



Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento

Júlia Maia Viudes Agostinho

Epigenética do exercício: 8 semanas de treinamento resistido dinâmico favorece ganho de força mas não altera metilação global do DNA em fibras musculares oxidativa, glicolítica e mista de ratos saudáveis

Presidente Prudente

2023

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Júlia Maia Viudes Agostinho

Epigenética do exercício: 8 semanas de treinamento resistido dinâmico favorece ganho de força mas não altera metilação global do DNA em fibras musculares oxidativa, glicolítica e mista de ratos saudáveis

Dissertação apresentada à Banca Examinadora e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento - Interunidades, da Universidade Estadual Paulista (UNESP) campus de Presidente Prudente, como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestra em Ciências do Movimento**.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim

Presidente Prudente

2023

A275e	Agostinho, Júlia Maia Viudes Epigenética do exercício: 8 semanas de treinamento resistido dinâmico favorece ganho de força mas não altera metilação global do DNA em fibras musculares oxidativa, glicolítica e mista de ratos saudáveis / Júlia Maia Viudes Agostinho. -- Presidente Prudente, 2023 61 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente Orientadora: Patrícia Monteiro Seraphim 1. Epigenética. 2. Fenótipo. 3. Metilação de DNA. 4. Músculo esquelético. 5. Treinamento de força. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

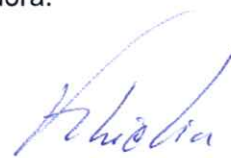
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Epigenética do exercício: 8 semanas de treinamento resistido dinâmico favorece ganho de força mas não altera metilação global do DNA em fibras musculares oxidativa, glicolítica e mista de ratos saudáveis

AUTORA: JULIA MAIA VIUDES AGOSTINHO

ORIENTADORA: PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências do Movimento, área: Avaliação e Intervenção em Fisioterapia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FÁBIO SANTOS DE LIRA (Participação Presencial)
Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia



VIDEOCONFERÊNCIA

Profa. Dra. PATRICIA RODRIGUES LOURENCO GOMES (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Biomédicas I – USP – São Paulo



Profa. Dra. GISELE ALBORGHETTI NAI (Participação Presencial)
Lab. de Anatomia Patológica / Universidade do Oeste Paulista de Presidente Prudente (Unoeste)



Profa. Dra. PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM (Participação Presencial)
Departamento de Fisioterapia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente

Presidente Prudente, 24 de janeiro de 2023

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha querida mãe **Ana**,
por fazer dos meus sonhos, os seus também.*

*E ao meu irmão e melhor amigo **José**,
por ser parte de quem sou e do que quero me tornar.
Nada disso seria possível sem vocês.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por todo amor, amparo e por nunca me abandonar nessa trajetória. Há em mim o sentimento de que todos nós possuímos um propósito na Terra e, se cheguei até aqui, Ele permitiu.

À Nossa Senhora Aparecida, por sua intercessão desde o meu nascimento, abençoando, guiando e protegendo-me de todo o mal.

Ao meu falecido avô José Agostinho, por ter me ensinado que nunca perdemos quando somos fontes de bondade e amor. És o maior exemplo da minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia, pelo carinho e persistência para podermos realizar a pesquisa, mesmo com todos os empecilhos relacionados ao investimento em ciência que há tempos assola nosso país. Não há como descrever o quanto evolui no meio acadêmico e isso não seria possível sem você. Obrigada.

A todos os professores da graduação e da pós-graduação. Vocês foram fundamentais para meu aprimoramento como profissional. Destaco o Prof. Dr. Rômulo por sua excelente disciplina de bioestatística, que me forneceu uma ampla aprendizagem de uma ferramenta essencial para um pesquisador. E ao Prof. Dr. Luiz Carlos, por ser um professor e pesquisador incrível e uma pessoa querida.

À minha família, por serem compreensivos e me apoiarem mesmo a distância. Sou grata especialmente à minha mãe Ana e ao meu irmão José Neto, que sempre estiveram comigo neste processo. Agradeço, ainda, os meus primos Rogerio e Samantha, por fazerem nossas vidas mais felizes. A infância é uma fase linda, e vocês me inspiram. Portanto, agradeço imensamente todo apoio e amor da minha família! Destaco minha avó Aurinete; minhas tias Geovana, Silvana, Viviane e Andreia; e meu tio Luiz, que todos os dias bem cedo me envia “bom dia” no WhatsApp; és um ícone. Amo vocês!

Ao meu namorado Raphael, por ser meu parceiro nesses quase dois anos. Você foi muito importante nesse período, e sua luta me inspira. Sou ainda mais grata por trazer contigo o Luck e o Snow. Amo vocês!

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFis) que estiveram presentes durante o desenvolvimento dessa pesquisa. Quero destacar, com muito

carinho, minhas amigas Cláudia, Natália e Evelyn por tornarem esse período mais leve e divertido.

Aos colaboradores que com muita dedicação fizeram parte dessa pesquisa, tornando-a mais robusta. Vocês foram fundamentais e espero que colhamos, juntos, bons frutos desse trabalho.

Aos funcionários técnicos e administrativos da UNESP por todo trabalho e dedicação, em especial, o Lincoln, que sempre esteve disponível para sanar dúvidas. Aos guardas da guarita, por zelarem pela nossa segurança e organização do prédio. Aos funcionários de manutenção e limpeza por proporem um ambiente mais agradável para realizarmos nosso trabalho.

À minha querida *teacher*, Fernanda, por toda paciência e carinho durante nossas aulas de inglês. Adorei compartilhar esse período com você e espero retomar nossas aulas em breve. Felizmente, nossa amizade permaneceu.

À minha querida amiga Simone, por ser tão presente em minha vida. Provavelmente uma das poucas pessoas que não fazem parte da minha família, mas que esteve comigo desde o início da minha graduação. Mesmo assim, considero-a como se fosse. Obrigada por nossa amizade. Sem dúvida, o sr. Valter te olha lá de cima, pois és uma filha maravilhosa. Deixo aqui minha singela homenagem a ele.

A todas as minhas amigas e todos os meus amigos da UNESP e de fora dela, que se fizeram presentes. A amizade é um laço do qual escolhemos, e sou muito feliz por cada vínculo conquistado ao longo da minha vida.

Aos doutores Fabio Lira, Gisele Nai e Patrícia Gomes, – que foram banca da minha defesa – pelas contribuições para que eu pudesse aprimorar meu trabalho. Estendo meu agradecimento também à doutora Solange Moraes, que fez parte da minha banca de qualificação.

Por fim, mas não menos importante, agradeço os animais que concederam suas vidas em prol da ciência. Garanto que não foram em vão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A verdade pode ser intrigante. Pode dar algum trabalho lidar com ela. Pode ser contraintuitiva. Ela pode contradizer ideias e preconceitos profundamente enraizados. Pode não se coadunar com o que queremos desesperadamente que seja verdade. Mas não são nossas preferências que determinam o que é verdade. (...) Para mim, é melhor compreender a realidade como ela é de fato do que persistir no engano, por mais satisfatório e tranquilizador que possa parecer.

Carl Sagan

(1934 - 1996)

RESUMO

Introdução: O exercício físico é capaz de promover adaptações positivas no músculo esquelético, principalmente nas mitocôndrias; mas os mecanismos destas alterações fisiológicas ainda não estão totalmente esclarecidos. Há indícios de que marcadores epigenéticos estejam influenciando tais mudanças. **Objetivo:** Analisar o envolvimento da metilação do DNA nas alterações fisiológicas ocasionadas pelo treinamento resistido dinâmico (TRD) em fibras musculares esqueléticas oxidativa, glicolítica e mista de ratos saudáveis. **Métodos:** Vinte e dois ratos machos Wistar adultos jovens foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Controle (C) e Treinado (T). Após realização do teste de Carga Máxima (CM), os animais do grupo T realizaram o TRD durante 8 semanas subindo em escada vertical com adição progressiva de carga a cada semana. A força foi avaliada pelo teste de CM em diferentes momentos ao decorrer da intervenção. Após a eutanásia sob anestesia, os músculos esqueléticos extensor longo dos dedos (EDL), gastrocnêmio (G) e sóleo (S) foram removidos para: 1) análise de metilação global do DNA; 2) avaliação histopatológica; 3) quantificação de expressão de proteínas mitocondriais NRF2 e TFAM, e 4) determinação do consumo de oxigênio apenas no músculo misto gastrocnêmio. Para análise estatística, os dados foram analisados pelo teste T de Student não pareado. Todavia, outros testes foram recorridos a depender da normalidade assumida e do objetivo estipulado para cada variável. Valores de P inferiores a 5% ($p < 0,05$) foram considerados significantes. **Resultados:** Os animais do grupo T conquistaram um aumento da força avaliada pelo teste de CM ($p < 0,003$) após 8 semanas de TRD. A metilação global do DNA foi semelhante entre os grupos C vs. T para os músculos EDL ($p = 0,437$), G ($p = 0,929$) e S ($p = 0,976$), porém, observou-se que o músculo misto gastrocnêmio apresentou maior percentual de metilação comparado aos demais músculos. Não foram encontradas diferenças no diâmetro dos músculos ($p = 0,799$; $p = 0,778$ e $p = 0,748$, respectivamente), assim como a ausência de fibrose ($p = 0,556$, $p = 0,268$ e $p = 0,531$) e de alteração na estocagem de glicogênio ($p = 0,556$, $p = 0,459$ e $p = 0,808$) entre os grupos. A expressão de proteína mitocondrial NRF2 e TFAM nos diferentes músculos EDL (NRF2: $p = 0,0641$; TFAM: $p = 0,1677$), G (NRF2: $p = 0,7116$; TFAM: $p = 0,7037$) e S (NRF2: $p = 0,9510$; TFAM: $p = 0,6088$) foi semelhante entre os grupos. Também não foi observada alterações em variáveis relacionadas ao consumo de oxigênio no músculo misto (SCRSucc - $p = 0,121$, RCRADP - $p = 0,766$, FCRL -

$p=0,618$ e FCRPI - $p=0,134$). **Conclusão:** Podemos concluir que o TRD de 8 semanas aumentou a força muscular, mas não promoveu alterações estruturais e em sua composição nas diferentes fibras musculares, nem afetou a metilação global do DNA. Ainda, foi observado que o percentual de metilação global do DNA foi extremamente variável nos diferentes tipos de fibras musculares, independentemente do TRD; sugerindo que cada fibra possui seu próprio potencial de metilação, com ou sem intervenção externa. Nesse sentido, sugere-se que a alteração na força não esteve envolvida nas modificações da metilação global do DNA, nem ocasionou alterações na atividade mitocondrial de fibras musculares oxidativas, glicolíticas e mistas de ratos saudáveis.

Palavras-chave: Epigenética; fenótipo; metilação de DNA; músculo esquelético; treinamento de força.

ABSTRACT

Introduction: Physical exercise is able to promote positive promoters in skeletal muscle, mainly in mitochondria; but the mechanisms of these physiological changes are still not fully understood. There are indications that epigenetic markers are influencing such changes. **Objective:** To analyze the involvement of DNA methylation in the physiological alterations caused by dynamic resistance training (DRT) in oxidative, glycolytic and mixed skeletal muscle fibers of healthy rats. **Methods:** Twenty-two young adult male Wistar rats were randomly divided into two groups: Control (C) and Trained (T). After completing the Maximum Load (ML) test, the animals in the T group performed DRT for 8 weeks, climbing a vertical ladder with progressive addition of load each week. The strength was assessed using the ML test at different times during the intervention. After euthanasia under anesthesia, the skeletal muscles extensor digitorum longus (EDL), gastrocnemius (G) and soleus (S) were removed for: 1) global DNA methylation analysis; 2) histopathological evaluation; 3) quantification of NRF2 e TFAM mitochondrial protein expression, and 4) oxygen consumption analysis only in the gastrocnemius oxidative-glycolytic muscle. Data were analyzed by unpaired Student's t test. However, other tests were used depending on the assumed normality and the stipulated objective for each variable. P values less than 5% ($p < 0.05$) were considered significant. **Results:** The animals in the T group achieved an increase in strength assessments by the CM test ($p < 0.003$) after 8 weeks of DRT. The global DNA methylation was similar between C vs T rats for the muscles EDL ($p = 0.437$), G ($p = 0.929$) and S ($p = 0.976$), however, it was observed that the gastrocnemius muscle had a higher percentage of methylation compared to other muscles. No differences were found either in the diameter of these muscle fibers ($p = 0.799$, $p = 0.778$ and $p = 0.748$, respectively), as well as the absence of fibrosis ($p = 0.556$, $p = 0.268$ and $p = 0.531$) and changes in storage of glycogen ($p = 0.556$, $p = 0.459$ and $p = 0.808$). The expression of mitochondrial protein NRF2 and TFAM in the different muscles EDL (NRF2: $p = 0.0641$; TFAM: $p = 0.1677$), G (NRF2: $p = 0.7116$; TFAM: $p = 0.7037$) and S (NRF2: $p = 0.9510$; TFAM: $p = 0.6088$) was similar between the groups. No changes were observed in variables related to oxygen consumption in the mixed muscle (SCRSucc - $p = 0.121$, RCRADP - $p = 0.766$, FCRL - $p = 0.618$ and FCRPI - $p = 0.134$). **Conclusion:** We can conclude that the 8-week DRT increased muscle strength, but did not promote structural changes in different muscle fibers and their

composition, nor did it affect global DNA methylation. Furthermore, it was observed that the percentage of global DNA methylation was extremely variable in different types of muscle fibers, regardless of DRT; suggesting that each type of muscle fiber has its own potential for methylation, with or without external intervention. Thus, it is understood that the change in strength does not involve changes in global DNA methylation, as well as changes in mitochondrial activity of oxidative, glycolytic and mixed muscle fibers of healthy rats.

Keywords: DNA methylation; epigenetics; phenotype; skeletal muscle; strength training.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Inclusão da epigenética na compreensão do desenvolvimento.....	19
Figura 2: Molécula de citosina transformando-se em 5-mC.....	20
Figura 3: Vias da biogênese ativadas pelo exercício físico.....	22
Figura 4: Escada utilizada para o treinamento.....	26
Figura 5: Protocolo do TRD de 8 semanas.....	27
Figura 6: Linha temporal da intervenção realizada.....	28
Figura 7: Ganho de peso corporal por grupo.....	37
Figura 8: Consumo de ração durante as semanas.....	38
Figura 9: Ganho de força acompanhado pelo teste de CM.....	40
Figura 10: Momentos de ganho de força pelo teste de CM.....	41
Figura 11: Momentos pré e pós intervenção pelo teste de CM.....	42
Figura 12: Aderência de cada animal ao treinamento.....	43
Figura 13: Representação dos valores de metilação nos músculos.....	45
Figura 14: Comportamento da metilação em cada músculo.....	45
Figura 15: Análise histopatológica do músculo EDL.....	46
Figura 16: Análise histopatológica do músculo G.....	47
Figura 17: Análise histopatológica do músculo S.....	47
Figura 18: Blots das amostras em ensaio de <i>Western Blotting</i>	49
Figura 19: Blots das amostras dos músculos EDL, G e S.....	49
Figura 20: Expressão da proteína mitocondrial NRF2.....	50
Figura 21: Expressão da proteína mitocondrial TFAM.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação do peso corporal inicial, final e seguimento entre grupos.....	36
Tabela 2: Valores dos testes de Carga Máxima.....	39
Tabela 3: Valores gerais de metilação global do DNA.....	44
Tabela 4: Comparação dos dados de metilação global do DNA entre grupos.....	44
Tabela 5: Valores de consumo de oxigênio entre grupos.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FCT: Faculdade de Ciências e Tecnologia

UNESP: Universidade Estadual Paulista

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

UNOESTE: Universidade do Oeste Paulista

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

RNA: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

mtDNA: *Mitochondrial DNA* (DNA mitocondrial)

DNMT: *DNA methyltransferase* (DNA metiltransferase)

DNMT3A: *DNA methyltransferase 3A* (DNA metiltransferase 3A)

DNMT3: *DNA methyltransferase T3* (DNA metiltransferase T3)

DNMT1: *DNA methyltransferase T1* (DNA metiltransferase T1)

TET: *Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase* (translocação de dez-onze, metilcitosina dioxigenase)

DMPs: *Differentially methylated positions* (posições diferencialmente metiladas)

5-mC: 5-metilcitosina

miRNA: MicroRNA

CH₃: Grupo metil

H₂O: Água

EDL: *Extensor digitorum longus* (extensor longo dos dedos)

HE: Hematoxilina-eosina

TM: Tricrômio de Masson

PAS: *Periodic acid-Schiff* (ácido periódico de Schiff)

CGA: Campo de grande aumento

NRF1: *Nuclear respiratory factor 1* (fator respiratório nuclear 1)

NRF2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2)

TFAM: *Transcription factor A, mitochondrial* (fator de transcrição mitocondrial A)

mTOR: *Mammalian target of rapamycin* (alvo mamífero da rapamicina)

AMPK: *AMP-activated protein kinase* (proteína quinase ativada por AMP)

PGC-1α: *Peroxisome proliferator gamma coactivator 1 alpha* (proliferador de peroxissoma gama coativador 1 alfa)

SIRT1: *Sirtuina 1* (sirtuina 1)

ATP: *Adenosine triphosphate* (adenosina trifosfato)

ADP: *Adenosine diphosphate* (adenosina difosfato)

AMP: *Adenosine monophosphate* (adenosina monofosfato)

ROS: *Role of reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

OXPHOS: *Oxidative phosphorylation* (fosforilação oxidativa)

CM: Carga máxima

1RM: Uma repetição máxima

H₀: Hipótese nula

H₁: Hipótese alternativa

h: Hora

min: Minuto

cm: Centímetro

mm: Milímetro

mm²: Milímetro quadrado

mg: Miligrama

kg: Quilograma

g: Grama

g/L: Gramas por litro

mg/kg: Miligrama por quilograma

mg/mL: Miligrama por mililitro

mg/dL: Miligrama por decilitro

mol/L: Molar por litro

mmol/L: Milimolar por litro

nm: Nanograma

M: Molar

mM: Milimolar

rpm: Rotações por minuto

μ: Micro

μl: Microlitro

μg: Micrograma

mL: Mililitro

pH: Potencial hidrogeniônico

IgG: imunoglobulina G

HRP: *Horseradish peroxidase* (peroxidase de rábano)

HDL: *High density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidade)

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EGTA: *Egtazic acid* (ácido egtazic)

MiR05: *Mitochondrial Respiration Buffer*

Na: Sódio

NaCl: Cloreto de sódio

MgCl₂: Cloreto de magnésio

KH₂PO₄: Fosfato monopotássico

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* (agente tamponante de ácido sulfônico zwitteriônico)

SDS: *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (fluoreto de fenilmetilsulfonil)

HCl: ácido clorídrico

APS: *Ammonium persulfate* (persulfato de amônia)

BSA: *Bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)

PBS: *Phosphate-buffered saline* (tampão fosfato-salino)

SPSS: *Statistical Packages for Social Sciences*

IC: Intervalo de confiança

DP: Desvio padrão

ANOVA: Análise de variância

SCRSucc: *Substrate Control Ratio for Succinate*

RCRADP: *Respiratory Control Ratio for ADP*

FCRL: *Flux Control Ratio for Leak Respiration*

FCRPI: *Flux Control Ratio for Complex I*

AU: *Arbitrary unit* (unidade arbitrária)

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

LISTA DE SIMBOLOS

%: Porcentagem

°C: Graus celsius

(): Parênteses

±: Mais ou menos

<: Menor que

/: Por

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Formação do campo da epigenética.....	18
1.2. Definição do termo “epigenética”.....	18
1.3. Metilação do DNA: um marcador epigenético.....	19
1.4. Epigenética e exercício físico.....	20
1.5. Adaptações no músculo frente ao exercício físico.....	21
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	23
3. OBJETIVO.....	24
3.1. Objetivo geral.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. Amostra.....	25
4.2. Treinamento resistido dinâmico (TRD).....	26
4.3. Eutanásia.....	27
4.4. Análises.....	28
4.4.1. Análise da metilação global do DNA.....	28
4.4.2. Análise do teste de Carga Máxima.....	30
4.4.3. Análise histopatológica (HE, TM e PAS).....	30
4.4.4. Quantificação das proteínas mitocondriais.....	31
4.4.5. Análise de consumo de oxigênio.....	33
5. ANÁLISE E TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	33
5.1. Análise estatística geral.....	33
5.2. Descrição da análise estatística de cada variável.....	34
6. RESULTADOS.....	36
6.1. Dados de peso corporal.....	36
6.2. Consumo geral de ração.....	37
6.3. Ganhos de força pelos testes de Carga Máxima.....	38
6.4. Dados de aderência ao treinamento.....	42
6.5. Valores de metilação global do DNA (EDL, G e S).....	43
6.6. Histopatologia (EDL, G e S).....	46
6.7. Dados de consumo de oxigênio (G).....	48
6.8. Quantificação de proteínas NRF2 e TFAM (EDL, G e S).....	48

7. DISCUSSÃO.....	51
8. CONCLUSÃO.....	55
9. REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO 1.....	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 Formação do campo da epigenética

No início de 1940, Conrad H. Waddington (1905-1975) definiu o campo da epigenética em seu clássico trabalho *"The epigenotype"* (VAN SPEYBROECK, 2006; WADDINGTON, 1942), abrindo possibilidades e interesse de pesquisadores e estudiosos no assunto. Como consequência dessa notoriedade, observou-se inconsistências no que diz respeito à definição do termo "epigenética" e seu real objetivo na análise de fenômenos (DEANS et al., 2015; HOLLIDAY, 1994). Debates sobre a natureza que fundamentava o desenvolvimento do organismo dividiam embriologistas e afins em duas teorias, havendo àqueles que defendiam que a complexidade do ser já era alcançada desde o embrião inicial (pré-formação) e os que acreditavam que essa complexidade se expandia ao longo do desenvolvimento (epigênese) (DEANS et al., 2015; FELSENFELD, 2014; VAN SPEYBROECK, 2006).

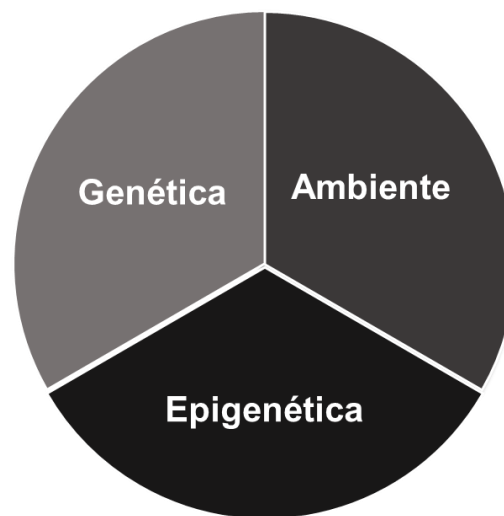
Com uma visão direcionada à embriologia e genética, Waddington acreditava que ambas poderiam ser complementares, possuindo uma relação flexível entre a genética e o ambiente (Figura 1) (DEANS et al., 2015; VAN SPEYBROECK, 2006; WADDINGTON, 1959). David L. Nanney (1925-2016) agregou às ideias de Waddington correlacionando marcadores epigenéticos na regulação de genes específicos. Mais que isso, Nanney propôs que esses estados regulados poderiam perpetuar durante e após a divisão celular (HAIG, 2004; NANNEY, 1958). Dentre vários autores que acrescentaram e discutiram sobre uma abordagem mais concreta no campo da epigenética, Robin Holliday (1932-2014) abriu um caminho por incluir a herdabilidade como um fator possível e presente, verificado por estudos sobre o padrão de metilação do DNA (DEANS et al., 2015; HAIG, 2004; HOLLIDAY et al., 1975; NANNEY, 1958).

1.2 Definição do termo "epigenética"

A definição do termo "epigenética" pode variar a depender da abordagem proposta, haja vista sua vasta possibilidade de análises e objetivos a serem alcançados. Com embasamento teórico e prático, Deans et al. (2015) propuseram uma definição, sendo: "o estudo de fenômenos e mecanismos que causam alterações hereditárias ligadas ao cromossomo na expressão do gene que não depende de alterações na sequência de DNA". Apesar de parte desses padrões de modificações

serem adquiridos por fatores hereditários, eles também são impactados por fatores extrínsecos (ambiente) (JACQUES et al., 2019). Por este motivo, e pela forma no qual o assunto será tratado neste estudo, definiremos epigenética como sendo uma modificação multinível capaz de regular padrões de atividade gênica, mas que não interfere na sequência do DNA (SEABORNE et al., 2020; WIDMANN et al., 2019).

Figura 1. Inclusão da epigenética na compreensão do desenvolvimento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Waddington quebrou paradigmas incluindo a epigenética como mais uma possibilidade, sobre as únicas duas teorias do desenvolvimento da época (pré-formação (genética) vs. epigênese (ambiente)).

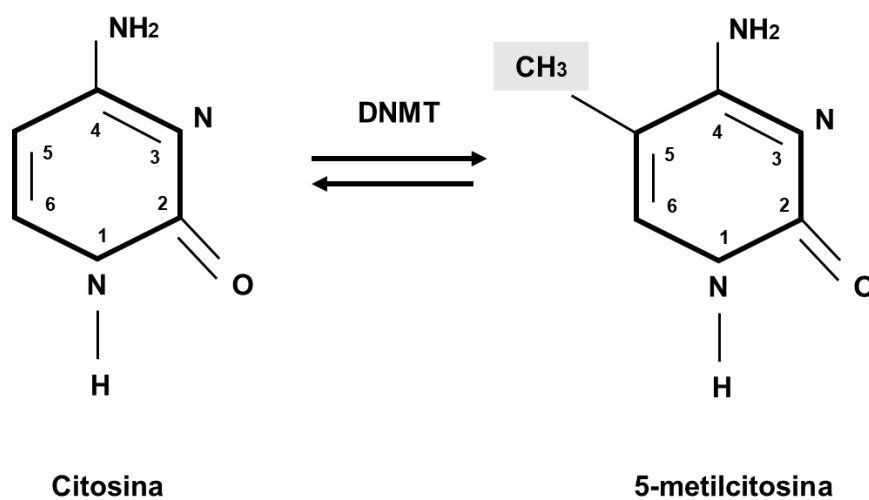
1.3 Metilação do DNA: um marcador epigenético

Os principais mecanismos epigenéticos são: 1) metilação do DNA, 2) modificações de histonas e, 3) RNAs não codificantes (como por exemplo, miRNA). Estes são caracterizados por suas capacidades em alterar a conformação do DNA e da cromatina podendo ativar ou inibir a expressão gênica (SEABORNE et al., 2018; COSTA et al., 2013; BARRÈS et al., 2012).

Sendo o primeiro marcador a ser descrito (HOLLIDAY et al., 1975), a metilação do DNA fundamenta-se em uma única modificação covalente de uma base de citosina transferindo um grupo metil (CH_3) ao carbono 5, constituindo a 5-metilcitosina (5-mC) (Figura 2) (JACQUES et al., 2019). Essa reação é catalisada pelas enzimas DNMT3A e DNMT3B, constituintes da família *DNA metiltransferase* (DNMT). Já a DNMT1, outra

enzima dessa família, está envolvida na permanência da metilação ao longo da divisão celular (JACQUES et al., 2019; YONG et al., 2016; LI et al., 2014). Vale ressaltar que é possível observar a reação oposta, caracterizada pela remoção do grupo metil (WEINHOLD, 2006). Nesta circunstância, são as enzimas da família *ten-eleven translocation* (TET) que atuam na desmetilação do DNA (JACQUES et al., 2019; WEINHOLD, 2006).

Figura 2. Molécula de citosina transformando-se em 5-mC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como mencionado, fatores ambientais são potenciais desencadeadores de tais alterações. Posto isso, a avaliação da metilação do DNA tem sido frequentemente recorrida para solucionar questões biológicas, fazendo-se importante na correlação de eventos (SEABORNE et al., 2020; JACQUES et al., 2019; WIDMANN et al., 2019; McGEE et al., 2019), diferenciando sua interação como sendo responsiva ou causal (DEANS et al., 2015).

1.4 Epigenética e exercício físico

A noção de que as adaptações do organismo não dependiam apenas do código genético ou das alterações na sequência do DNA, possibilitou melhor entendimento sobre a influência ambiental e comportamental na qual o indivíduo possa ser submetido. Exemplo disso é o próprio exercício físico (JACQUES et al., 2019; WIDMANN et al., 2019). No músculo esquelético, o ato isolado de contração muscular

já é capaz de promover modificações importantes para o funcionamento deste tecido (SEABORNE et al., 2018). Quando sistematizado, periodizado e havendo constância, tem a capacidade de proporcionar adaptações morfológicas, metabólicas e funcionais benéficas, tanto locais como sistêmicas (JACQUES et al., 2019; WIDMANN et al., 2019; SEABORNE et al., 2018; BARRÈS et al., 2012). Essas mudanças são mediadas por mecanismos moleculares complexos, sendo estes reguladores transcricionais, co-traducionais e pós-traducionais (JACQUES et al., 2019; COSTA et al., 2013).

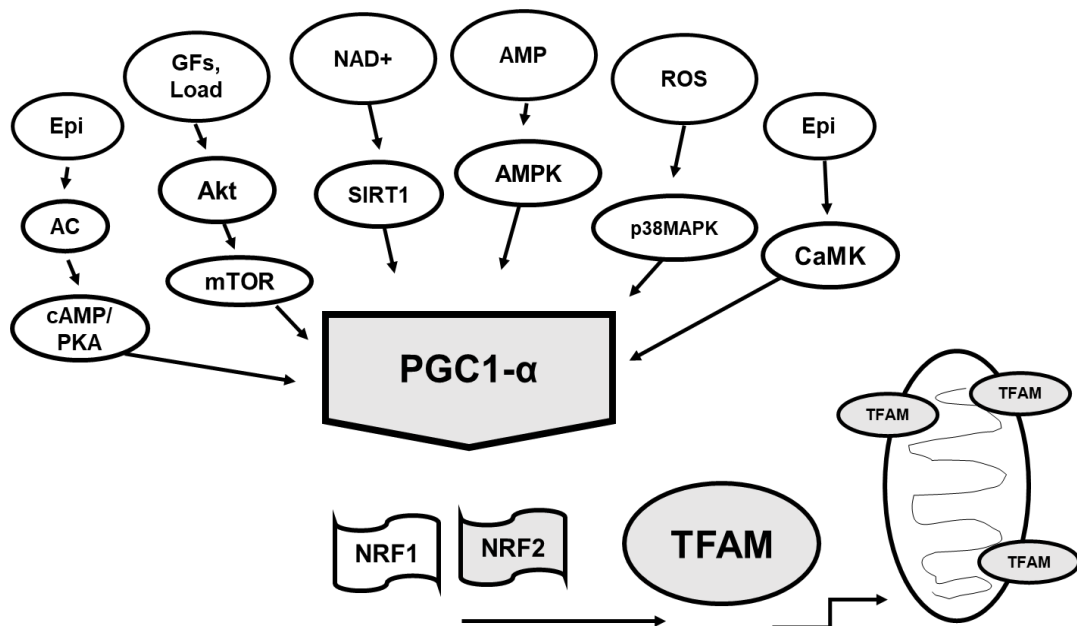
1.5 Adaptações no músculo frente ao exercício físico

Existe um equilíbrio entre degradação e síntese de proteínas no músculo esquelético, para a manutenção de um ambiente adequado e favorável para possíveis adaptações (ILHA et al., 2018). No tecido saudável, biomarcadores são ativados e estão bem expressos, sendo o caso de vias contendo como proteínas principais AMPK (proteína quinase ativada por AMP), mTOR (alvo mamífero da rapamicina) e seus complexos multiproteicos mTORC1 e mTORC2, SIRT1 (sirtuína 1), PGC1 alfa (proliferador de peroxissoma gama coativador 1 alfa) e TFAM (fator de transcrição mitocondrial A) (ILHA et al., 2018; YOON et al., 2019; OGASAWARA et al., 2016). As adaptações moleculares da musculatura esquelética são variadas, e contam com a melhora do conteúdo proteico levando à hipertrofia, otimizando a força, favorecendo o ambiente celular – em especial – a composição energética mitocondrial (OGASAWARA et al., 2016; DRAKE, et al., 2016; SCHOENFELD 2013; JØRGENSEN et al., 2006).

A biossíntese dessas e outras proteínas na musculatura esquelética acontecem por alguns fatores, e o treinamento resistido é um deles (ILHA et al., 2018; OGASAWARA et al., 2016; WILKINSON et al., 2008; DREYER et al., 2006). Durante esse tipo de atividade física, as células utilizam a energia advinda da molécula de ATP (adenosina trifosfato) que após o processo de quebra, torna-se ADP (adenosina difosfato), e em seguida, AMP (adenosina monofosfato). A percepção de que a atividade energética está elevada proporciona a ativação da AMPK, promovendo a ascensão de várias vias catabólicas (YOON et al., 2019). Em suma, o estresse ocasionado pelo exercício físico é capaz de mediar várias vias envolvidas no metabolismo celular (degradação e síntese de proteínas, respostas antioxidantes, absorção de gorduras) (YOON et al., 2019; ILHA et al., 2018). A biogênese

mitocondrial é alvo de vários estudos, especialmente quanto ao treinamento aeróbio. No entanto, estudos já demonstram que o treinamento resistido pode favorecer a respiração celular de forma ampla (Figura 3) (HUANG et al., 2019; LEE et al., 2018; DRAKE et al., 2016; PORTER et al., 2015; SCHNYDER et al., 2015)

Figura 3. Vias da biogênese ativadas pelo exercício físico.



Fonte: Adaptado de (THEILEN et al., 2017).

Legenda: Vias da biogênese mitocondrial. O estímulo externo ocasiona o aumento de fatores circulantes (AMP, NAD⁺, entre outros), nos quais esses ativam o PGC-1 α (proliferador de peroxissoma gama coativador 1 alfa), que se caracteriza por ser uma ligação entre diversas cascatas de sinalização ativadas pelo exercício físico, como também por desempenhar um papel central na regulação do metabolismo energético celular atuando na modulação de diferentes genes. Por sua vez, o PGC-1 α interage com os fatores respiratórios nucleares 1 e 2 (NRF1 e NRF2), e esses regulam o processo de transcrição e replicação mitocondrial. Por conseguinte, esses fatores possibilitam a transcrição da proteína TFAM (fator de transcrição mitocondrial A), – moduladora chave da biogênese mitocondrial – em que seu papel se baseia em regular a expressão do mtDNA (DNA mitocondrial). Dessa forma, a proteína TFAM liga-se ao mtDNA a fim de protegê-lo das ROS (espécies reativas de oxigênio) e de várias formas de degradação, fazendo-se possível sua plena transcrição. Quando tais eventos ocorrem, torna-se viável a biogênese de proteínas mitocondriais e o

resultante aumento da função mitocondrial no tecido muscular (GROENNEBAEK et al., 2017; THEILEN et al., 2017; KANG et al., 2016; VALERO 2014).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A relevância desse estudo se dá pela ampliação do conhecimento sobre a capacidade do tecido muscular em se adaptar ao exercício físico. Além disso, trará perspectivas futuras agregando na literatura ao tema referente à modulação epigenética (metilação do DNA) ocasionada pelo exercício – um campo ainda muito jovem. Uma recente revisão sistemática realizada por Jacques, *et al.* (2019), apontou lacunas importantes na área da epigenética do exercício, não completamente respondidas com base em baixos tamanhos amostrais de estudo em humanos, variações entre idade, sexo, tempo de intervenção e modalidade de treinamento, além da fraca abordagem na diferença entre tipos de fibras musculares e no impacto desses marcos epigenéticos induzidos pelo treinamento resistido nas adaptações fisiológicas do indivíduo.

Devido à impossibilidade de coletar quantidade suficiente para os ensaios propostos no estudo dos três músculos esqueléticos – exceto quando submetido à cirurgia – faz-se necessária a utilização de animais. A submissão do indivíduo à cirurgia já é um empecilho de sua utilização no estudo, principalmente com os indivíduos controles. Além disso, o estudo não poderia ser realizado *in vitro* ou *in silico*, uma vez que objetivamos investigar o impacto do treinamento resistido considerando sua ação no organismo como um todo. Ainda, como almejamos avaliar os parâmetros-alvos após intervenção, utilizaremos modelos animais vivos e não células isoladas (ou qualquer outro modelo alternativo) para qualificação do estudo. Neste contexto, optamos por utilizar ratos Wistar (*rattus norvegicus*) por ser uma linhagem amplamente utilizada em estudos científicos e que apresenta certa semelhança fisiológica com os seres humanos.

Hipótese nula (H_0)

Não haveria alteração no padrão de metilação do DNA em músculos esqueléticos (EDL, G e S) de ratos que realizaram treinamento resistido durante 8 semanas.

Hipótese alternativa (H_1)

Haveria alteração no padrão de metilação do DNA em músculos esqueléticos (EDL, G e S) de ratos que realizaram treinamento resistido por 8 semanas em comparação aos não treinados. Havendo, possivelmente, uma hipometilação nos treinados e hipermetilação nos controles.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Analisar o envolvimento da metilação do DNA nas alterações fisiológicas ocasionadas pelo treinamento resistido dinâmico (TRD) em tecido muscular esquelético oxidativo, glicolítico e misto de ratos saudáveis.

3.2 Objetivos específicos

Para devida compreensão do impacto do protocolo de treinamento no tecido muscular, além da metilação global do DNA, foram analisados parâmetros funcionais e estruturais, como também foi realizada uma avaliação da atividade mitocondrial, como segue:

A) Metilação global do DNA:

- Porcentagem de metilação global do DNA em músculo oxidativo, glicolítico e misto;

B) Eficácia do protocolo de treinamento resistido de 8 semanas através de:

- Determinação do ganho de força muscular pelo teste de Carga Máxima;
- Aderência ao treino;
- Análise histopatológica dos músculos;

C) Parâmetros utilizados para avaliar respostas fisiológicas frente ao treinamento:

- Quantificação proteínas da biogênese mitocondrial (NRF2 e TFAM) nos músculos;
- Avaliação da função mitocondrial através da análise de consumo de oxigênio no músculo gastrocnêmio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

Todas as intervenções foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (FCT/UNESP) campus de Presidente Prudente, Brasil (protocolo nº 01/2020), obedecendo os preceitos éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Caracterizado como um estudo experimental randomizado, vinte e dois ratos machos Wistar provenientes do Biotério Central da UNESP - campus de Botucatu, com 50 dias de vida e pesando 200 ± 50 g foram alocados no Biotério II da FCT/UNESP - campus de Presidente Prudente, com umidade, temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro 12/12h (7h00min/19h00min) controlados. De forma aleatória (mediante sorteio *online*), os animais foram devidamente separados em 2 ratos por gaiola e divididos em dois grupos: Controle (C/n=11) e Treinado (T/n=11).

Os animais foram alocados e permaneceram sem qualquer tipo de intervenção durante 18 dias para devida adaptação ao ambiente, e para que atingissem a idade adulta jovem (2 meses de idade). Após 18 dias de adaptação ao ambiente e 3 dias de adaptação à escada vertical utilizada no treinamento, totalizando 3 semanas de adaptação, o teste de Carga Máxima (CM) foi realizado, obtendo-se a maior carga da escalada única de cada rato. A chamada “Carga Máxima” para este modelo animal objetivou refletir o método clínico de avaliação conhecido como 1RM (Uma Repetição Máxima), visando mensurar força muscular máxima.

Durante o período de permanência dos ratos no Biotério II, ração padrão para roedores (Alisul, Brasil) e água filtrada foram ofertadas livremente. A alimentação foi acompanhada por meio de pesagem em balança digital (Commerce, Brasil) com frequência de 2 vezes por semana, a fim de controlar o consumo de ração por gaiola, como sendo também um indicativo de bem-estar animal. Além disso, o peso corporal foi averiguado 1 vez por semana ao longo das semanas de permanência dos animais. A limpeza geral do biotério, lavagem das caixas de prolipropileno e as trocas das maravalhas eram realizadas 2 vezes por semana.

4.2 Treinamento resistido dinâmico (TRD)

A intervenção foi realizada utilizando-se uma escada vertical (Insight Ltda., Brasil) com inclinação de 80°, altura de 1110mm, base de 300mm x 350mm e distância entre os degraus de 6mm. Na fase de adaptação ao equipamento, todos os animais pertencentes ao grupo Treinado (T) realizaram 2 sessões com intervalo de 24h, realizando 3 escaladas sem carga por animal. Em seguida, foi realizado o teste de Carga Máxima (CM), com carga inicial determinada como 50% do peso corpóreo do animal. Anilhas de peso foram colocadas dentro de luvas que foram fixadas à porção proximal da cauda do animal. Ao completar a escalada, 30g eram adicionadas à carga que estava acoplada. Caso durante esse processo de progressão o rato não conseguisse realizar a escalada completa ou apresentava tremores nas patas, era determinada como CM a última carga utilizada na escalada sem falhas. Foram realizadas no máximo 8 escalas com intervalo de 1min entre elas (IRVING et al., 2015). A figura 4 apresenta a escalada do animal e a carga acoplada.

A intervenção ocorreu de forma progressiva, iniciando com 50% da CM e progredindo para 65%, 80% e 95%. Ao final da 4ª semana, o teste de CM foi realizado novamente para averiguação de ganho de força e readaptação da carga para continuidade da intervenção. Após o segundo teste de CM, o treinamento iniciou-se em 65%, progredindo para 75%, 85% e 95%. O treinamento consistiu em três escaladas da 1ª à 6ª semana, e quatro escaladas nas semanas 7 e 8 (Figura 5). O descanso ofertado entre as repetições sempre foi de 1min.

Figura 4. Escada utilizada para o treinamento.



Fonte: Arquivo do laboratório GPFis.

Figura 5. Protocolo do TRD de 8 semanas.

Semana	% CM	Escaladas
Primeiro teste de CM*		
Semana 1	50	3
Semana 2	65	3
Semana 3	80	3
Semana 4	95	3
Segundo teste de CM**		
Semana 5	65	3
Semana 6	75	3
Semana 7	85	4
Semana 8	95	4
Último teste de CM***		

Fonte: Elaborado pelo autor.

*Primeiro teste de CM iniciou o protocolo de TRD, começando com 50% da CM do animal e evoluindo 15% do valor, semanalmente, nas primeiras 4 semanas.

**Segundo teste de CM realizado para readaptação do valor da carga, começando com 65% e evoluindo 10%, semanalmente.

***Último teste de CM realizado para a avaliação do efeito do protocolo de TRD de 8 semanas.

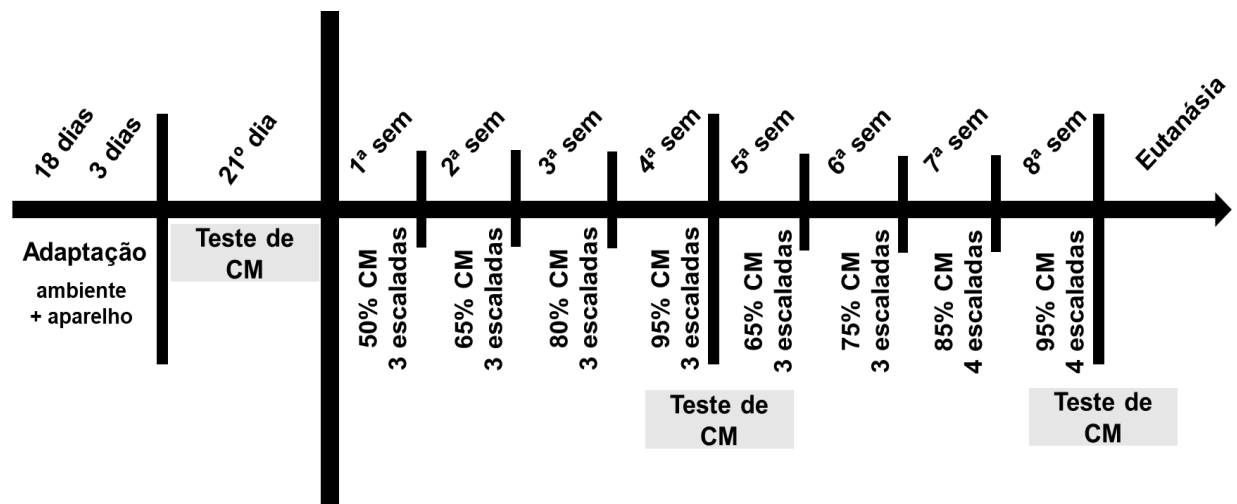
O treinamento sempre foi realizado no período matutino (9h00min, horário de Brasília/DF), com frequência de 3 vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras) durante 8 semanas, totalizando 24 sessões.

4.3 Eutanásia

A eutanásia ocorreu sob anestesia com cloridrato de cetamina (60mg/kg peso corporal) e xilazina (10mg/kg peso corporal) que foram injetadas via intraperitoneal após 12h de jejum e 24h do último dia de treinamento (Figura 6). A remoção dos

tecidos foi efetuada após a ausência do reflexo da retirada da pata, no qual os animais foram posicionados em pronação e realizada laparotomia mediana. Foram coletados os músculos esqueléticos extensor longo dos dedos (EDL), gastrocnêmio (G) e sóleo (S). Todos os tecidos foram pesados e armazenados em nitrogênio líquido, e outra parte armazenada em formalina tamponada a 10% para avaliação histopatológica. O sangue também foi coletado por punção cardíaca.

Figura 6. Linha temporal da intervenção realizada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: CM: Carga Máxima; Sem: semana.

4.4 Análises

4.4.1 Análise da metilação global do DNA

A análise epigenética foi baseada nos valores de metilação global do DNA. Para isso, foi efetuada a extração do DNA genômico dos músculos extensor longo dos dedos (EDL), gastrocnêmio (G) e sóleo (S), e realizada a quantificação do DNA metilado.

Etapas 1: Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico dos músculos (EDL, G e S) foi realizada por meio de protocolo padrão, no qual 50mg de tecido foram macerados e transferidos para tubos onde foi adicionado 500ul de solução de lise, contendo Tris 1 M (pH 8), EDTA 0,5 M, SDS 10%, NaCl 5 M e H₂O *nuclease free*; e adicionados 10ul de RNase A e

10ul de Proteinase K em cada tubo. As amostras foram colocadas em banho-maria a 55°C sob agitação a 700rpm, por cerca de 2h. Foram adicionados 500ul de solução contendo fenol, clorofórmio e álcool isoamílico em proporções de 25:25:1, respectivamente. Os tubos foram invertidos lentamente e, em seguida, centrifugados em 12.000g, a 4°C por 10min. Posteriormente, a fase superior foi transferida para um novo tubo. Foram adicionados 400ul de isopropanol e os tubos foram novamente invertidos lentamente até ser possível visualizar indícios do DNA no tubo. As amostras foram centrifugadas em 12.000g, a 4°C por 10min, e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 200ul de etanol 75% lentamente e os tubos foram agitados em vórtex. Mais uma vez, os tubos foram centrifugados em 12.000g, a 4°C por 10min. O sobrenadante foi então descartado, e o tubo foi deixado aberto em temperatura ambiente para completa secagem. Por fim, as amostras foram ressuspensas com 100ul de H₂O *nuclease free* e armazenadas a -20°C.

Etapa 2: Análise da concentração de DNA

Para verificar a concentração de DNA em cada amostra, foi realizada a dosagem em espectrofotômetro (Gene Quant Pro DNA/RNA Amersham Biosciences, Austin, EUA).

Etapa 3: Quantificação do DNA metilado

Para a análise de metilação do DNA, foi utilizado o kit de quantificação de DNA metilado (Sigma Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos da América), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 30uL de DNA diluído em DNA *binding solution* em cada poço da placa. A placa foi então coberta e incubada a 37°C por 60min. Após esse tempo, foram adicionados 150uL de *block solution* em cada poço, e incubado novamente a 37°C por 30min. Em sequência, a placa foi lavada 3x com 150uL de tampão de lavagem 1x. Na etapa de captura do DNA metilado, o anticorpo de captura (1:100) foi diluído em tampão de lavagem 1x e adicionados 50uL em cada poço. As amostras foram incubadas por 60min em temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados 4x em 150ul de tampão de lavagem 1x. O anticorpo de detecção (1:1.000) foi diluído em tampão de lavagem, e adicionados 50uL em cada poço. Novamente, a placa foi coberta e incubada por 30min em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas 5x com 150uL de tampão de lavagem 1x. Para concluir a detecção, foi adicionado o *developing solution* (100uL), a placa foi coberta e incubada em temperatura ambiente por aproximadamente 5min, sendo monitorada a reação por alteração de cor. Após a

percepção de mudança de coloração, foram adicionados 50uL de *stop solution*, alterando novamente a cor da reação, para finalmente a placa ser lida em absorbância de 450nm em leitor de microplacas (BioTek ELx808, Alemanha). Os valores encontrados foram calculados e apresentados em porcentagem em função do DNA metilado padrão.

4.4.2 Análise do teste de Carga Máxima

Para a avaliação e acompanhamento dos ganhos relacionados à força muscular no período de intervenção, foi utilizado o teste de Carga Máxima (CM). Propomos aplicar esse teste em três momentos: 1) antes de iniciar a intervenção, a fim de avaliá-los quanto a atual força com base na maior carga (g) que o animal conseguisse escalar, 2) ao fim da 4^a semana do protocolo, com intuito de observar possíveis ganhos já nesse período, e para readaptar a CM, e 3) ao fim do treinamento, para a análise do efeito deste protocolo de 8 semanas.

Em cada sessão de intervenção foram realizadas pontuações referentes ao desempenho do animal no treino. A classificação de desempenho da escalada foi dividida em: i) excelente, ii) regular, iii) realizou sem carga, e iv) não realizou. Cada classificação continha uma pontuação por escalada, sendo: excelente = 3; regular = 2; sem carga = 1; não realizou = 0. Ao final, essas pontuações foram somadas, na qual a classificação de cada sessão foi de 0 a 9. Pontuações de 0-4 foram consideradas “baixa aderência”, de 5-7 “média aderência” e 8-9 “alta aderência”. Esses dados foram tabulados e apresentados para uma melhor compreensão da qualidade do treinamento de cada animal.

4.4.3 Análise histopatológica (HE, TM e PAS)

Concluída a eutanásia, os músculos esqueléticos extensor longo dos dedos (EDL), gastrocnêmio (G) e sóleo (S) foram coletados. Esses tecidos foram seccionados em corte transversal e adicionado a formol tamponado a 10% (Cinética Indústria Química, Brasil) durante 24 horas, e submetidos a processamento histológico convencional, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, Brasil).

A importância dessa análise se deu em observar alterações principalmente na área de secção transversa, na proporção de tecido não-contrátil dos músculos

esqueléticos coletados e na estocagem de glicogênio desses músculos. Para isso, cortes de 4 μ foram adquiridos e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, Brasil) para análise estrutural do tecido, por tricrômio de Masson (TM) (Merck, Alemanha) para quantificação das fibras colágenas (não-contrátil) e por ácido periódico de Schiff (PAS) (Merck, Alemanha) para análise de estocagem de glicogênio. O processamento das lâminas foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), localizado no Campus I, Presidente Prudente/SP. Vale ressaltar que a análise histopatológica ocorreu a cega e desempenhada por um único observador habilitado, utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão). A contagem das fibras musculares na coloração HE foi realizada por uma medida de cinquenta fibras visíveis em campos de grande aumento (CGA), correspondendo a cerca de 1mm², em aumento de 400x.

4.4.4 Quantificação das proteínas mitocondriais

Para avaliar o conteúdo de proteínas mitocondriais NRF2 (1:1000) e TFAM (1:1000) em músculos esqueléticos (extensor longo dos dedos, gastrocnêmio e sóleo) foi utilizado o ensaio de *Western Blotting*.

Etapas 1: Extração de proteínas de músculos

Em tubos de 2mL, cada tecido foi homogeneizado em tampão de lise contendo EDTA 10mM (pH 7), Tris base 100mM (pH 7,5), Pirofosfato de Na 100mM, Fluoreto de Na 100mM, Ortovanadato de Na mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 2mM, Aprotinina 1mg/mL e H₂O destilada, sendo utilizada a proporção de 60mg de tecido para 600 μ L de tampão (todos os componentes do tampão foram adquiridos da Synth (Synth, Diadema, Brasil) e Sigma (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Após homogeneizada, foram adicionados 60 μ L de Triton 10% e agitada em vórtex para, em seguida, ser incubada no gelo por 40min. As amostras foram centrifugadas a 12.000g, por 30min, a 4°C. Ao final, o sobrenadante foi transferido para novo tubo e estocado em freezer -20°C até dosagem de proteínas totais.

Etapas 2: Dosagem de proteínas totais

A avaliação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford, com leitura em 590nm. Para isso, foi realizada a diluição das amostras em 25x e preparada a curva padrão utilizando BSA em 8 diferentes concentrações (1mg/mL, 0,75mg/mL, 0,5mg/mL, 0,4mg/mL, 0,2mg/mL, 0,1mg/mL, 0,05mg/mL e

Branco). Para a preparação do reagente de Bradford (Bio-Rad, Dye Reagent Concentrate, Hercules, EUA), foi utilizada a proporção de 1:5. Por fim, foram adicionados 6µl de amostra e 294µl do reagente Bradford diluído, para que fosse realizada a leitura da absorbância em leitor de microplacas (BioTek ELx808, Alemanha).

Etapa 3: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (PAGE-SDS)

Finalizada a etapa de dosagem de proteínas totais, 30µg de proteína de cada amostra foram fervidas por 5min em tampão de Laemmli constituído por Tris HCl 1 M (pH 6,8), glicerol 15%, azul de bromofenol 0,05%, SDS 10% e mercaptoetanol 6%, para que, posteriormente, as amostras fossem aplicadas em gel de poliacrilamida com Gel de empacotamento (*stacking gel*) a 4% contendo acrilamida e bisacrilamida 12%, Tris 0,5 M (pH 6,8), SDS 10% (dodecil sulfato de sódio), APS 1,5% (persulfato de amônia), Temed e H₂O destilada; e Gel de separação (*resolving gel*) a 12% constituído por acrilamida e bis+acrilamida 30%, Tris 1,5 M (pH 8,9), SDS 10%, APS 10%, Temed e H₂O destilada. A corrida eletroforética ocorreu em Tampão (*running buffer*) contendo Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%, EDTA 2H₂O e H₂O destilada. Uma alíquota de marcador (8µl) com proteínas de peso molecular (Thermo Scientific) conhecido foi sempre aplicada na primeira coluna (*lane*) de cada gel.

Na sequência, foi efetuada a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad). A transferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em tampão Tris 25 mM, Glicina 192 mM e Metanol 20%. No final da transferência, a membrana foi corada com vermelho Ponceau, por cerca de 10 min, para avaliar a qualidade da transferência e também para utilização para a normalização do conteúdo da proteína alvo. A membrana foi lavada em uma solução basal contendo solução salina tamponada com Tris 1M pH 7,5 + Tween 20 0,1%.

Etapa 4: Immunoblotting

A membrana foi incubada em solução bloqueadora (Tris HCl 0,05 M, Tween 20; NP-40, azida sódica e albumina 5%) por 1h em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas rapidamente com PBS 1x e incubadas com o anticorpo específico: anti-NRF2 (1:1.000, Abcam cat #89443), anti-TFAM (1:1.000, Abcam cat #119684).

Em seguida, a membrana foi lavada e incubada com IgG anti-coelho juntamente com HRP (Jackson ImmunoResearch Lab) diluído 1:5.000 em solução

de bloqueio durante 1h em temperatura ambiente. Após, a membrana foi lavada e as bandas foram detectadas por quimioluminescência com solução Clarity™ Western ECL Substrate (Bio–Rad, CA, EUA). As membranas foram expostas a um fotodocumentador (Amersham Imager 600 - GE Healthcare, EUA). A abundância de proteínas foi estimada por análise densitométrica das bandas usando o *software* gratuito ImageJ (NIH). O carregamento de proteína foi normalizado por membranas coradas com Ponceau.

4.4.5 Análise de consumo de oxigênio

A avaliação do consumo de oxigênio mitocondrial foi feita por intermédio de um sensor desenvolvido Grupo de Pesquisa em Eletroanalítica e Sensores (GPES) do Prof. Dr. Marcos Teixeira do Departamento de Química e Bioquímica da FCT/UNESP, campus Presidente Prudente.

A análise foi executada conforme descrito no estudo de Olean-Oliveira *et al.* (2019). Para avaliar o consumo de oxigênio pela célula muscular, primeiramente foi feita a preparação do músculo esquelético gastrocnêmio dissecando 2mg de tecido em meio MIR05 em agitação constante. Depois de preparado, o tecido foi incubado em tampão BIOPS contendo 0,5 mmol/L de EGTA, 3,0 mmol/L de MgCl₂, 60 mmol/L de ácido lactobiônico, 20 mmol/L de taurina, 10 mmol/L de KH₂PO₄, 20 mmol/L de HEPES, 0,11 mol/L de D-sacarose e 1g/L de BSA em 37°C. As taxas respiratórias: i) *Routine* (R) – atingida após adição das mitocôndrias, ii) *Leak* (L) – atingida após adição de 5 mmol/L de piruvato, e iii) *OXPHOS* (P) – atingida após adição de 5 mmol/L de succinato foram calculadas pela média das 3 últimas medidas após atingir o *steady state*.

5. ANÁLISE E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

5.1 Análise estatística geral

Os valores foram expressos em média±desvio padrão e/ou intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste T de Student não pareado, assumindo a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, com n-1 de graus de liberdade.

O nível de confiança adotado foi de 95%, com valores de P inferiores a 5% considerados estatisticamente significantes. O *software* utilizado para a análise dos dados foi o SPSS Statistics versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

5.2 Descrição da análise estatística de cada variável

Para a análise bioquímica dos animais foi utilizada estatística descritiva sendo os valores apresentados em média, desvio padrão e limite inferior e superior do intervalo de confiança (IC) de 95%. A normalidade foi verificada por meio do teste Shapiro-Wilk, em que, para todas as variáveis a normalidade foi comprovada. Após a análise geral dos dados, foi realizada a comparação entre grupos utilizando o teste T de Student não pareado.

Para a comparação da diferença do peso corporal inicial (1ª semana) e final (13ª semana) entre grupos o teste T Student pareado foi recorrido, uma vez que o conjunto de dados dessa diferença apresentou normalidade. Já para análise do peso corporal dos animais ao decorrer do estudo, foi utilizada estatística descritiva pelo teste ANOVA para medidas repetidas com ajuste do Bonferroni apenas com o fator tempo. Para avaliar o ganho de peso ao decorrer das semanas entre grupos, foi utilizado o teste ANOVA para medidas repetidas com ajuste do Bonferroni utilizando fator tempo e intervenção. Uma vez que houve significância no teste de esfericidade de Mauchly ($<0,0001$) foram considerados valores de P com correção do Greenhouse-Geisser (0,131).

Na análise de consumo de ração também foi utilizado o teste ANOVA para medidas repetidas com ajuste do Bonferroni. Novamente, no teste de esfericidade de Mauchly foram considerados valores de P com correção do Greenhouse-Geisser (0,221). É válido ressaltar que não foi possível realizar a análise considerando além do tempo, a relação entre grupos. Isso porque os animais foram aleatorizados, e a distribuição por gaiolas não permitiu essa avaliação, já que houve casos em que os animais da dupla eram de grupos distintos.

Para análise da força muscular dos animais treinados, foi realizado três testes de CM ao longo da intervenção. Para avaliar estes três momentos foi utilizado o teste ANOVA para medidas repetidas com ajuste do Bonferroni, utilizando fator tempo. No teste de Mauchly foi encontrado valor superior à 5% (0,555), sendo assumida a

esfericidade para análise. Já para comparação do momento pré e pós, foi utilizado teste Wilcoxon visto que os dados foram não paramétricos ($<0,0001$).

Para análise geral dos dados referentes à metilação global do DNA, foi realizada estatística descritiva nos três músculos (EDL, G e S) considerando os dois grupos juntos ($n=10$). Já para a análise descritiva da comparação entre os grupos, foi realizado o teste de normalidade para o conjunto de dados de cada um dos três músculos, seguindo a estatística para análise paramétrica destes dados.

Na análise da coloração em Hematoxilina-Eosina (H.E), o teste de normalidade foi realizado para cada um dos músculos, não havendo diferença entre os dados de um mesmo grupo, como também entre os grupos. Seguindo, portanto, para comparação dos grupos pelo Teste T independente. Para análise da coloração do Tricrômio de Masson (TM), a normalidade também foi comprovada em cada grupo e entre os grupos de cada músculo, seguindo para o Teste T independente. Por fim, na análise da coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS), a normalidade foi testada e confirmada pelo teste Shapiro-Wilk para os músculos gastrocnêmio e sóleo, seguindo para comparação dos grupos pelo Teste T independente. Já o músculo EDL apresentou diferença no teste de normalidade Shapiro-Wilk no grupo Treinado (0,005), seguindo, portanto, para o teste não paramétrico (Mann-whitney).

Na análise do consumo de oxigênio do músculo gastrocnêmio, foi realizada a análise comparando os grupos. A normalidade pelo teste Shapiro-Wilk foi realizada para cada uma das variáveis que caracterizam o experimento (SCRSucc, RCRADP, FCRL, FCRPI), não havendo diferença entre os grupos. Seguindo para o teste paramétrico, a igualdade de variância pelo teste de Levene não foi assumida para as variáveis SCRSucc (0,028) e FCRPI (0,030), já para RCRADP e FCRL, essa igualdade foi assumida.

Para análise de proteínas mitocondriais (NRF2 e TFAM) em cada músculo a normalidade pelo teste Shapiro-Wilk foi testada, havendo homogeneidade nas amostras do mesmo grupo e entre grupos. Seguindo para o teste paramétrico, os valores de NRF2 para todos os músculos não obteve diferença estatisticamente significativa. Também para a expressão da proteína TFAM, não houve diferença entre grupos.

Como não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em todas as variáveis (exceto para força muscular – amostras dependentes); não foi possível realizar análise de tamanho de efeito (d de Cohen). Vale lembrar que

em todas as análises utilizou-se do *software* SPSS versão 20.0 considerando significância estatística valor de P inferior a 5% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

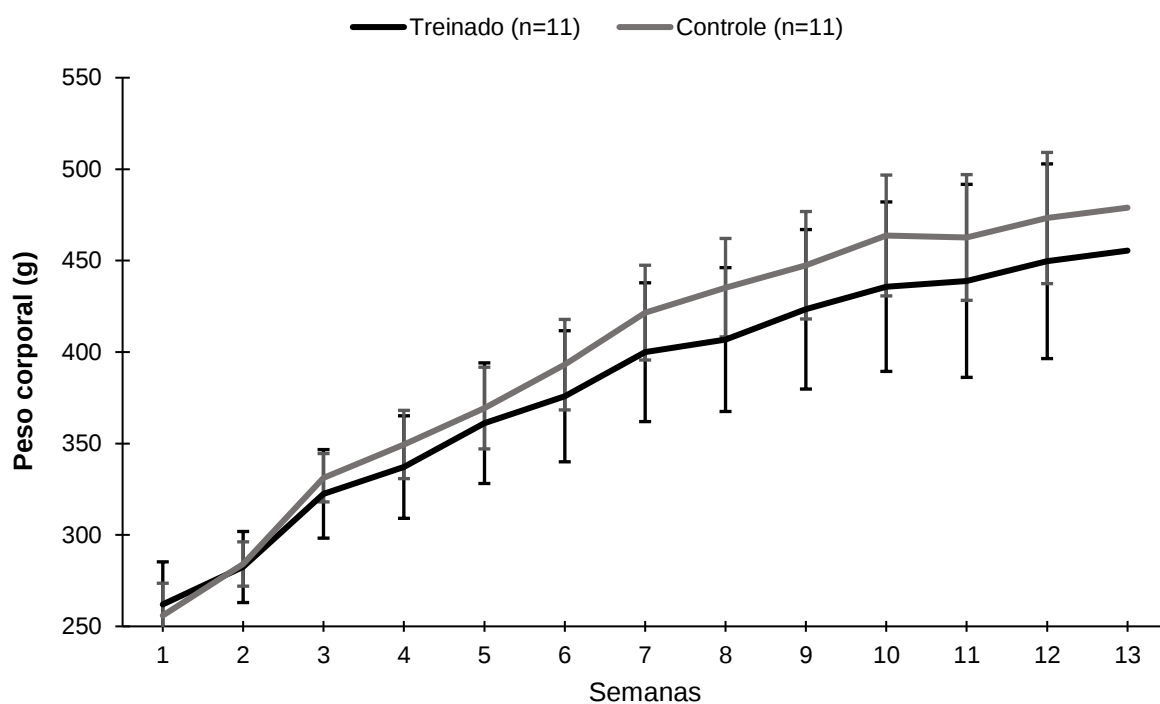
6.1 Dados de peso corporal

Na tabela 1 é possível observar a comparação dos resultados de peso inicial, peso final e *follow up* (1ª semana (-) 13ª semana) entre os grupos. Na análise da evolução do peso corporal, observou-se que para o fator tempo, houve diferença significativa em ambos os grupos ($p = < 0,0001$). Já na interação intervenção e tempo, não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,124$), assim como não foi estatisticamente significativa o fator intervenção ($p = 0,210$). Por outro lado, ao analisar a figura dos valores de média dos pesos corporais (Figura 7), o grupo C apresentou uma tendência média superior à do grupo T, porém, o desvio padrão ultrapassa essa média.

Tabela 1. Comparação do peso corporal inicial, final e seguimento entre grupos.

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Delta Δ (g)
Controle (n=11)	255,91 (17,68)	478,91 (41,31)	223,91 (43,72)
Treinado (n=11)	262,00 (23,26)	455,45 (54,37)	193,45 (55,74)
P-valor	0,370 ^a	0,784 ^a	0,885 ^b

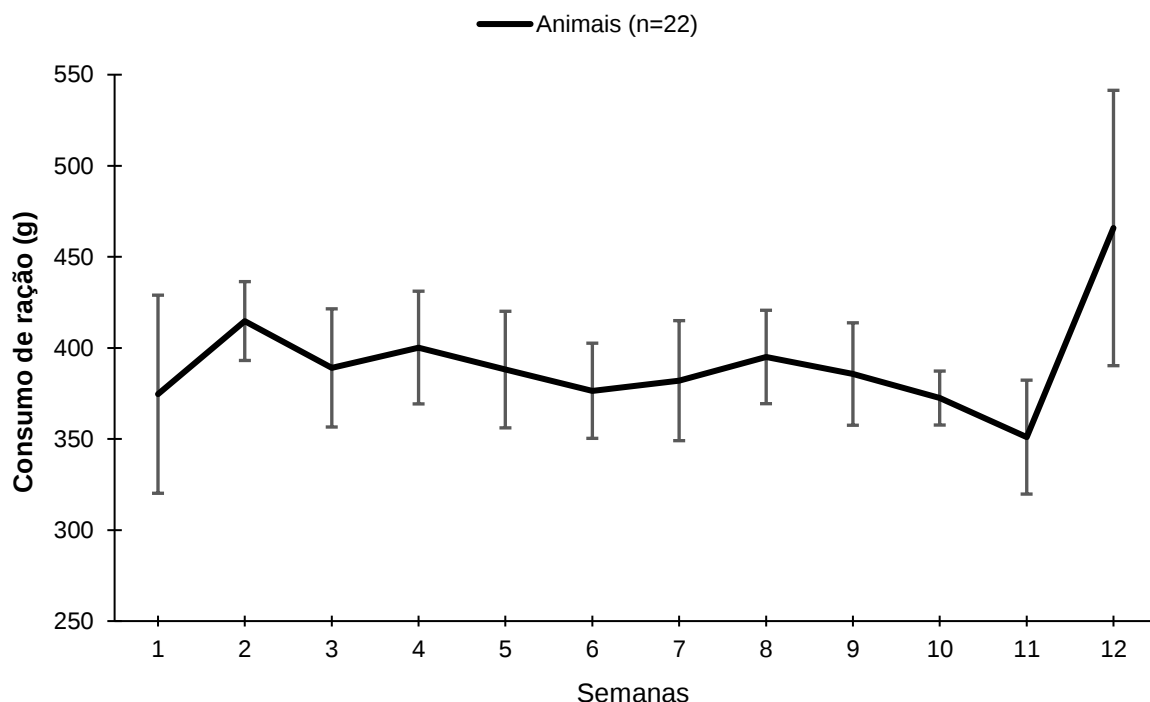
Notas: Dados expressos em média (desvio padrão). **Legenda:** g = grama; delta = diferença entre peso inicial e final (ganho de peso corporal); ^a = p-valor do Teste T Student não pareado; ^b = p-valor do Teste T Student pareado (follow-up 1ª e 13ª semana).

Figura 7. Ganho de peso corporal por grupo.

Notas: Representação gráfica dos valores em média e desvio padrão de peso corporal dos animais. N= 11/grupo. **P-valor:** 0,124 (fator tempo e intervenção); <0,0001 (fator tempo, para ambos os grupos); 0,210 (fator intervenção). Valores de P: Greenhouse-Geisser. **Legenda:** g= grama.

6.2 Consumo geral de ração

Com a distribuição aleatória dos animais por gaiola, o consumo da ração foi acompanhado semanalmente. É possível visualizar o comportamento do consumo na Figura 8.

Figura 8. Consumo de ração durante as semanas.

Notas: Representação gráfica dos valores em média e desvio padrão de consumo de ração pelos animais durante as semanas. N=22. **P-valor** Greenhouse-Geisser= 0,001 (fator tempo). **Legenda:** g= grama.

Os animais tiveram um comportamento estável em relação à alimentação semanal. Curiosamente, na semana anterior à eutanásia, houve uma elevação considerável desse consumo. No teste utilizado para a análise desse consumo pelos animais, foi observado uma diferença estatisticamente significativa no que diz respeito ao fator tempo ($p = 0,001$). Apesar da pequena discrepância encontrada no consumo da 12ª semana, o teste foi rodado sem esta e mesmo assim obteve valor significativo ($p = 0,005$), assim como, sem a 11ª e 12ª semanas ($p = 0,042$).

6.3 Ganhos de força pelos testes de Carga Máxima

O teste de Carga Máxima (CM) foi realizado nos animais treinados para a devida avaliação do ganho de força muscular no período de intervenção. A apresentação dos valores de cada teste encontra-se na tabela 2. O ganho de força dos animais através da evolução de cada teste de carga máxima obteve significância estatística ($<0,0001$).

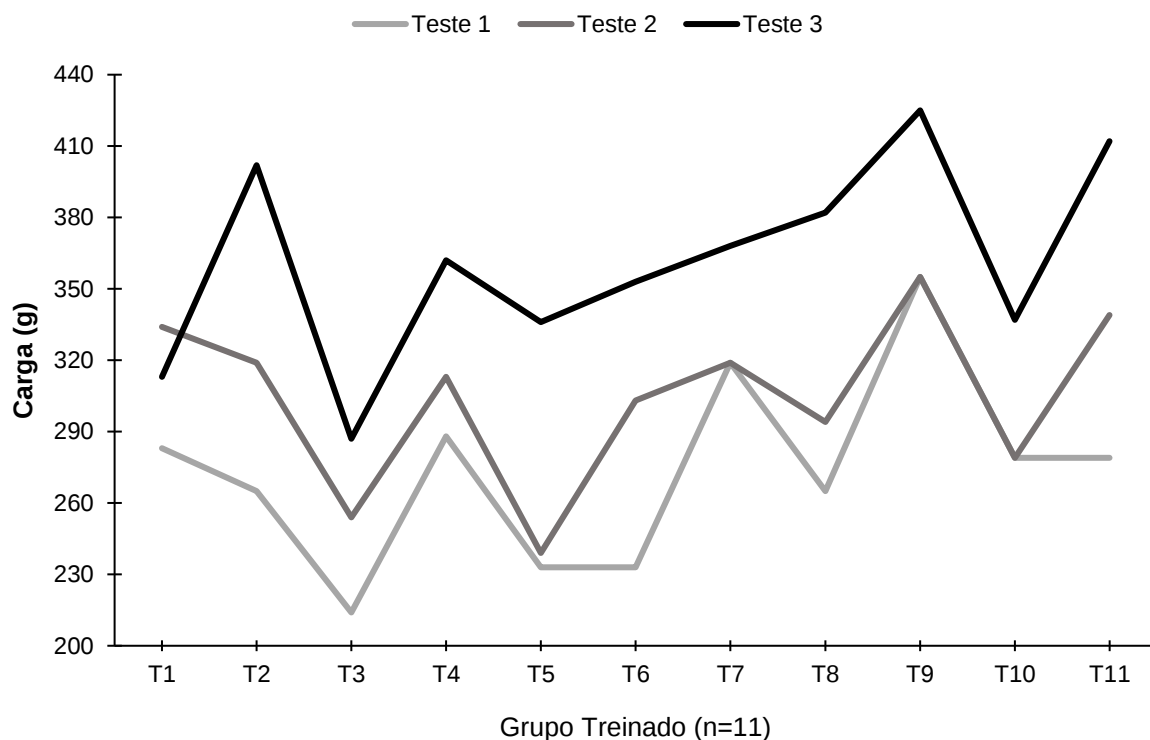
Tabela 2. Valores dos testes de Carga Máxima.

	Média (g)	Desvio Padrão (g)
1º Teste de Carga Máxima	273,91	40,05
2º Teste de Carga Máxima	304,36	35,65
3º Teste de Carga Máxima	361,55	42,32

Notas: Dados expressos em média e desvio padrão. Amostra contendo animais do grupo Treinado (n=11). **P-valor:** <0,0001 (fator tempo). **Legenda:** g= grama.

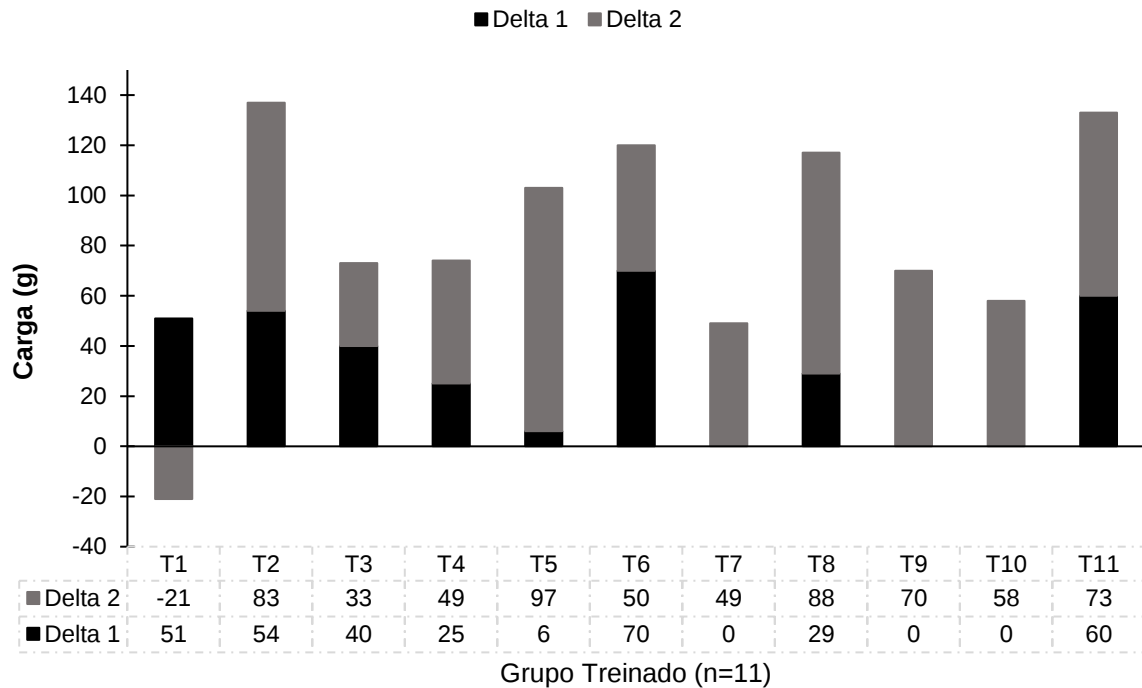
A figura 9 apresenta a evolução nos testes de CM de cada animal. É possível observar a singularidade do animal, na qual cada um apresentou traços, valores e períodos individualizados de ganho.

Figura 9. Ganho de força acompanhado pelo teste de Carga Máxima.



Notas: Representação gráfica dos valores absolutos da carga máxima de cada animal nos três testes realizados. Teste 1= primeiro teste de CM, sendo efetuado na primeira semana de intervenção; Teste 2= segundo teste de CM realizado na quinta semana de intervenção; Teste 3= último teste de CM realizado no final da oitava semana de intervenção. **Legenda:** g= grama; CM= carga máxima; T (1 a 11)= treinado, referente à cada animal deste grupo.

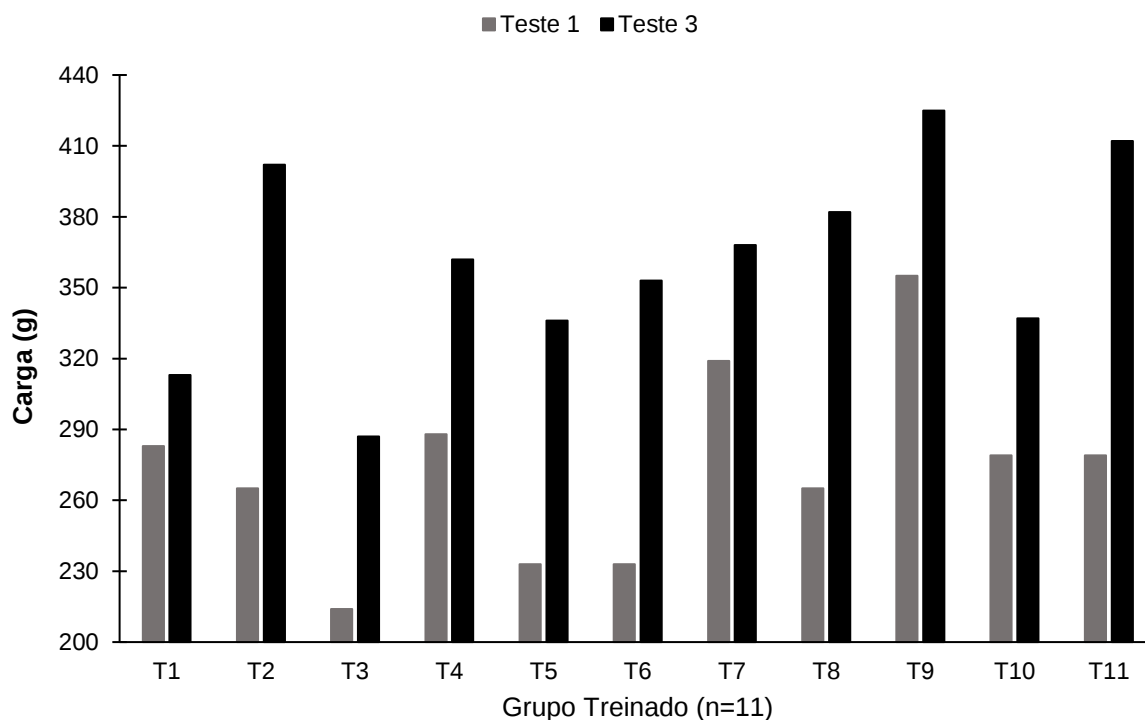
Na análise dos momentos em que estes animais obtiveram maior ganho de força refletido nos testes de carga máxima, a figura 10 foi realizada com os valores das evoluções. Realizando cálculo subtraindo os testes, obteve-se os valores de Delta 1 e Delta 2, no qual expõe a trajetória do ganho de cada animal.

Figura 10. Momentos de ganho de força pelo teste de Carga Máxima.

Notas: Delta 1: diz respeito ao valor encontrado para cada animal quando realizada a subtração do valor obtido no primeiro e segundo teste de carga máxima (Teste 2 de CM (-) Teste 1 de CM); Delta 2: diz respeito ao valor encontrado para cada animal quando realizada a subtração do valor obtido no segundo e terceiro teste de carga máxima (Teste 3 de CM (-) Teste 2 de CM). **Legenda:** g= grama; T (1 a 11)= treinado, referente à cada animal pertencente ao grupo.

Para avaliar o ganho total obtido por estes animais considerando o momento pré e pós intervenção, foi realizada a análise do teste de carga máxima 1 e 3, em que este ganho foi estatisticamente significativo ($p= 0,003$) (Figura 11).

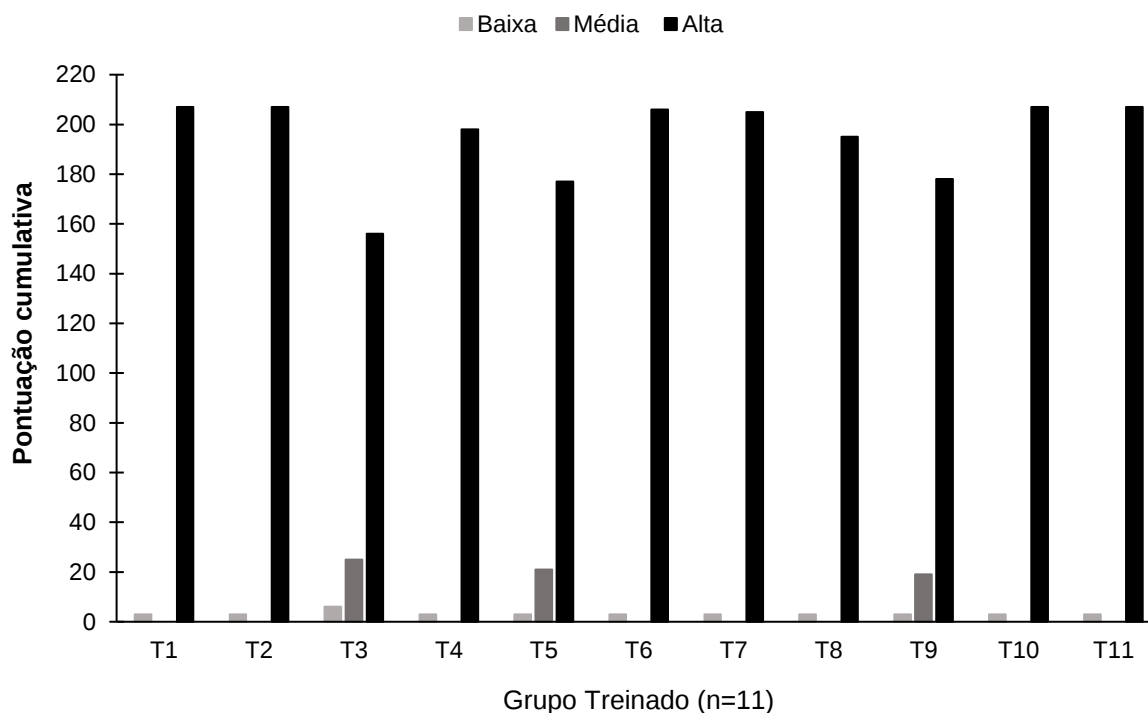
Figura 11. Momentos pré e pós intervenção pelo teste de Carga Máxima.



Notas: Representação dos momentos pré e pós intervenção utilizando o Teste de Carga Máxima como ferramenta de avaliação da força muscular. **P-valor:** <0,003. **Legenda:** g= grama; T (1 a 11)= treinado, referente à cada animal do grupo.

6.4 Dados de aderência ao treinamento

A aderência de cada animal foi acompanhada e avaliada em cada dia de intervenção. Dessa forma, foi possível analisar com maior subsídio a eficácia do exercício frente às análises propostas. O índice de aderência de cada animal está representado na Figura 12.

Figura 12. Aderência de cada animal ao treinamento.

Notas: Representação gráfica da aderência ao treinamento por sessão para cada animal. A pontuação foi distribuída de maneira cumulativa, sendo o valor máximo alcançado 210 (soma total). A pontuação mínima por sessão foi de 0, e máxima de 9. Pontuações de 0-4 foram consideradas “baixa aderência”, de 5-7 “média aderência” e 8-9 “alta aderência”. **Legenda:** T (1 a 11)= treinado, referente à cada animal do grupo.

6.5 Valores de metilação global do DNA (EDL, G e S)

A metilação global do DNA foi quantificada e calculada para obtenção dos resultados em porcentagem (%). Na tabela 3, encontram-se os valores de estatística descritiva geral dos dados.

Tabela 3. Valores gerais de metilação global do DNA.

	Média (%)	Desvio Padrão (%)	IC 95% (%)
EDL (n=10)	33,56	24,82	5,93 – 82,96
G (n=10)	72,82	7,45	58,15 – 87,78
S (n=10)	27,78	21,73	2,96 – 67,04

Notas: Dados expressos em média, desvio padrão (DP) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). N=10. **Legenda:** EDL= extensor longo dos dedos; Gastro= gastrocnêmio; %= porcentagem.

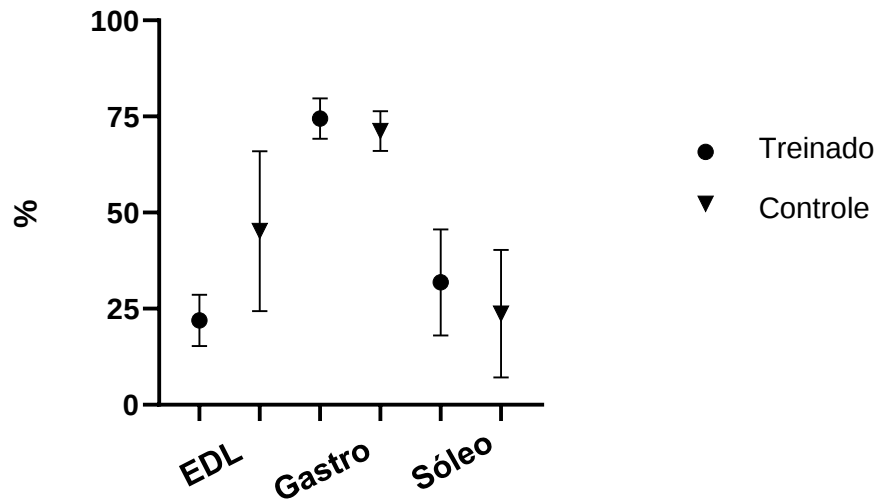
A metilação global do DNA foi quantificada e calculada para obtenção dos resultados em porcentagem (%). Na tabela 4, encontram-se os valores de estatística descritiva de comparação dos grupos Controle vs. Treinado. Já na figura 13 é possível visualizar e comparar o padrão de metilação de cada músculo e grupo. Por fim, na figura é possível observar o comportamento de cada amostra para cada tecido e grupo.

Tabela 4. Comparação dos dados de metilação global do DNA entre grupos.

	Controle (n=5)			Treinado (n=5)		
	Média	DP	IC 95%	Média	DP	IC 95%
EDL (%)	45,183	30,04	13,33 – 82,96	21,94	9,88	5,93 – 32,96
G (%)	71,202	7,61	58,15 – 77,04	74,44	7,77	68,52 – 87,78
S (%)	23,70	24,56	2,96 – 65,19	31,85	20,43	18,15 – 67,04

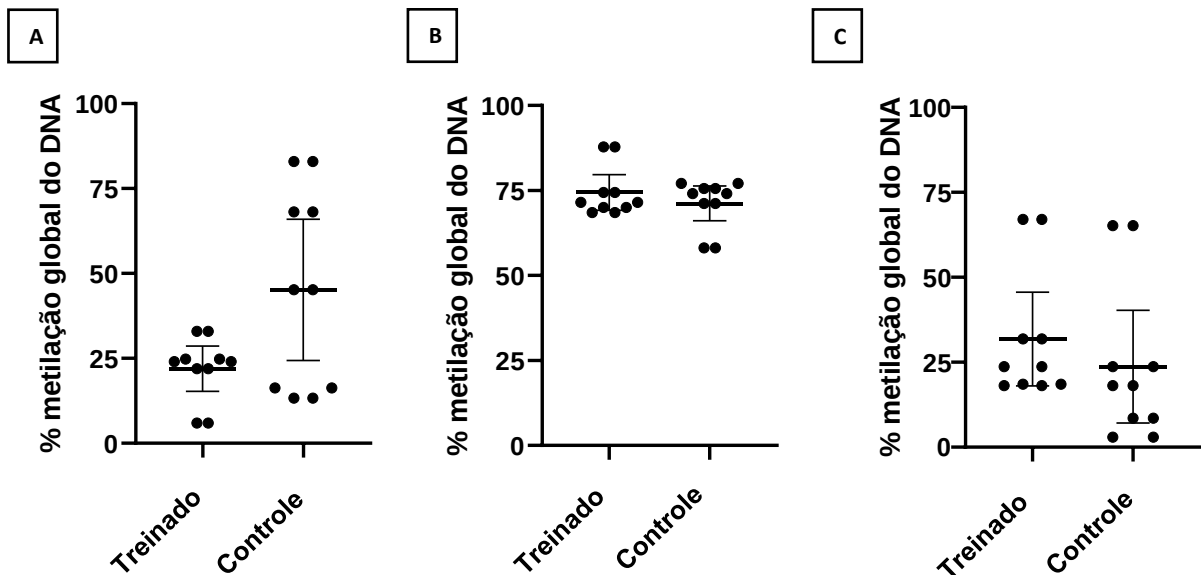
Notas: Dados expressos em média, desvio padrão (DP) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para cada grupo e músculo. **Legenda:** EDL= extensor longo dos dedos; Gastro= gastrocnêmio; %= porcentagem.

Figura 13. Representação dos valores de metilação nos músculos.



Notas: Metilação global do DNA. Valores médios expressos em % média de metilação $\pm$ IC 95%. N= 5/grupo. **Legenda:** EDL= extensor longo dos dedos; Gastro= gastrocnêmio; %= Porcentagem; IC 95%= Intervalo de Confiança de 95%.

Figura 14. Comportamento da metilação em cada músculo.

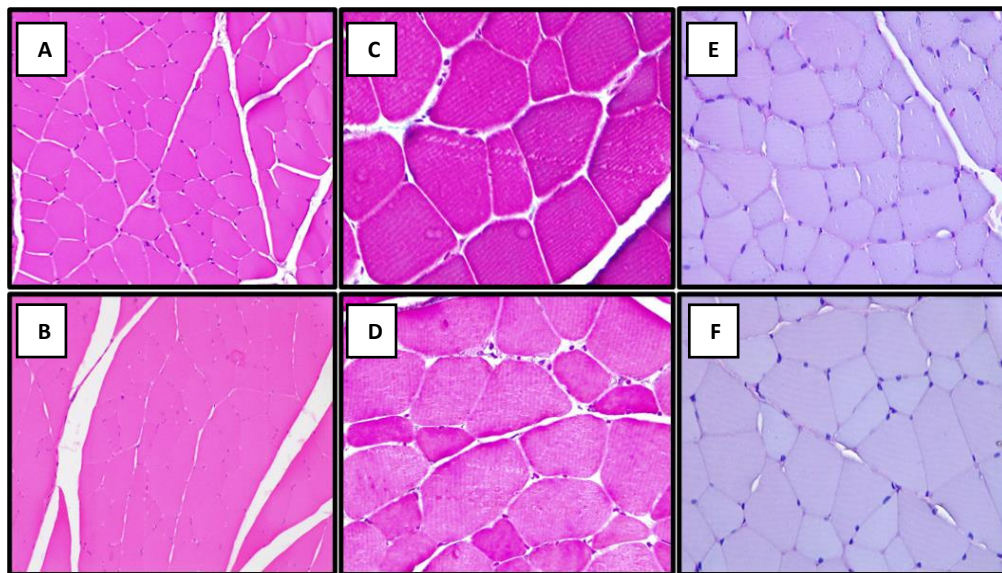


Notas: Metilação global do DNA para cada músculo. Foi realizada a duplicada do valor de cada amostra, para melhor visualização do comportamento da metilação. Valores médios expressos em % de metilação $\pm$ IC 95%. N= 5/grupo. **Legenda:** **A)** Músculo extensor longo dos dedos ($p= 0,437$ T vs. C). **B)** Músculo gastrocnêmio ($p= 0,929$ T vs. C). **C)** Músculo sóleo ($p= 0,976$ T vs. C). Em todos os casos, na comparação entre os grupos T vs. C, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

6.6 Histopatologia (EDL, G e S)

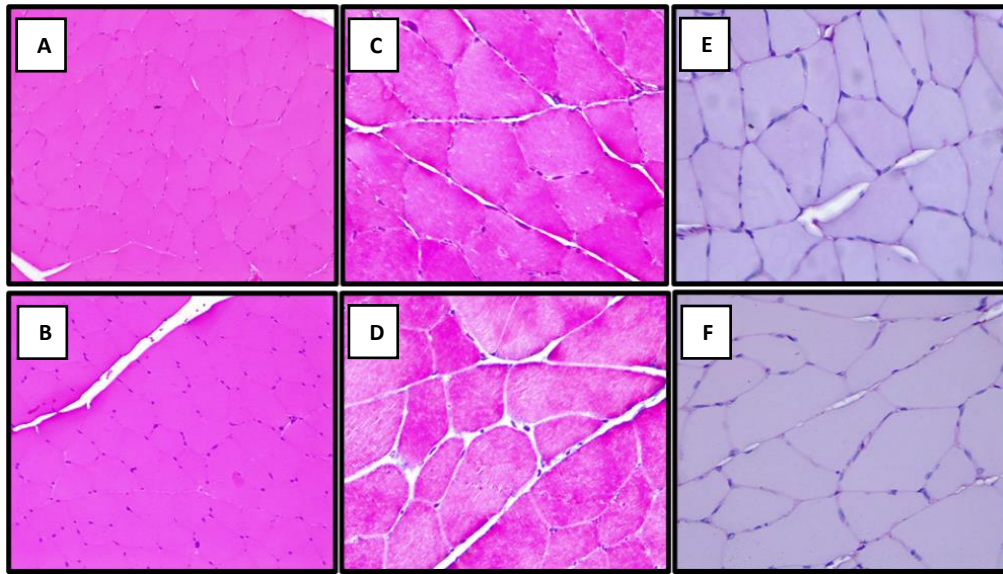
Na figura 15 encontra-se imagens do músculo extensor longo dos dedos (EDL), já a figura 16 refere-se a análise do músculo gastrocnêmio (G), e por fim, a figura 17 do músculo sóleo (S) para todas as colorações histológicas avaliadas: HE, TM e PAS. Não foi observada diferença estatística entre os grupos (T vs. C) para tamanho de fibras musculares, depósito de colágeno ou concentração citoplasmática de glicogênio.

Figura 15. Análise histopatológica do músculo EDL.



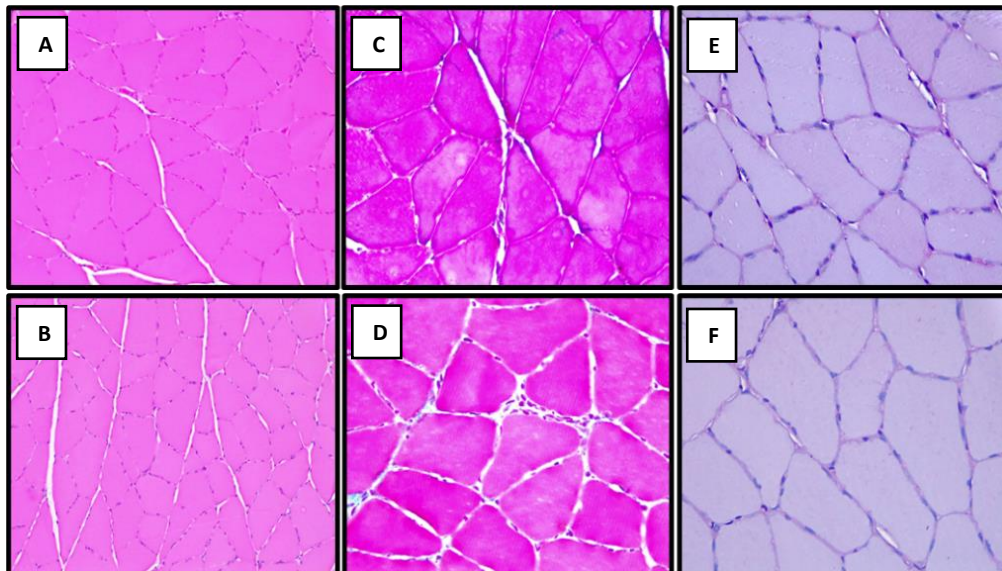
Notas: Análise histopatológica do músculo extensor longo dos dedos (EDL). N= 11/grupo. **Legenda:** Coloração HE: **A)** grupo Treinado, **B)** grupo Controle ($p= 0,799$ T vs. C). Coloração TM: **C)** grupo Treinado, **D)** grupo Controle ($p= 0,556$ T vs. C). Coloração PAS: **E)** grupo Treinado, **F)** grupo Controle ($p= 0,556$ T vs. C). Todas as colorações foram analisadas em aumento de 400x.

Figura 16. Análise histopatológica do músculo G.



Notas: Análise histopatológica do músculo gastrocnêmio (G). N= 11/grupo. **Legenda:** Coloração HE: **A)** grupo Treinado, **B)** grupo Controle ($p= 0,778$ T vs. C). Coloração TM: **C)** grupo Treinado, **D)** grupo Controle ($p= 0,268$ T vs. C). Coloração PAS: **E)** grupo Treinado, **F)** grupo Controle ($p= 0,459$ T vs. C). Todas as colorações foram analisadas em aumento de 400x.

Figura 17. Análise histopatológica do músculo S.



Notas: Análise histopatológica do músculo sóleo (S). N= 11/grupo. **Legenda:** Coloração HE: **A)** grupo Treinado, **B)** grupo Controle ($p= 0,748$ T vs. C). Coloração TM: **C)** grupo Treinado, **D)** grupo Controle ($p= 0,531$ T vs. C). Coloração PAS: **E)** grupo Treinado, **F)** grupo Controle ($p= 0,808$ T vs. C). Todas as colorações foram analisadas em aumento de 400x.

6.7 Dados de consumo de oxigênio (G)

Na análise de respiração mitocondrial realizando no músculo gastrocnêmio, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de consumo de oxigênio entre grupos.

	Controle (n=7)			Treinado (n=7)		
	Média	DP	IC 95%	Média	DP	IC 95%
SCRSucc	1,040	0,056	0,93 – 1,11	0,921	0,170	0,63 – 1,11
RCRADP	1,186	0,587	0,40 – 2,30	1,257	0,199	1,00 – 1,60
FCRL	1,051	0,657	0,40 – 2,42	0,916	0,245	0,68 – 1,29
FCRPI	0,964	0,057	0,90 – 1,08	1,121	0,237	0,90 – 1,58

Notas: Dados expressos em média, desvio padrão (DP) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). N=7/grupo. **P-valor:** 0,121 SCRSucc; 0,766 RCRADP; 0,618 FCRL; 0,134 FCRPI. **Legenda:** SCRSucc = Substrate Control Ratio for Succinate; RCRADP = Respiratory Control Ratio for ADP; FCRL = Flux Control Ratio for Leak Respiration; FCRPI = Flux Control Ratio for Complex I.

6.8 Quantificação de proteínas NRF2 e TFAM (EDL, G e S)

Na análise da expressão de proteínas mitocondriais (NRF2 e TFAM) não foram encontradas diferenças entre os grupos independente do músculo. A figura 18 corresponde à imagem de uma típica membrana corada com Ponceau – S, utilizada para normalização dos resultados aferidos por densitometria dos “blots” no ensaio de *Western Blotting*. A figura 19 refere-se às imagens típicas dos blots obtidos na avaliação da expressão da proteína NRF2 e TFAM em cada músculo.

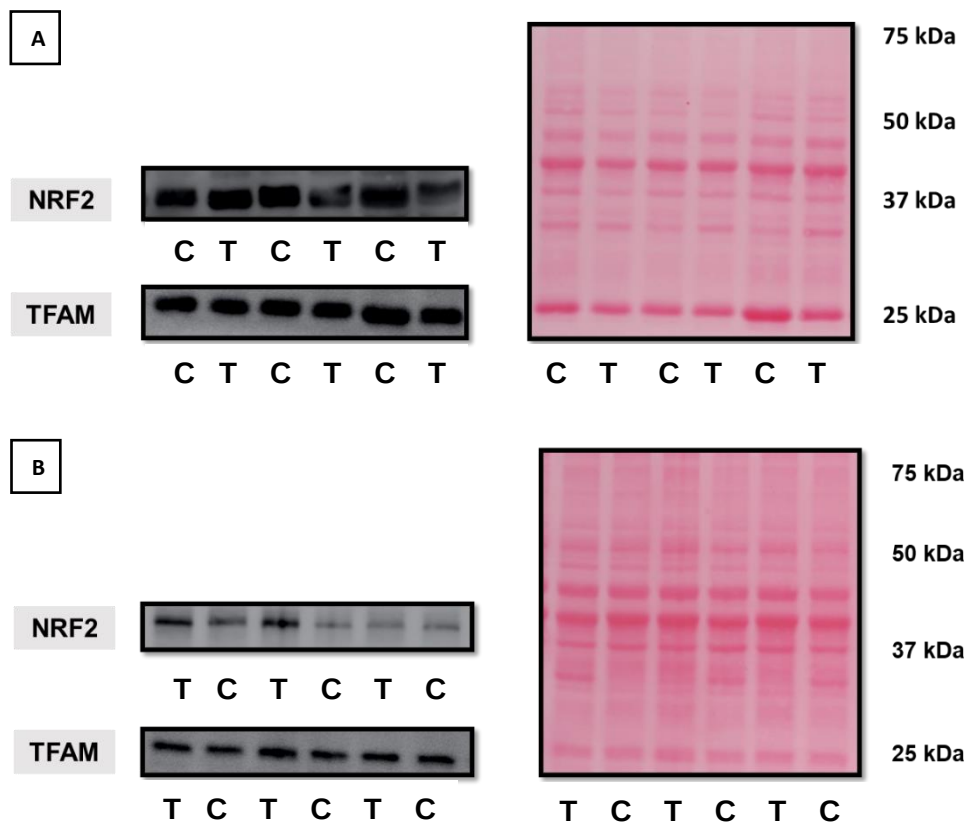
Já as figuras 20 e 21 correspondem aos valores das análises de expressão proteica entre grupos. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a proteína NRF2: EDL (p= 0,0641), G (p= 0,7116) e S (p= 0,9510); assim como para a proteínas= TFAM (p= 0,1677; p= 0,7037 e p= 0,6088, respectivamente).

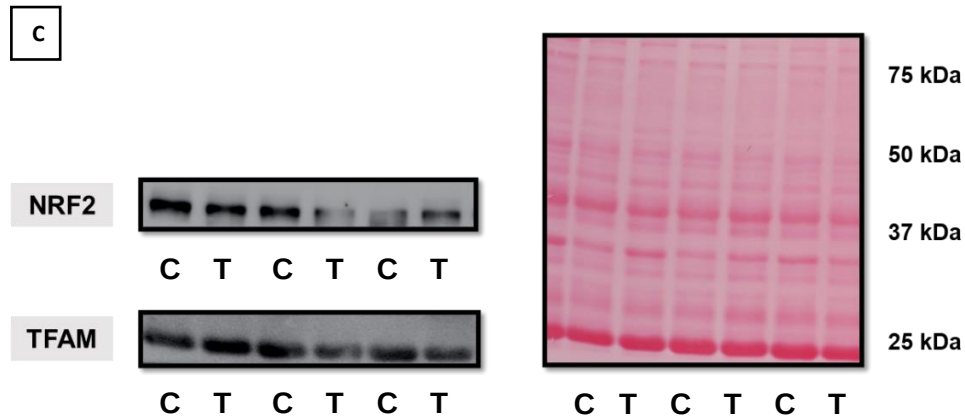
Figura 18. Blots das amostras em ensaio de *Western Blotting*.



Notas: Blots das amostras em ensaio de *Western Blotting*. N=6/grupo. **Legenda:** Exemplo de membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S em que foram transferidas as proteínas do gel de poliacrilamida, destacando-se, em amarelo, duas faixas com peso molecular referente à proteína de interesse (NRF2 e TFAM, respectivamente).

Figura 19. Blots das amostras dos músculos EDL, G e S.

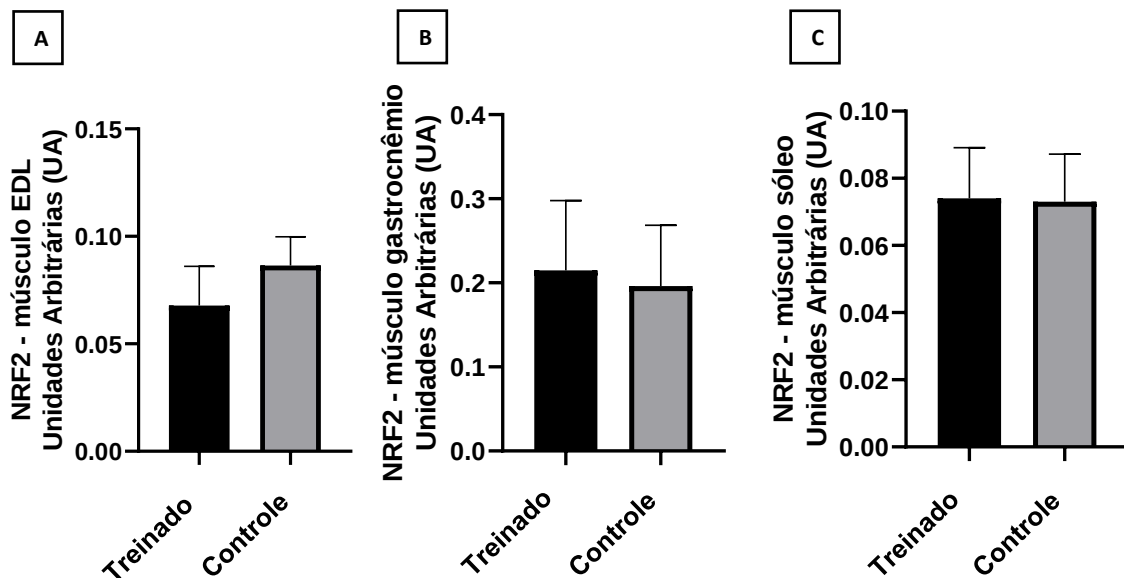




Notas: Blots das amostras para cada músculo intercaladas entre grupos, em ensaio de Western Blotting. N=6/grupo. **A)** músculo Extensor longo dos dedos (EDL); **B)** Gastrocnêmio (G); e **C)** Sóleo (S).

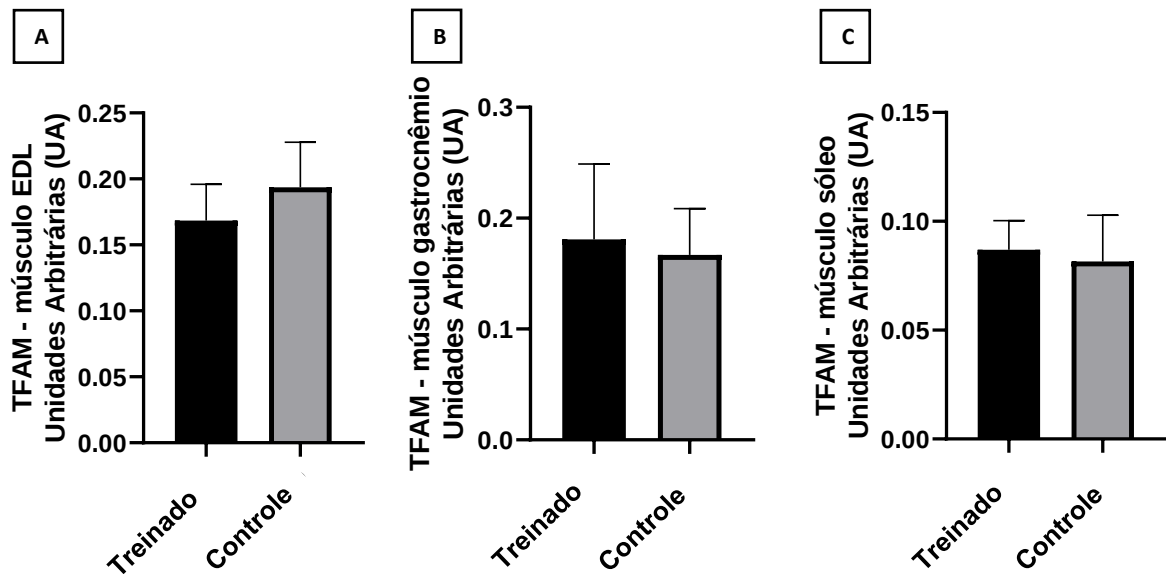
Legenda: C= controle; T= treinado.

Figura 20. Expressão da proteína mitocondrial NRF2.



Notas: Expressão da proteína NRF2 nos músculos: **A)** Extensor longo dos dedos ($p=0,0641$ T vs. C). **B)** Gastrocnêmio ($p=0,7116$ T vs. C). **C)** Sóleo ($p=0,9510$ T vs. C). Valores médios expressos em UA/ μ g de proteína $\pm$ DP. N= 6/grupo. **Legenda:** UA/ μ g= Unidades Arbitrárias por micrograma; DP= Desvio Padrão.

Figura 21. Expressão da proteína mitocondrial TFAM.



Notas: Expressão da proteína TFAM nos músculos: **A)** Extensor longo dos dedos ($p = 0,1677$ T vs. C). **B)** Gastrocnêmio ($p = 0,7037$ T vs. C). **C)** Sóleo ($p = 0,6088$ T vs. C). Valores médios expressos em UA/ μ g de proteína $\pm$ DP. N= 6/grupo. **Legenda:** UA/ μ g= Unidades Arbitrárias por micrograma; DP= Desvio Padrão.

7. DISCUSSÃO

Não são recentes as descobertas em relação a epigenética. Na década de 40, Waddington (WADDINGTON, 1942) já havia proposto uma nova forma de compreender as adaptações do organismo em seu processo de desenvolvimento. Apesar de se caracterizar como uma temática que vêm sendo estudada há décadas, suas áreas de observação estão sendo cada vez mais destrinchadas, como é o caso da epigenética do exercício. Alguns autores não encaram a epigenética como algo que se desvincula do fator hereditário (DEANS et al., 2015); no entanto, a ideia de que modulações a níveis moleculares ocasionadas por fatores externos poderiam desencadear tais alterações já no próprio indivíduo, possibilitou a investigação de mudanças sem incorporar a questão da hereditariedade (JACQUES et al., 2019; GARCIA et al., 2022; SEABORNE et al., 2018; NITERT et al., 2012).

Dessa forma, os estudos na área da epigenética do exercício trouxeram uma nova perspectiva para solucionar lacunas sobre como o organismo se adapta à essa intervenção externa, e, no caso desse estudo, se alterações no fenótipo (como ganho

de força, hipertrofia, entre outros) estão relacionadas com marcador epigenético em musculatura esquelética, bem como almejando compreender se há distinção nessa relação nos diferentes tipos de fibras musculares (oxidativa, glicolítica e mista).

Com base nos resultados do presente estudo, foi possível observar que o treinamento resistido dinâmico (TRD) de 8 semanas foi capaz de aumentar a força de escalada dos animais treinados 3x por semana (totalizando 24 sessões), no qual esse aumento crescente foi potencializado na observação da diferença entre o primeiro e terceiro teste de Carga Máxima (CM). Isso corroborou com alguns estudos utilizando-se da mesma intervenção com o mesmo ou menor tempo e/ou frequência de treinamento (PADILHA et al., 2019; AAMANN et al., 2019; DENHAM et al., 2016; KIM et al., 2015). Essa diferença expressiva de ganho de força reforça o já estabelecido mecanismo de adaptação neural, condição fisiológica que tem sido alvo de estudos há décadas. Škarabot *et al.* (2021) relatam nessa revisão os possíveis mecanismos que levam à essa adaptação inicial, e, apesar da não compreensão exata sobre o local em que isso ocorre, há indícios que tais adaptações se baseiam, de forma geral, nas mudanças estruturas corticais e/ou subcorticais.

A porcentagem de metilação global do DNA não foi alterada entre os grupos e em nenhum dos três tipos de fibras musculares com o treinamento resistido dinâmico. Com base nos valores obtidos, percebeu-se uma grande variabilidade entre os grupos e entre as amostras de um mesmo grupo. Curiosamente, destaca-se na fibra muscular mista glicolítica-oxidativa (músculo gastrocnêmio) um comportamento de hipermetilação bem pronunciado, para ambos os grupos. Uma revisão sistemática (JACQUES et al., 2019) avaliou estudos que objetivaram investigar marcadores epigenéticos em musculatura esquelética de humanos. Quando observada a metilação do DNA em genoma amplo como o marcador epigenético de interesse, Nitert *et al.* (2012), Lindholm *et al.* (2014), Robinson *et al.* (2017) e Seaborne *et al.* (2018) realizaram trabalhos utilizando-se do treinamento (resistido, aeróbio ou ambos) para avaliar a metilação do DNA, no qual os resultados foram bastante heterogêneos. Seaborne *et al.* (2018) foi o único estudo utilizando apenas o treinamento resistido, sendo realizado 3x por semana, em homens jovens saudáveis. O protocolo foi de 1 sessão aguda de treinamento resistido, seguido de 7 semanas de treinamento, 7 semanas de destreinamento e, por fim, 7 semanas de retreinamento. Os autores encontraram valores maiores nas posições diferencialmente metiladas (DMPs), associando tais áreas hipometiladas com a hipertrofia muscular encontrada. Uma das

limitações do presente estudo foi a ausência de avaliação da expressão gênica das enzimas envolvidas no processo de hiper e hipometilação.

Nesse sentido, pode-se notar a baixa quantidade de estudos avaliando a metilação do DNA relacionada ao treinamento resistido em diferentes tipos de fibras musculares, e, ainda, na compreensão da relação com o fenótipo adquirido. No entanto, no presente estudo foi possível observar que a hipermetilação encontrada na fibra muscular mista foi a alteração mais pronunciada e estável, porém, até onde sabemos, não há nenhuma evidência que explique tal resultado.

Na análise histopatológica dos músculos, não foram encontradas diferenças entre os grupos. Na coloração HE, na qual objetivamos analisar o diâmetro das fibras musculares, os resultados evidenciaram que hipertrofia não foi conquistada, sendo uma das possíveis adaptações frente ao exercício físico. Esse resultado vai de encontro com uma revisão sistemática (LOURENÇO et al., 2020) que utilizou o treinamento resistido no modelo de escada para roedores, em que foram avaliados desfechos como a força e hipertrofia muscular, e, no caso da hipertrofia, evidenciou-se uma variabilidade dos resultados a depender do tipo de fibra avaliado. Mesmo assim, com base na grande variabilidade de resultados, em uma análise de subgrupos, não foi encontrado efeito global significativo (incluindo os três tipos de fibras musculares avaliados no presente estudo). Uma vez que o treinamento ocorreu 3x por semana durante 8 semanas, acreditamos que o tempo e a frequência da intervenção não foram parâmetros suficientes para provocar aumento do diâmetro das fibras pelo fator dose-resposta bem presente nesse tipo de adaptação muscular, assim como, a ausência de controle alimentar dos animais e/ou suplementação (FIGUEIREDO et al., 2018; RADAELLI et al., 2015; MORTON et al., 2018). Já era esperado que não ocorresse alterações nas fibras não-colágenas pela coloração MT, assim como a estocagem de glicogênio avaliada pela coloração PAS, uma vez que os animais eram saudáveis.

Foram avaliadas taxas de controle de fluxo de oxigênio as quais fornecem uma impressão digital de acoplamento e controle de substrato independentemente da quantidade de mitocôndria no tecido, e taxas de controle respiratório e de substrato, que representam o aumento máximo no consumo de oxigênio mitocondrial que pode ser atingido ao conduzir a fosforilação de ADP em ATP (OLEAN-OLIVEIRA et al., 2019). Ambos os grupos apresentaram comportamento semelhante no que diz respeito a estas taxas, evidenciando que 8 semanas de treinamento não foram

suficientes para melhorar a capacidade respiratória da musculatura desses animais, pelo menos para a fibra muscular mista. É provável que se tal análise fosse realizada em fibra muscular glicolítica um incremento nas taxas e na atividade funcional mitocondrial poderia ser observada, dada à característica do treinamento de força empregado. A escolha da fibra muscular mista tornou-se viável pela quantidade de material para os experimentos propostos, e para a compreensão do treinamento de forma sistêmica.

A expressão de proteínas relacionadas à biogênese mitocondrial TFAM e NRF2 também não foi alterada com o treinamento resistido dinâmico de 8 semanas. Esses resultados podem ser explicados muito provavelmente pelo fato da intervenção ter sido realizada em tempo e/ou frequência relativamente menores quando comparado aos estudos que encontraram resultados expressivos entre grupos (MARCANGELI et al., 2022; ISLAM et al., 2019; KANG et al., 2013), especialmente naqueles que possuíam grupos com alguma alteração substancial para que a intervenção propusesse um papel protetor ou reversor de alguma condição adversa (YOUSSEF et al., 2022; MARCANGELI et al., 2022; THEILEN et al., 2019). Uma recente revisão (MESQUITA, et al., 2021) trouxe informações referentes à biogênese ribossomal e mitocondrial, sugerindo que o treinamento resistido prioriza a biogênese ribossomal, e o treinamento aeróbio, a mitocondrial. Apesar de amplo conhecimento sobre a forma como os processos ocorrem, suas formas de análise podem ser limitantes, como por exemplo, quando se desconsidera os processos de degradação. Isso significa que a grande maioria dos estudos, como o nosso, acabam por utilizar medidas indiretas para avaliar a biogênese ribossomal ou mitocondrial, e poucos, medidas diretas – como marcadores isotópicos estáveis, no caso da biogênese mitocondrial. Além disso, diferentes estudos mostraram uma variedade de respostas relacionadas à biogênese ribossomal e mitocondrial, mas que ambas não se caracterizam por competir/sobrepôr entre si. Uma das possibilidades é de que outros mediadores possam estar interferindo na devida sinalização de vias, mas que ainda não foram descritos (MESQUITA et al., 2021).

O presente estudo propôs analisar se 8 semanas de treinamento resistido dinâmico realizado 3x por semana alteraria um dos marcadores epigenéticos em fibras musculares esqueléticas oxidativas, glicolíticas e mistas de ratos saudáveis, e se esse marcador estaria envolvido nas alterações relacionadas ao fenótipo. Os achados desse trabalho mostram que não é possível relacionar o ganho de força obtido com a

metilação global do DNA, independentemente do tipo de fibra muscular. Além disso, o TRD não foi capaz de provocar hipertrofia muscular nem aumentar a expressão de proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial, nem a capacidade respiratória em fibra muscular mista. Mesmo assim, foi possível observar que o percentual de metilação global do DNA foi extremamente variável nas fibras musculares, independente da intervenção proposta. Ainda, o músculo gastrocnêmio se diferenciou por apresentar uma hipermetilação pronunciada, sugerindo, portanto, que cada tipo de fibra muscular possui um potencial próprio de metilação global, com ou sem o treinamento.

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, podemos afirmar que o treinamento resistido dinâmico (TRD) de 8 semanas aumentou a força muscular, mas não promoveu alterações estruturais e na atividade mitocondrial de fibras musculares oxidativa, glicolítica e mista de ratos saudáveis. Além disso, o TRD não alterou a metilação global do DNA em nenhum tipo de fibra muscular. Porém, a porcentagem de metilação global do DNA foi extremamente variável nos diferentes tipos de fibras musculares independentemente do TRD, sugerindo que cada tipo de fibra muscular possui seu próprio potencial de metilação.

9. REFERÊNCIAS

- Aamann L, *et al.* Progressive resistance training prevents loss of muscle mass and strength in bile duct-ligated rats. **Liver International**. 2019;39(4):676-683. doi: 10.1111/liv.13997.
- Barrès R, *et al.* Acute Exercise Remodels Promoter Methylation in Human Skeletal Muscle. **Cell Metabolism**. 2012;15(3):405-411. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.001.
- Costa EBO, Pacheco C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciencias Biologicas e da Saude**. 2013;34(2):125-136. doi: 10.5433/1679-0367.2013v34n2p125.

Deans C, Maggert KA. What Do You Mean, “Epigenetic”? **Genetics**. 2015;199(4):887-896. doi: 10.1534/genetics.114.173492.

Denham J, Marques FZ, Bruns EL, O'Brien BJ, Charchar FJ. Epigenetic changes in leukocytes after 8 weeks of resistance exercise training. **European Journal of Applied Physiology**. 2016;116(6):1245-53. doi: 10.1007/s00421-016-3382-2.

Drake JC, Wilson RJ, Yan Z. Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. **The FASEB Journal**. 2016;30(1):13-22. doi: 10.1096/fj.15-276337.

Dreyer HC, *et al.* Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**. 2006;576(Pt 2):613-24. doi: 10.1113/jphysiol.2006.113175.

Felsenfeld G. A Brief History of Epigenetics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 2014;6(1):a018200. doi: 10.1101/cshperspect.a018200.

Figueiredo VC, de Salles BF, Trajano GS. Volume for Muscle Hypertrophy and Health Outcomes: The Most Effective Variable in Resistance Training. **Sports Medicine**. 2018;48(3):499-505. doi: 10.1007/s40279-017-0793-0.

Groennebaek T, Vissing K. Impact of Resistance Training on Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis, Content, and Function. **Frontiers in Physiology**. 2017;8:713. doi: 10.3389/fphys.2017.00713.

Holliday R. Epigenetics: An Overview. **Developmental genetics**. 1994;15(6):453-457. doi: 10.1002/dvg.1020150602.

Holliday R, Pugh JE. DNA Modification mechanisms and gene activity during Development. **Science**. 1975;187(4173):226-232. doi: 10.1126/science.187.4173.226.

Huang D. The (Dual) Origin of Epigenetics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 2004;69:67-70. doi: 10.1101/sqb.2004.69.67.

Huang DD, *et al.* Nrf2 deficiency exacerbates frailty and sarcopenia by impairing skeletal muscle mitochondrial biogenesis and dynamics in an age-dependent manner. **Experimental Gerontology**. 2019;119:61-73. doi: 10.1016/j.exger.2019.01.022.

Ilha J, do Espírito-Santo CC, de Freitas GR. mTOR Signaling Pathway and Protein Synthesis: From Training to Aging and Muscle Autophagy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 2018;1088:139-151. doi: 10.1007/978-981-13-1435-3_7.

Islam H, *et al*. The impact of acute and chronic exercise on Nrf2 expression in relation to markers of mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**. 2019;120(1):149–160. doi:10.1007/s00421-019-04259-7.

Irving BA, *et al*. Combined training enhances skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity independent of age. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2015;100(4):1654-63. doi: 10.1210/jc.2014-3081.

Jacques M, *et al*. Epigenetic changes in healthy human skeletal muscle following exercise- a systematic review. **Epigenetics**. 2019;14(7):633–648. doi:10.1080/15592294.2019.1614416.

Jørgensen SB, Richter EA, Wojtaszewski JF. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. **The Journal of Physiology**. 2006;574(Pt 1):17-31. doi: 10.1113/jphysiol.2006.109942.

Kang C, Ji LL. PGC-1 α overexpression via local transfection attenuates mitophagy pathway in muscle disuse atrophy. **Free Radical Biology and Medicine**. 2016;93:32-40. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.032.

Kang C, Chung E, Diffie G, Ji LL. Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle: role of PGC-1 α . **Experimental Gerontology**. 2013;48(11):1343-50. doi: 10.1016/j.exger.2013.08.004.

Kim JY, *et al*. The Preventive Effects of 8 Weeks of Resistance Training on Glucose Tolerance and Muscle Fiber Type Composition in Zucker Rats. **Diabetes & Metabolism Journal**. 2015;39(5):424-33. doi: 10.4093/dmj.2015.39.5.424.

Lee H, *et al*. A cellular mechanism of muscle memory facilitates mitochondrial remodelling following resistance training. **The Journal of Physiology**. 2018;596(18):4413-4426. doi: 10.1113/JP275308.

Li E, Zhang Y. DNA Methylation in Mammals. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 2014;6(5):a019133. doi: 10.1101/cshperspect.a019133.

Lourenço Í, *et al.* Muscle hypertrophy and ladder-based resistance training for rodents: A systematic review and meta-analysis. **Physiological Reports**. 2020;8(17):e14502. doi: 10.14814/phy2.14502.

Marcangeli V, *et al.* Impact of high-intensity interval training with or without l-citrulline on physical performance, skeletal muscle, and adipose tissue in obese older adults. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**. 2022; 13(3):1526-1540. doi: 10.1002/jcsm.12955.

McGee SL, Hargreaves M. Epigenetics and Exercise. **Trends in Endocrinology & Metabolism**. 2019;30(9):636-645. doi: 10.1016/j.tem.2019.06.002.

Mesquita PHC, Vann CG, Phillips SM, McKendry J, Young KC, Kavazis AN, Roberts MD. Skeletal Muscle Ribosome and Mitochondrial Biogenesis in Response to Different Exercise Training Modalities. **Frontiers in Physiology**. 2021;12:725866. doi: 10.3389/fphys.2021.725866.

Morton RW, *et al.* A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training-induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. **British Journal of Sports Medicine**. 2018;52(6):376-384. doi: 10.1136/bjsports-2017-097608.

Nanney DL. Epigenetic Control Systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 1958;44(7):712-717. doi: 10.1073/pnas.44.7.712.

Ogasawara R, *et al.* The role of mTOR signalling in the regulation of skeletal muscle mass in a rodent model of resistance exercise. **Scientific Reports**. 2016;6:31142. doi: 10.1038/srep31142.

Olean-Oliveira A, Olean-Oliveira T, Moreno ACR, Seraphim PM, Teixeira MFS. A Chemiresistor Sensor Based on Azo-Polymer and Graphene for Real-Time Monitoring of Mitochondrial Oxygen Consumption. **ACS Sensors**. 2019;25;4(1):118-125. doi: 10.1021/acssensors.8b01013.

Padilha CS, *et al.* Moderate vs high-load resistance training on muscular adaptations in rats. **Life Sciences**. 2019;1;238:116964. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116964.

Radaelli R, *et al.* Dose-response of 1, 3, and 5 sets of resistance exercise on strength, local muscular endurance, and hypertrophy. **The Journal of Strength & Conditioning Research**. 2015;29(5):1349-58. doi: 10.1519/JSC.0000000000000758.

Schnyder S, Handschin C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. **Bone**. 2015;80:115-125. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.008.

Schoenfeld BJ. Potential mechanisms for a role of metabolic stress in hypertrophic adaptations to resistance training. **Sports Medicine**. 2013;43(3):179-94. doi: 10.1007/s40279-013-0017-1.

Seaborne RA, *et al.* Human Skeletal Muscle Possesses an Epigenetic Memory of Hypertrophy. **Scientific Reports**. 2018;30;8(1):1898. doi: 10.1038/s41598-018-20287-3.

Seaborne RA & Sharples AP. The Interplay Between Exercise Metabolism, Epigenetics, and Skeletal Muscle Remodelling. **Exercise and Sport Sciences Reviews**. 2020;48(4):188-200. doi: 10.1249/jes.0000000000000227.

Škarabot J, Brownstein CG, Casolo A, Del Vecchio A, Ansdell P. The knowns and unknowns of neural adaptations to resistance training. **European Journal of Applied Physiology**. 2021;121(3):675-685. doi: 10.1007/s00421-020-04567-3.

Theilen NT, Jeremic N, Weber GJ, Tyagi SC. TFAM overexpression diminishes skeletal muscle atrophy after hindlimb suspension in mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 2019;15;666:138-147. doi: 10.1016/j.abb.2018.12.015.

Theilen NT, Kunkel GH, Tyagi SC. The Role of Exercise and TFAM in Preventing Skeletal Muscle Atrophy. **Journal of Cellular Physiology**. 2017;232(9):2348-2358. doi: 10.1002/jcp.25737.

Valero T. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. **Current Pharmaceutical Design**. 2014;20(35):5507-9. doi: 10.2174/138161282035140911142118.

Van Speybroeck L. From Epigenesis to Epigenetics: The Case of C. H. Waddington. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2006;981(1):61-81. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04912.x.

Waddington CH. The Epigenotype, 1942. **International Journal of Epidemiology**. 2012;41(1):10-3. doi: 10.1093/ije/dyr184.

Waddington CH. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature**.1959;183(4676):1654-1655. doi: 10.1038/1831654a0.

Weinhold B. Epigenetics: The Science of Change. **Environmental Health Perspectives**. 2006;114(3):A160-A167. doi: 10.1289/ehp.114-a160.

Widmann M, Nieß AM, Munz B. Physical Exercise and Epigenetic Modifications in Skeletal Muscle. **Sports Medicine**. 2019;49(4):509-523. doi: 10.1007/s40279-019-01070-4.

Wilkinson SB, *et al*. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. **The Journal of Physiology**. 2008 Aug 1;586(15):3701-17. doi: 10.1113/jphysiol.2008.153916.

Yong WS, Hsu FM, Chen PY. Profiling genome-wide DNA methylation. **Epigenetics & Chromatin**. 2016;29;9:26. doi: 10.1186/s13072-016-0075-3.

Yoon KJ, Zhang D, Kim SJ, Lee MC, Moon HY. Exercise-induced AMPK activation is involved in delay of skeletal muscle senescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2019;512(3):604-610. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.086.

Youssef L, *et al*. Clinical and Biological Adaptations in Obese Older Adults Following 12-Weeks of High-Intensity Interval Training or Moderate-Intensity Continuous Training. **Healthcare** (Basel). 2022;10(7):1346. doi: 10.3390/healthcare10071346.

ANEXO 1. Certificado CEUA local (FCT/UNESP).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Presidente Prudente

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Efeito do treinamento resistido sobre a função mitocondrial e parâmetros secundários em músculos esquelético de ratos adultos jovens com membros posteriores previamente imobilizados**, protocolo nº **01/2020** sob responsabilidade de **Patricia Monteiro Seraphim** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUAS da Faculdade de Ciência e Tecnologia da UNESP, campus de Presidente Prudente, em reunião de **13.05.2020**.

Vigência da autorização	Até 30/06/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogênico/ Wistar
Nº de Animais	50
Peso/Idade	200g/ 45 dias
Sexo	50 machos
Origem	Biotério Central da Unesp Campus de Botucatu - SP

Prof. Dr. Augusto Cesarando de Carvalho
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais.