



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

RESPOSTAS MORFOLÓGICAS E MOLECULARES DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS IDOSOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO APÓS ESTÍMULO ATRÓFICO

Ivan José Vechetti Júnior

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração em Biologia Celular,
Estrutural e Funcional.

Prof.^a. Dr.^a. Maeli Dal Pai

**BOTUCATU – SP
2015**



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**RESPOSTAS MORFOLÓGICAS E MOLECULARES DO
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS IDOSOS
SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO APÓS
ESTÍMULO ATRÓFICO**

Ivan José Vechetti Júnior

Prf^a. Dr^a. Maeli Dal Pai

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração em Biologia Celular,
Estrutural e Funcional.

**BOTUCATU – SP
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Vechetti Júnior, Ivan José.

Respostas morfológicas e moleculares do músculo esquelético de ratos idosos submetidos ao treinamento físico após estímulo atrofico / Ivan José Vechetti Júnior. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maeli Dal Pai

Capes: 20703007

1. Envelhecimento. 2. Imobilização animal. 3. Massa muscular. 4. Exercícios físicos. 5. Músculos.

Palavras-chave: Envelhecimento; Imobilização; Massa Muscular; Recuperação; Treinamento Físico.

Dedicatória

“Dedico este trabalho a minha amiga, professora e orientadora Dr^a. Maeli Dal Pai. A esta devo a confiança em minha capacidade como pesquisador, além da paciência e tranquilidade para me transmitir os ricos ensinamentos durante toda essa jornada. Sou imensamente grato por todo apoio teórico-prático, pelo incentivo, pelo exemplo de competência e perseverança não apenas no campo científico como também frente às adversidades da vida. Obrigado por tudo...”

Agradecimentos

Ao longo desses vários anos de trabalho, em uma travessia repleta de percalços, consegui superá-las graças a muito trabalho e ajuda de várias pessoas que colaboraram direta ou indiretamente. Esta colaboração, não se restringe apenas à relação científica e prática, mas também a um sorriso, um incentivo, um conselho, uma palavra de motivação, uma conversa, uma compreensão, etc... Quero agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam, que foram solidárias, que torceram por mim. Mas sei que agradecer é sempre muito difícil. Posso cometer mais injustiças esquecendo pessoas que me ajudaram do que fazer jus a todas que merecem. Espero não ter me esquecido de ninguém.

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada é possível. Obrigado por sempre guiar os meus passos, me amparar nos momentos difíceis, mostrar os caminhos nas horas incertas e me proteger sempre.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Maeli Dal Pai, pois permitiu que fizesse parte de seu grupo de pesquisa, confiando em minha capacidade e nos frutos deste projeto. Nossas conversas foram sempre muito esclarecedoras e colaboraram imensamente para a solução dos problemas com que me deparei ao longo desta jornada. Estes anos foram valiosos para a minha formação e isto jamais será perdido. Muito, obrigado!

Agradeço profundamente à minha esposa Daniele Capelin da Silva Vechetti por permanecer incondicionalmente ao meu lado todo esse tempo; por me demonstrar, mesmo nos momentos mais difíceis (que não foram raros) que conseguiria chegar ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Sou grato por todo seu amor, carinho, amizade e cumplicidade em todos esses anos que estamos juntos. Obrigado por todos os sacrifícios a que esta tese a obrigaram e por me proporcionar momentos de felicidade e alegria. Te amo.

Agradeço imensamente aos meus pais Ivan José Vechetti e Aparecida Assumpção Vechetti pelos sacrifícios que precisaram fazer, sem nunca reclamar, para me ajudar a alcançar meus objetivos. Obrigado por todo amor, respeito e acima de tudo por me conduzirem, ensinando como

seguir o melhor caminho, sem precisar transpor as amizades e o respeito para com as outras pessoas.

Agradeço a minha irmã Amanda Vechetti que de forma indireta, porém não menos importante, me apoiou durante a realização deste trabalho; Agradeço também minha sobrinha Ana Clara Vechetti Texeira que apesar de muito nova me ajudou com seu sorriso sincero e sua alegria contagiante. Desejo que Deus continue abençoando vocês.

Agradeço a todos os meus familiares presentes e os que já partiram (em memória) que sempre me incentivaram a continuar nessa jornada para alcançar esse tão almejado título. Obrigado a todos.

Agradeço também aos meus amigos Pedro e Juliane que mesmo sem contribuir diretamente para a pesquisa, me apoiaram nos momentos difíceis e me fizeram sair de casa, conversar e acima de tudo entenderam minha ausência durante este período. Muitíssimo obrigado.

Agradeço meus amigos do Laboratório de Biologia do Músculo Esquelético (LBME): Ana Omoto, Bruna Zanella, Bruno Duran, Carlos Alves, Carlos Freitas, Edson Mareco, Francielle Mosele, Geysson Fernandez, Grasieli Oliveira, Jéssica Valente, Juarez Ferreira, Leonardo Moraes, Paula Aiello, Paula Freire, Rafaela Nunes, Raquel Bertaglia, Rondinelle Salomão, Sarah Cury, Tassiana de Paula, Warlen Piedade, Prof. Dr. Robson Carvalho e Rodrigo Souza pelo convívio agradável, conhecimento compartilhado e constante apoio.

Gostaria de agradecer de maneira especial alguns membros do grupo LBME que foram imprescindíveis para que este trabalho fosse concluído. Sem a enorme ajuda de vocês não acabaria esta tese. Muito obrigado Raquel Santilone Bertaglia de Almeida, Rodrigo Wagner Alves de Souza, Tassiana Gutierrez de Paula, Leonardo Nazário de Moraes, Geysson Javier Fernandez Garcia, Juarez Henrique Ferreira, Edson Assunção Mareco e Ana Carolina Mieko Omoto.

Agradeço ao José Eduardo e Ricardo Teixeira, funcionários do Departamento de Morfologia, pela dedicação, amizade e auxílio prestado com muito bom humor e sinceridade aos discentes do Departamento.

Aos funcionários do departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu por serem prestativos e estarem sempre presentes.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo profissionalismo e pela disposição em sempre querer ajudar.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Morfologia (UNESP/IBB/Botucatu), que participaram, positivamente, na minha formação acadêmico-científica.

Agradeço a Luciana Cristina Montes, secretária do Departamento de Morfologia, pela competência na organização e colaboração prestada, durante a realização deste trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de SP por financiar este trabalho e acreditar em nosso potencial (processo nº 2011/14484-4 e 2012/20183-0).

RESUMO

Introdução: Durante o envelhecimento, a perda de massa muscular (sarcopenia) é inevitável e contribui para a elevada morbidade e mortalidade; assim, evitar a sarcopenia é importante para manutenção da saúde e qualidade de vida a longo prazo. Além disso, o treinamento físico tem sido demonstrado ser importante para o controle de massa muscular durante o envelhecimento através da ativação de várias vias incluindo, IGF1-AKT e PGC-1 α . Além disso, foi demonstrado que LRP130, um componente do complexo do PGC-1 α é importante para a transcrição dependente de vários genes mitocondriais *in vivo*. Portanto, nós hipotetizamos que o treinamento físico pode melhorar a recuperação muscular, possivelmente através do complexo PGC-1 α /LRP130 por inibição do sistema ubiquitina-proteassoma após atrofia induzida por desuso em ratos idosos. Portanto, foi investigado os efeitos do processo de regeneração muscular após curto período de imobilização seguido de 3 ou 7 dias de recuperação utilizando treinamento aeróbio (AT) ou treinamento resistido (TR).

Métodos: Após 7 dias de imobilização, os animais foram submetidos ao processo de recuperação muscular com exercício (AT ou RT) ou sem exercício (R) durante 3 ou 7 dias. No final do experimento, os animais foram sacrificados, e o músculo plantar (PL) foi removido para análises morfológicas (avaliação da atividade mATPase, para avaliar a área de secção transversal das fibras musculares (CSA), bem como a frequência dos tipos de fibras específicas), análises bioquímicas (isoformas da cadeia pesada de miosina, MyHC), expressão gênica de 44 marcadores moleculares de massa muscular (RT-qPCR). Para entender melhor a relevância biológica das interações de mRNA, foi realizada uma análise de rede que estão relacionados com o nosso conjunto de genes diferencialmente expressos (plugin GeneMANIA Cytoscape). Os genes diferencialmente expressos foram submetidos à análise de Western blot.

Resultados: Após 7 dias de estímulo atrofico, apenas os músculos PL dos animais submetidos ao AT recuperaram os padrões normais da CSA. A frequência dos tipos de fibras e isoformas MyHC não se alterou durante o experimento em todos os grupos. Após 3 dias de recuperação, a expressão

do sistema ubiquitina-proteassoma envolvidos na atrofia muscular (MAFbx, MuRF-1 e FoxO1) foram reduzidos exclusivamente no grupo AT. Interessantemente, no grupo AT, os níveis elevados de PGC-1 α e LRP130 acelerou o processo de recuperação muscular possivelmente inibindo a via FOXO1.

Conclusão: O AT potencializou o processo de regeneração muscular após a atrofia induzida por desuso em ratos idosos, possivelmente através do complexo PGC-1 α /LRP130 por inibição do sistema ubiquitina-proteassoma. Nossos resultados forneceram importantes insights sobre o processo de regeneração muscular em animais idosos, o que poderia contribuir para o controle da sarcopenia no envelhecimento.

Palavras-chave: Envelhecimento. Massa Muscular. Imobilização. Recuperação. Treinamento

Físico

ABSTRACT

Background: During aging, loss of muscle mass (sarcopenia) is inevitable and contributes to increased morbidity and mortality; thus, the maintenance of skeletal muscle mass is critical for long-term health and quality of life. In addition, physical training has been shown to be important to the control of muscle mass during aging through the activation of several pathways including, IGF1-AKT and PGC-1 α . Also, it was demonstrated that LRP130, a component of the PGC-1 α complex is important for the PGC-1 α - dependent transcription of several mitochondrial genes *in vivo*. Therefore, we hypothesized that the physical training could improve the muscle recovery possibly through of the LRP130/PGC-1 α complex by inhibiting the ubiquitin-proteasome system after disuse-induced atrophy in aged rats. We therefore investigated the effects on muscle recovery after short-term immobilization followed by 3 or 7 days of retraining with aerobic training (AT) or resistance training (RT).

Methods: After 7 days of immobilization, the animals underwent the re-growth process with exercise (AT or RT) or without exercise (R) for 3 or 7 days. At the end of the experiment, the animals were sacrificed, and the plantaris (PL) muscle was removed for morphological analyses (assessment of mATPase activity, to assess the total muscle fiber cross sectional area (CSA), and the frequency of specific fiber types), biochemical analyses (Myosin Heavy Chain, MyHC), gene expression of 44 molecular markers of muscle mass (RT-qPCR). To further understand the biological relevance of the mRNA interactions, we performed a search for additional genes that are related to our differentially expressed gene set (GeneMANIA Cytoscape plugin). Differentially expressed genes were submitted to Western blotting analysis.

Results: At 7 days after an atrophic stimulus, only PL muscles from animals subjected to AT had recovered their normal CSA patterns. The frequency of fiber types and MyHC isoforms did not change during the experiment in all groups. After 3 days of recovery, the expression muscle-specific ubiquitin ligases involved in muscle atrophy (MAFbx, MuRF-1 and FoxO1) were reduced

exclusively in the AT group. Interestingly, in the AT group, high levels of PGC-1 α and LRP130 accelerated the process of muscle recovery by inhibiting the FoxO1 pathway.

Conclusion: AT enhanced the muscle regeneration process after disuse-induced atrophy in aged rats possibly through of the LRP130/PGC-1 α complex by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. Our results provide important insight into the process of muscle regeneration in aged animals, which could contribute to the control of sarcopenia in aging.

Keywords: Aging. Muscle Mass. Immobilization. Recovery. Exercise Training.

Lista de Abreviações

1RM – Uma Repetição Máxima

Actb – *Beta Actin*

ACVR2A ou ActRII – Receptor de Activina IIA (*do inglês: Activin receptor type-2A*)

ACVR2B ou ActRIIB – Receptor de Activina IIB (*do inglês: Activin receptor type-2B*)

AKT – Quinase Serina-Treonina (*do inglês: serine-threonine kinase*)

AST – Área de secção transversal

AT3 – Grupo Submetido ao Treinamento Aeróbio 3 dias

AT7 – Grupo Submetido ao Treinamento Aeróbio 7 dias

C – Grupo Controle

C3 – Grupo Controle 3 dias

C7 – Grupo Controle 7 dias

CDK – Ciclinas Dependentes de Quinase

CS – Células Satélites ou Células Mioassatélites

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

EDL – Extensor Longo dos Dedos

FoxO – *Forkhead box O*

GAPDH – *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GDF8 – Fator de crescimento e diferenciação 8 (*do inglês: growth differentiation factor 8*)

GPD - α -glicerolfosfatase desidrogenase

HMM – Meromiosina Pesada (*do inglês: heavy meromyosin*)

I – Grupo Imobilizado

IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina (*do inglês: insulin-like growth factor-I*)

IL-6 – Interleucina 6

IRS – Substrato Receptor Insulínico (*do inglês: insulin response substrate*)

LA – Limiar Anaeróbio

LAC E1 – Concentração de Lactato 1ª série

LAC E2 – Concentração de Lactato 2ª série

LMM – Meromiosina Leve (*do inglês: light meromyosin*)

LRP130/LRPPRC – *Leucine-rich PPR (multiple pentatricopeptide repeats) motif-containing protein*

MAFbx – *Muscle Atrophy F-box*

mATPase – ATPase Miofibrilar

MIQE – *Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment*

MLC – Cadeia Leve de Miosina (*do inglês: myosin light chain*)

MRFs – Fatores de Regulação Miogênicas (*do inglês: myogenic regulatory factors*)

MSTN – Miostatina

mtDNA – DNA mitocondrial

mTOR – Alvo de Rapamicina em Mamíferos (*do inglês: mammalian target of rapamycin*)

MuRF1 – *Muscle RING Finger 1*

MyHC – Cadeia Pesada de Miosina (*do inglês: myosin heavy chain*)

NF- κ B – Fator Nuclear-Kappa B (*do inglês: nuclear factor kappa b*)

p70S6K – *p70S6 Kinase*

PBS – Tampão Fosfato Salino (*do inglês: Phosphate-buffered saline*)

PBS-T – Tampão Fosfato + Tween (*do inglês: Phosphate-buffered saline + Tween*)

PDU – Sistema Proteassomal Dependente de Ubiquitina

pFoxO1 – *Phosphorylated Forkhead box O*

PGC1 α – *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha*

PI3K – Quinase Fosfatidil Inositol 3 (*do inglês: phosphatidyl-inositol-3 kinase*)

PL – Músculo Plantar

R3 – Grupo Recuperado 3 dias

R7 – Grupo Recuperado 7 dias

RNA_m – RNA mensageiro

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (*do inglês: Reactive Oxygen Species*)

Rplp0 – *Ribosomal protein, large, P0*

RT – Transcrição Reversa

RT3 – Grupo Submetido ao Treinamento Resistido 3 dias

RT7 – Grupo Submetido ao Treinamento Resistido 7 dias

RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa

SDH – Succinato desidrogenase

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio

TGF- β – Fator de Crescimento Transformante Beta (*do inglês: Transforming growth factor beta*)

TLDA – *TaqMan Low Density Arrays*

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α (*do inglês: Tumor necrosis factor alpha*)

Lista de Figuras

Figura 1. A: Corte transversal do músculo sóleo de rato submetido a coloração HE. Fibras musculares (F); Perimísio (seta descontínua); Endomísio (seta contínua) e Mionúcleos (ponta da seta). B: Esquema da molécula de miosina da classe II. Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas de miosina (MyHC) e quatro cadeias leves de miosina (MLC). As MyHC podem ser clivadas em meromiosina leves (LMM) e pesadas (HMM). As HMM são formadas pela porção globosa S1 e porção α hélice S2. As MLC estão dispostas na proporção de duas cadeias (uma essencial e uma reguladora) para cada subfragmento S1 (Adaptado de Dal Pai-Silva et al. [8]).

Figura 2. Cortes transversais seriados do músculo sóleo (A-C) e plantar (D-F) de rato após análise histoquímica da mATPase com pH 4.1 (A), 4.52 (B), 10.6 (C), 4.2 (D), 4.32 (E) e 9.8 (F). Fibras Puras (I, IIA, IID e IIB) e fibras híbridas (IC, IIC, IIAD e IIDB) [15].

Figura 3 – Processo de regeneração Muscular. Fibra muscular normal com célula satélite quiescente e mionúcleo (A). Após um miotrauma (B), as células satélites quiescentes são ativadas, proliferam-se (C) e se diferenciam em mioblastos (E). No miotrauma adaptativo do exercício físico, os mioblastos migram para a região danificada e fundem-se à fibra muscular pré-existente para reparar o local da microlesão e/ou adicionar núcleos para ampliar a taxa síntese protéica (hipertrofia) (F). Porém, em situações de miotraumas severos que ocorra necrose das fibras (ação de toxinas e distrofia), os mioblastos poderão se alinhar e fundir-se entre si, para formar uma nova miofibra (G), e reparar o dano da fibra muscular (H). Durante o processo de regeneração, alguns mioblastos retornam ao estado quiescente e restabelecem a população de células satélites (D) (Adaptado de Charge e Rudnick [78]).

Figura 4. Principais vias que controlam o crescimento muscular. Síntese e degradação proteica reguladas por diferentes estímulos, na qual ativam múltiplas vias de sinalização. Linhas tracejadas denotam vias cujo mecanismo e papel molecular no músculo esquelético não estão completamente definidos (Adaptado de Bonaldo e Sandri [101]).

Figura 5. Os sistemas proteolíticos envolvidos na atrofia muscular: (A) ativação de calpaínas dependente de cálcio, (B) proteases lisossomais (catepsinas), e (C) proteossomal dependente de ubiquitina. A ubiquitinização de proteínas alvo para a proteólise proteossomal é mediada por uma família de proteínas e três complexos protéicos distintos: enzimas de ativação de ubiquitina (E1),

enzimas de conjugação de ubiquitina (E2), e enzimas de ligação de ubiquitina (E3) (adaptado de Jackman & Kandarian, [116]).

Figura 6. Esquema da atrofia muscular via NF- κ B induzida pelo TNF- α . A ligação do TNF- α ao seu receptor (TNFR1) induz a fosforilação da proteína I κ B pelo complexo quinase IKB (IKK= IKK- α + IKK- β + IKK- γ) e a sua ubiquitinação (Ub) para a degradação proteossomal. O heterodímero NF- κ B (p65 + p50) é translocado para o interior do núcleo celular para a ativação de genes dependente de NF- κ B, relacionados com a atrofia muscular (adaptado de Jackman & Kandarian, [116]).

FIGURA 7. Figura ilustrando o programa de treinamento aeróbio de natação utilizado no experimento [15].

FIGURA 8. Figura ilustrando o programa de treinamento de força (salto) utilizado no experimento [128].

Sumário

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
Lista de Abreviações	xii
Lista de Figuras	xiv
I - INTRODUÇÃO.....	1
1. Características gerais das fibras do músculo esquelético	1
2. Adaptações do músculo esquelético ao envelhecimento	4
3. Regeneração muscular	7
4. Mecanismos moleculares relacionados ao controle da massa muscular	11
II - JUSTIFICATIVA.....	17
III – OBJETIVO GERAIS.....	17
IV – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
V - METODOLOGIA.....	19
1. Animais e Protocolo Experimental	19
2. Imobilização dos membros posteriores	19
3. Protocolo de treinamento	20
4. Dados Anatômicos	23
5. Análise sérica do cortisol	24
6. Análise histoquímica e área de secção transversal das fibras musculares	24
7. Análise bioquímica da MyHC.....	24
8. Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).....	25
9. Avaliação quantitativa da expressão protéica por Western Blot	26
10. Análise Estatística	28
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
VII - ANEXO	38
VIII – MANUSCRITO	40
IX – DADOS SUPLEMENTARES	73

I - INTRODUÇÃO

1. Características gerais das fibras do músculo esquelético

O músculo estriado esquelético é um tecido constituído por células multinucleadas especializadas, as fibras musculares, que apresentam mionúcleos localizados na região periférica da fibra, abaixo da membrana plasmática (Figura 1A). Morfologicamente, as fibras musculares são constituídas por unidades contráteis repetidas, os sarcômeros [1]. Cada sarcômero é formado por proteínas, das quais se destacam as proteínas contráteis miosina (filamento grosso formado pela polimerização de 200 a 300 moléculas de miosina da classe II) e actina (filamento fino associado às proteínas reguladoras troponina e tropomiosina) [1]. A miosina é um hexâmero formado por seis polipeptídeos: duas cadeias pesadas (*myosin heavy chain*, MyHC), enroladas em α -hélice e quatro cadeias leves (*myosin light chain*, MLC) [2–4] (Figura 1B). Cada MyHC pode ser separada em duas porções: meromiosina leve (*light meromyosin*, LMM), em forma de bastão, e meromiosina pesada (*heavy meromyosin*, HMM), conhecida como porção globular da miosina, que contém um sítio de interação com a actina e uma região de ligação com a molécula de ATP (com atividade ATPase) [1,4] (Figura 1B). A contração muscular ocorre através da interação entre os filamentos finos (actina) e grossos (porção globular da molécula de miosina) do sarcômero [1], após a hidrólise do ATP, pela ATPase miofibrilar (mATPase) [4]. A porção globular da MyHC representa o componente essencial para o mecanismo de geração de força do músculo. Segundo Talmadge e Roy [5], a velocidade de contração é diretamente proporcional a atividade da mATPase, na porção globular da MyHC. Tal evento foi demonstrado em análises de fibras isoladas, que revelaram uma alta correlação entre o tipo de fibra, baseado na atividade da mATPase, com a especificidade da MyHC [6,7].

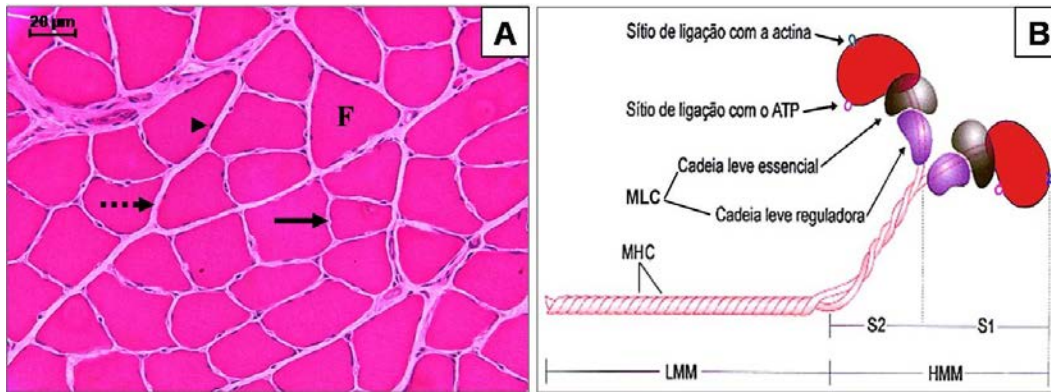


Figura 1. A: Corte transversal do músculo sóleo de rato submetido a coloração HE. Fibras musculares (F); Perimísio (seta descontínua); Endomísio (seta contínua) e Mionúcleos (ponta da seta). B: Esquema da molécula de miosina da classe II. Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas de miosina (MyHC) e quatro cadeias leves de miosina (MLC). As MyHC podem ser clivadas em meromiosina leves (LMM) e pesadas (HMM). As HMM são formadas pela porção globosa S1 e porção α hélice S2. As MLC estão dispostas na proporção de duas cadeias (uma essencial e uma reguladora) para cada subfragmento S1 (Adaptado de Dal Pai-Silva et al., [8]).

Os músculos são constituídos por diferentes tipos de fibras que conferem a este tecido uma ampla diversidade estrutural, metabólica e funcional [6,9]. Inicialmente, as fibras musculares foram divididas em três categorias: 1- fibras oxidativas de contração lenta (tipo I), 2- fibras oxidativas/glicolíticas de contração rápida (tipo IIA) e 3- fibras glicolíticas de contração rápida (tipo IIB), de acordo com o padrão de coloração histoquímica para a reação da mATPase [10]. No entanto, evidências mais recentes baseadas nas características bioquímicas e imunohistoquímicas das fibras musculares, demonstraram uma estreita relação entre a classificação histoquímica das fibras do tipo I, IIA e IIB, e a expressão das isoformas de MyHC expressas por essas fibras [11]. Neste contexto, Pette e Staron [12], classificaram as fibras musculares de mamíferos em quatro tipos distintos: fibras de contração lenta (tipo I), expressando MyHCI; e fibras de contração rápida (tipo II), subdivididas em tipo IIA, IID e IIB, que expressam as isoformas de MyHCIIa, MyHCIIId e MyHCIIb, respectivamente. Os autores classificaram essas fibras como puras, uma vez que, expressavam uma única isoforma de MyHC. As fibras do tipo IID (MyHCIIId) equivalem às fibras

IIX (MyHCIIx), descritas em ratos [9]. Vale ressaltar que as fibras musculares humanas não expressam a MyHCIIb, a classificação prévia de fibras IIB se equivale às fibras do tipo IIX ou IID (MyHCIIx ou MyHCIIId), de acordo com a similaridade da MyHC descrita em ratos [13]. No entanto, a literatura comumente denomina as fibras do tipo IIX/D como fibras do tipo IIB.

Além das fibras puras, existem as fibras “híbridas”, que expressam duas ou mais isoformas de miosina. Estas fibras foram classificadas em Tipo IC (MyHCI > MyHCIIa), IIC (MyHCIIa > MyHCI), IIAD (MyHCIIa > MyHCIIId), IIDA (MyHCIIId > MyHCIIa), IIDB (MyHCIIId > MyHCIIb) e IIBD (MyHCIIb > MyHCIIId) [6,12]. A associação entre as fibras puras e híbridas representa um contínuo de fibras lentas em direção a fibras mais rápidas: I → I/IIA → IIA/I → IIA → IIA/D → IID/A → IID → IID/B → IIB/D → IIB [14]. Deste modo, assume-se uma organização sequencial das fibras puras, as quais são intermediadas por fibras híbridas (I ↔ IC ↔ IIC ↔ IIA ↔ IIAD ↔ IID ↔ IIDB ↔ IIB) (figura 2).

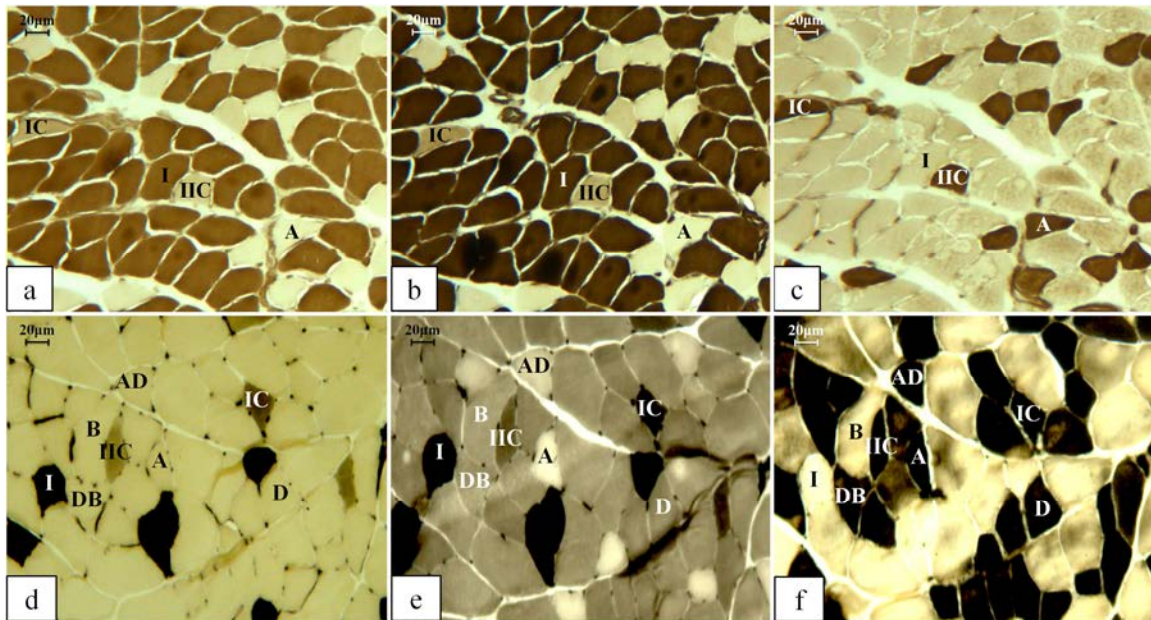


Figura 2. Cortes transversais seriados do músculo sóleo (A-C) e plantar (D-F) de rato após análise histoquímica da mATPase com pH 4.1 (A), 4.52 (B), 10.6 (C), 4.2 (D), 4.32 (E) e 9.8 (F). Fibras Puras (I, IIA, IID e IIB) e fibras híbridas (IC, IIC, IIAD e IIDB) [15].

As características funcionais e metabólicas dos diferentes tipos de fibras tem sido investigadas em estudos que correlacionaram a expressão de diferentes isoformas de MyHC, com as propriedades metabólicas e funcionais das fibras musculares [6,16]. Rivero et al. [11], utilizando-se de métodos histoquímicos, investigaram as interrelações entre a atividade da mATPase, a atividade das enzimas oxidativas (*succinato desidrogenase*, SDH) e glicolíticas (*α -glicerolfosfatase desidrogenase*, GPD) e a área de secção transversal (AST) das fibras musculares do músculo gastrocnêmio de ratos. Este estudo evidenciou um padrão de atividade das enzimas glicolíticas mATPase e GPD, de acordo com o tipo de fibra: IIB> IID/X> IIA>I. Por outro lado, a atividade da enzima oxidativa SDH foi maior nas fibras IIA e I. Os autores também demonstraram uma maior atividade da GPD nas fibras com maior AST (IIB e IID/X), enquanto as fibras com menor AST (I e IIA) apresentaram maior atividade da SDH. Os resultados deste estudo apontam uma estreita relação entre a expressão das isoformas de MyHC, a AST e as propriedades metabólicas dos diferentes tipos de fibras musculares.

A expressão diferencial das isoformas de MyHC nos diferentes tipos de fibras é refletida em suas respostas funcionais, tais como as características contráteis (exemplo: velocidade de contração e produção de potência) e metabólicas (exemplo: resistência à fadiga). Neste contexto, tem sido relatado que o músculo esquelético pode se adaptar através de um mecanismo quantitativo, baseado nas mudanças da massa muscular e área da fibra, e por um mecanismo qualitativo, fundamentado nas alterações dos tipos de fibras e conteúdo das isoformas de MyHC [17]. Essas modificações fenotípicas são necessárias para suprir as necessidades funcionais e metabólicas do organismo decorrentes de diferentes estímulos.

2. Adaptações do músculo esquelético ao envelhecimento

Uma das principais características da plasticidade muscular é a regulação intrínseca da transcrição de genes músculo-específicos que promovem o aumento ou redução da síntese protéica

[18]. Considerando que o conteúdo de proteínas miofibrilares representa aproximadamente 85% do volume da fibra muscular [19], qualquer situação que altere o balanço entre a síntese e degradação de proteínas pode contribuir para o aumento (hipertrofia) ou redução (atrofia) da massa muscular [20]. Nesta linha de investigação, vários estudos demonstram que o treinamento resistido pode modular o grau de síntese e degradação das proteínas miofibrilares e, potencialmente, promover a hipertrofia muscular [17,21]. Por outro lado, situações de desuso que promovem a redução da atividade muscular como a imobilização, suspensão do membro posterior, desnervação, repouso no leito ou processos fisiológicos (como o envelhecimento) e patológicos (como o câncer, doenças neuromusculares e insuficiência respiratória) podem conduzir a severa perda da massa muscular [22,23]. Sabe-se que a massa muscular contribui para ~50% do peso corporal total em jovens adultos, entretanto, durante o envelhecimento ocorre um decréscimo de 25% em indivíduos com 75-80 anos de idade, processo denominado de sarcopenia [24].

A sarcopenia é caracterizada por uma diminuição da massa e da força muscular resultando na diminuição da independência e da capacidade funcional, sendo considerado um importante preditor de mortalidade, estando associada com uma baixa qualidade de vida na senilidade [25,26]. Em adição, Janssen et al. [27] observaram que a habilidade funcional, como andar, ficar em pé, levantar-se da cadeira de rodas, é 3 vezes menor em indivíduos que apresentam um quadro de sarcopenia. O declínio da atividade física aumenta a susceptibilidade a atrofia promovida por desuso (repouso na cama), processo completamente reversível na população mais jovem [28], entretanto, durante o envelhecimento essa atrofia é exacerbada e a capacidade regenerativa diminuída [29,30]. Carlson et al. [31] observaram uma perda de 30% da massa muscular após duas semanas de imobilização em homens idosos, em comparação com uma perda de menos de 2% em homens jovens.

Seguindo esta linha de investigação, o desuso muscular (proveniente da inatividade física dessa população) é muitas vezes acompanhado pelo aumento da fadiga muscular (redução da capacidade oxidativa) [32–34]. Além disso, a perda de capilar e redução do fluxo sanguíneo durante

o envelhecimento [35,36] contribui para este aumento na fadiga muscular devido a um fornecimento deficiente de substratos de energia e oxigênio para o músculo. Este fato pode ser explicado devido a relação existente entre o fluxo sanguíneo com o tipo e tamanho das fibras musculares, demonstrando a importância da manutenção da massa muscular durante o envelhecimento [37]. Durante a sarcopenia, as alterações morfológicas do músculo esquelético estão diretamente relacionadas com a disfunção mitocondrial e com a diminuição/ausência da habilidade do reparo, crescimento e hipertrofia muscular [38–40]. Têm sido demonstrado que o envelhecimento promove uma diminuição do número e do tamanho das fibras musculares, sendo mais acentuada nas fibras de contração rápida (tipo II), o que torna o músculo mais lento [41–43]. Corroborando com estes achados, Lee et al. [44] observaram uma redução em fibras do tipo IIA/IIB em idosos após avaliarem a morfologia de 65 pacientes chineses com idade entre 17-96 anos.

Os mecanismos propostos para a perda de massa muscular durante o envelhecimento incluem o aumento de espécies reativas de oxigênio (*do inglês: Reactive Oxygen Species*, ROS), mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), deficiência no mecanismo de autofagia e aumento de apoptose. Foi demonstrado que um declínio progressivo da função mitocondrial leva a um aumento na formação do stress oxidativo e a produção de ROS, o que promove mutações no mtDNA e morte celular [45–47]. Normalmente, o dano oxidativo em proteínas alteram suas estruturas e funções, conduzindo à formação de agregados, que são ubiquitinados e conduzidos pelo proteassoma a degradação [48]. No entanto, com o envelhecimento o processo autofágico (renovação celular) diminui, promovendo um acúmulo destas proteínas agregadas, aumento de apoptose e estresse oxidativo [49]. Esses mecanismos contribuem para diminuição das miofibras observados na sarcopenia em consequência da deficiência desses processos. A perda progressiva do tecido muscular tem um impacto significativo sobre as respostas fisiológicas e bem-estar social de idosos. Foi demonstrado que prevenir a perda do tecido muscular aumenta o tempo de sobrevivência [50], além de diminuir a fragilidade e aumentar a independência dos idosos [51].

Neste sentido, alguns estudos demonstraram que o exercício físico atenua os efeitos deletérios que o músculo sofre em resposta ao envelhecimento [52–54]. Enquanto apenas o treinamento resistido promove hipertrofia no músculo adulto, vários trabalhos demonstraram que tanto o treinamento resistido como o aeróbico pode atenuar o efeito da sarcopenia em músculos senis [55–58]. Apesar de bem estabelecida a importância do treinamento físico para minimizar o efeito da sarcopenia, poucos trabalhos procuraram investigar a capacidade de regeneração do músculo senil, na tentativa de atenuar o processo de atrofia muscular. Em adição, Hurst & Fitts [53], após submeterem ratos à atrofia por imobilização do membro posterior e realizarem exercícios isométricos três vezes por semana durante 14 dias, não verificaram melhora na função do músculo gastrocnêmio. Resultados similares foram observados por, Arora et al. [59], após imobilizarem o membro posterior de ratos senis e submeterem a 15 minutos diários de exercício em esteira. Além disso, alguns trabalhos demonstraram que após imobilização do membro posterior houve um menor aumento da massa muscular em ratos senis quando comparados com ratos jovens submetidos a estímulo mecânico [60,61]. Coletivamente, estes trabalhos demonstram que a capacidade de regeneração do músculo esquelético parece diminuir com o envelhecimento. Entretanto a maioria destes estudos não investigaram os mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste processo.

3. Regeneração muscular

O músculo esquelético é um tecido composto essencialmente por diferentes tipos de fibras musculares que contribuem para sua plasticidade [6], possibilitando um aumento na síntese e/ou degradação de proteínas miofibrilares dependendo do estímulo. Essas alterações no balanço da síntese e degradação de proteínas são controladas por diversos fatores moleculares que regulam a massa muscular [62]. Teoricamente, o número de mionúcleos é o fator determinante da taxa de síntese protéica, uma vez que fornecem a quantidade necessária de DNA para suportar o aumento da transcrição [63]. A quantidade de citoplasma (área da fibra) controlada por um único mionúcleo caracteriza o conceito de domínio mionuclear (região controlada por um único mionúcleo) [63]. Em

humanos, Petrella et al. [64,65] sugerem que até um limite moderado de hipertrofia, que alcance um tamanho máximo de $\sim 2.000\text{-}2.250\ \mu\text{m}^2$ na área do domínio mionuclear, o aumento na AST das fibras é suportado sem a necessidade de acrescentar novos mionúcleos. Tal fato ocorre devido à capacidade dos mionúcleos existentes na fibra de intensificar o processo de tradução e, assim, promover um aumento da síntese protéica. Porém, em modelos de treinamento resistido de longo prazo, que envolvem sessões repetidas de exercício, o aumento da AST das fibras pode exceder um volume citoplasmático suportável pelo mionúcleo. Neste caso, a adição de novos mionúcleos é necessária para suprir a hipertrofia/regeneração das fibras musculares [66,67].

Com base no conhecimento de que os mionúcleos das fibras musculares maduras são considerados pós-mitóticos (não apresentam capacidade de divisão), sugere-se que a adição de novos mionúcleos seja realizada somente pelas células satélites (CS), também denominadas de células mio-satélites. As CS são precursores miogênicos com intensa atividade mitogênica, que contribuem para o crescimento muscular pós-natal, regeneração das fibras musculares danificadas e a manutenção do músculo esquelético adulto [68]. O número de CS é dependente da espécie, da idade e do tipo de fibra considerado, e sua frequência varia ao longo da fibra muscular [69]. As CS são mitoticamente quiescentes no músculo adulto, mas em resposta a miotraumas severos, que promovam a necrose da fibra (como a ação de toxinas ou distrofia muscular), ou miotraumas adaptativos (como o exercício resistido), estas células proliferam e migram para a região danificada e fundem-se na fibra muscular pré-existente para reparar o local do miotrauma promovendo assim o reparo muscular [70]. Consistente com a participação das CS no processo de hipertrofia, Kadi et al. [21] observaram em humanos um aumento do número de CS, após 30 (19%) e 90 (31 %) dias de treinamento resistido, porém, o número de mionúcleos permaneceu inalterável por todo período de treinamento.

Devido a importância das CS no processo de regeneração do tecido muscular, a sua diminuição induz uma deficiência neste processo impossibilitando a manutenção da massa muscular, fato que acontece naturalmente no envelhecimento [71]. Os autores demonstraram que

esta redução pode indicar uma depleção do pool de CS para o reparo ou regeneração do músculo esquelético. Estudos com CS em humanos têm indicado que o envelhecimento está associado com uma redução do potencial e/ou habilidade para o processo de diferenciação celular [72]. Similar a estes estudos, pesquisas recentes observaram alteração no número de CS com o aumento da idade [58]. Coletivamente estes trabalhos demonstram que durante o envelhecimento ocorre uma diminuição no número e/ou da atividade das CS, fato que poderia explicar em parte a diminuição na capacidade regenerativa do músculo esquelético nessa idade. Entretanto, estudos com knockout de CS não observaram diferença na AST durante o processo de hipertrofia em camundongos adultos submetidos a ablação do sinergista [73]. Os autores argumentam que para o processo de hipertrofia muscular não há a necessidade de uma adição de mionúcleos nas fibras musculares. Desta forma os resultados relacionados com a necessidade das CS para o processo de regeneração permanecem contraditórios.

As CS tanto no estado de quiescência como no estado ativado, expressam marcadores miogênicos [70], que controlam a ativação, proliferação e diferenciação celular, durante o processo de reparo muscular [68]. Entre os marcadores miogênicos destacam-se os fatores de regulação miogênica (MRFs), que são proteínas que pertencem à família dos fatores transcricionais “basic helix-loop-helix” (BHLH), da qual fazem parte a MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4 [68]. Essas proteínas contêm um domínio altamente conservado, que é necessário para a ligação com as proteínas E, como E12 e E47. Os heterodímeros MRF-proteína E e os monômeros de MRFs ligam-se a sequências de DNA (5'-CANNTG-3'), conhecidas como Ebox, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos [74], levando à expressão dos mesmos. As CS quiescentes não expressam os MRFs, porém, quando comprometidas com a proliferação e diferenciação, passam a expressar os MRFs [68]. O aumento na expressão da MyoD e Myf5 está associado com a fase de proliferação das CS, e durante a fase de diferenciação há maior expressão de Miogenina e MRF4 [75]. Juntos, os MRFs são comumente utilizados como indicadores das fases de proliferação e diferenciação das CS, envolvidas com o processo de hipertrofia muscular [76].

Em resposta a estímulos adaptativos (processo de regeneração muscular) as CS são ativadas, proliferam-se e se diferenciam em mioblastos [75]. Uma pequena proporção de células satélites que sofreram proliferação retorna ao estado quiescente e restabelece a população de CS, pelo processo de auto-renovação [77] (Figura 3). Já, os mioblastos comprometidos com a regeneração migram para a região danificada e fundem-se à fibra muscular pré-existente para reparar o local da microlesão e/ou adicionar núcleos para ampliar a capacidade de síntese protéica e, assim, promover a hipertrofia. Entretanto, em casos de lesões mais severas que sobrevenha a necrose da fibra (ação de toxinas e distrofia muscular), os mioblastos poderão alinhar-se e fundir-se entre si, para formar uma nova miofibra [70,78] (Figura 3).

Considerando o importante papel dos MRFs no controle da atividade das CS para o processo de regeneração muscular, vários estudos têm procurado compreender as possíveis interações existentes entre a expressão dos MRFs e ativação das vias moleculares envolvidas com o processo de hipertrofia e atrofia muscular, na tentativa de entender os mecanismos envolvidos no controle da massa muscular durante o envelhecimento.

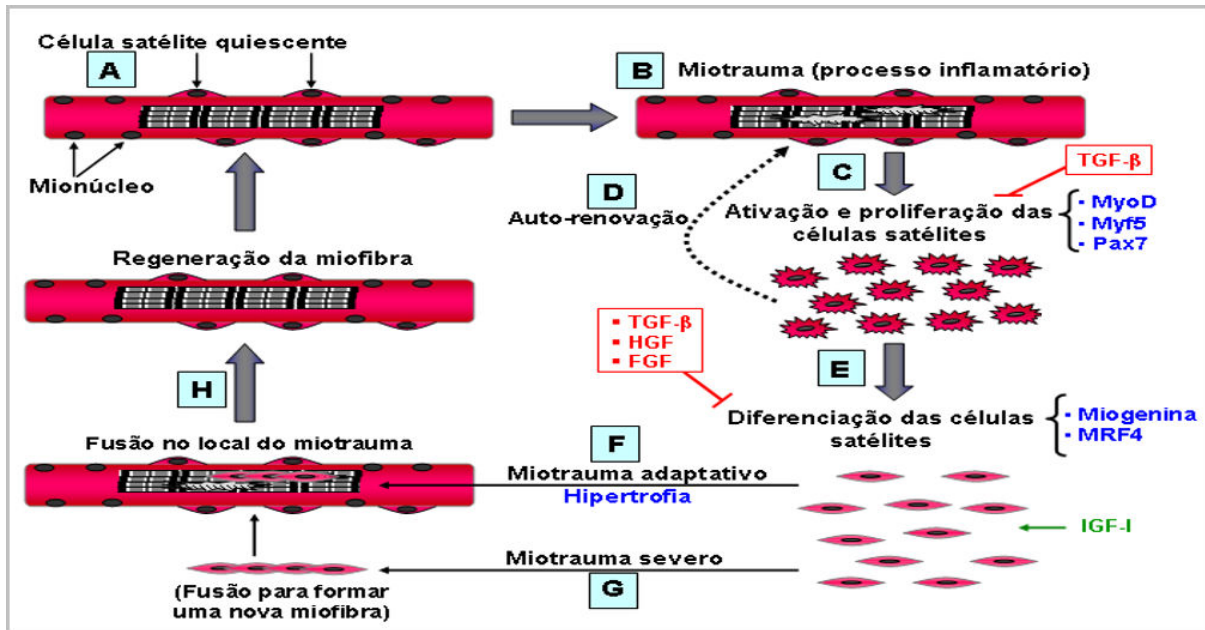


Figura 3 – Processo de regeneração Muscular. Fibra muscular normal com célula satélite quiescente e mionúcleo (A). Após um miotrauma (B), as células satélites quiescentes são ativadas, proliferam-se (C) e se diferenciam em mioblastos (E). No miotrauma adaptativo do exercício físico, os mioblastos migram para a região danificada e fundem-se à fibra muscular pré-existente para reparar o local da microlesão e/ou adicionar núcleos para ampliar a taxa síntese protéica (hipertrofia) (F). Porém, em situações de miotraumas severos que ocorra necrose das fibras (ação de toxinas e distrofia), os mioblastos poderão se alinhar e fundir-se entre si, para formar uma nova miofibrila (G), e reparar o dano da fibra muscular (H). Durante o processo de regeneração, alguns mioblastos retornam ao estado quiescente e restabelecem a população de células satélites (D) (Adaptado de Charge e Rudnick [78]).

4. Mecanismos moleculares relacionados ao controle da massa muscular

No que se refere ao processo de regeneração muscular têm sido demonstrado que vias moleculares envolvidas com o controle da massa muscular são importantes para esse processo, dentre eles podemos destacar as vias relacionadas com atrofia (sistema ubiquitina-proteassoma) e com hipertrofia (via do IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina; *do inglês: insulin-like growth factor-I*) e da Miostatina (MSTN)) (Figura 4) [78–80].

De fato, o IGF-I tem sido apontado como um potente sinal anabólico no tecido muscular, estimulando a síntese protéica em diferentes condições fisiológicas [62,81,82]. A expressão de IGF-I no músculo promove significativa hipertrofia e concomitante aumento da produção de força [83]. A importância do IGF-I na promoção da hipertrofia muscular foi demonstrada em estudos que monitoraram o aumento da expressão do IGF-I em associação com o aumento da massa muscular [82,84]. Neste sentido, o aumento na expressão gênica do IGF-I promove um aumento na massa muscular e consequentemente poderia retardar o processo de sarcopenia. Em adição, Kim et al. [85], observaram que os níveis de RNA do IGF-I foram maiores em indivíduos idosos quando comparados a indivíduos adultos após uma única sessão de treinamento resistido. Corroborando com estes achados, Edstrom & Ulfhake [86], relataram que os indivíduos que apresentavam um alto nível de sarcopenia tinham uma menor expressão do IGF-I. Além disso, o IGF-I pode ser liberado em resposta a carga mecânica e, consequentemente, desencadear uma cascata de eventos intracelulares, por meio da via IRS (*insulin response substrate*)→PI3K (*phosphatidyl-inositol-3 kinase*)→AKT (*serine-threonine kinase*)→mTOR (*mammalian target of rapamycin*)→p70S6K (*p70S6 Kinase*), que atua como potente estimulador da síntese protéica. O IGF-I ligado ao receptor promove a ativação da PI3K, que fosforila a AKT tornando-a ativa para fosforilar o mTOR e, subsequentemente, a p70S6K que atua como potente estimulador da síntese protéica [62].

Em contraste ao IGF-I a MSTN, um membro da família do TGF- β (Fator de Crescimento Transformante Beta (*do inglês: Transforming growth factor beta*) também conhecida como fator de crescimento e diferenciação 8 (*do inglês: growth differentiation factor 8*) (GDF8), é caracterizada como um potente regulador negativo do crescimento muscular [79,87,88]. Além da ação inibitória sobre a ativação das CS, a MSTN pode inibir a atuação de fatores transcricionais, assim como a MyoD e a Miogenina [89] e promover proteólise através de regulação de alguns componentes do sistema ubiquitina-proteassoma [90]. A proteína MSTN é sintetizada como um precursor que é clivada em um pró-peptídeo amino-terminal e uma região madura do terminal carboxi (forma ativa da molécula) [91]. No músculo esquelético e na circulação, a MSTN é encontrada em complexos

inativos em diferentes composições com outras proteínas, tais como o seu próprio pro-péptido, folistatina-3 (também conhecido como gene relacionado com a folistatina) e a proteína de ligação TGF- β [92–94]. O exato mecanismo de ativação destes complexos, ou se todos estes complexos são capazes de serem ativados segue ainda desconhecido. Uma vez ativada, a MSTN tem alta afinidade para o receptor de activina IIB (ACVR2B, também conhecido como ActRIIB) e afinidade fraca para Acvr2a (também conhecido como ActRII e ActRIIA), os quais possuem afinidades com várias ligantes, assim como outros receptores da família do TGF- β [95]. A ligação da MSTN nos receptores inicia uma via envolvendo a fosforilação das moléculas de sinalização Smad 2 e 3 [88]. Esses Smad por sua vez se combinam com Smad 4, para formar um fator de transcrição, capaz de entrar no núcleo bloqueando o crescimento de mioblastos (*in vitro*) através da inibição dos MRFs tais como MyoD e estimular a expressão de inibidores de ciclinas dependentes de quinase (CDK), tais como p21 [88].

Várias semanas de treinamento de força reduz o conteúdo de proteína e RNAm para MSTN em músculo esquelético de humanos [96] e ratos [80]. Reciprocamente, o bloqueio do gene da MSTN causa aumento da massa muscular tanto em humanos [97] quanto em animais [87,88], e o treinamento de força de curto prazo reduz os níveis do gene da Mstn em conjunto com o aumento do Igf-I em músculo esquelético humano [80]. Neste contexto, foi sugerido que o bloqueio do gene da Mstn poderia ser uma estratégia adequada para atenuar ou até mesmo bloquear a perda progressiva da massa muscular no envelhecimento e em patologias [98]. Desta forma, um estudo transversal de homens e mulheres jovens, de meia-idade e idosos sugere que os níveis do soro da MSTN aumentam com o avançar da idade, sendo inversamente associado com massa muscular [99]. No entanto, vários trabalhos não conseguiram demonstrar diferenças relacionadas entre a idade e os níveis de RNAm da Mstn [72,100]. Coletivamente esses resultados, demonstram que o papel da MSTN no envelhecimento permanece controverso e necessita ser melhor investigado.

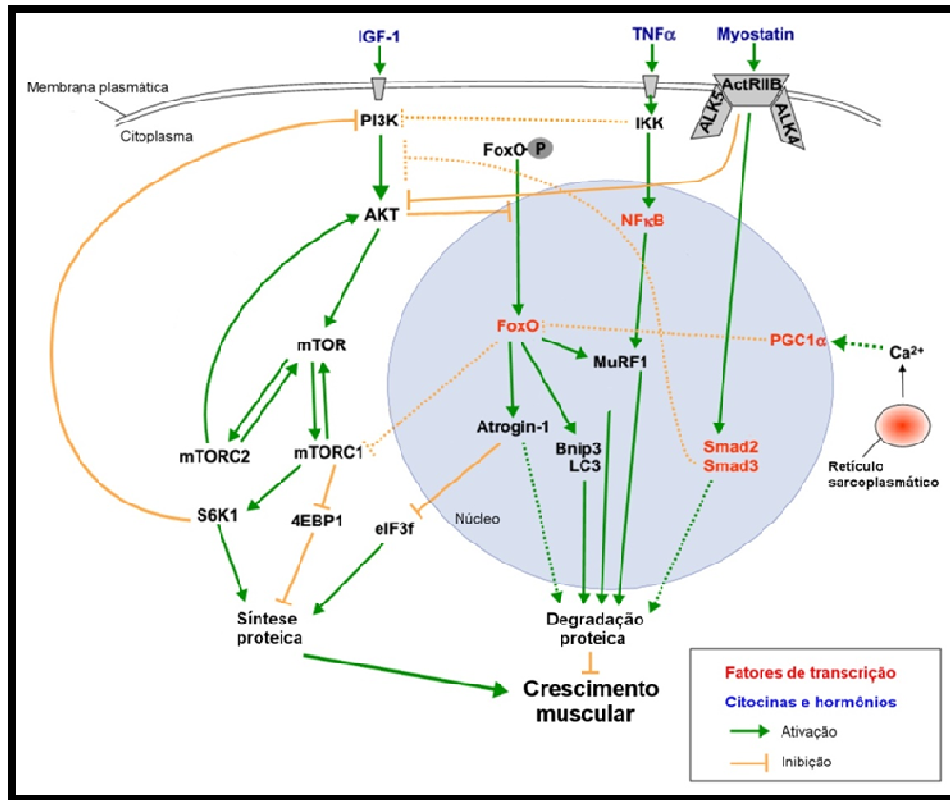


Figura 4. Principais vias que controlam o crescimento muscular. Síntese e degradação proteica reguladas por diferentes estímulos, na qual ativam múltiplas vias de sinalização. Linhas tracejadas denotam vias cujo mecanismo e papel molecular no músculo esquelético não estão completamente definidos (Adaptado de Bonaldo e Sandri [101]).

Além das alterações específicas do IGF-I e da MSTN, várias citocinas inflamatórias podem estar ativadas durante o controle da massa muscular, dentre elas podemos destacar a interleucina-6 (IL-6) e, em particular, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) [62]. Neste contexto, o TNF- α pode ativar uma família de fatores transcricionais conhecidos como Fator Nuclear-Kappa B (NF- κ B), que podem ativar o sistema proteossomal dependente de ubiquitina (PDU) [102,103]. No estado inativo, NF- κ B é sequestrado no citoplasma por uma família de proteínas inibidoras chamado de I κ B; em resposta ao TNF- α , a quinase I κ B é fosforilada pelo complexo IKK β , resultando na sua ubiquitinação e degradação proteossomal, levando a translocação nuclear de NF κ B e ativação da transcrição de genes mediados por NF- κ B (Figura 6) [104]. Dentre esses genes, podemos destacar o

aumento da expressão do MuRF1 (*do inglês: Muscle RING Finger 1*) [50,105], além do MAFbx (*do inglês: Muscle Atrophy F-box*) [18]. Corroborando com estes achados, vários trabalhos demonstraram que MuRF1 e MAFbx estão altamente expressos em modelos que mimetizam a atrofia muscular (atrofia por desuso) que acontece de maneira natural durante o envelhecimento [106–109]. Em adição, foi demonstrado que o knockout das E3 ligases (MURF1 e MAFBx) previne a atrofia muscular em ratos [107].

Além da ativação via TNF- α , foi demonstrado que a translocação e atividade do FoxO (*do inglês: forkhead box O*) é necessária para o aumento da expressão de MAFbx e MuRF1 [110]. A atividade da FoxO é controlada por meio de modificações pós-traducionais, incluindo a fosforilação, acetilação, e ubiquitinação [111]. Além disso, a atividade do FoxO também é modulada por ações diretas ou indiretas de cofatores e através da interação com outros fatores transcricionais como o PGC1 α (*do inglês: peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha*), um cofator essencial para a biogênese mitocondrial [112]. Foi demonstrado que o aumento de contrações musculares repetidas podem estimular o aumento da expressão dessa molécula permitindo sua atuação no processo de inibição de atrofia muscular [113]. Manutenção de altos níveis de PGC1 α durante condições catabólicas de desnervação, jejum, envelhecimento, sarcopenia e insuficiência cardíaca foi capaz de preservar a massa muscular [113–115]. Além desse mecanismo, vários outros sistemas de proteólise, tais como o que envolve as proteases lisossomais (catepsinas) e as calpaínas dependente de cálcio são ativados para degradação de proteínas musculares [revisado em Jackman & Kandarian, [116]] (Figura 5 e 6). Estudos em pacientes e em modelos animais, incluindo trabalho do nosso grupo, têm demonstrado consistentemente que o sistema PDU é o regulador primário da degradação proteica em diversos tipos de atrofia [102,117,118].

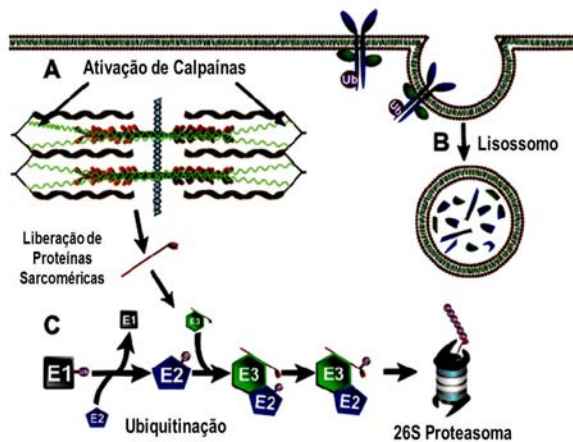


Figura 5. Os sistemas proteolíticos envolvidos na atrofia muscular: (A) ativação de calpains dependente de cálcio, (B) proteases lisossomais (catepsinas), e (C) proteossomal dependente de ubiquitina. A ubiquitinização de proteínas alvo para a proteólise proteossomal é mediada por uma família de proteínas e três complexos protéicos distintos: enzimas de ativação de ubiquitina (E1), enzimas de conjugação de ubiquitina (E2), e enzimas de ligação de ubiquitina (E3) (adaptado de Jackman & Kandarian, [116]).

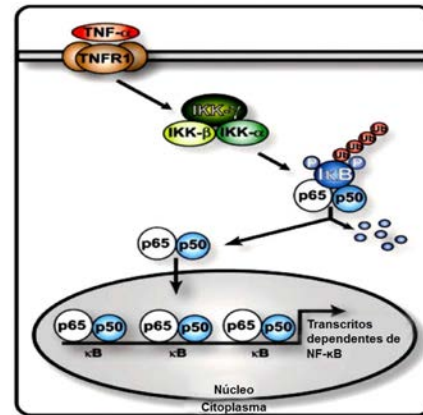


Figura 6. Esquema da atrofia muscular via NF-κB induzida pelo TNF-α. A ligação do TNF-α ao seu receptor (TNFR1) induz a fosforilação da proteína IκB pelo complexo quinase IκB (IKK= IKK-γ + IKK-β + IKK-α) e a sua ubiquitinização (Ub) para a degradação proteossomal. O heterodímero NF-κB (p65 + p50) é translocado para o interior do núcleo celular para a ativação de genes dependentes de NF-κB, relacionados com a atrofia muscular (adaptado de Jackman & Kandarian, [116]).

Apesar de bem relatado a importância sobre o papel dos MRFs, dos componentes das vias de hipertrofia e atrofia, bem como o envolvimento das CS no controle da massa muscular, poucos trabalhos procuraram investigar estas respostas durante o processo de regeneração em músculos senis. Além disso, têm sido amplamente divulgado que o treinamento pode estimular o crescimento da massa muscular em idosos e atenuar o processo de sarcopenia bem como potencializar o processo de regeneração muscular [52–54]. Desta forma, testamos a hipótese de que o treinamento físico acelera a recuperação da massa muscular em ratos senis após estímulo atrofico.

II - JUSTIFICATIVA

Elucidar o papel dos mecanismos que regulam o processo de regeneração muscular após treinamento físico traz a esperança de que novas terapias possam ser encontradas para atenuar ou até mesmo bloquear a atrofia muscular decorrente do envelhecimento fisiológico e em condições de miopatias. O estudo das vias moleculares envolvidas na regeneração do músculo senil após estímulo atrófico acompanhados do exercício físico poderá fornecer informações sobre a co-regulação existente entre os fatores responsáveis pela atrofia e hipertrofia muscular. A identificação destes fatores pode contribuir para uma maior eficácia na prescrição de treinamento na tentativa de prevenir a perda da massa muscular, caracterizando o exercício como uma adequada intervenção terapêutica.

III – OBJETIVO GERAIS

Avaliar as adaptações morfológicas e moleculares durante o processo de regeneração em músculo de ratos envelhecidos submetidos ao treinamento físico após estímulo atrófico.

IV – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o processo de regeneração no músculo Plantar (glicolítico e de contração rápida) em ratos envelhecidos submetidos a estímulo atrófico (imobilização), potencializada pelo treinamento físico, através das seguintes análises:

- Expressão gênica (RNAm) dos MRFs, dos componentes das vias hipertrófica e atrófica utilizando-se da técnica de RT-qPCR com a plataforma TLDA.
- Expressão de proteínas selecionadas a partir dos alvos envolvidos com o controle da massa muscular e regeneração muscular com base nos dados da morfologia, bioquímica, imunofluorescência e RT-qPCR, utilizando-se da técnica de Western Blot.
- Número de células satélites quiescentes e ativadas, através da imunofluorescência para os marcadores Pax7, MyoD e miogenina.

- AST das fibras musculares de cortes histológicos submetidos à coloração HE.
- Modulação dos tipos de fibras e isoformas da MyHC, por meio da análise histoquímica para a enzima mATPase e eletroforese em gel de poliacrilamida, respectivamente.

V - METODOLOGIA

1. Animais e Protocolo Experimental

Neste estudo foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos envelhecidos por 18 meses, conforme Shefer et al. [58]. Estes foram provenientes do Biotério Central – UNESP, Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas (2 animais por gaiola), no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia, em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo de luminosidade claro/escuro invertido (12/12h), onde receberam ração e água *ad libitum*. Este experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (Protocolo No. 343-CEEA).

Para realização do experimento foram utilizados 10 grupos experimentais (n=6): Controle (C); Imobilizado (I); Controle 3 e 7 dias (C3 e C7, respectivamente); Imobilizados e submetidos a recuperação muscular por 3 e 7 dias (R3 e R7, respectivamente); Imobilizados e submetidos a treinamento aeróbio por 3 e 7 dias (AT3 e AT7, respectivamente); Imobilizados e submetidos a treinamento resistido por 3 e 7 dias (RT3 e RT7, respectivamente).

2. Imobilização dos membros posteriores

Inicialmente, os animais dos grupos I, R3, R7, AT3, AT7, RT3 e RT7 foram anestesiados com Ketamina (50 mg/kg, i.p) e cloridrato de Xilazina (10 mg/kg, i.p), a fim de garantir a completa sedação dos animais durante a efetivação da imobilização. Em seguida, o segmento posterior dos animais foi imobilizado com atadura gessada de secagem rápida (Figura no artigo). A abrangência da imobilização foi do quadril até o tornozelo, de modo que o músculo PL permanecesse em uma posição neutra. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e permaneceram imobilizados durante 7 dias, para promover significativa perda da massa muscular [119,120]. A atrofia muscular foi confirmada após uma comparação estatística direta dos valores da AST das fibras musculares dos animais dos grupos I e C, sacrificados imediatamente após este período. Após o período de

imobilização, os animais dos grupos R3 e R7, foram mantidos em gaiolas para a recuperação muscular e os animais dos grupos AT3, AT7, RT3 e RT7 foram submetidos a um programa de recuperação muscular com treinamento aeróbio e/ou resistido por 3 e 7 dias, respectivamente. Todos os animais dos grupos C3, R3, C7 e R7 foram mantidos em água rasa durante todo o período de treinamento.

3. Protocolo de treinamento

Treinamento Aeróbio

O treinamento aeróbio (natação) foi realizado em um aquário subdividido em 4 compartimentos preenchido com 40 cm de água à 28-30° C (Figura 7). Os animais do grupo C e R foram mantidos em água rasa durante todo o período experimental, enquanto os animais dos grupos AT (3 e 7 dias) foram submetidos ao treinamento aeróbio de natação [15,121]. Inicialmente, todos os animais completaram 5 sessões de adaptação ao treinamento em um volume (0 até 15 min.) e intensidade (0 até 2% do peso corporal como sobrecarga) progressivos. Para definir uma intensidade ideal de treinamento, foi realizado um teste de lactato para obtenção do limiar anaeróbio (LA). Este teste determina o LA pelo ponto de inflexão da curva do lactato sanguíneo o que corresponde a intensidade limite entre a transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio [122]. O protocolo utilizado neste experimento é caracterizado por um teste de duplo-esforço não invasivo [123,124]. Este teste consiste de duas séries de 5 minutos de natação na mesma intensidade, com dois minutos de intervalo entre as séries e com coleta de sangue da cauda dos animais para análise do lactato ao final da primeira e da segunda série. Durante o descanso (intervalo entre as séries) os animais foram mantidos em água rasa para evitar o estresse.

As alterações da concentração de lactato (Δ) foram calculadas pela subtração da concentração do lactato do final da segunda série (LAC E2) da concentração do final da primeira série (LAC E1): (Δ LAC= LAC E2 – LAC E1). Posteriormente, utilizando os valores de Δ para cada carga, uma interpolação linear individual foi plotada permitindo o cálculo da “carga nula” que

corresponde ao LA. As intensidades utilizadas para o teste de duplos esforços foram de 2, 3 e 4% do peso corporal dos animais. Cada animal realizou o teste nas três intensidades com intervalo de 24 horas entre elas. Essas intensidades foram escolhidas baseado em estudos que determinaram o LA (5% do peso corporal) em ratos adultos [121,125]. Após a determinação do LA, os animais foram submetidos a 20 minutos com 2.3% do peso corporal (LA) por 3 (AT3) e 7 (AT7) dias de treinamento. As sessões de treinamento foram performados sempre no mesmo período, entre às 14 e 16h. Nós acreditamos que por ser um teste não exaustivo, a sua utilização para determinar o LA em animais velhos submetidos ao estímulo atrófico foi a ferramenta mais adequada, uma vez que a maioria dos testes para determinação da LA exigem a exaustão.

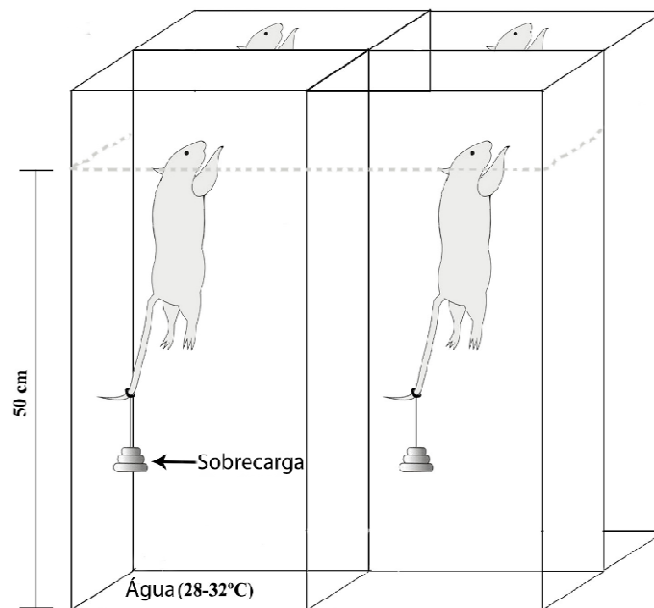


FIGURA 7. Figura ilustrando o programa de treinamento aeróbio de natação utilizado no experimento [15].

Treinamento Resistido

O treinamento resistido (força) foi baseado no protocolo descrito por Cunha et al. [126]. Antes do início do experimento os animais realizaram uma semana de pré-treinamento para se

adaptarem com a água e o protocolo de treinamento. Nesta fase os animais saltaram de dentro de uma cuba contendo 38 cm de água com temperatura entre 28-32°C (Figura 8). A profundidade foi apropriada para que o animal conseguisse respirar na superfície da água durante os sucessivos saltos. O salto era contabilizado apenas quando os animais conseguiam pular até a superfície e retornar ao fundo da cuba. O processo de adaptação foi progressivo com aumento do número de séries (2 até 4) e repetições (5 até 10), suportando uma sobrecarga de 50% do peso corporal adicionados a um colete colocado no animal (Figura 8). Após o período de adaptação e para garantir a mesma intensidade de treinamento entre os animais, as cargas foram ajustadas através do teste de 1 repetição máxima (1RM). O teste foi realizado com aumento progressivo das cargas (80%, 90%, 100% e 110% do peso corporal de cada animal) sendo realizadas com um intervalo de 5 minutos de pausa entre as tentativas. O teste foi realizado com no máximo 4 tentativas para cada animal até a carga que representasse 1RM. A carga de 1RM foi definida com o peso mais alto que o animal conseguisse realizar apenas em um único salto. Posteriormente, os animais foram submetidos a 3 (RT3) ou 7 (RT7) dias de treinamento de força após estímulo atrofico. O treinamento consistiu de 3 séries de 10 saltos com 60% da 1RM o que corresponde a faixa de treinamento de força [127]. As sessões de treinamento foram realizadas sempre no mesmo período do dia, entre 14 e 16h.

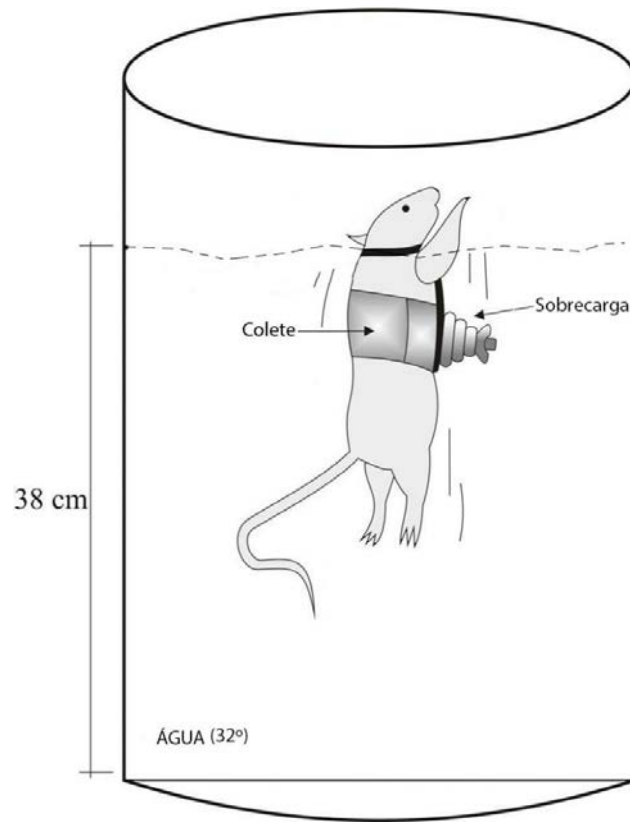


FIGURA 8. Figura ilustrando o programa de treinamento de força (salto) utilizado no experimento [128].

4. Dados Anatômicos

Durante todo o período de experimento foram monitorados, diariamente, o peso corporal e o consumo de ração dos animais. Ao término do experimento os animais foram pesados e sacrificados por decapitação. A seguir, o músculo plantar (PL) foi coletado, pesado e submetido as análises morfológicas, bioquímicas, histoquímicas e moleculares. Em adição, foi coletado a gordura corporal total (visceral, epididimal e retroperitoneal) para avaliar a composição corporal dos animais ao término do experimento. Além disso, foram utilizados 3 parâmetros para avaliar o índice de atrofia e/ou hipertrofia muscular: Peso do músculo (mg), relação entre o peso do músculo e comprimento da tíbia e AST das fibras musculares (μm^2).

5. Análise sérica do cortisol

Para avaliar o nível do stress presente nos animais após o período de imobilização e recuperação muscular de 3 e 7 dias foram realizados as dosagens dos níveis sérico do cortisol. O sangue foi coletado após decapitação, centrifugado (3000 x g por 15 minutos), o soro coletado e armazenado a -80°C. As concentrações do cortisol foram quantificadas através de ensaios imunoenzimático, seguindo as orientações do fabricante (R&D systems).

6. Análise histoquímica e área de secção transversal das fibras musculares

Após a retirada do músculo Plantar, uma porção foi imediatamente congelada em n-Hexano resfriado em nitrogênio líquido (-156°C) e armazenada em freezer a -80°C. Cortes histológicos (12 µm) foram obtidos em um criostato a -20°C. Foi realizada a reação histoquímica da mATPase para a análise dos tipos e subtipos de fibras [129].

Utilizando-se um Sistema de Análise de Imagens (Leika Qwin) foi determinada a frequência dos tipos e subtipos de fibras e mensurada a AST de aproximadamente 200 fibras (dois campos aleatórios de cada músculo) de cada animal.

7. Análise bioquímica da MyHC

A análise bioquímica das MyHCs foi realizada por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Para tanto, foram coletados 12 cortes de 12 µm de espessura de cada amostra previamente congelada para a análise morfológica. Os cortes foram colocados em 0,5 ml de uma solução contendo glicerol 10 % (w/vol), 2-mercaptoetanol 5 % (vol/vol) e sódio dodecilsulfato (SDS) 2,3 % (w/vol) em um tampão Tris/HCl 0.9% (Ph 6,8) (w/vol). Em seguida, os cortes foram agitados durante um minuto e aquecidos por 10 min a 60 °C. Posteriormente, foi realizada a eletroforese dos extratos (15-20 µl), em gel de 7% de poliacrilamida, com um gel de empacotamento a 4%, em um período de 26 h de corrida, a 180 V e 13mA, em seguida, corados com Coomassie Blue [130].

Os géis foram utilizados para determinar a presença das isoformas de MyHC identificadas de acordo com seus respectivos pesos moleculares, evidenciando as bandas nas regiões correspondentes. Foi incluída também uma amostra do músculo extensor longo dos dedos (EDL) como controle para comparação.

8. Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment [131].

a) Extração de RNA com TRIzol (Life Technologies Coporation, Carlsbad, CA, EUA)

Para a extração de RNA total, fragmentos do músculo PL previamente congelados em nitrogênio líquido, foram homogeneizados utilizando beads de aço inoxidável de 3,2 milímetros em 1 ml de TRIzol utilizando 2 séries de 1 minutos em um homogeneizador de tecidos (The Bullet Blender™, Next Advance Inc., Averill Park, NY), conforme as especificações do fabricante. O RNA purificado foi ressuspensionado em água nuclease free e armazenado a -80 °C. Foi utilizado o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE HealthCare, EUA) para verificar a qualidade da extração e quantificar o RNA. A integridade do RNA foi analisada por gel de agarose 1% (pela análise das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18 e 28S) e pelo número da integridade do RNA (RNA Integrity Number, RIN), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluidos, utilizando-se o sistema 2100 Bioanalyzer (Agilent, EUA) [132]. Após esta etapa, foi realizado o tratamento do RNA com Dnase, conforme as instruções do protocolo TURBO DNA-free™ Kit (Ambion, Life Technologies, EUA).

b) Reação de Transcrição Reversa (RT)

A reação de RT foi realizada utilizando-se o High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), conforme especificação do fabricante. Foram utilizados 2 µg de RNA total obtido do músculo esquelético para uma reação de 20 µL.

c) Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

A plataforma de microfluidos TaqMan Low Density Arrays (TLDA) (Anexo I) v1.0 (Life Technologies) foi utilizada para análise da expressão gênica das vias moleculares envolvidas com o controle da massa muscular por RT-qPCR. Inicialmente, para cada amostra de cDNA (30 µL, diluídos 50 vezes) foi adicionado 20 µL de água livre de RNase e 50 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (2 x) (No AmpErase UNG; Applied Biosystems). Esta mistura foi então transferida para um cartão de TDLA customizado contendo 44 genes alvo e 04 genes endógenos (Anexo I). O cartão foi centrifugado duas vezes com 331 x g por 1 minuto cada e à amplificação do produto de PCR foram realizadas no sistema QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante. Foram analisados por meio do software Genorm 4 genes constitutivos dos quais os mais estáveis (Rplp0 e Actb) foram utilizados como genes de referência. O fator de normalização gerado pelo software foi utilizado para normalizar os dados de expressão dos genes alvo (Data Assist 2.0) (Life Technologies).

9. Avaliação quantitativa da expressão protéica por Western Blot

As amostras musculares congeladas foram homogeneizadas em sonda de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) com 0,5 mL de tampão de lise [20 mM Tris·HCl (pH 8.0), 140mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% sódio dodecilsulfato, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2µl/ml NaF 1M, 2µL/mL NaF 1M, 2µL/mL ortovanadato and 10µL/mL inibidor de protease (Sigma)]. As amostras foram centrifugadas a 15100 x g por 10 min e o sobrenadante coletado. Uma alíquota de 50 µL do homogenato foi tratada com 25 µL do tampão de amostra de Laemmli (SDS 2%, glycerol 20%, azul

de bromofenol 0.04 mg/mL, Tris-HCl 0.12M pH 6.8 e β -mercaptoetanol 0.28M). As amostras foram incubadas a 97°C por 5 minutos e armazenadas em freezer -20°C até sua utilização.

Uma alíquota do extrato puro de cada amostra (não tratado com Laemmli) foi utilizada para quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford [133]. Quantidades exatas de proteínas totais de cada amostra (50 ou 70 μ g) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corados com Coomassie blue, para verificar qual a melhor concentração das amostras para iniciar a análise protéica. Definido a concentração, as amostras foram novamente separadas por SDS-PAGE e as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California), em sistema úmido.

Posteriormente as membranas foram bloqueadas com Leite 5% diluída em tampão fosfato salino (PBS-T: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, NaCl 0,15M, Tween-20 0,1% pH 7,4), por 60 minutos, para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários [GAPDH - 50 μ g (1:2000, no. 2118); FoxO1 - 70 μ g (1:1000, no. 9454); pFoxO1 - 70 μ g (1:1000, no. 9461) – Cell Signaling (USA)], [PGC1 α - 70 μ g (1:1000, ab-106814) - Abcam (Cambridge, MA)], [MURF1 - 70 μ g (1:100, sc-27642); MAFBx - 70 μ g (1:100, sc-27644); LRP130 - 70 μ g (1:200, sc-66845) - Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)] diluídos em solução BSA 5% + PBS-T, *overnight*, nas concentrações previamente testadas. Após 3 etapas de lavagem de 10 minutos cada com tampão PBS-T, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários da Santa Cruz [goat anti-rabbit IgG (1:5.000), donkey anti-goat IgG (1:5.000) and goat anti-mouse IgG (1:5.000)], conjugados com a enzima *horseradich peroxidase* (HRP), por 60 minutos em temperatura ambiente. Novamente, as membranas foram lavadas e foi utilizado o sistema de detecção quimioluminescente *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, para gerar um sinal na posição referente a cada proteína detectada.

O sinal gerado pelas bandas foi captado através do ImageQuant 350 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) e a quantificação feita por densitometria, utilizando-se o software *Image J software for Windows* (versão 1.71, 2006, Áustria). Os valores de expressão protéica foram normalizados pelos valores obtidos para a proteína GAPDH, usada como referência. Os valores de expressão relativa gerados foram apresentados em *fold change*.

10. Análise Estatística

Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição dos dados. As diferenças entre os grupos C e I foram comparadas utilizando o teste T' Student. A frequência dos tipos de fibras e as isoformas de MyHC foram analisadas utilizando o teste Kruskal-Wallis. Foi utilizado a análise de variância (ANOVA) para o modelo com 1 fator, seguido por teste *post-hoc* de Tukey para avaliar os dados de CSA, cortisol sérico, RNAm e proteína. A frequência dos tipos de fibras foi analisada por meio do teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais. Foi utilizado regressão linear de Pearson para avaliar a relação entre as proteínas do PGC-1 α e LRP130. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa Instat (versão 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Huxley HE. The mechanism of muscular contraction. *Science*. 1969;164:1356–65.
2. Elliott A, Offer G. Shape and flexibility of the myosin molecule. *J. Mol. Biol.* 1978;123:505–19.
3. Weeds AG, Lowey S. Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *J. Mol. Biol.* 1971;61:701–25.
4. Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, Baker H. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.* 1969;42:1–29.
5. Talmadge RJ, Roy RR. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J. Appl. Physiol.* 1993;75:2337–40.
6. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.* 2000;50:500–9.
7. Bárány M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.* 1967;50:Suppl:197–218.
8. Dal Pai-Silva M, Dal Pai V, Carvalho RF. Célula Muscular Estriada Esquelética. In: Carvalho H., Collares-Buzato C, editors. *Células uma abordagem Multidiscip.* São Paulo: Editora Manole; 2005. p. 1967.
9. Schiaffino S, Reggiani C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 1994;77:493–501.
10. Brooke MH, Kaiser KK. Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* 1970;18:670–2.
11. Rivero JL, Talmadge RJ, Edgerton VR. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in equine skeletal muscle and the influence of training. *Anat. Rec.* 1996;246:195–207.
12. Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem. Cell Biol.* 2001;115:359–72.
13. Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M, Leinwand L, Schiaffino S. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1994;267:C1723–8.
14. Pette D, Peuker H, Staron RS. The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiol. Scand.* 1999;166:261–77.
15. Vechetti-Junior I, Aguiar A, de Souza R, Almeida F, Dias H, de Aguiar Silva M, et al. NFAT isoforms regulate muscle fiber type transition without altering CaN during aerobic training. *Int. J. Sports Med.* 2013;34:861–7.

16. Reiser PJ, Moss RL, Giulian GG, Greaser ML. Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J. Biol. Chem.* 1985;260:9077–80.
17. Campos GER, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2002;88:50–60.
18. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005;37:1974–84.
19. Hoppeler H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int. J. Sports Med.* 1986;7:187–204.
20. Favier FB, Benoit H, Freyssenet D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch.* 2008;456:587–600.
21. Kadi F, Johansson F, Johansson R, Sjöström M, Henriksson J. Effects of one bout of endurance exercise on the expression of myogenin in human quadriceps muscle. *Histochem. Cell Biol.* 2004;121:329–34.
22. Machida S, Booth FW. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2004;36:52–9.
23. Degens H, Alway SE. Control of muscle size during disuse, disease, and aging. *Int. J. Sports Med.* 2006;27:94–9.
24. Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, Nair KS. Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004;286:E92–101.
25. Metter EJ, Talbot LA, Schrager M, Conwit R. Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2002;57:B359–65.
26. Janssen I. Influence of sarcopenia on the development of physical disability: the Cardiovascular Health Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2006;54:56–62.
27. Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2002;50:889–96.
28. Brooks S V, Faulkner JA. Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1994;26:432–9.
29. Morris RT, Spangenburg EE, Booth FW. Responsiveness of cell signaling pathways during the failed 15-day regrowth of aged skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 2004;96:398–404.
30. Chakravarthy M V, Davis BS, Booth FW. IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 2000;89:1365–79.

31. Carlson ME, Suetta C, Conboy MJ, Aagaard P, Mackey A, Kjaer M, et al. Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. *EMBO Mol. Med.* 2009;1:381–91.
32. Degens H, Veerkamp JH. Changes in oxidative capacity and fatigue resistance in skeletal muscle. *Int. J. Biochem.* 1994;26:871–8.
33. Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *J. Exp. Biol.* 2001;204:3201–8.
34. Ohira M, Hanada H, Kawano F, Ishihara A, Nonaka I, Ohira Y. Regulation of the properties of rat hind limb muscles following gravitational unloading. *Jpn. J. Physiol.* 2002;52:235–45.
35. Tyml K, Mathieu-Costello O. Structural and functional changes in the microvasculature of disused skeletal muscle. *Front. Biosci.* 2001;6:D45–52.
36. Kano Y, Shimegi S, Takahashi H, Masuda K, Katsuta S. Changes in capillary luminal diameter in rat soleus muscle after hind-limb suspension. *Acta Physiol. Scand.* 2000;169:271–6.
37. Degens H. Age-related changes in the microcirculation of skeletal muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998;454:343–8.
38. Pattison JS, Folk LC, Madsen RW, Booth FW. Selected Contribution: Identification of differentially expressed genes between young and old rat soleus muscle during recovery from immobilization-induced atrophy. *J. Appl. Physiol.* 2003;95:2171–9.
39. Siu PM, Pistilli EE, Butler DC, Alway SE. Aging influences cellular and molecular responses of apoptosis to skeletal muscle unloading. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005;288:C338–49.
40. Song W, Kwak H-B, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxid. Redox Signal.* 2006;8:517–28.
41. Lexell J, Downham D. What is the effect of ageing on type 2 muscle fibres? *J. Neurol. Sci.* 1992;107:250–1.
42. Evans WJ. Protein nutrition, exercise and aging. *J. Am. Coll. Nutr.* 2004;23:601S – 609S.
43. Ogura Y, Naito H, Kakigi R, Ichinoseki-Sekine N, Kurosaka M, Yoshihara T, et al. Effects of ageing and endurance exercise training on alpha-actinin isoforms in rat plantaris muscle. *Acta Physiol. (Oxf).* 2011;202:683–90.
44. Lee W-S, Cheung W-H, Qin L, Tang N, Leung K-S. Age-associated decrease of type IIA/B human skeletal muscle fibers. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2006;450:231–7.
45. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.* 2003;5:557–61.
46. Humphries KM, Szweda PA, Szweda LI. Aging: a shift from redox regulation to oxidative damage. *Free Radic. Res.* 2006;40:1239–43.
47. Loeb LA, Wallace DC, Martin GM. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:18769–70.

48. Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB J.* 1994;8:182–91.
49. Terman A, Brunk UT. Oxidative stress, accumulation of biological “garbage”, and aging. *Antioxid. Redox Signal.* 2006;8:197–204.
50. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Oh B-C, Lidov HGW, et al. IKK β /NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell.* 2004;119:285–98.
51. Baar K, Nader G, Bodine S. Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. *Essays Biochem.* 2006;42:61–74.
52. Thompson L V. Skeletal muscle adaptations with age, inactivity, and therapeutic exercise. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* 2002;32:44–57.
53. Hurst JE, Fitts RH. Hindlimb unloading-induced muscle atrophy and loss of function: protective effect of isometric exercise. *J. Appl. Physiol.* 2003;95:1405–17.
54. Brown M, Taylor J. Prehabilitation and rehabilitation for attenuating hindlimb unweighting effects on skeletal muscle and gait in adult and old rats. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2005;86:2261–9.
55. Starling RD, Ades PA, Poehlman ET. Physical activity, protein intake, and appendicular skeletal muscle mass in older men. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999;70:91–6.
56. Tarpenning KM, Hamilton-Wessler M, Wiswell RA, Hawkins SA. Endurance training delays age of decline in leg strength and muscle morphology. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2004;36:74–8.
57. Stiller K. Safety issues that should be considered when mobilizing critically ill patients. *Crit. Care Clin.* 2007;23:35–53.
58. Shefer G, Rauner G, Yablonka-Reuveni Z, Benayahu D. Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise. *PLoS One.* 2010;5:e13307.
59. Arora P, Husom AD, Ferrington DA, Thompson L V. Age-dependent effects of treadmill exercise during a period of inactivity. *Exp. Gerontol.* 2008;43:668–73.
60. Zarzhevsky N, Carmeli E, Fuchs D, Coleman R, Stein H, Reznick AZ. Recovery of muscles of old rats after hindlimb immobilisation by external fixation is impaired compared with those of young rats. *Exp. Gerontol.* 2001;36:125–40.
61. Childs TE, Spangenburg EE, Vyas DR, Booth FW. Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003;285:C391–8.
62. Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell Biol.* 2003;5:87–90.
63. Cheek DB. The control of cell mass and replication. The DNA unit--a personal 20-year study. *Early Hum. Dev.* 1985;12:211–39.

64. Petrella JK, Kim J, Cross JM, Kosek DJ, Bamman MM. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006;291:E937–46.
65. Petrella JK, Kim J-S, Mayhew DL, Cross JM, Bamman MM. Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. *J. Appl. Physiol.* 2008;104:1736–42.
66. Kadi F, Thornell LE. Concomitant increases in myonuclear and satellite cell content in female trapezius muscle following strength training. *Histochem. Cell Biol.* 2000;113:99–103.
67. Allen DL, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 1995;78:1969–76.
68. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.* 2000;218:115–24.
69. Schmalbruch H, Hellhammer U. The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *Anat. Rec.* 1977;189:169–75.
70. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* 2001;91:534–51.
71. Kadi F, Charifi N, Denis C, Lexell J. Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve.* 2004;29:120–7.
72. Welle S. Cellular and molecular basis of age-related sarcopenia. *Can. J. Appl. Physiol.* 2002;27:19–41.
73. McCarthy JJ, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui AB, et al. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development.* 2011;138:3657–66.
74. Li H, Capetanaki Y. Regulation of the mouse desmin gene: transactivated by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:335–43.
75. Smith CK, Janney MJ, Allen RE. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J. Cell. Physiol.* 1994;159:379–85.
76. Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50. *J. Histochem. Cytochem.* 2011;59:1041–59.
77. Baroffio A, Hamann M, Bernheim L, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Bader CR. Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation.* 1996;60:47–57.
78. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 2004;84:209–38.
79. Walsh FS, Celeste a J. Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochem. Soc. Trans.* 2005;33:1513–7.

80. Heinemeier KM, Olesen JL, Schjerling P, Haddad F, Langberg H, Baldwin KM, et al. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. *J. Appl. Physiol.* 2007;102:573–81.
81. Goldspink G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:232–8.
82. Roberts MD, Dalbo VJ, Sunderland KL, Poole CN, Hassell SE, Bembien D, et al. IGF-1 splice variant and IGF-1 peptide expression patterns in young and old human skeletal muscle prior to and following sequential exercise bouts. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2010;110:961–9.
83. Sartorelli V, Fulco M. Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. *Sci. STKE*. 2004;2004:re11.
84. Goldspink DF, Cox VM, Smith SK, Eaves L a, Osbaldeston NJ, Lee DM, et al. Muscle growth in response to mechanical stimuli. *Am. J. Physiol.* 1995;268:E288–97.
85. Kim J, Kosek DJ, Petrella JK, Cross JM, Bamman MM. Resting and load-induced levels of myogenic gene transcripts differ between older adults with demonstrable sarcopenia and young men and women. *J. Appl. Physiol.* 2005;99:2149–58.
86. Edström E, Ulfhake B. Sarcopenia is not due to lack of regenerative drive in senescent skeletal muscle. *Aging Cell*. 2005;4:65–77.
87. Patel K, Amthor H. The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord.* 2005;15:117–26.
88. Fedoruk MN, Rupert JL. Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy? *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 2008;18:123–31.
89. Durieux A-C, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Pasdeloup M, et al. Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology*. 2007;148:3140–7.
90. Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, et al. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology*. 2007;148:452–60.
91. McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94:12457–61.
92. Lee S-J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004;20:61–86.
93. Anderson SB, Goldberg AL, Whitman M. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 2008;283:7027–35.
94. Hill JJ, Davies M V, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, et al. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J. Biol. Chem.* 2002;277:40735–41.
95. De Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:1–11.

96. Roth SM, Martel GF, Ferrell RE, Metter EJ, Hurley BF, Rogers M a. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2003;228:706–9.
97. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.* 2004;350:2682–8.
98. Ko IG, Jeong JW, Kim YH, Jee YS, Kim SE, Kim SH, et al. Aerobic exercise affects myostatin expression in aged rat skeletal muscles: a possibility of antiaging effects of aerobic exercise related with pelvic floor muscle and urethral rhabdosphincter. *Int. Neurourol. J.* 2014;18:77–85.
99. Yarasheski KE, Bhasin S, Sinha-Hikim I, Pak-Loduca J, Gonzalez-Cadavid NF. Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. *J. Nutr. Health Aging.* 2002;6:343–8.
100. Ratkevicius A, Joyson A, Selmer I, Dhanani T, Grierson C, Tommasi AM, et al. Serum concentrations of myostatin and myostatin-interacting proteins do not differ between young and sarcopenic elderly men. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2011;66:620–6.
101. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* 2013;6:25–39.
102. Dogra C, Changotra H, Wedhas N, Qin X, Wergedal JE, Kumar A. TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB J.* 2007;21:1857–69.
103. Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve.* 2006;33:155–65.
104. Peterson JM, Bakkar N, Guttridge DC. NF- κ B signaling in skeletal muscle health and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* 1st ed. Elsevier Inc.; 2011;96:85–119.
105. Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, Damrauer J, Reiser PJ, Swoap S, et al. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J. Clin. Invest.* 2004;114:370–8.
106. Dupont-Versteegden EE, Fluckey JD, Knox M, Gaddy D, Peterson CA. Effect of flywheel-based resistance exercise on processes contributing to muscle atrophy during unloading in adult rats. *J. Appl. Physiol.* 2006;101:202–12.
107. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001;294:1704–8.
108. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98:14440–5.
109. Haddad F, Adams GR, Bodell PW, Baldwin KM. Isometric resistance exercise fails to counteract skeletal muscle atrophy processes during the initial stages of unloading. *J. Appl. Physiol.* 2006;100:433–41.

110. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004;117:399–412.
111. Schiaffino S, Dyar K a, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*. 2013;280:4294–314.
112. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature*. 2003;423:550–5.
113. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2006;103:16260–5.
114. Geng T, Li P, Yin X, Yan Z. PGC-1 α promotes nitric oxide antioxidant defenses and inhibits FOXO signaling against cardiac cachexia in mice. *Am. J. Pathol*. 2011;178:1738–48.
115. Souza RW a, Piedade WP, Soares LC, Souza P a T, Aguiar AF, Vechetti-Júnior IJ, et al. Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions. *PLoS One*. 2014;9:e110020.
116. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2004;287:C834–43.
117. Braun T, Gautel M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2011;12:349–61.
118. Carvalho RF, Castan EP, Coelho CA, Lopes FS, Almeida FLA, Michelin A, et al. Heart failure increases atrogin-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy. *J. Mol. Histol*. 2010;41:81–7.
119. Appell HJ. Skeletal muscle atrophy during immobilization. *Int. J. Sports Med*. 1986;7:1–5.
120. Da Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2006;39:979–85.
121. Gobatto C a, de Mello M a, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos L a, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol*. 2001;130:21–7.
122. Wasserman K, Mcilroy MB. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. *Am. J. Cardiol*. 1964;14:844–52.
123. Chassain A-P. Méthode d'appréciation objective de la tolérance de l'organisme à l'effort: application à la mesure des puissances critiques de la fréquence cardiaque et de la lactatémie. *Sci. Sports*. 1986;1:41–8.
124. Manchado DB, Gobatto CA, Voltarelli FA, Alice M, Mello R De. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. 2006;736:731–6.

125. Voltarelli F, Gobatto C, de Mello M. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002;35:1389–94.
126. Cunha TS, Tanno AP, Costa Sampaio Moura MJ, Marcondes FK. Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci.* 2005;77:1030–43.
127. Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2002;34:364–80.
128. Aguiar AF, Aguiar DH, Felisberto ADS, Carani FR, Milanezi RC, Padovani CR, et al. Effects of creatine supplementation during resistance training on myosin heavy chain (MHC) expression in rat skeletal muscle fibers. *J. Strength Cond. Res.* 2010;24:88–96.
129. Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry a C, Murray JD, Campos GE. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem. Cell Biol.* 1999;111:117–23.
130. Bär a, Pette D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1988;235:153–5.
131. Bustin S a, Benes V, Garson J a, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009;55:611–22.
132. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* 2006;27:126–39.
133. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248–54.

VII - ANEXO

GENES INSERIDOS NO CARTÃO TLDA CUSTOMIZADO
Eukaryotic 18S rRNA
Actin, beta
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
TATA box binding protein
Myogenic differentiation 1
Myogenic factor 5
Myogenin
Myogenic factor 6
F-box protein 32
Tripartite motif-containing 63
Insulin-like growth factor 1
Insulin-like growth factor 1 receptor
Insulin receptor substrate 1
Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
Thymoma viral proto-oncogene 1
3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
Tuberous sclerosis 1
Tuberous sclerosis 2
Protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit
Insulin-like growth factor binding protein 3
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
Ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1
Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
Glycogen synthase kinase 3 beta
Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha
SMAD family member 3
Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform
Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3
Myocyte enhancer factor 2C
Myostatin
Mitogen activated protein kinase 1
Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
Tumor necrosis factor
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1 ^a
Interleukin 6
Interleukin 6 receptor
Transforming growth factor, beta 1
Forkhead box O1
Forkhead box O3
Insulin-like growth factor 1Ea

Insulin-like growth factor 1Eb
Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent
Myogenic regulatory factor 4
Mitogen activated protein kinase 3

VIII – MANUSCRITO

Aerobic exercise recovers disuse-induced atrophy by stimulating the LRP130 / PGC-1 α complex in aged rats

Ivan José Vechetti Júnior^{1*}, Raquel Santilone Bertaglia¹, Geysson Javier Fernandez¹, Tassiana Gutierrez de Paula¹, Rodrigo Wagner Alves de Souza^{1,3}, Leonardo Nazário de Moraes¹, Edson Assunção Mareco¹, Carlos Eduardo Assumpção de Freitas^{1,4}, Andreo Fernando Aguiar², Robson Francisco Carvalho¹ and Maeli Dal-Pai-Silva¹

¹Department of Morphology, São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Botucatu, São Paulo, Brazil

²University of Northern Parana (UNOPAR), Londrina, Paraná, Brazil

³Department of Molecular Biology, University of São Paulo (USP), Institute of Biosciences, São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴Department of Physiotherapy, University of Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

Ivan José Vechetti-Junior (*)

Departament of Morphology, UNESP - Sao Paulo State University, Botucatu, Brazil

Email: ijvechetti@gmail.com

Phone: 55.14.3880 0470

*Corresponding author

Keywords: Aging. Muscle Mass. Immobilization. Recovery. Exercise Training.

Submitted to Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle

Abstract

Background: During aging, loss of muscle mass (sarcopenia) is inevitable and contributes to increased morbidity and mortality; thus, the maintenance of skeletal muscle mass is critical for long-term health and quality of life. In addition, physical training has been shown to be important to the control of muscle mass during aging through the activation of several pathways including, IGF1-AKT and PGC-1 α . Also, it was demonstrated that LRP130, a component of the PGC-1 α complex is important for the PGC-1 α - dependent transcription of several mitochondrial genes *in vivo*. Therefore, we hypothesized that the physical training could improve the muscle recovery possibly through of the LRP130/PGC-1 α complex by inhibiting the ubiquitin-proteasome system after disuse-induced atrophy in aged rats. We therefore investigated the effects on muscle recovery after short-term immobilization followed by 3 or 7 days of retraining with aerobic training (AT) or resistance training (RT).

Methods: After 7 days of immobilization, the animals underwent the re-growth process with exercise (AT or RT) or without exercise (R) for 3 or 7 days. At the end of the experiment, the animals were sacrificed, and the plantaris (PL) muscle was removed for morphological analyses (assessment of mATPase activity, to assess the total muscle fiber cross sectional area (CSA), and the frequency of specific fiber types), biochemical analyses (Myosin Heavy Chain, MyHC), gene expression of 44 molecular markers of muscle mass (RT-qPCR). To further understand the biological relevance of the mRNA interactions, we performed a search for additional genes that are related to our differentially expressed gene set (GeneMANIA Cytoscape plugin). Differentially expressed genes were submitted to Western blotting analysis.

Results: At 7 days after an atrophic stimulus, only PL muscles from animals subjected to AT had recovered their normal CSA patterns. The frequency of fiber types and MyHC isoforms did not change during the experiment in all groups. After 3 days of recovery, the expression muscle-specific ubiquitin ligases involved in muscle atrophy (MAFbx, MuRF-1 and FoxO1) were reduced

exclusively in the AT group. Interestingly, in the AT group, high levels of PGC-1 α and LRP130 accelerated the process of muscle recovery by inhibiting the FoxO1 pathway.

Conclusion: AT enhanced the muscle regeneration process after disuse-induced atrophy in aged rats possibly through of the LRP130/PGC-1 α complex by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. Our results provide important insight into the process of muscle regeneration in aged animals, which could contribute to the control of sarcopenia in aging.

Keywords: Aging. Muscle Mass. Immobilization. Recovery. Exercise Training.

1. Introduction

During aging, loss of muscle mass has a significant impact on physiological responses (frailty, strength, weakness) and contributes to elevated morbidity and mortality [1]. In addition, the negative health consequences, such as impaired functional capacity and strength, predispose the elderly to periods of prolonged bed rest, which exacerbate muscle loss [2] and worsen clinical status. Although the maintenance of muscle mass is important for the health of the elderly, who are prone to long periods of inactivity, very little is known about the mechanisms that control the regenerative capacity of the skeletal muscle in these individuals.

While some atrophy models (hindlimb suspension and immobilization) have been used to better understand the response of muscle to aging and prolonged bed rest [3,4], few studies have investigated muscle recovery in these circumstances [17, 34]. Muscle recovery from disuse is slower during aging [5], so strategies to alleviate progressive loss of muscle mass need to be tested. In this regard, resistance training (RT) has been used in an attempt to enhance muscle regeneration after atrophy, because this intervention is known to induce hypertrophy in skeletal muscle [7]. However, RT protocols have not been found to restore old muscle to normal [3], perhaps because RT promotes mild tissue trauma [8], which could initially worsen the clinical status of old animals experiencing an atrophic stimulus.

The mechanisms that control the loss of muscle mass during disuse atrophy have been shown to consist mainly of protein degradation through the ubiquitin-proteasome system, a specific pathway for the selective degradation of muscle proteins under catabolic conditions [9,10]. Corroborating these findings, numerous studies have demonstrated that two important components of this pathway, the E3 ubiquitin ligases, MAFbx or atrogen-1, and MuRF-1, were highly elevated in several models of muscle disuse [3,7].

Notably, various studies have shown that the upregulation of atrogen-1 and MuRF1 depends on the activity of the FoxO family [13,14]. FoxO1 activity is modulated by interaction with several

transcription factors, including PGC-1 α , a critical transcriptional co-activator involved in mitochondrial biogenesis in cardiac and skeletal muscle [15]. Furthermore, it has been suggested that high levels of PGC-1 α spare muscle mass in models of denervation, fasting and heart failure [16]. Additionally, PGC-1 α expression in skeletal muscle can be induced by a variety of stimuli, including AT [17,18]. Although some studies have found a relationship between PGC-1 α and FoxO during atrophy, little is known about the mechanism involved [19].

In addition, Cooper et al. [20], in a model of the French Canadian type of Leigh syndrome, showed that LRP130 (also known as LRPPRC, leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein), which was initially isolated as a lectin-binding protein of unknown function from HepG2 cells [21], is a component of the PGC-1 α complex and is necessary for the PGC-1 α -dependent transcription of several mitochondrial genes *in vivo*; these authors also observed that this protein interacted with FoxO1 via PGC-1 α . Therefore, we hypothesized that the physical training could improve the muscle recovery possibly through of the LRP130 / PGC-1 α complex by inhibiting the ubiquitin-proteasome system after disuse-induced atrophy in aged rats. Given the importance of muscle mass in aging, we explored mechanisms related to muscle recovery from disuse-induced atrophy in old rats. This initial study investigated the effects on muscle recovery after short-term immobilization (lower limb cast immobilization) followed by 3 or 7 days of retraining with aerobic training (AT) or RT.

2. Methods

All procedures were performed in accordance with institutional guidelines for the care and use of laboratory animals, and protocols were approved by the Biosciences Institute Ethics Committee, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (Protocol No. 343-CEEA). Old male (18 mo) Wistar rats [22] were purchase from the central animal facility at UNESP. They were housed in polypropylene cages in a temperature-controlled room under a 12-h light dark cycle and received food and water *ad libitum*. Animals were divided into 10 experimental groups: immobilized for 1 week (I), with their corresponding controls (C); immobilized and allowed to recover for 3 or 7 days (R3 and R7, respectively), with their corresponding controls (C3 and C7, respectively); immobilized and then subjected to AT for 3 or 7 days (AT3 and AT7, respectively); immobilized and then subjected to RT for 3 or 7 days (RT3 and RT7, respectively).

Initially, the animals underwent a week of adaptation to the training protocol and the water to minimize the effects of stress during the process of recovery after the atrophic stimulus. The immobilization process was based on a procedure adapted from Frimel [23]. Briefly, the animals in groups I, R3, AT3, RT3, R7, AT7 and RT7 were anesthetized with a mixture of ketamine (50 mg/kg, ip) and xylazine (10 mg/kg, ip) to ensure complete sedation of animals during the procedure. After the animals regained consciousness, their hindlimbs were fixed with a fast drying plaster bandage (Figure 1a). The extent of the immobilization was from the hip to the ankle so that the plantaris muscle would remain in a neutral position during the 7 days of immobilization, to promote muscle atrophy (Figure 1b) [24].

After the immobilization period, the animals in the R3 and R7 groups were kept in their cages for muscle recovery, and the animals in the AT3, AT7, RT3 and RT7 groups underwent a program of AT or RT for 3 or 7 days, to modulate muscle recovery. All animals in the C3, R3, C7 and R7 groups were kept in shallow water during the training period. At the end of the experiment, immediately following euthanasia, the plantaris (PL) muscle was frozen and stored at -80 °C for further analyses as described below.

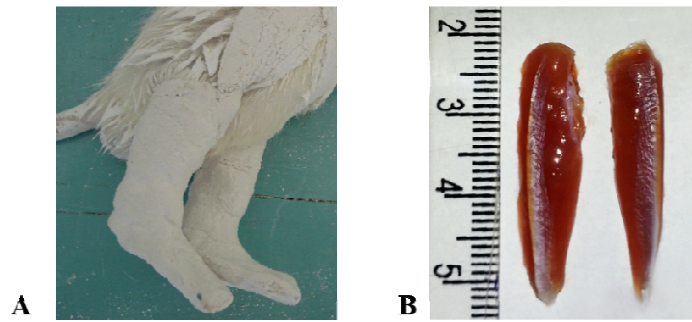


Figure 1. (A) Diagram illustrating the atrophic model used in the experiment; (B) surgically removed PL muscles from immobilized (right) and control (left) hindlimbs at day 7 post-immobilization.

2.1 Anatomical data

The body weight (BW) and feed intake of the animals was monitored daily throughout the experiment. The PL muscle was collected, weighed and subjected to morphological, biochemical, histochemical and molecular analyzes. Furthermore, the visceral, epididymal and retroperitoneal fat pads were excised and weighed to assess the animal's body composition at the end of the experiment. Additionally, three parameters were used to evaluate the rate of muscle atrophy/hypertrophy: muscle weight (mg), muscle-to-tibia length ratio and muscle fiber cross sectional area (CSA) (μm^2).

2.2 Analysis of serum cortisol

To assess the level of stress present in the animals after the period of muscle immobilization and recovery of 3 and 7 days, serum cortisol levels were measured. Blood was collected after decapitation and centrifuged (3000 g for 15 min.), and the serum was collected and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cortisol concentrations were quantified by enzyme-linked immunosorbent assays, following the manufacturer's instructions (R & D Systems).

2.3 Training Protocol

2.3.1 Aerobic training

Aerobic or resistance exercise training was used in an attempt to enhance the process of muscle recovery after the atrophic stimulus. The AT (swimming) bouts were individually performed in an aquarium subdivided into 4 compartments and filled with 40 cm of water at 28-30° C. The animals in groups C and R were kept in shallow water throughout the training period, while animals in groups AT3 and AT7 were subjected to an aerobic swimming training program for 3 and 7 days, respectively [25]. Initially, all of the animals completed 5 sessions to adapt to the water in a progressive volume (0 to 15 min.) and intensity (expressed as a load of 0 to 2% of body weight). To define an appropriate intensity of training, the anaerobic threshold was measured. This test characterizes the inflection point of the blood lactate curve and corresponds to the limit of the metabolic transition from the zone of aerobic to anaerobic predominance [26]. The protocol has a non-exhaustive test double effort [27] comprising two efforts of swimming for five minutes at the same intensity, with two minutes rest between them, with blood collection for lactate analysis at the end of the first and second efforts. The intensities were varied by loads of 2, 3 and 4% of the animal's BW. Animals performed the test at the three intensities with an interval of 24 hours between the tests. These intensities were chosen based on study that determined the anaerobic threshold (5% of BW) in adult rats [28].

After determining the anaerobic threshold of animals, volume (time) and intensity (load) training took 20 min. with 2.3% of BW (anaerobic threshold) for 3 (AT3) and 7 (AT7) days of training. The training sessions were performed at the same time of day, between 14:00 and 16:00h.

2.3.2 Resistance training

Resistance training was based on the protocol described by Cunha [29]. Initially, the animals underwent one week of training to acclimatize them to the water and training protocol. In this acclimation stage, the animals jumped into a vat containing water to a depth of 38 cm with a

temperature between 28-32°C. The depth was appropriate to allow the animal to breathe on the surface of the water during successive jumps. The jump was recorded as successful only when the animals jumped to the edge of the container up to the water surface in successive movements. The adaptation process was gradual: the number of sets was increased (2 to 4), as was the number of repetitions (5 to 10), and the animals carried an added load of 50% body weight in a vest. After the acclimation period, and to ensure the same training intensity among animals, the loads were adjusted for a one repetition maximum test (1RM). The test was performed with a gradual increase in loads performed with a 5 minute interval between the attempts. Four trials were carried out within one day to determine the load that represents the 1RM (the heaviest load that the animal can achieve only once). Subsequently, the animals were submitted to 3 (RT3) or 7 (RT7) days of strength training after the atrophic stimulus. The training comprised 3 sets of 10 jumps using 60% of the 1RM, which corresponds to strength training [30]. The training sessions were performed at the same time of day, between 14:00 and 16:00 h.

2.4 Histochemical analysis

The PL muscles were dissected, weighed and a portion was quickly frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stored at -80 °C before sectioning. Histological sections (12 µm) were cut and the total CSA and the frequency of specific fiber types were determined by myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase) histochemistry [31]. CSA was measured on 400 fibers of the muscle in each animal, and the mean was calculated.

2.5 MyHC analysis

Biochemical analysis of MyHC was performed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in duplicate. Histological sections were collected from each sample and placed in an extraction solution (10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol and 2.3% SDS in a 0.9% Tris-HCl buffer (pH 6.8)). For electrophoretic separation, 15-20 µL of each

extract was loaded onto a 7–10% SDS-PAGE gradient gel over a period of 26 h at 185 V. The gels were stained with Coomassie Blue [32] to identify the MyHC isoforms according to their molecular weights. The relative content of the different MyHC isoforms was determined using the densitometry readings of the bands that corresponded to each MyHC isoform using Image Master VDS Software (Pharmacia Biotech, EUA).

2.6 RT- qPCR analysis

RT-qPCR experiments were performed following the MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) guidelines [33]. Total RNA was isolated from PL muscle previously frozen in liquid nitrogen by homogenization using TRIzol according to the manufacturer's instructions in a tissue homogenizer (Bullet Blender™, Next Advance Inc., Averill Park, NY).

The RNA quality was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) [34] and quantified using a NanoVue Plus spectrophotometer (GE HealthCare, USA). Following isolation, RNA samples were treated with TURBO DNase (Ambion, Life Technologies, USA). cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The PCR reactions consisted 50-fold dilution of the cDNA, using microfluidics platform TaqMan Low Density Arrays (TLDA) v1.0 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was then transferred to TDLA containing 44 target genes and 4 endogenous genes (supplementary material) and the relative quantification of gene expression was performed by the comparative C_q method [35] using Data Assist 2.0 (Life Technologies).

2.7 Pathway Analysis

To further understand the biological relevance of the mRNA interactions, we performed a search for additional genes that are related to our differentially expressed gene set, in the context of functional association data, such as protein and genetic interactions, pathways, co-expression, co-localization and protein domain similarity, using the GeneMANIA Cytoscape plugin [36] (Figure 2).

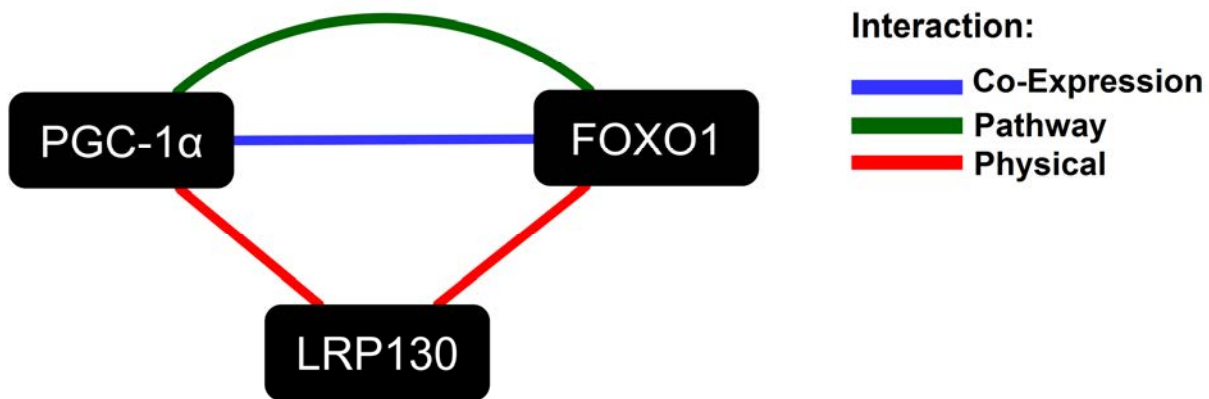


Figure 2. Interaction network. Network of protein interactions involved in PGC-1 and Foxo regulation. The solid lines connecting molecules represent validated interactions. Red line: Physical protein interaction. Blue Line: Co expressed in the same cell context. Green line: Functional interaction in a pathway.

2.8 Western blot analysis

Protein lysates were prepared from the gastrocnemius muscle according to standard protocols. Tissue from the all groups were used and 50 μ g protein lysate was loaded per lane. The membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies: from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), anti-GAPDH (2118), anti-FoxO1 (9454), and anti-pFoxO1 (9461); from Abcam (Cambridge, MA), anti-PGC-1 α (106814); and from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany), anti-MURF1 (27642), anti-Mafbx (27644), and anti-LRP130 (66845), as

well as appropriate secondary antibodies. Finally, immunoreactive protein signals were detected using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), according to the manufacturer's instructions.

2.9 Statistical Analysis

Data are expressed as the mean $\pm$ SD. The Kolmogorov-Smirnov normality test was used to verify data normal distribution. The differences between C and I group parameters were tested with unpaired Student's *t* tests. The muscle fiber type frequency- and MyHC data were analyzed using the Kruskal-Wallis test. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by a posteriori Tukey multiple comparison test was used to analyze CSA, serum cortisol, mRNA and protein expression data. Linear regression was used to assess the relationship between PGC-1 α and LRP130 protein expression with the 3- and 7-day recovery process. Statistical significance was considered achieved when the value of *P* was < 0.05 .

3. Results

3.1 Body Weight and Food Intake.

During the experimental period, the BW of the animals was measured daily, and there was no significant difference between the experimental groups after the period of immobilization and after recovery (Figure 3). These data demonstrate that all of the animals were kept under the same conditions. Furthermore, visceral, retroperitoneal and epididymal fat were removed and weighed to assess the overall body profile of the animals. There were no significant differences in the animals' fat (Figure 4): these results support the BW findings. In keeping with this, food intake did not differ significantly between the groups (data not shown).

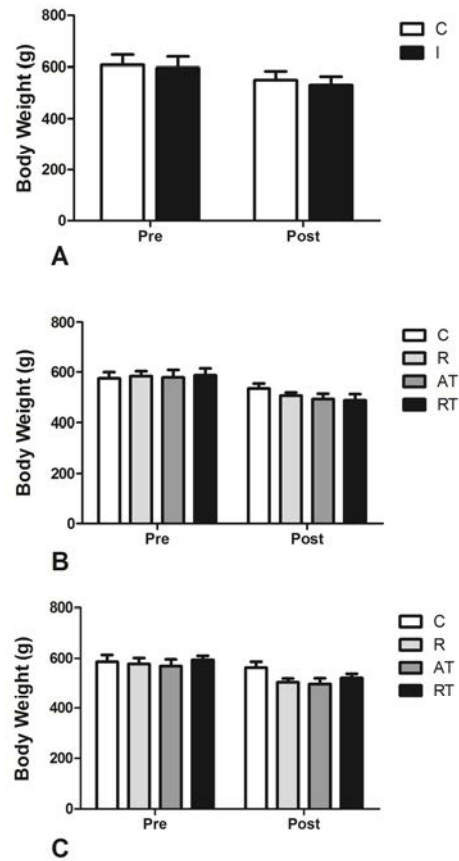


Figure 3. Body weight during the experimental period (Pre and Post). A – experimental groups after 1 week of immobilization; B – experimental groups after 3 days of recovery; C – experimental groups after 7 days of recovery. Values are expressed as the means $\pm$ SD. $n=6$ rats per group. No significant differences were observed among groups ($p > 0.05$).

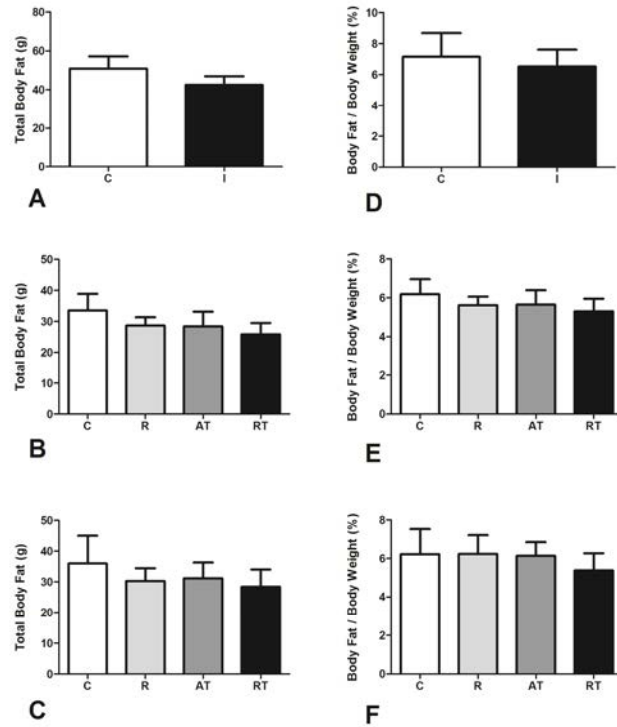


Figure 4. Total body fat (A-C) and body fat-to-body weight ratio (D-F) after the experimental period (Pre and Post). A and D – experimental groups after 1 week of immobilization; B and E – experimental groups after 3 days of recovery.; C and F – experimental groups after 7 days of recovery. Values are expressed as the means $\pm$ SD. $n = 6$ rats per group. No significant differences were observed among groups ($p > 0.05$).

3.2 Muscle atrophy and recovery process.

After 7 days of immobilization, there was significant PL muscle atrophy in the I group compared to C group (15% by muscle weight, 9% by muscle-to- tibia length ratio and 19% by muscle fiber CSA). Animals subsequently underwent 3 to 7 days of muscle recovery with or without exercise. After 3 days of muscle recovery, none of the animals that had undergone the atrophy process regained muscle mass, as determined from all of the analyzed parameters (Table 1); however, after 7 days of muscle recovery, the groups that exercised (AT and RT) regained muscle mass according to all of the analyzed parameters (Table 2).

Table 1. Muscle atrophy parameters after 3 days of recovery with (AT and RT) or without (R) exercise

	Groups			
	C	R	AT	RT
Muscle Weight (g)	0.4446±0.02	0.3506±0.05*	0.3454±0.05*	0.3555±0.02*
Muscle-to-tibia length ratio	0.0942±0.01	0.06425±0.01*	0.0826±0.01*	0.08617±0.01*

Values are means ± SD. n= 6 rats per group. C: control group; R: recovery group; AT: aerobic training group; RT: resistance group. *Significant difference compared to C group at $p < 0.05$.

Table 2. Muscle atrophy parameters after 7 days of recovery with (AT and RT) or without (R) exercise

	Groups			
	C	R	AT	RT
Muscle Weight (g)	0.4560±0.05	0.3350±0.05*	0.4020±0.05	0.3900±0.02
Muscle-to-tibia length ratio	0.0932±0.01	0.06523±0.01*	0.0812±0.01	0.08027±0.01

Values are means ± SD. n= 6 rats per group. C: control group; R: recovery group; AT: aerobic training group; RT: resistance group. *Significant difference compared to C group at $p < 0.05$

Muscle atrophy was also evaluated by assessing the CSA of specific muscle fibers and of the entire PL after the immobilization and recovery periods. After immobilization, the PL muscle and component fiber types (I, IIA, IID and IIB) had a lower CSA than in the C group (Figure 5A and B). Moreover, after 3 days of muscle recovery, no muscle fibers in the R group recovered a normal CSA pattern (Figure 5C and D); however, the animals subjected to training, in the AT and RT groups, had the CSA of oxidative muscle fibers (I and IIA) and were recovered compared to group C ($p < 0.05$); by contrast, the CSA of the entire PL muscle did not recover (Figure 5C and D). There was no change in the frequency of the muscle fiber types or in the MyHC analysis (data not shown), demonstrating that neither the immobilization nor the recovery process changed the phenotypic profile of the PL muscle.

After 7 days of recovery, the CSA of the oxidative muscle fibers had recovered in all experimental groups. However, the CSA of the glycolytic muscle fibers recovered only in animals

subjected to AT; in the RT groups, only the type IID fibers recovered. Corroborating these findings, the CSA of the muscle fibers and the PL muscle returned to normal only in the animals subjected to AT (Figure 5E and F).

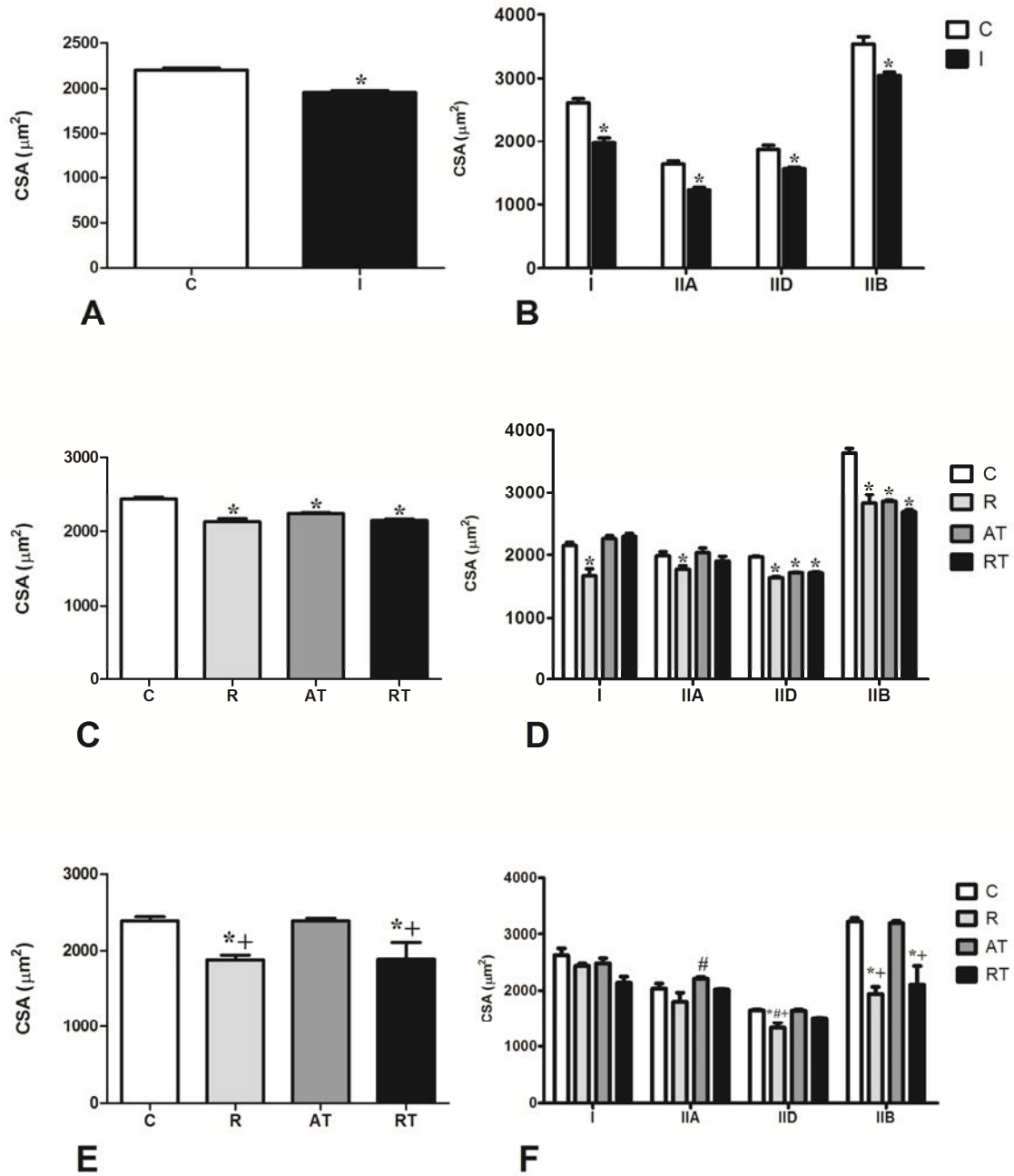


Figure 5. Cross sectional area (CSA) (A, C and E) and fiber type (B, D and F) after the experimental period. A and B - experimental groups after 1 week of immobilization; C and D – experimental groups after 3 days of recovery.; E and F – experimental groups after 7 days of recovery. Values are expressed as the means $\pm$ SD. n= 6 rats per group. *Significant difference compared to C group; #Significant difference compared to R group; +Significant difference compared to AT group ($p < 0.05$).

3.3 Analysis of Serum Cortisol.

There were no differences in serum cortisol levels between groups (data not shown), showing that all animals remained in the same condition of stress throughout the experimental period.

3.4 Gene expression of muscle atrophy and hypertrophy markers.

The gene expression of markers of muscle atrophy and hypertrophy was analyzed by TLDA, to obtain a more global perspective of the muscle recovery process in aging rats. Based on the genes grouped on the TLDA card, we focused on components of the following signaling pathways: Cell Proteolytic Systems and Cell Death (ubiquitin-proteasome system, oxidative stress, autophagy-lysosome system and apoptotic pathways), Inflammatory Cytokines (TNF α pathway) and Muscle Growth (IGF1-AKT signaling pathway and Myostatin pathway). There were no changes in the gene expression or protein expression of factors involved in muscle growth, after immobilization (data not shown). The ubiquitin-proteasome pathway was the most enriched following the immobilization, with an increase in the key markers of muscle atrophy (MaFbx or atrogin-1, Murf-1, and FoxO1); moreover, PGC-1 α and LRP130 expression decreased (Figure 6).

After 3 days of recovery, the expression levels of MaFbx and FoxO1 remained high only in the R and RT groups, with expression decreased in animals subjected to AT (Figure 7). Interestingly, in the AT group, the expression of atrophy-related genes decreased as the PGC-1 α and LRP130 levels increased (Figure 6), which could reflect a relationship between these two components. Despite these changes in pathways involved in muscle atrophy, there was no muscle recovery in any group after 3 days (Figure 5). After 7 days, these atrophy markers were expressed at lower levels in all groups (the protein expression of MAFbx remained high in the R group), with an increase in only the protein expression of PGC-1 α and LRP130; LRP130 expression remained down regulated only in the R and RT group animals (Figure 8). In addition, only the AT group recovered muscle mass compared with the R and RT groups, confirming the potential of the PGC-1 α and

LRP130 proteins to aid in the recovery of aging muscle. Additionally, linear regression analysis of the 3 and 7 day R and AT groups' results revealed a moderate correlation between LRP130 and PGC-1 α protein expression after 3 days (Pearson's $r=0.67$, $p = 0.003$) and a strong correlation after 7 days (Pearson's $r=0.98$, $p \leq 0.0001$) (Figure 9).

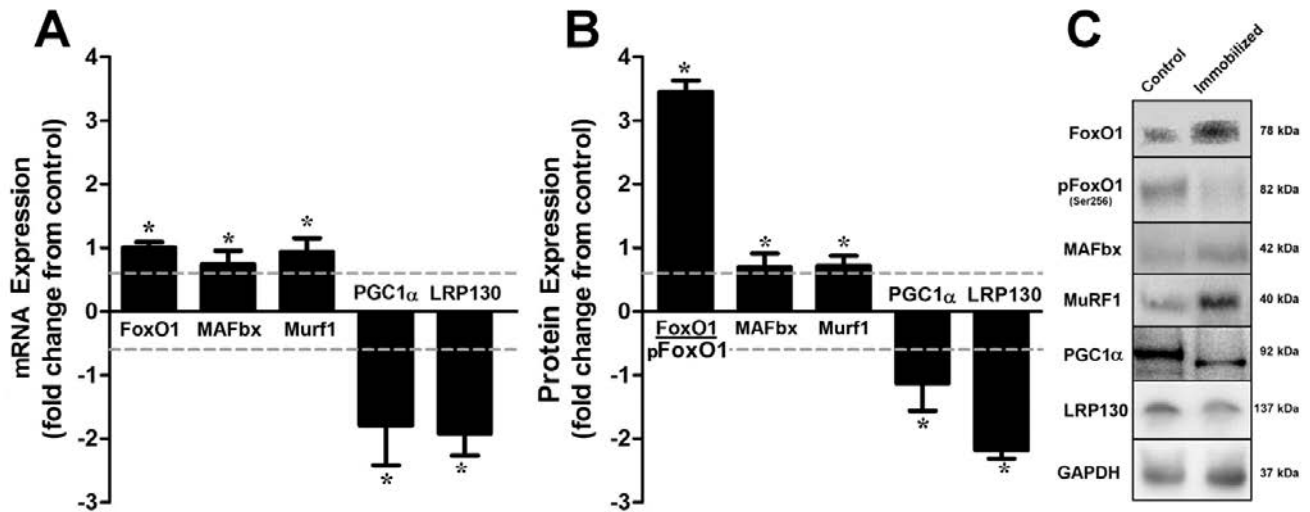


Figure 6. Relative mRNA and protein expression (log₂ fold change from C group). A - mRNA levels of immobilized group compared to control. B - protein content of immobilized group compared to control; C - representative blots of experimental groups after 1 week of immobilization. n= 6 rats per group. *Significant difference compared to C group (baseline) ($p < 0.05$).

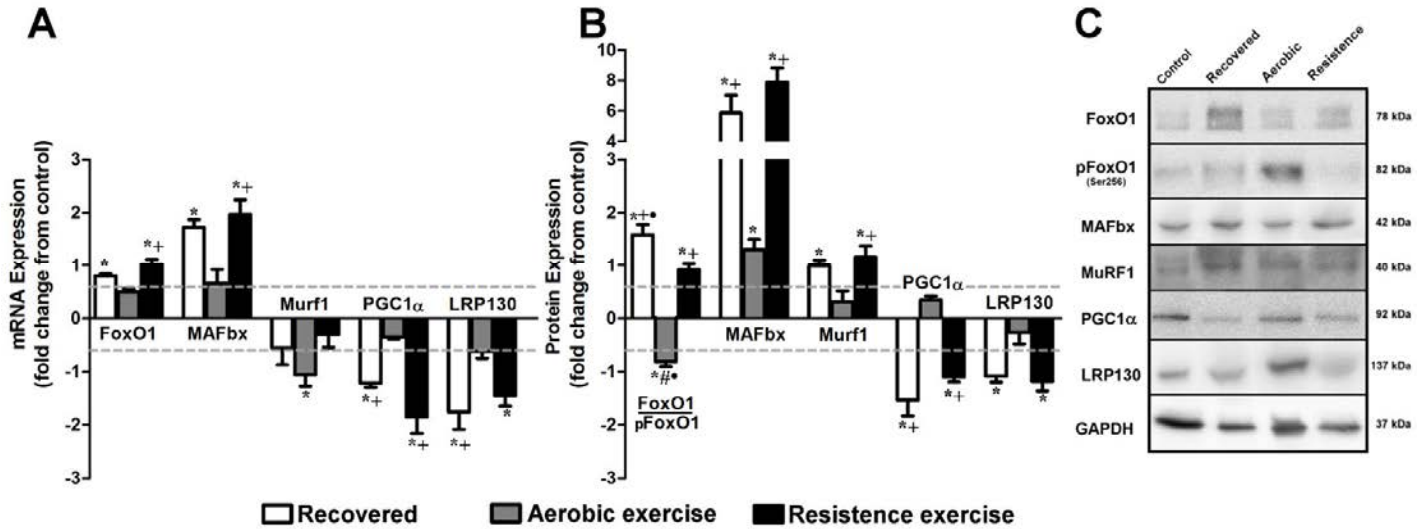


Figure 7. Relative mRNA and protein expression (log₂ fold change from C group). A - mRNA levels of experimental groups after 3 days of recovery. B - protein content of experimental groups after 3 days of recovery; C - representative blots of experimental groups after 3 days of recovery. n= 6 rats per group. *Significant difference compared to C group (baseline); +Significant difference compared to AT group; #Significant difference compared to R group; •Significant difference compared to RT group (p < 0.05).

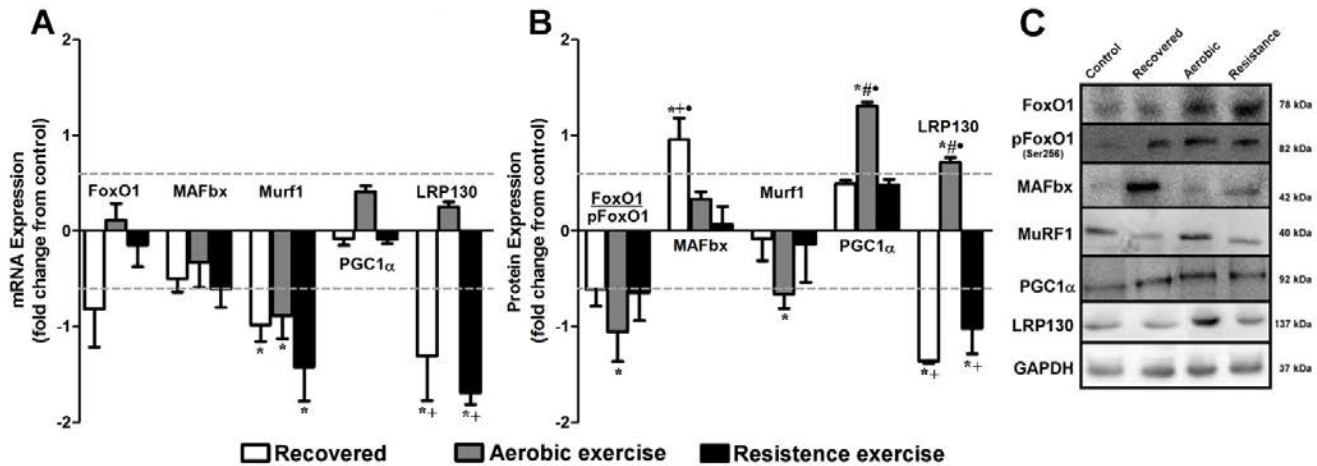


Figure 8. Relative mRNA and protein expression (log₂ fold change from C group). A - mRNA levels of experimental groups after 7 days of recovery. B - protein content of experimental groups after 7 days of recovery; C - representative blots of experimental groups after 7 days of recovery. n=6 rats per group. *Significant difference compared to C group (baseline); +Significant difference compared to AT group; #Significant difference compared to R group; •Significant difference compared to RT group (p < 0.05).

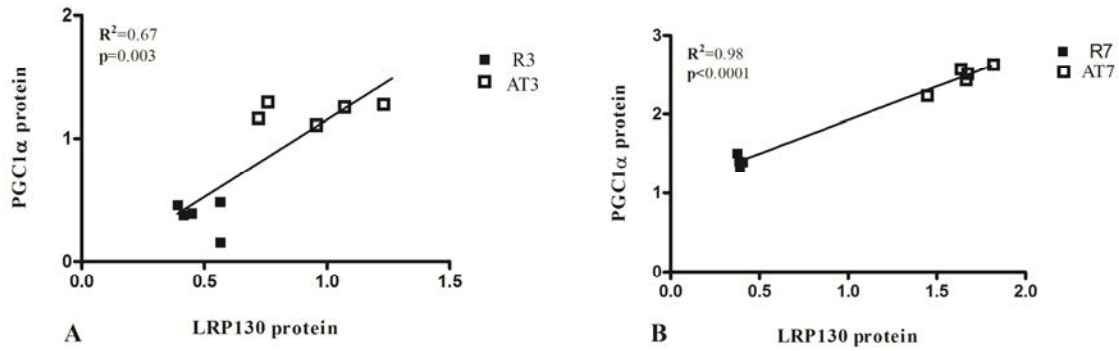


Figure 9. Relationship between PGC1α and LRP130 protein expression after 3 days of recovery (A) and 7 days (B). There were significant correlations between the PGC1α and LRP130 protein levels. For all correlations, individual data points from the R and AT groups ($n = 6$ rats per group) were used.

4. Discussion

Although the regeneration capacity of atrophied muscle is known to decrease with age [37,38], the molecular mechanisms underlying regeneration after muscle atrophy during aging are poorly understood. Several studies using models of disuse-induced atrophy [6,10,39] have investigated the muscle regeneration process, but, in the absence of complete recovery of muscle mass, all of the mechanisms may not have been controlled for. In this context, the current study was designed to evaluate the effects on muscle recovery during aging after short-term immobilization (lower limb cast immobilization). Moreover, we used AT or RT to stimulate muscle recovery after disuse-induced atrophy. The major findings of our study are: 1) animals subjected to AT showed recovery of CSA after 7 days of regeneration process; 2) the ubiquitin-proteasome system components involved in muscle atrophy showed reduced expression in the AT group after 3 days of recovery; 3) PGC-1 α accelerated the process of muscle recovery by inhibiting the FoxO pathway, with the possible involvement of LRP130.

Although muscle recovery after an atrophic stimulus (especially hindlimb suspension) during aging has already been investigated, none of the studies that used RT have, to the best of our knowledge, succeeded in completely restoring muscle mass (in the short-term). Additionally, AT has not previously been used to assess recovery after disuse-induced atrophy during aging. In our study, after 7 days of muscle recovery from disuse-induced atrophy, only the animals subjected to AT had completely recovered the original CSA of their PL muscles (Figure 4). The reason that other researchers have failed to show successful muscle recovery [37,40] can be explained by the different species strains used, the type of disuse-induced atrophy model (external fixation versus hindlimb suspension), the time of immobilization and retraining, and, importantly, the type, quantity and intensity of training, and especially the training stimulus (resistance or, as in our study, aerobic).

Furthermore, to investigate whether muscle recovery in response to different stimuli (aerobic or resistance training) occurred in a fiber type-specific manner, we evaluated the frequency

and the CSA of the PL muscle fiber types. Interestingly, muscle recovery occurred in a similar way regardless of the stimulus, with the recovery of oxidative fibers after 3 days in animals subjected to AT or RT, and only after 7 days in the animals in the R group; the glycolytic fibers recovered after 7 days only in the AT group, and there was no recovery in the R group, whereas only the IID fibers of the RT-group animals recovered, with no change in the IIB fibers. Studies have shown that aging is associated with a preferential atrophy in type II muscle fibers [41,42], so we considered that our recovery model would not suffice to promote a total recovery of these fibers, especially in the R and RT groups. Although RT promotes hypertrophy mainly in type II fibers, we thought that the mild tissue trauma promoted by this type of exercise [8] would prevent the full recovery of these fibers after 7 days. By contrast, AT does not appear to damage muscle tissue [43] and so could potentiate the recovery process. In relation to type I fibers, recovery is easier because they have a lower CSA and an increased blood supply [44].

Even though our study demonstrated recovery of the PL muscle in the AT group after 7 days, the expression of ubiquitin-proteasome system components, which are involved in the control of muscle catabolism, decreased after only 3 days of recovery. These finding indicates that AT enhances the regeneration process in aging rats; moreover, it seems that RT takes longer than AT to re-establish the normal expression patterns in the atrophic pathways (ubiquitin-proteasome system) involved in this process, even though this training stimulus promotes an increase in protein synthesis [45,46].

Considering the signaling pathways involved in disuse-induced atrophy followed by muscle re-growth, protein synthesis and degradation, apoptosis, autophagy, and cell proliferation among others, have been shown to be regulated in a distinct manner under different experimental conditions [3,10], and some studies argue that RT does not affect all of these pathways. In the present study, we investigated some components of the following pathways in response to exercise training after immobilization: the ubiquitin-proteasome system, oxidative stress, the autophagy-lysosome system, apoptotic pathways, the TNF α pathway, the IGF1-AKT signaling pathway and

Myostatin. We found that the most enriched pathways following immobilization were the ubiquitin-proteasome system (which was enriched in MaFbx, Murf-1 and FoxO1) (Figure 5). Furthermore, there was no change in hypertrophy pathway components (data not shown) and an interesting change in PGC-1 α and LRP130 was observed, which could be associated with FoxO1 (Figure 5).

The increased expression of the two ubiquitin ligases (MaFbx and Murf-1), which have been suggested to be atrophy markers [47], was similarly associated with a loss of muscle mass in our study. Our results are consistent with studies that used hindlimb suspension to evaluate the response of muscle mass to unloading and exercise, showing an increase in these markers [11,48]. In this sense, the FoxO family is an important contributor, regulating muscle mass by controlling muscle atrophy-related genes (MuRF-1 and MaFbx). Indeed, overexpression of FoxO1, FoxO3, or both is sufficient to cause muscle atrophy *in vivo*. In our study, the increased expression of FoxO1, which controls the activity of atrophy-associated genes, contributed to muscle atrophy in our model. During muscle wasting conditions, FoxO is dephosphorylated and translocates to the nucleus, which leads to the induction of genes that promote atrophy (MuRF-1 and atrogin-1/MaFbx).

The regulation of FoxO transcriptional activity is complex; however, some evidence indicates that increased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) expression can protect muscles from atrophy by inhibiting FoxO [16,49]. In addition, it is well established that repetitive muscle contractions, as occur in aerobic training, activate the AMPK pathway, which could induce PGC-1 α expression [50]. Indeed, our aerobic training protocol increased PGC-1 α expression in PL muscle; additionally, there was a decrease in FoxO1 expression, showing the relationship between these proteins. Even though this relationship has already been demonstrated, other factors could participate in this process, and the exact mechanism of these pathways remains unknown. LRP130 has been shown to cooperate with PGC-1 α in the liver to maintain glucose homeostasis in French Canadian Leigh syndrome [20]. Furthermore, this study shows that LRP130 may be required to increase or decrease the docking of PGC-1 α and its concomitant transcriptional action on specific transcription factors genes and promoters. In

addition, these authors investigated the relationship between PGC-1 α , LRP130 and FoxO1 in cells that lacked LRP130 and showed that PGC-1 α had lost its ability to co-activate FoxO1 in these cells, whereas exogenous expression of LRP130 restored this co-activation function. Although this interaction has been demonstrated only in the liver, our results suggest that LRP130 can also bind to PGC-1 α to stimulate its transcriptional activity, blocking the function of FoxO1 (as supported by pathway analysis) during muscle recovery after immobilization-induced atrophy.

Interestingly, the expression levels of PGC-1 α and LRP130 during recovery after disuse-induced atrophy were positively correlated (3 days, $r=0.67$, $p = 0.003$; 7 days, $r=0.98$, $p<0.0001$). Although these results do not demonstrate a causal relationship between these components, they confirm an earlier study [20] demonstrating a strong correlation between LRP130 and PGC-1 α ; therefore, they provide insight into the functional role of these proteins in the skeletal muscle recovery process during aging. In addition, this relationship was only evident after 3 days of recovery (when the LRP130 and PGC-1 α proteins returned to normal levels of expression) and was more pronounced after 7 days only in animals subjected to AT. Indeed, the increase of PGC-1 α in response to AT is widely known [18]; however, to our knowledge, this is the first demonstration of a relationship between PGC-1 α , LRP130 and FoxO1 in skeletal muscle during the recovery process in aging rats. We strongly believe that AT enhances the muscle regeneration process in older animals possibly via LRP130 and PGC-1 α and, corroborating our data, RT failed to lead to muscle recovery after an atrophic stimulus [3]. (Figure 10).

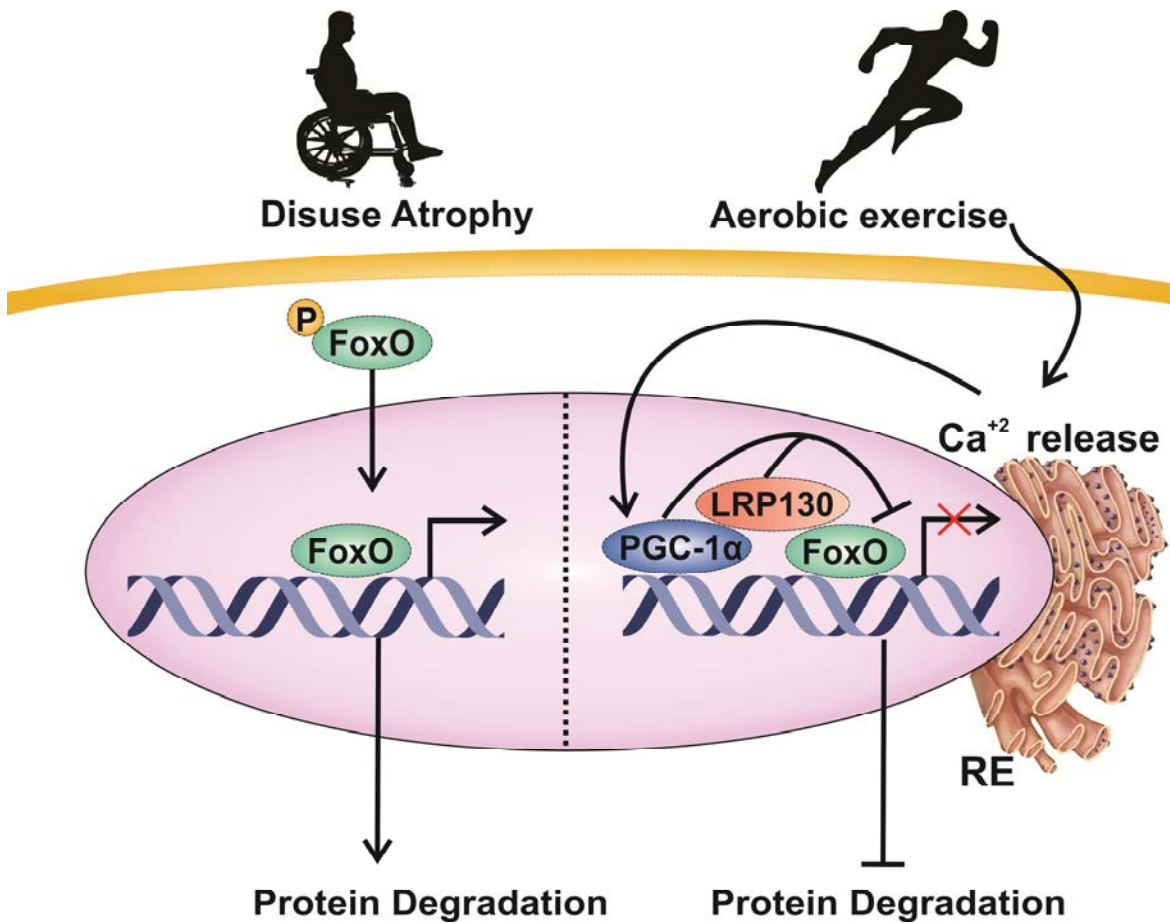


Figure 10. Model of inhibition of FoxO and atrophy by the complex PGC1alpha/RPL130 induced by aerobic exercise in aging. Aerobic exercise increase the Ca^{+2} release of RE and drives PGC1alpha activation and translocation to nucleus by Ca^{+} signaling, where interact to form a complex with the protein RPL130 leading to inhibits transcriptional activity of FoxO, which suppress the activation of atrophic genes and protein degradation.

In summary, our main novel finding is that AT enhanced the muscle regeneration process after disuse-induced atrophy in aged rats possibly through of the LRP130 / PGC-1 α complex by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. These results provide important information that improves our understanding of the mechanisms underlying muscle preservation and/or recovery during aging and could therefore help to identify treatment strategies for age-related loss of muscle mass.

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP (Proc. 2011/14484-4). The authors of this manuscript certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia, and Muscle 2010;1:7–8 (von Haehling S, Morley JE, Coats AJ, and Anker SD).

Conflict of interest statement and statement of authorship

Each author has participated intellectually or practically in the work to take public responsibility for the content of the article. The authors have read and approved the final manuscript. All authors of this research declares that have no conflict of interest.

References

1. Metter EJ, Talbot LA, Schrager M, Conwit R. Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2002;57:B359–65.
2. Kortebein P, Ferrando A, Lombeida J, Wolfe R, Evans WJ. Effect of 10 days of bed rest on skeletal muscle in healthy older adults. *JAMA.* 2007;297:1772–4.
3. Dupont-Versteegden EE, Fluckey JD, Knox M, Gaddy D, Peterson CA. Effect of flywheel-based resistance exercise on processes contributing to muscle atrophy during unloading in adult rats. *J. Appl. Physiol.* 2006;101:202–12.
4. Pattison JS, Folk LC, Madsen RW, Booth FW. Selected Contribution: Identification of differentially expressed genes between young and old rat soleus muscle during recovery from immobilization-induced atrophy. *J. Appl. Physiol.* 2003;95:2171–9.
5. Suetta C, Hvid LG, Justesen L, Christensen U, Neergaard K, Simonsen L, et al. Effects of aging on human skeletal muscle after immobilization and retraining. *J. Appl. Physiol.* 2009;107:1172–80.
6. Hvid L, Aagaard P, Justesen L, Bayer ML, Andersen JL, Ørtenblad N, et al. Effects of aging on muscle mechanical function and muscle fiber morphology during short-term immobilization and subsequent retraining. *J. Appl. Physiol.* 2010;109:1628–34.
7. Haddad F, Adams GR, Bodell PW, Baldwin KM. Isometric resistance exercise fails to counteract skeletal muscle atrophy processes during the initial stages of unloading. *J. Appl. Physiol.* 2006;100:433–41.
8. Sousa N, Mendes R, Monteiro G, Abrantes C. Progressive resistance strength training and the related injuries in older adults: the susceptibility of the shoulder. *Aging Clin. Exp. Res.* 2014;26:235–40.
9. Okamoto T, Torii S, Machida S. Differential gene expression of muscle-specific ubiquitin ligase MAFbx/Atrogin-1 and MuRF1 in response to immobilization-induced atrophy of slow-twitch and fast-twitch muscles. *J. Physiol. Sci.* 2011;61:537–46.
10. Suetta C, Frandsen U, Jensen L, Jensen MM, Jespersen JG, Hvid LG, et al. Aging affects the transcriptional regulation of human skeletal muscle disuse atrophy. *PLoS One.* 2012;7:e51238.
11. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001;294:1704–8.
12. Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Léger B, Russell AP. The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch.* 2011;461:325–35.
13. Southgate RJ, Neill B, Prelovsek O, El-Osta A, Kamei Y, Miura S, et al. FOXO1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 2007;282:21176–86.
14. Liu C-M, Yang Z, Liu C-W, Wang R, Tien P, Dale R, et al. Effect of RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 on muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Cancer Gene Ther.* 2007;14:945–52.

15. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature*. 2003;423:550–5.
16. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103:16260–5.
17. Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.* 2002;16:1879–86.
18. Bayod S, Del Valle J, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, de Luxán-Delgado B, Coto-Montes A, et al. Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues. *Exp. Gerontol.* 2012;47:925–35.
19. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* 2013;6:25–39.
20. Cooper MP, Qu L, Rohas LM, Lin J, Yang W, Erdjument-Bromage H, et al. Defects in energy homeostasis in Leigh syndrome French Canadian variant through PGC-1 α /LRP130 complex. *Genes Dev.* 2006;20:2996–3009.
21. Hou J, Wang F, McKeehan WL. Molecular cloning and expression of the gene for a major leucine-rich protein from human hepatoblastoma cells (HepG2). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 1994;30A:111–4.
22. Shefer G, Rauner G, Yablonka-Reuveni Z, Benayahu D. Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise. *PLoS One*. 2010;5:e13307.
23. Frimel TN, Kapadia F, Gaidosh GS, Li Y, Walter GA, Vandenborne K. A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice. *Muscle Nerve*. 2005;32:672–4.
24. Da Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2006;39:979–85.
25. Vechetti-Junior IJ, Aguiar a F, de Souza RW a, Almeida FL a, de Almeida Dias HB, de Aguiar Silva M a, et al. NFAT isoforms regulate muscle fiber type transition without altering CaN during aerobic training. *Int. J. Sports Med.* 2013;34:861–7.
26. Wasserman K, Mcilroy MB. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. *Am. J. Cardiol.* 1964;14:844–52.
27. Chassain A-P. Méthode d'appréciation objective de la tolérance de l'organisme à l'effort: application à la mesure des puissances critiques de la fréquence cardiaque et de la lactatémie. *Sci. Sports*. 1986;1:41–8.
28. Gobatto C a, de Mello M a, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos L a, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2001;130:21–7.

29. Cunha TS, Tanno AP, Costa Sampaio Moura MJ, Marcondes FK. Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci.* 2005;77:1030–43.
30. Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2002;34:364–80.
31. Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry a C, Murray JD, Campos GE. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem. Cell Biol.* 1999;111:117–23.
32. Bär a, Pette D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1988;235:153–5.
33. Bustin S a, Benes V, Garson J a, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009;55:611–22.
34. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* 2006;27:126–39.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402–8.
36. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Kazi F, Wright G, Donaldson SL, et al. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics.* 2010;26:2927–8.
37. Zarzhevsky N, Carmeli E, Fuchs D, Coleman R, Stein H, Reznick AZ. Recovery of muscles of old rats after hindlimb immobilisation by external fixation is impaired compared with those of young rats. *Exp. Gerontol.* 2001;36:125–40.
38. Gallegly JC, Turesky NA, Strotman BA, Gurley CM, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE. Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. *J. Appl. Physiol.* 2004;97:1082–90.
39. Suetta C, Frandsen U, Mackey a L, Jensen L, Hvid LG, Bayer ML, et al. Ageing is associated with diminished muscle re-growth and myogenic precursor cell expansion early after immobility-induced atrophy in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 2013;591:3789–804.
40. Hao Y, Jackson JR, Wang Y, Edens N, Pereira SL, Alway SE. β -Hydroxy- β -methylbutyrate reduces myonuclear apoptosis during recovery from hind limb suspension-induced muscle fiber atrophy in aged rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011;301:R701–15.
41. Aagaard P, Suetta C, Caserotti P, Magnusson SP, Kjaer M. Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 2010;20:49–64.
42. Andersen JL. Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 2003;13:40–7.
43. Kargotich S, Keast D, Goodman C, Bhagat CI, Joske DJL, Dawson B, et al. Monitoring 6 weeks of progressive endurance training with plasma glutamine. *Int. J. Sports Med.* 2007;28:211–6.

44. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.* 2000;50:500–9.
45. Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V, et al. Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am. J. Physiol.* 1997;273:C579–87.
46. Hurst JE, Fitts RH. Hindlimb unloading-induced muscle atrophy and loss of function: protective effect of isometric exercise. *J. Appl. Physiol.* 2003;95:1405–17.
47. Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell Biol.* 2003;5:87–90.
48. Stevenson EJ, Giresi PG, Koncarevic A, Kandarian SC. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 2003;551:33–48.
49. Souza RW a, Piedade WP, Soares LC, Souza P a T, Aguiar AF, Vechetti-Júnior IJ, et al. Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions. *PLoS One.* 2014;9:e110020.
50. De Lange P, Moreno M, Silvestri E, Lombardi A, Goglia F, Lanni A. Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: signaling pathways and regulatory mechanisms. *FASEB J.* 2007;21:3431–41.

TLDA
Eukaryotic 18S rRNA
Actin, beta
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
TATA box binding protein
Myogenic differentiation 1
Myogenic factor 5
Myogenin
Myogenic factor 6
F-box protein 32
Tripartite motif-containing 63
Insulin-like growth factor 1
Insulin-like growth factor 1 receptor
Insulin receptor substrate 1
Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
Thymoma viral proto-oncogene 1
3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
Tuberous sclerosis 1
Tuberous sclerosis 2
Protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit
Insulin-like growth factor binding protein 3
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
Ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1
Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
Glycogen synthase kinase 3 beta
Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha
SMAD family member 3
Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform
Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3
Myocyte enhancer factor 2C
Myostatin
Mitogen activated protein kinase 1
Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
Tumor necrosis factor
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
Interleukin 6
Interleukin 6 receptor
Transforming growth factor, beta 1
Forkhead box O1
Forkhead box O3
Insulin-like growth factor 1Ea
Insulin-like growth factor 1Eb

Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent
Myogenic regulatory factor 4
Mitogen activated protein kinase 3

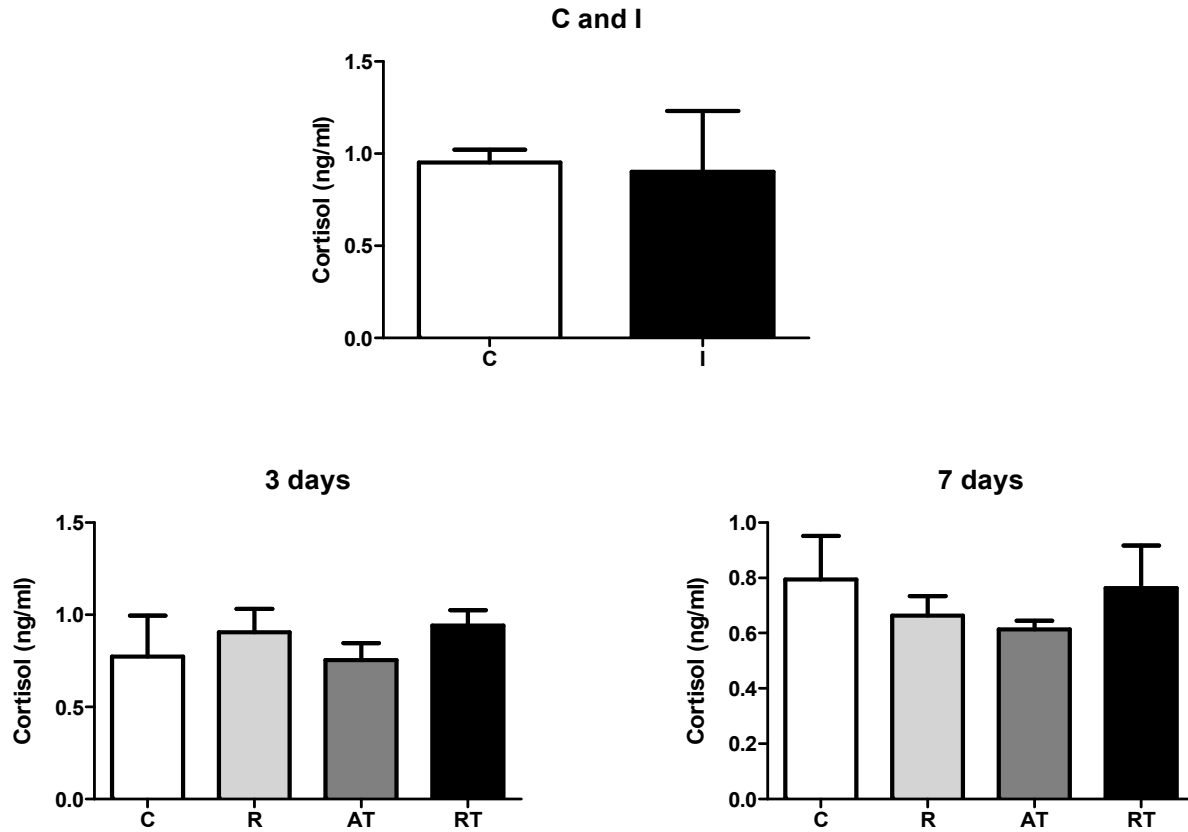
IX – DADOS SUPLEMENTARES**1 – Análise Sérica do Cortisol**

Figure 1. Analysis of serum cortisol during the experimental period. Experimental groups after 1 week of immobilization; 3 days – experimental groups after 3 days of recovery; 7 days – experimental groups after 7 days of recovery. Values are expressed as the means $\pm$ SD. $n=6$ rats per group. No significant differences were observed among groups ($p > 0.05$).

2 – Análise da Frequência dos Tipos de Fibras

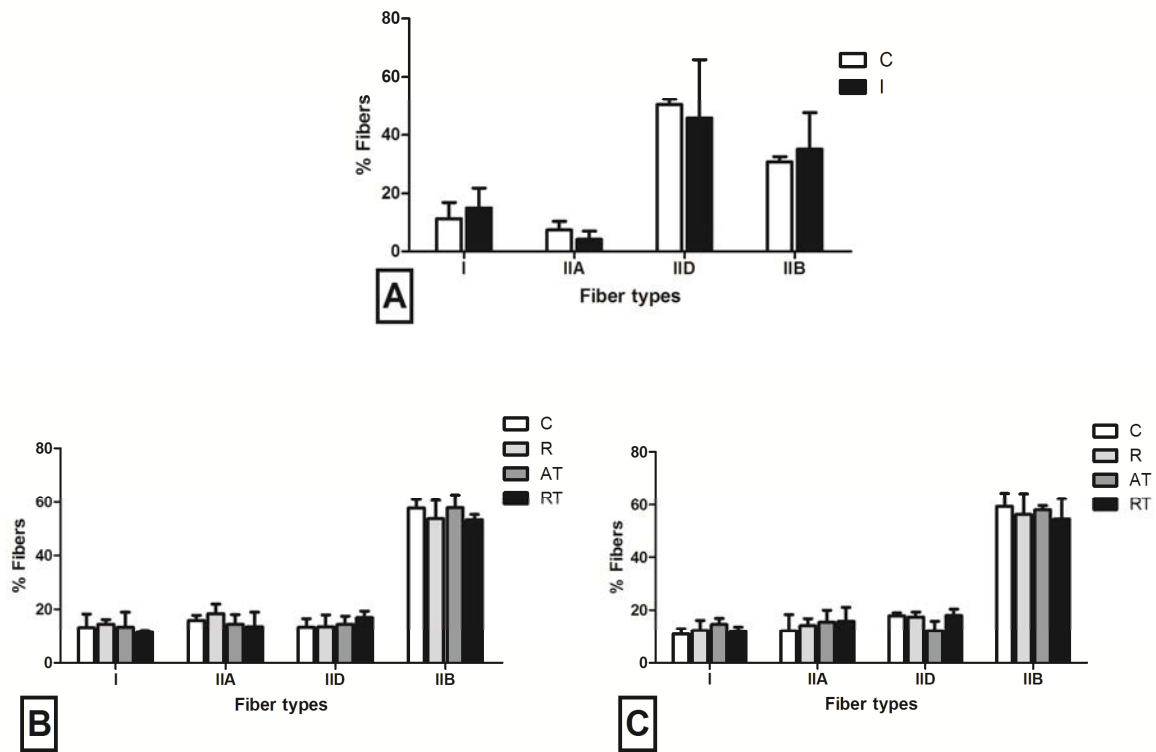


Figure 2. Frequency of specific fiber types during the experimental period. A - Experimental groups after 1 week of immobilization; B - Experimental groups after 3 days of recovery; C - Experimental groups after 7 days of recovery. Values are expressed as the means $\pm$ SD. $n=6$ rats per group. No significant differences were observed among groups ($p > 0.05$).

3 – Análise das Isoformas da Cadeia Pesada de Miosina (MyHC)

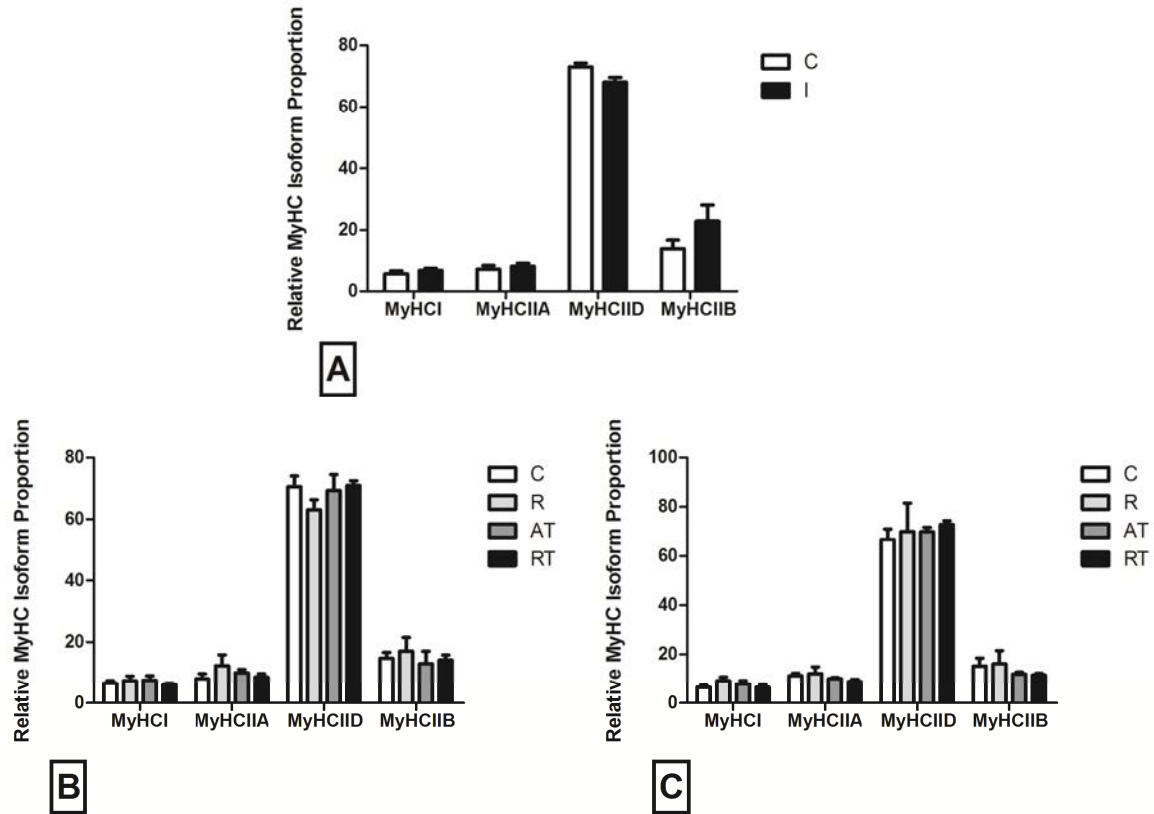


Figure 3. Relative MyHC isoform proportion during the experimental period. A - Experimental groups after 1 week of immobilization; B - Experimental groups after 3 days of recovery; C - Experimental groups after 7 days of recovery. Values are expressed as the means $\pm$ SD. $n = 6$ rats per group. No significant differences were observed among groups ($p > 0.05$).

4 – Análise da expressão gênica das vias moleculares envolvidas com o controle da massa muscular

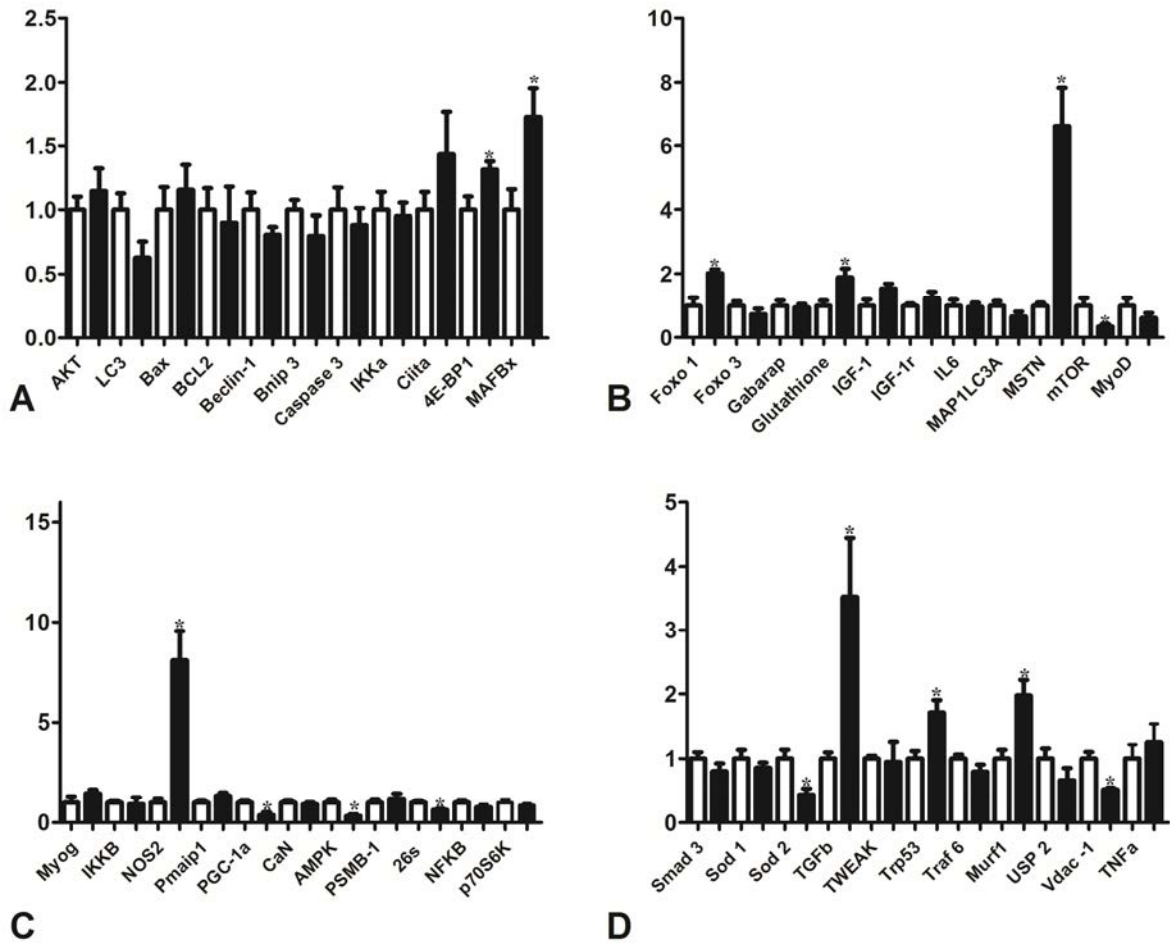


Figure 4. Gene expression performed by TLDA during the experimental period between control and immobilized groups. Values are expressed as the means $\pm$ SD. n= 6 rats per group. *Significant differences were observed among groups ($p < 0.05$).