muscular, por atuar no controle da massa muscular por vias de sinalização diferentes no processo de envelhecimento.

Em um estudo combinando treinamento de força à suplementação com OP (2g/dia), Rodacki et al. (2012) investigaram o efeito da combinação sobre a função

neuromuscular em 45 mulheres idosas (64.6 ± 1.44 anos), que foram aleatoriamente designadas em três grupos: submetido ao treinamento de força por 90 dias, submetido ao treinamento de força em conjunto à suplementação com OP, ou submetidos à suplementação por 60 dias antes do início do protocolo de treinamento. Neste estudo, o principal achado foi que a suplementação com OP em conjunto com o treinamento, melhorou a resposta do sistema neuromuscular enquanto a suplementação prévia ao treinamento não foi hábil em provocar efeitos. Ainda, as voluntárias que foram submetidas ao treinamento e força em associação à suplementação, apresentaram aumento adicional no pico de torque e na taxa de desenvolvimento de torque.

A literatura sugere que os AGPIs n-3 tanto podem modular processos tróficos na célula muscular quanto otimizar os eventos de comunicação celular envolvidos na JNMs. Aqui identificamos que a combinação de exercício e suplementação, não protege os animais da redução de atividade de ChE, de maneira que já aos 13 meses encontramos redução da atividade da enzima. A ChE tem sido apontada como participante fundamental da regulação de processos de comunicação celular nas JNMs, podendo estar envolvida no avanço do estresse oxidativo encontrado no envelhecimento e na consolidação da fragilidade do idoso (LIU et al., 2017). Entretanto é preciso lembrar que AGPIs n-3 podem participar do processo de comunicação celular estimulando vias de sinalização celular, facilitando a abertura de canais iônicos, ativando vias dependentes das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK) e modulando a expressão gênica (KIM et al., 2019). Desta forma, vários mecanismos associados à melhora da força muscular podem ser modulados em nível pós-sináptico para compensar alterações nas JNMs ou degeneração da comunicação neuromuscular (HEPPLE; RICE, 2016).

Vários mecanismos moleculares têm sido propostos para explicar os efeitos dos AGPIs n-3 e sua capacidade quimioprotetora em diferentes doenças, entretanto o papel dos AGPIs na prevenção ou reversão da sarcopenia ainda são pouco presentes na literatura. Sabe-se que sua ação é pelo menos parcialmente mediada por vias de transdução de sinal que envolvem mTOR-p70S6K (alvo da rapamicina de mamíferos; proteína quinase S6 ribossômica). Tais vias estão diretamente envolvidas na modulação da massa muscular esquelética, em especial nos protocolos que envolvem estimulação mecânica do músculo (MANGANO et al., 2013). Recentemente tem sido sugerido que AGPIs n-3 podem participar da regulação destas vias, produzindo efeitos semelhantes, uma vez que maior disponibilidade de AGPIs n-3, em

especial DHA, podem ativar vias intrínsecas reguladas pela PKC (proteína quinase C) e assim elevar a atividade traducional e de síntese proteica na célula muscular.

Ainda, é preciso considerar que no envelhecimento há um cenário inflamatório de baixo grau e que, em decorrência do estresse oxidativo síntese de eicosanoides derivados do ácido araquidônico pode estar aumentada. Estes eicosanoides com potencial efeito pró-inflamatório, tendem a piorar o cenário da inflamação no idoso, contribuindo para o avanço da senescência, uma vez que os processos regulatórios usuais de inflamação podem estar prejudicados. Neste sentido torna-se importante a compreensão de como os AGPIs n-3 podem participar da regulação do processo inflamatório, modulando a secreção de determinadas citocinas e com isso refreando degeneração celular, acúmulo de dano e o envelhecimento, para que se possa de forma segura aplicar protocolos de suplementação para essa população especial.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste modelo experimental podemos sugerir que marcadores bioquímicos do processo de envelhecimento podem ser identificados, antes que alterações funcionais sejam identificadas, uma vez que em animais de 13 meses identificamos alterações bioquímicas na capacidade de defesa antioxidante e de comunicação neural, afetando principalmente músculos com fibras glicolíticas, promovendo danos celulares que levam a redução de força do animal. Também identificamos que a suplementação com óleo de peixe, durante oito semanas foi hábil em aumentar a capacidade de defesa do sistema antioxidante aos 13 meses, levando ao atraso da redução da comunicação neuronal nas fibras glicolíticas e do surgimento de danos oxidativos nas fibras oxidativas, o que leva a redução da transição metabólica em músculos glicolíticos, reduzindo a perda de força muscular. A associação da suplementação ao exercício resistido, foi hábil em melhorar a defesa antioxidante e com isso foi capaz de postergar o surgimento de danos oxidativos, de forma que apenas aos 17 meses houve redução da força dos animais.

Embora tenha sido identificado significativo atraso de declínio nos animais submetidos ao exercício resistido, este resultado já era esperado, em função de seus efeitos serem há muito conhecidos. Assim, torna-se fundamental ressaltar que tanto a suplementação quanto a associação desta ao exercício foram hábeis em mitigar o declínio de força dos animais.

REFERÊNCIAS

- ABDULKADER, F. R. M. Estrutura, classificação e propriedades físico-químicas dos ácidos graxos. In: HIABARA, S. M.; GORJÃO, R.; LAMBERTUCCI, R. H.; VISOLO, M. A. R. **Ácidos graxos na saúde e na doença**: influência da genética, nutrição, exercício físico e esporte. 1.ed. Curitiba: CRV, 2015. p. 243-249.
- ABREU, P.; LEAL-CARDOSO, J. H.; CECCATTO, V. M. Adaptation of skeletal muscle to physical exercise: Molecular and energy considerations. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 23, n. 1, p. 60–65, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1590/1517-869220172301167371>
- ABRIGO, J. et al. Mitochondrial dysfunction in skeletal muscle pathologies. **Current Protein & Peptide Science**, v. 20, n. 6, 2019. Doi: <https://doi.org/10.2174/1389203720666190402100902>
- AHTIAINEN, J. P. et al. Physiological adaptations to resistance training in rats selectively bred for low and high response to aerobic exercise training. **Experimental Physiology**, v. 103, n. 11, p. 1513–1523, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1113/EP087144>.
- ANDREWS, R. M. et al. Positive aging expectations are associated with physical activity among urban-dwelling older adults. **Gerontologist**, v. 57, suppl. 2, p. S178–S186, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1093/geront/gnx060>.
- ANTON, S. D. et al. Successful aging: advancing the science of physical independence in older adults. **Ageing research reviews**, v. 24, pt. B, p. 304–327, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.09.005>.
- APOLINÁRIO, L. M. et al. Long-Term Therapy With Omega-3 Ameliorates Myonecrosis and Benefits Skeletal Muscle Regeneration in Mdx Mice. **Anatomical Record**, v. 298, n. 9, p. 1589–1596, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1002/ar.23177>.
- ARNOLD, J. C. et al. Aging-related limit of exercise efficacy on motor decline. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–20, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188538>
- BAKER, E. J. et al. Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. **Progress in Lipid Research**, v. 64, p. 30–56, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.07.002>.
- BARBIERI, E.; SESTILI, P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. **Journal of Signal Transduction**, v. 2012, p. 1–17, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1155/2012/982794>.
- BARREIRO, E. et al. Aging, sex differences, and oxidative stress in human respiratory and limb muscles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 5, p. 797–809, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.027>.

BAUER, J. et al. Sarcopenia: a time for action. An SCWD position paper. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 5, p. 956–961, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12483>.

BAUMAN, A. et al. Updating the evidence for physical activity: summative reviews of the epidemiological evidence, prevalence, and interventions to promote “active aging”. **Gerontologist**, v. 56, supl. 2, p. S268–S280, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1093/geront/gnw031>.

BAYLIS, D. et al. Understanding how we age: insights into inflammaging. **Longevity & Healthspan**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1186/2046-2395-2-8>.

BEAUDART, C. et al. Sarcopenia in daily practice: assessment and management. **BMC Geriatrics**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12877-016-0349-4>.

BENATTI, P. et al. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 281–302, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719371>.

BERTELLI, J. A.; MIRA, J. C. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 58, n. 1–2, p. 151–155, 1995. Doi: [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)00169-H](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)00169-H).

BEYFUSS, K.; HOOD, D. A. A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. **Redox Report**, v. 23, n. 1, p. 100–117, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1416773>.

BORBA, V. Z. C. et al. Mechanisms of endocrine disease sarcopenia in endocrine and non-endocrine disorders. **European Journal of Endocrinology**, v. 180, n. 5, p. R185–R199, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0937>.

BOUZID, M. A. et al. Radical oxygen species, exercise and aging: an update. **Sports Medicine**, v. 45, n. 9, p. 1245–1261, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0348-1>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976. Doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

BRADY, A. O.; STRAIGHT, C. R.; EVANS, E. M. Body composition, muscle capacity, and physical function in older adults: an integrated conceptual model. **Journal of Aging and Physical Activity**, v. 22, n. 3, p. 441–452, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1123/japa.2013-0009>.

BRATIC, A.; LARSSON, N. G. The role of mitochondria in aging. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 3, p. 951–957, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1172/JCI64125>.

BRAY, N. W. et al. Exercise prescription to reverse frailty. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 41, n. 10, p. 1112–1116, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1139/apnm-2016-0226>.

BROOK, M. S. et al. Skeletal muscle hypertrophy adaptations predominate in the early stages of resistance exercise training, matching deuterium oxide-derived measures of muscle protein synthesis and mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling. **FASEB Journal**, v. 29, n. 11, p. 4485–4496, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1096/fj.15-273755>.

BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Archives of Neurology**, v. 23, n. 4, p. 369–379, 1970. Doi: <https://doi.org/10.1001/archneur.1970.00480280083010>.

BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Introduction to fatty acids and lipids. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 112, p. 1–16, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1159/000365423>.

BYUN, H. O. et al. From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. **BMB Reports**, v. 48, n. 10, p. 549–558, 2015. Doi: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.10.122>.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3–4, p. 222–230, 2000. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00317-8).

CALCINOTTO, A. et al. Cellular senescence: aging, cancer, and injury. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 2, p. 1047–1078, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>.

CALDER, P. C. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 39, Supl. 1, p. 18S–32S, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>.

CALDER, P. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids , inflammation , and inflammatory. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, Supl. 6, p. 1505S–1519S, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1505S>.

CALDER, P. C.; YAQOOB, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. **BioFactors**, v. 35, n. 3, p. 266–272, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1002/biof.42>.

CANDELA, C. G.; LÓPEZ, L. M.; KOHEN, V. L. Importancia del equilibrio del índice omega-6/omega-3 en el mantenimiento de un buen estado de salud. recomendaciones nutricionales. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, n. 2, p. 323–329, 2011. Disponível em: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000200013&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 23 maio 2020.

CARDA, S.; CISARI, C.; INVERNIZZI, M. Sarcopenia or muscle modifications in neurologic diseases: a lexical or pathophysiological difference? **European journal of physical and rehabilitation medicine**, v. 49, n. 1, p. 1119–30, 2013.

CARLSON, M. C.; VARMA, V. R. Activity and neurocognitive health in older adults. In WALDSTEIN, S. R.; ELIAS, M. F. (Eds.). **Neuropsychology of cardiovascular disease**. 2nd. ed. New York: Psychology Press, 2015, p. 79–108. Doi: <https://doi.org/10.4324/9781315851877>.

CARRERA-HUESO, F. J. Positive aspects of aging. **Farmacia hospitalaria**, v. 38, n. 6, p. 451–453, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.7399%2Ffh.2014.38.6.8268>.

CARTER, C. S.; JUSTICE, J. N.; THOMPSON, L. D. Lipotoxicity, aging, and muscle contractility: does fiber type matter? **GeroScience**, v. 41, n. 3, p. 297–308, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00077-z>.

CASEROTTI, P. Strength training in older adults: changes in mechanical muscle function and functional performance. **The Open Sports Sciences Journal**, v. 3, p. 62–66, 2010. Doi: <https://doi.org/10.2174/1875399X010030100062>

CASSILHAS, R. C. et al. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. **Neuroscience**, v. 202, p. 309–317, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.029>.

CASSILHAS, R. C. et al. Animal model for progressive resistance exercise: A detailed description of model and its implications for basic research in exercise. **Motriz. Revista de Educacao Fisica**, v. 19, n. 1, p. 178–184, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1980-65742013000100018>.

CENTRO INTERNACIONAL DE LONGEVIDADE BRASIL. **Envelhecimento ativo: um marco político em resposta à revolução da longevidade**. 1.ed. Rio de Janeiro: Centro Internacional de Longevidade Brasil, 2015.

CHAI, R. J. et al. Striking denervation of neuromuscular junctions without lumbar motoneuron loss in geriatric mouse muscle. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028090>.

CHANDRASEKARAN, A.; IDELCHIK, M. D. P. S.; MELENDEZ, J. A. Redox control of senescence and age-related disease. **Redox Biology**, v. 11, p. 91–102, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.005>.

CHAPMAN, I. M. et al. The anorexia of ageing. **Biogerontology**, v. 3, n. 1-2, p. 67–71, 2002. Doi: <https://doi.org/10.1023/a:1015211530695>.

CHOLEWA, J. et al. Basic models modeling resistance training: an update for basic scientists interested in study skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 9, p. 1148–1156, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.24542>

CHOLEWSKI, M.; TOMCZYKOWA, M.; TOMCZYK, M. A comprehensive review of chemistry, sources and bioavailability of omega-3 fatty acids. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1–33, 2018. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu10111662>.

CLARKE, S. Aging as war between chemical and biochemical processes: protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. **Ageing Research Reviews**, v. 2, n. 3, p. 263–285, 2003. Doi: [https://doi.org/10.1016/s1568-1637\(03\)00011-4](https://doi.org/10.1016/s1568-1637(03)00011-4).

CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. **Age and Ageing**, v. 39, n. 4, p. 412–423, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1093/ageing/afq034>

CRUZ-JENTOFT, A. J. Sarcopenia: What should a pharmacist know? **Farmacia Hospitalaria**, v. 41, n. 4, p. 543–549, 2017. Doi: <https://doi.org/10.7399/fh.2017.41.4.10802>.

CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. **Age and Ageing**, v. 48, n. 1, p. 16–31, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1093/ageing/afy169>.

CURCIO, F. et al. Biomarkers in sarcopenia: a multifactorial approach. **Experimental Gerontology**, v. 85, p. 1–8, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.09.007>.

DA BOIT, M.; HUNTER, A. M.; GRAY, S. R. Fit with good fat? The role of n-3 polyunsaturated fatty acids on exercise performance. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 66, p. 45–54, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.10.007>.

DAVIES, K. J. A. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4-5, p. 279–289, 2000. Doi: <https://doi.org/10.1080/713803728>.

DE SPIEGELEER, A. et al. Pharmacological interventions to improve muscle mass, muscle strength and physical performance in older people: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. **Drugs and Aging**, v. 35, n. 8, p. 719–734, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s40266-018-0566-y>.

DESCHENES, M. R. et al. Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 5, p. 389–393, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.007>.

DIAS, R. M. R. et al. Influence of familiarization process on muscular strength assessment in 1-RM tests. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 1, p. 34–42, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-86922005000100004>.

DISTEFANO, G.; GOODPASTER, B. H. Effects of exercise and aging on skeletal muscle. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 3, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029785>.

DOHERTY, T. J. Invited review: Aging and sarcopenia. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 95, n. 4, p. 1717–27, 2003. Doi: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00347.2003>.

DONATTO, F. F. et al. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. **Cytokine**, v. 61, n. 2, p. 426–432, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.10.021>.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. **Muscle biopsy: a modern approach**. 1. ed. London: Saunders College Publishing, 1973.

DUMITRU, A. et al. Muscle changes during atrophy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1088, p. 73–92, 2018. Doi: https://doi.org/10.1007/978-981-13-1435-3_4.

DUPONT, J. et al. The role of omega-3 in the prevention and treatment of sarcopenia. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 31, n. 6, p. 825–836, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1007/s40520-019-01146-1>.

ELLMANN, G. L. et al. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961. Doi: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

ERMAK, G.; DAVIES, K. J. A. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 10, p. 713–721, 2002. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(01\)00108-0](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(01)00108-0).

FANÒ, G. et al. Age and sex influence on oxidative damage and functional status in human skeletal muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 22, n. 4, p. 345–351, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1023/a:1013122805060>.

FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 106, n. 1, p. 1–29, 2000. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(00\)00128-6](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(00)00128-6).

FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 33, n. 2, p. 79–97, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1002/mas.21381>.

FERNANDES, A. M. B. L. et al. Efeitos da prática de exercício físico sobre o desempenho da marcha e da mobilidade funcional em idosos. **Fisioterapia em Movimento**, v. 25, n. 4, p. 821–830, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-51502012000400015>.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceito, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>.

FERRUCCI, L. et al. Age-related change in mobility : perspectives from life course epidemiology and geroscience. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 71, n. 9, p. 1184–1194, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1093/gerona/glw043>.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress: relative with exercise and training. **Sports Medicine**, v. 36, n. 4, p. 327–358, 2006. Doi: <https://doi.org/10.2165/00007256-200636040-00004>.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 2000. Doi: <https://doi.org/10.1038/35041687>.

FLATT, T.; PARTRIDGE, L. Horizons in the evolution of aging. **BMC Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0562-z>.

FORECHI, L. et al. Adherence to physical activity in adults with chronic diseases: ELSA-Brasil. **Revista de Saude Publica**, v. 52, p. 1–12, 2018. Doi: <https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2018052000215>.

FOSCHINI, D. et al. Força muscular, adaptações neuromusculares e princípios de treinamento de força. In: PRESTES, J. et al. **Prescrição e periodização do treinamento de força em academias**. 2.ed. São Paulo: Manole, 2016, p.29-97.

FRANCESCHI, C. et al. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 10, p. 576–590, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0059-4>.

FULLE, S. et al. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 1, p. 17–24, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.09.012>.

GALLON, D. et al. The effects of stretching on the flexibility, muscle performance and functionality of institutionalized older women. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 3, p. 229–235, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500012>.

GALMICHE, G. et al. N-3 Fatty acids preserve muscle mass and insulin sensitivity in a rat model of energy restriction. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 7, p. 1141–1152, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0007114516003111>.

GARCIA, B. C. et al. Efeitos da dieta suplementada com ômega-3 no músculo sóleo de ratos submetidos à natação: análise histológica e morfométrica. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 5, p. 363–367, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-86922010000500009>.

GOLDBERGER, A. L.; PENG, C. K.; LIPSITZ, L. A. What is physiologic complexity and how does it change with aging and disease? **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 1, p. 23–26, 2002. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(01\)00266-4](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(01)00266-4).

GOMES, A. R. S. et al. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1473–1480, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004001000005>.

GONZALEZ-FREIRE, M. et al. The neuromuscular junction: Aging at the crossroad between nerves and muscle. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, p. 208, 2014. Doi: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00208>.

GRAY, S. R.; DA BOIT, M. Fish oils and their potential in the treatment of sarcopenia. **The Journal of Frailty & Aging**, v. 2, n. 4, p. 211–216, 2013. Doi: <https://doi.org/10.14283/jfa.2013.31>.

GRAY, S. R.; MITTENDORFER, B. Fish oil-derived n-3 polyunsaturated fatty acids for the prevention and treatment of sarcopenia. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 21, n. 2, p. 104–109, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000441>.

GRAZIOLA, F.; SOLIS, V. S.; CURI, R. Estrutura química e classificação dos ácidos graxos. In: CURI, R. et al. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. 1.ed. São Paulo: Manole, 2002. p. 5-23.

GRIFFIN, G. E.; WILLIAMS, P. E.; GOLDSPIK, G. Region of longitudinal growth in striated muscle fibres. **Nature New Biology**, v. 232, n. 27, p. 28–29, 1971. Doi: <https://doi.org/10.1038/newbio232028a0>.

GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9–10, p. 922–935, 1999. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00176-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00176-8).

GROENNEBAEK, T.; VISSING, K. Impact of resistance training on skeletal muscle mitochondrial biogenesis, content, and function. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 713, 2017. Doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00713>.

GUZZONI, V. et al. Effect of resistance training on extracellular matrix adaptations in skeletal muscle of older rats. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1–10, 2018. Doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00374>.

HÄKKINEN, K. et al. Changes in muscle morphology, electromyographic activity, and force production characteristics during progressive strength training in young and older men. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 53, n. 6, p. B415–B423, 1998. Doi: <https://doi.org/10.1093/gerona/53a.6.b415>.

HARMAN, D. Aging: a theory on free radical radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, p. 298–300, 1956. Doi: <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>.

HARRIS, M. B. et al. Resistance training improves femoral artery endothelial dysfunction in aged rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 3, p. 533–540, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1250-z>.

HEPPLE, R. T.; RICE, C. L. Innervation and neuromuscular control in ageing skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 8, p. 1965–1978, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1113/JP270561>.

HIONA, A.; LEEUWENBURGH, C. The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: Implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. **Experimental Gerontology**, v. 43, n. 1, p. 24–33, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.10.001>.

HÖHN, A. et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. **Redox Biology**, v. 11, p. 482–501, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.001>.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian journal of applied physiology**, v. 29, n. 1, p. 16–31, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1139/h04-002>.

HU, X. et al. Are mice good models for human neuromuscular disease? Comparing muscle excursions in walking between mice and humans. **Skeletal Muscle**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13395-017-0143-9>.

HUANG, J. H.; HOOD, D. A. Age-associated mitochondrial dysfunction in skeletal muscle: Contributing factors and suggestions for long-term interventions. **IUBMB Life**, v. 61, n. 3, p. 201–214, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1002/iub.164>.

HUGHES, D. C.; WALLACE, M. A.; BAAR, K. Effects of aging, exercise, and disease on force transfer in skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 309, n. 1, p. E1–E10, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00095.2015>.

HUNTER, S. K.; PEREIRA, X. H. M.; KEENAN, K. G. The aging neuromuscular system and motor performance. **Journal of Applied Physiology**, v. 121, n. 4, p. 982–995, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00475.2016>.

INNIS, S. M. Omega-3 fatty acid biochemistry: perspectives from human nutrition. **Military medicine**, v. 179, Supl. 11, p. 82–87, 2014. Doi: <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-14-00147>.

JAFARINASABIAN, P. et al. Aging human body: changes in bone, muscle and body fat with consequent changes in nutrient intake. **Journal of Endocrinology**, v. 234, n. 1, p. R37–R51, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0603>.

JANG, Y. C.; VAN REMMEN, H. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 2–3, p. 193–198, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.08.029>.

JEROMSON, S. et al. Omega-3 fatty acids and skeletal muscle health. **Marine Drugs**, v. 13, n. 11, p. 6977–7004, 2015. Doi: <https://doi.org/10.3390/md13116977>.

JI, L. L.; FU, R.; MITCHELL, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: Effects of fiber type and exercise intensity. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, n. 5, p. 1854–1859, 1992. Doi: <https://doi.org/10.1152/jappl.1992.73.5.1854>.

JIANG, Z.-Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853–856, 1991. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF02536169>.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos Ed., 1983.

KATZ, B.; MILEDI, R. The binding of acetylcholine to receptors and its removal from the synaptic cleft. **The Journal of physiology**, v. 231, n. 3, p. 549–574, 1973. Doi: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010248>.

KAUR, K. K.; ALLAHBADIA, G.; SINGH, M. Impact of nutrigenomics on various metabolic disorders in relation to life style alteration. **Austin Journal of Nutrition and Food sciences**, v. 6, n. 1, p. 1100, 2018.

KHOSA, S. et al. An overview of neuromuscular junction aging findings in human and animal studies. **Current Aging Science**, v. 12, n. 1, p. 28–34, 2019. Doi: <https://doi.org/10.2174/1874609812666190603165746>.

KIM, J. S.; WILSON, J. M.; LEE, S. R. Dietary implications on mechanisms of sarcopenia: roles of protein, amino acids and antioxidants. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.06.014>.

KIM, N. et al. Eicosapentaenoic Acid (EPA) modulates glucose metabolism by targeting AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4751, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20194751>.

KNUTH, A. G. et al. Changes in physical activity among Brazilian adults over a 5-year period. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 64, n. 7, p. 591–595, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1136/jech.2009.088526>.

KOSTOGLU-ATHANASSIOU, I.; ATHANASSIOU, L.; ATHANASSIOU, P. The effect of omega-3 fatty acids on rheumatoid. **Mediterranean Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 2, p. 190-194, 2020. Doi: <https://doi.org/10.31138/mjr.31.2.190>.

KRAEMER, W. J.; FLECK, S. J.; DESCHENES, M. R. **Fisiologia do exercício: teoria e prática**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2016.

KRAUSE NETO, W. et al. Quantitative morphological analysis revealed muscular hypertrophy in different skeletal muscle types induced by anabolic steroid and resistance training in rats. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 14, p. 591–598, 2013.

KRAUSE NETO, W. et al. Vertical climbing for rodent resistance training : a discussion about training parameters. **International Journal of Sports Science**, v. 6, n. 1A, p. 36–49, 2016. Doi: <https://doi.org/10.5923/s.sports.201601.07>.

KRAUSE NETO, W. et al. Effects of strength training and anabolic steroid in the peripheral nerve and skeletal muscle morphology of aged rats. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, p. 205, 2017. Doi: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00205>.

KUO, I. Y.; EHRLICH, B. E. Signaling in muscle contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 2, p. a006023, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006023>.

LANDI, F. et al. Body mass index is strongly associated with hypertension: Results from the longevity check-up 7+ study. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p. 1976, 2018. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu10121976>.

LARSSON, L.; EDSTRÖM, L. Effects of age on enzyme-histochemical fibre spectra and contractile properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles in the rat. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 76, n. 1, p. 69–89, 1986. Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(86\)90143-7](https://doi.org/10.1016/0022-510X(86)90143-7)

LARSSON, L. et al. Sarcopenia: aging-related loss of muscle mass and function. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 427–511, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00061.2017>.

LAURENTIUS, T. et al. Long-chain fatty acids and inflammatory markers coaccumulate in the skeletal muscle of sarcopenic old rats. **Disease Markers**, v. 2019, Article ID 9140789, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1155/2019/9140789>.

LEE, S. et al. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 3, p. 1097–1104, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00479.2003>.

LEE, J. M. et al. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2016. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu8010023>.

LEE, S. Y. et al. Physical activity and sarcopenia in the geriatric population: a systematic review. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 19, n. 5, p. 378–383, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2018.02.003>.

LEITE, M. A. et al. Experimental Periodontitis in the Potentialization of the Effects of Immobilism in the Skeletal Striated Muscle. **Inflammation**, v. 40, n. 6, p. 2000–2011, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0640-3>.

LE MOAL, E. et al. Redox control of skeletal muscle regeneration. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 27, n. 5, p. 276–310, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6782>.

LIPINA, C.; HUNDAL, H. S. Lipid modulation of skeletal muscle mass and function. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, n. 2, p. 190–201, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12144>.

LIU, C. K. et al. The impact of sarcopenia on a physical activity intervention : the lifestyle interventions and independence for elders pilot study(LIFE-P). **The journal of nutrition, health & aging**. v. 18, n. 1, p. 59–64, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12603-013-0369-0>.

LIU, W. et al. Loss of adult skeletal muscle stem cells drives age-related neuromuscular junction degeneration. **eLife**, v. 6, e26464, p. 1–15, 2017. Doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.26464>.

LOCHYNSKI, D. et al. Contractile properties of motor units and expression of myosin heavy chain isoforms in rat fast-type muscle after volitional weight-lifting training. **Journal of Applied Physiology**, v. 121, n. 4, p. 858–869, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00330.2016>.

LOCKE, A.; SCHNEIDERHAN, J.; ZICK, S. M. Diets for health: Goals and guidelines. **American Family Physician**, v. 97, n. 11, p. 721–728, 2018.

LOGAN, S. L.; SPRIET, L. L. Omega-3 fatty acid supplementation for 12 weeks increases resting and exercise metabolic rate in healthy community- dwelling older females. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, e0144828, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144828>.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The Hallmarks of Aging. **Europe PMC Funders Group**. v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.

LOWE, D. A.; ALWAY, S. E. Animal Models for Inducing Muscle Hypertrophy: Are They Relevant for Clinical Applications in Humans? **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 32, n. 2, p. 36–43, 2002. Doi: <https://doi.org/10.2519/jospt.2002.32.2.36>.

LUO, L. et al. Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 4, p. 427–436, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.02.009>.

MAKANAE, Y.; FUJITA, S. Role of exercise and nutrition in the prevention of sarcopenia. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 61, Suppl., p. S125–S127, 2015. Doi: <https://doi.org/10.3177/jnsv.61.S125>.

MANGANO, K. M. et al. Polyunsaturated fatty acids and their relation with bone and muscle health in adults. **Current Osteoporosis Reports**, v. 11, n. 3, p. 203–212, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11914-013-0149-0>.

MANINI, T. Development of physical disability in older adults. **Current Aging Science**, v. 4, n. 3, p. 184–191, 2011. Doi: <https://doi.org/10.2174/1874609811104030184>.

MARTINEZ-PENA Y VALENZUELA, I.; AKAABOUNE, M. Acetylcholinesterase mobility and stability at the neuromuscular junction of living mice. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 8, p. 2904–2911, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-02-0093>.

MARTY, E. et al. A review of sarcopenia: Enhancing awareness of an increasingly prevalent disease. **Bone**, v. 105, p. 276–286, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.09.008>.

MARZETTI, E. et al. Sarcopenia: an overview. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 29, n. 1, p. 11–17, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1007/s40520-016-0704-5>.

MCGLORY, C.; CALDER, P. C.; NUNES, E. A. The influence of Omega-3 fatty acids on skeletal muscle protein turnover in health, disuse, and disease. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, p. 1–13, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00144>.

MCGLORY, C. et al. Fish oil supplementation suppresses resistance exercise and feeding-induced increases in anabolic signaling without affecting myofibrillar protein synthesis in young men. **Physiological Reports**, v. 4, n. 6, e12715, 2016. Doi: <https://doi.org/10.14814/phy2.12715>.

MCMULLEN, C. A.; ANDRADE, F. H. Functional and morphological evidence of age-related denervation in rat laryngeal muscles. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 64, n. 4, p. 435–442, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1093/gerona/gln074>.

MENG, S. J.; YU, L. J. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1509–1526, 2010. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms11041509>.

MIRANDA, G. M. D.; MENDES, A. C. G.; SILVA, A. L. A. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, n. 3, p. 507–519, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1590/1809-98232016019.150140>.

MITCHELL, S. J. et al. Animal models of aging research: Implications for human aging and age-related diseases. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 3, p. 283–303, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110829>.

MIYAJIMA, M. Amino acids: Key sources for immunometabolites and immunotransmitters. **International Immunology**, v. 32, n. 7, p. 435–446, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa019>.

MOLFINO, A. et al. The role for dietary omega-3 fatty acids supplementation in older adults. **Nutrients**, v. 6, n. 10, p. 4058–4073, 2014. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu6104058>.

NARICI, M.; FRANCHI, M.; MAGANARIS, C. Muscle structural assembly and functional consequences. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, pt. 2, p. 276–284, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.128017>.

NASCIMENTO, V. et al. Morphoquantitative analysis revealed Triceps Brachialis muscle hypertrophy by specific Resistance training equipment in rats. **Journal of Morphological Sciences**, v. 30, n. 4, p. 276–280, 2013.

NAVARRO-HORTAL, M. D. et al. Heart histopathology and mitochondrial ultrastructure in aged rats fed for 24 months on different unsaturated fats (virgin olive oil, sunflower oil or fish oil) and affected by different longevity. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2390, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu11102390>

NICCOLI, T.; PARTRIDGE, L. Ageing as a risk factor for disease. **Current Biology**, v. 22, n. 17, p. R741–R752, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.024>.

NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 668–676, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.072>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **World report on ageing and health**, Geneva: OMS, 2015. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/186463>>. Acesso em: 20 set. 2020.

PAPADOPOULOU, S. K. Sarcopenia: a contemporary health problem among older adult populations. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1293, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu12051293>.

PASSARINO, G.; DE RANGO, F.; MONTESANTO, A. Human longevity: Genetics or Lifestyle? It takes two to tango. **Immunity & Ageing**, v. 13, n. 1, p. 12, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12979-016-0066-z>.

PATERSON, D. H.; JONES, G. R.; RICE, C. L. Ageing and physical activity: Evidence to develop exercise recommendations for older adults. **Canadian journal of public health**, v. 98, Suppl. 2, p. S69-108, 2007.

PERINI, J. A. L. et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 6, p. 1075–1086, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000600013>

PITHON-CURI, T. S. **Fisiologia do exercício**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2013.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1243–1276, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>.

POWERS, S. K. et al. Reactive oxygen species: Impact on skeletal muscle. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 2, p. 941–969, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1002/cphy.c100054>.

POWERS, S. K. et al. Exercise-induced oxidative stress: friend or foe? **Journal of Sport and Health Science**, v. 9, n. 5, p. 415–425, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.04.001>.

RADER, E. P. et al. Role of dystroglycan in limiting contraction-induced injury to the sarcomeric cytoskeleton of mature skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 39, p. 10992–10997, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1605265113>.

RAHAL, A. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, 761264, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1155/2014/761264>.

REINDERS, I. et al. Plasma phospholipid PUFAs are associated with greater muscle and knee extension strength but not with changes in muscle parameters in older adults. **The Journal of nutrition**, v. 145, n. 1, p. 105–112, 2015. Doi: <https://doi.org/10.3945/jn.114.200337>.

ROBINSON, S. M. et al. Does nutrition play a role in the prevention and management of sarcopenia? **Clinical Nutrition** (Edinburgh, Scotland), v. 37, n. 4, p. 1121–1132, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.08.016>.

RODACKI, L. F. et al. Fish-oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 2, p. 428–436, 2012. Doi: <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.021915>.

ROM, O. et al. Lifestyle and Sarcopenia – Etiology, Prevention and Treatment. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 3, n. 4, p. e0024, 2012. Doi: <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10091>.

RONDANELLI, M. et al. Novel Insights on Nutrient Management of Sarcopenia in Elderly. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–14, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1155/2015/524948>.

ROS, M.; CARRASCOSA, J. M. Current nutritional and pharmacological anti-aging interventions. **Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 3, p. 165612, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165612>.

ROSSI, P. et al. Human Skeletal Muscle Aging and the Oxidative System: Cellular Events. **Current Aging Science**, v. 1, n. 3, p. 182–191, 2008. Doi: <https://doi.org/10.2174/1874609810801030182>.

RUSS, D. W. et al. Dietary fish oil supplement induces age-specific contractile and proteomic responses in muscles of male rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01333-4>

SAMUEL, M. A. et al. Agrin and Synaptic Laminin Are Required to Maintain Adult Neuromuscular Junctions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, e46663, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046663>.

SAYER, A. A. et al. New horizons in the pathogenesis, diagnosis and management of sarcopenia. **Age and Ageing**, v. 42, n. 2, p. 145–150, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1093/ageing/afs191>.

SCHEFFER, D. L. et al. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. **Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme**, v. 37, n. 6, p. 1239–1246, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1139/h2012-115>.

SCHOENFELD, B. J. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 24, n. 10, p. 2857–2872, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181e840f3>.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968. Doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4).

SESHAMANI, M.; GRAY, A. Time to death and health expenditure: An improved model for the impact of demographic change on health care costs. **Age and Ageing**, v. 33, n. 6, p. 556–561, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1093/ageing/afh187>.

SHAFIEE, G. et al. Prevalence of sarcopenia in the world: A systematic review and meta-analysis of general population studies. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1186/s40200-017-0302-x>.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 345–381, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>.

SHAVLAKADZE, T.; MCGEACHIE, J.; GROUNDS, M. D. Delayed but excellent myogenic stem cell response of regenerating geriatric skeletal muscles in mice. **Biogerontology**, v. 11, n. 3, p. 363–376, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9260-0>.

SIDDIQUE, U. et al. Determining the Sites of Neural Adaptations to Resistance Training: A Systematic Review and Meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 50, n. 6, p. 1107–1128, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1007/s40279-020-01258-z>.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365–379, 2002. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(02)00253-6).

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic diseases. **Forum of nutrition**, v. 56, p. 67–70, 2003.

SIMOPOULOS, A. P.; DINICOLANTONIO, J. J. The importance of a balanced ω -6 to ω -3 ratio in the prevention and management of obesity. **Open Heart**, v. 3, n. 2, e000385, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1136/openhrt-2015-000385>.

SIQUEIRA FILHO, M. A. **Envelhecimento e músculo esquelético**: força muscular, atividade proteossomal e sinalização relacionada ao balanço proteico. 2012. 68 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

SMITH, D. O. Restricted diffusion of extracellular potassium at the neuromuscular junction of aged rats. **Brain research**, v. 239, n. 2, p. 668–673, 1982. Doi: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90548-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90548-0).

SMITH, G. I. The effects of dietary Omega-3s on muscle composition and quality in older adults. **Current Nutrition Reports**, v. 5, n. 2, p. 99–105, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13668-016-0161-y>.

SMITH, G. I. et al. Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 2, p. 402–412, 2011. Doi: <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.005611>.

SMITH, G. I. et al. Fish oil-derived n–3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 102, n. 1, p. 115–122, 2015. Doi: <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.105833>.

SOBOLEV, A. P. et al. Age-related changes in skeletal muscle composition: a pilot nuclear magnetic resonance spectroscopy study in mice. **Experimental Gerontology**, v. 92, p. 23–27, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.03.005>.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase: new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294–302, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1038/35067589>.

SPERETTA, G. F. F. et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics**, v. 67, n. 12, p. 1469–1477, 2012. Doi: [https://doi.org/10.6061/clinics/2012\(12\)19](https://doi.org/10.6061/clinics/2012(12)19).

STARON, R. S. et al. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 111, n. 2, p. 117–123, 1999. Doi: <https://doi.org/10.1007/s004180050341>.

STRANDBERG, E. et al. Influence of combined resistance training and healthy diet on muscle mass in healthy elderly women: A randomized controlled trial. **Journal of Applied Physiology**, v. 119, n. 8, p. 918–925, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00066.2015>.

SULLIVAN-GUNN, M. J.; LEWANDOWSKI, P. A. Elevated hydrogen peroxide and decreased catalase and glutathione peroxidase protection are associated with aging sarcopenia. **BMC Geriatrics**, v. 13, 104, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2318-13-104>.

TACHTSIS, B.; CAMERA, D.; LACHAM-KAPLAN, O. Potential roles of n-3 PUFAs during skeletal muscle growth and regeneration. **Nutrients**, v. 10, n. 3, 309, 2018. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu10030309>.

TATEM, K. S. et al. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. **Journal of Visualized Experiments**, n. 91, p. 1–7, 2014. Doi: <https://doi.org/10.3791/51785>.

TEIXEIRA, I. N. D. A. O.; GUARIENTO, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 15, n. 6, p. 2845–2857, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232010000600022>

THALACKER-MERCER, A.; RIDDLE, E.; BARRE, L. Protein and amino acids for skeletal muscle health in aging. **Advances in food and nutrition research**, v. 91, p. 29-64, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.08.002>.

THEOU, O. et al. The effectiveness of exercise interventions for the management of frailty: A systematic review. **Journal of Aging Research**, 2011. Doi: <https://doi.org/10.4061/2011/569194>.

THIRUPATHI, A.; PINHO, R. A. Effects of reactive oxygen species and interplay of antioxidants during physical exercise in skeletal muscles. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 74, n. 3, p. 359–367, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13105-018-0633-1>.

THIRUPATHI, A.; PINHO, R. A.; CHANG, Y. Z. Physical exercise: An inducer of positive oxidative stress in skeletal muscle aging. **Life Sciences**, v. 252, p. 117630, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117630>.

TSUKIYAMA, Y. et al. Effects of exercise training on nitric oxide, blood pressure and antioxidant enzymes. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 60, n. 3, p. 180–186, 2017. Doi: <https://doi.org/10.3164/jcbn.16-108>.

UBEDA, N.; ACHON, M.; VARELA-MOREIRAS, G. Omega 3 fatty acids in the elderly. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. Supp 2, p. S137–S151, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0007114512001535>.

UCHITOMI, R.; OYABU, M.; KAMEI, Y. Vitamin d and sarcopenia: Potential of vitamin D supplementation in sarcopenia prevention and treatment. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 3189, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu12103189>.

VERDIJK, L. B. et al. Skeletal muscle hypertrophy following resistance training is accompanied by a fiber type-specific increase in satellite cell content in elderly men. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 64, n. 3, p. 332–339, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1093/gerona/gln050>.

VISVANATHAN, R.; CHAPMAN, I. Preventing sarcopaenia in older people. **Maturitas**, v. 66, n. 4, p. 383–388, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2010.03.020>.

VOLKERT, D. The role of nutrition in the prevention of sarcopenia. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 161, n. 17–18, p. 409–415, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10354-011-0910-x>.

WAGNER, K. H. et al. Biomarkers of aging: From function to molecular biology. **Nutrients**, v. 8, n. 6, p. 8–10, 2016. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu8060338>.

WANG, Y.; PESSIN, J. E. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 16, n. 3, p. 243–250, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328360272d>.

WITARD, O. C.; COMBET, E.; GRAY, S. R. Long-chain n-3 fatty acids as an essential link between musculoskeletal and cardio-metabolic health in older adults. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 79, n. 1, p. 47–55, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0029665119000922>.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva: WHO, 2003.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Global health estimates**. Geneva: WHO, 2019.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Noncommunicable diseases progress monitor 2015**. Geneva: WHO, 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **World health statistics 2011**. Geneva: WHO, 2011.

WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A.; BEREZIŃSKA, M.; NOWAK, J. Z. PUFAs: Structures, metabolism and functions. **Advances in Clinical and Experimental Medicine Wroclaw University of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 931–941, 2015. Doi: <https://doi.org/10.17219/acem/31243>.

WU, H.; XU, L.; BALLANTYNE, C. M. Dietary and pharmacological fatty acids and cardiovascular health. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 105, n. 4, p. 1030–1045, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz174>.

YAMAZAKI, R. K. et al. Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 66, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-66>.

ZELICKSON, B. R. et al. **Reactive oxygen and nitrogen species: interactions with mitochondria and pathophysiology**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2013.

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA PELA CEUA



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1067

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.154994/2017-61

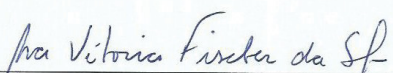
APROVADO/APPROVAL: 11/04/2017 – R.O. 03/2017

TÍTULO: Avaliação de parâmetros morfofuncionais da musculatura esquelética em ratos envelhecidos submetidos ao treinamento resistido ou à suplementação com óleo de peixe

TITLE: Evaluation of morphological and functional parameters of the skeletal musculature in aged rats submitted to resistance training or fish oil supplementation

AUTORES/AUTHORS: Katya Naliwaiko, Malu Cristina de Araujo Montoro Lima, Luiz Claudio Fernandes, Larisson Murilo Ramos de Paula, Juliana Beker Godoy, Bruna Aparecida Comotti de Oliveira

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Biologia Celular


Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
Coordenadora da CEUA