

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia

TESE DE DOUTORADO

**Treinamentos Resistido ou de Endurance em ratos adultos jovens e velhos:
efeitos sobre os músculos dos membros posteriores, medula espinhal
lombar e sobre a astrocitose hipocampal**

Autor: Pedro Ivo Kalil-Gaspar

Orientação: Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

Porto Alegre - 2011

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO GERAL

PARTE 1

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	63
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4. RESULTADOS.....	81
5. DISCUSSÃO.....	110
6. CONCLUSÕES.....	125
7. PERSPECTIVAS.....	127

PARTE 2129

1. INTRODUÇÃO.....	133
2. OBJETIVOS.....	134
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	134
4. RESULTADOS.....	137
5. DISCUSSAO.....	138
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	149

AGRADECIMENTOS150

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....151

TABELA DE ABREVIATURAS

5-HT - 5-hidroxi-triptamina, serotonina

ACh - acetilcolina

AChE - enzima acetilcolinesterase

ADI - área de interesse

AKT - proteinocinase B (AK strain transforming retrovírus)

AMP-cíclico - adenosina-monofosfato cíclico

ANOVA - análise de variância

ATPase - adenosina trifosfato fosforilase

BDNF - fator de crescimento derivado do encéfalo

BSA - bovine serum albumin

BuChE - butirilcolinesterase

CA1 - corno de Ammon 1

CA3 - corno de Ammon 3

CD - corno dorsal

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CV - corno ventral

DAB - 3,3-diaminobenzidina

DNA - ácido desóxi-ribonucléico

DO - densitometria óptica

DTNB - ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

GABA - ácido gama-aminobutírico

GFAP - proteína ácida fibrilar glial

GH - hormônio do crescimento

GPC - geradores de padrão central de locomoção

IECA - inibidor da enzima conversora de angiotensina

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina 1

IGFBP - proteína ligante do IGF

IL-6 - interleucina 6

IRS - substrato do receptor da insulina

JC - jovem corredor

JE - jovem escalador

JNM - junção neuromuscular

JS - jovem sedentário

MGF - mecanofator de crescimento

MHC (*myosin heavy chain*) - cadeia pesada da miosina

MN - motoneurônios

MTOR - proteína-alvo da rapamicina de mamíferos

NE - norepinefrina

NGF - fator de crescimento neural

NMDA - N-metil D-aspartato

p75-NGFR - receptor de baixa afinidade do fator de crescimento neural

PAP - peroxidase anti-peroxidase

PBS - tampão fosfato salino

PI3-K - fosfatidilinositol-3 cinase

PKA - proteinocinase A

RGB - red, Green and blue

RNA - ácido ribonucléico

SARM - moduladores de receptores específicos de androgênios

SNC - sistema nervoso central

TEM - teste de esforço máximo inicial

TGF - fator de crescimento transformante

TIFF - *tagged image file format*

VC - velho corredor

VE - velho escalador

VO₂max - consumo máximo de oxigênio

VS - velho sedentário

Apresentação

No mundo atual, o envelhecimento da população tem aumentado a necessidade de compreender-se os processos biológicos e patológicos que acompanham o aumento do tempo de vida. Fenômenos deletérios antes percebidos como inexoráveis tornaram-se objeto de estudo, revelando, frequentemente, possibilidades de intervenção, prevenção, ou retardo em sua evolução. A melhoria dos cuidados nas doenças cardiovasculares e no câncer, que são as principais causas de morbimortalidade na maioria das sociedades industrializadas, aumentou a prevalência das doenças do idoso e o reconhecimento de novas síndromes geriátricas, especialmente aquelas que afetam a qualidade de vida, a autonomia, a personalidade e a memória. Do ponto de vista coletivo, a crescente demanda por serviços de saúde voltados à população idosa é um efeito colateral benéfico do progresso que, no entanto, desafia a capacidade da parcela economicamente ativa de gerar riqueza e manter bem-estar social.

Como as alterações de saúde relacionadas ao envelhecimento assumem importância crescente, foram objeto desta tese a descrição de alguns fenômenos do envelhecimento, usando-se o rato albino Wistar como modelo de estudo. A primeira parte, voltada ao efeitos de diferentes modalidades de exercício no sistema locomotor, descreve modificações encontradas nos músculos do membro posterior e na medula espinhal. Na segunda parte, complementar, aproveitou-se

os mesmos animais para abordar os efeitos de diferentes modalidades de exercício no sistema nervoso central, especificamente sobre a gliose hipocampal.

Para fins de simplificação, o termo "músculo" será tratado como sinônimo de músculo estriado esquelético, já que os outros tipos histológicos (músculos liso e estriado cardíaco) não serão aqui abordados. O termo "idoso" será sempre usado para humanos, sendo o adjetivo "velho" utilizado de forma ampla, quando referindo-me a humanos ou a outras espécies animais.

PRIMEIRA PARTE

Treinamentos Resistido ou de Endurance em ratos adultos jovens e velhos: efeitos sobre os músculos dos membros posteriores e medula espinhal lombar

Resumo

Ratos Wistar machos adultos jovens (6 meses) e velhos (24-25 meses) foram alocados em treinamentos de endurance (corrida em esteira) ou resistido (escalada em grade) durante 6 semanas e comparados a controles sedentários (n=6). Ao final, músculos dos membros posteriores (sóleo e gastrocnêmio) foram analisados por histogramas e atividade total da enzima acetilcolinesterase (AChE). Na medula espinhal lombar, motoneurônios (MN) foram contados, bem como astrócitos da substância cinzenta marcados com GFAP. Densidades ópticas foram medidas nos cornos ventral (CV) e dorsal (CD) para CGRP-ir (MN e CD), AChE e 5-HT-ir (CV e CD). Para histogramas, dados foram analisados usando-se MANOVA e post hoc de Tukey. Os demais dados foram analisados usando-se ANOVA de 1 via e post hoc de Duncan. Resultados: histogramas de ratos jovens mostraram perfis de distribuição distintos após corrida (predominância de fibras de médio diâmetro) ou escalada (predominância de fibras de grande diâmetro) no músculo gastrocnêmio, mas não no sóleo. O perfil de predominância de fibras de pequeno diâmetro observado em ratos velhos sedentários foi igualmente revertido por corrida ou escalada, mas ratos velhos apresentaram limitado aumento de fibras de maior diâmetro. Tanto corrida quanto escalada diminuíram a atividade da AChE muscular. A medula espinhal de animais velhos apresentou menor número de MN e aumento do número de astrócitos. Tanto corrida quanto escalada reduziram a astrogliose no CV, mas não no CD. Ratos velhos mostraram aumento da CGRP-ir em MN, mas nenhum treinamento alterou a CGRP-ir em MN ou no CD. Tanto corrida quanto escalada aumentaram a AChE no CV em todos os

grupos treinados. A escalada diminuiu AChE no CD e 5-HT-ir no CV. Nos ratos jovens, a corrida elevou 5-HT-ir no CD, mas não nos ratos velhos. Estes resultados sugerem que distintas modalidades de exercícios crônicos evocam diferentes respostas de neurotransmissores na medula espinhal em diferentes idades.

Palavras-chave: envelhecimento, medula espinhal, CGRP, astrócitos, GFAP, exercício, treinamento de endurance, treinamento resistido, músculo, acetilcolinesterase.

Abstract

Young (6 months) and aged (24-25 months) male Wistar rats were assigned to endurance training (ET - treadmill running) and resistance training (RT - grid climbing with increasing weights) during 6 weeks and compared to sedentary controls (n=6). At the end, hindlimb muscles (soleus and gastrocnemius) were analysed by histograms and total AChE activity. In the lumbar spinal cord, motoneurons (MN) were counted, as well as gray matter's GFAP-labeled astrocytes. Optical densities were measured in the ventral (VH) and dorsal (DH) horns for CGRP-ir (MN and DH), AChE staining and 5-HT-ir (VH and DH). Data from histograms were analysed using MANOVA and Tukey's post hoc. The remaining data Weir analysed using ANOVA and Duncan's post hoc. Results: gastrocnemius, but not soleus, muscle histograms in young rats showed distinct fiber distribution profiles under ET (toward medium-diameter fibers) and RT (toward large-diameter fibers). The predominance in small-diameter muscle fibers

in aged rats was similarly reversed by ET and RT, but aged rats presented limited increase in large-diameter muscle fibers. Both ET and RT decreased muscle AChE activity. The aged spinal cords presented MN loss and greater astrocyte numbers. Both ET and RT reduced astrogliosis in VH, but not in DH. The aged rats displayed elevated CGRP-ir in MN, and neither ET nor RT altered CGRP-ir in MN or DH. Exercise (ET and RT) markedly increased AChE staining in VH in all groups. RT decreased AChE in DH and 5-HT-ir in VH. In young rats, running elevated 5-HT-ir in the DH. These results suggest that different chronic exercise modalities and age evoke distinct spinal cord neurotransmitter responses.

Key words: aging, spinal cord, CGRP, astrocytes, GFAP, exercise, resistance training, endurance training, muscle, acetylcholinesterase.

1. Introdução

1.1 A Sarcopenia

Nos mamíferos de idade avançada, a perda involuntária e progressiva de massa muscular que ocorre durante a senescência é o fator mais importante relacionado à diminuição de força muscular esquelética. O fenômeno, denominado sarcopenia (do grego "sarx", carne e "penia", falta de) foi proposto em 1989 por Irwin Rosenberg, para descrever a perda de massa muscular associada ao envelhecimento [1,2]. Desde então, é formalmente definido como as perdas de massa muscular esquelética e de força que ocorrem com o envelhecimento [3]. A sarcopenia, hoje, é considerada uma síndrome geriátrica grave. Ela acarreta progressivos declínios da força e da funcionalidade, com um amplo alcance, medido em termos de morbidade [4], incapacidade, altos custos de cuidados médicos [5] e mortalidade [6]. É um fenômeno prevalente na população idosa [7, 8], com múltiplos fatores contribuintes. Nestes incluem-se o próprio processo de envelhecimento, influências do período de juventude, dieta não ideal, restrição ao leito ou estilo de vida sedentário, doenças crônicas e certos tratamentos farmacológicos (vide Quadro 1) [9–11]. Como resultado, a sarcopenia gera aumento do risco de quedas e fraturas, sequelas e incapacidades, diminuição da tolerância ao exercício e da habilidade para atividades cotidianas, perda de independência e aumento do risco de morte [12–17].

O recente Consenso Europeu em Sarcopenia recomenda, para seu diagnóstico, a presença tanto de diminuição da função muscular (força ou desempenho) quanto de diminuição da massa muscular. A síndrome, então, pode ser considerada "primária" (apenas relacionada ao envelhecimento) ou, na maioria das vezes, de etiologia multifatorial [18]. Sua prevalência na população entre 60 e 70 anos é de 5-13%, chegando a 50% após os 80 anos. O número de pessoas no mundo com idade de 60 anos ou mais foi estimado em 600 milhões no ano 2000, um número que se espera aumentar para 1,2 bilhões em 2025. Mesmo em uma previsão conservadora, a sarcopenia afeta hoje mais de 50 milhões de pessoas, e esta população aumentará para mais de 200 milhões nos próximos 40 anos [18,19].

QUADRO 1: Mecanismos de sarcopenia (por causa) [18]

Sarcopenia primária	Relacionada ao envelhecimento, excluídas outras causas
Sarcopenia secundária	Relacionada à inatividade (restrição ao leito, estilo de vida sedentário, descondicionamento, condição de ausência de gravidade)
Sarcopenia relacionada a doenças	Relacionada a falência de órgãos (coração, pulmão, fígado, rim, encéfalo), doenças inflamatórias, neoplasias ou doenças endócrinas. □
Sarcopenia relacionada a desnutrição	Resulta de ingesta inadequada de energia e/ou proteínas, como na malabsorção, distúrbios

	gastrointestinais e uso de medicações anorexígenas.
--	---

1.2 Obesidade sarcopênica

Sabe-se que um adulto normal pode esperar ganhar aproximadamente 0,45 kg de gordura, e perder cerca de 0,23 kg de massa muscular por ano, entre 30 e 60 anos de idade [20]. Com o envelhecimento, tanto a gordura intramuscular quanto a gordura visceral aumentam, enquanto a gordura subcutânea diminui [21-23]. Envelhecendo, ou sob condições como neoplasias ou doenças autoimunes, perde-se massa muscular enquanto a gordura corporal total pode ser mantida ou até aumentada. Neste estado, chamado de obesidade sarcopênica, a redução da massa muscular ocorre independentemente do índice de massa corpórea, mascarada pelo peso corporal estável [24,25]. Estima-se que aproximadamente 30% dos homens e 10% das mulheres com idade maior que 80 anos apresentem obesidade sarcopênica [26,27], que pode, ainda, ser agravada pela infiltração gordurosa do músculo e substituição de fibras musculares por tecido adiposo, que diminuem a capacidade e a qualidade funcional do músculo [28,29].

1.3 A Sarcopenia como Componente de Outras Síndromes Geriátricas

A sarcopenia deve ser distinguida de outras síndromes nas quais ela representa parte importante do quadro clínico, principalmente a síndrome de

fragilidade do idoso, ou simplesmente fragilidade, e da caquexia. A fragilidade consiste em uma síndrome geriátrica resultante de declínios cumulativos entre múltiplos sistemas fisiológicos, com diminuição da reserva homeostática e reduzida capacidade de adaptação do organismo, aumentando a vulnerabilidade a desfechos adversos, isto é, quedas, hospitalização, institucionalização e morte [30,31]. A síndrome de fragilidade caracteriza-se por perda de peso involuntária, diminuição da massa e da força muscular, exaustão, alteração da marcha e do equilíbrio, anorexia, perda de peso progressiva [31,32]. Fragilidade e sarcopenia frequentemente coexistem; a maioria dos idosos frágeis tem sarcopenia, e idosos de idade mais avançada com sarcopenia tendem a evoluir para a fragilidade. A concepção geral da fragilidade, no entanto, transcende critérios de desempenho físico e locomotor, incluindo também dimensões cognitivas e sociais, o suporte social e fatores ambientais [30,32].

Analogamente, a sarcopenia é um dos elementos para definição diagnóstica da caquexia [33]. Caquexia (do grego, "cac", ruim, "hexis", condição) é uma síndrome frequentemente reconhecida em adultos mais velhos com perda ponderal significativa acompanhando estados mórbidos como neoplasias, cardiomiopatias graves, doenças renais ou hepáticas avançadas [34]. A caquexia é definida como uma síndrome metabólica complexa, associada a doença subjacente, e caracterizada por perda de massa muscular associada ou não a perda de gordura [33], devidas a inflamação, resistência a insulina, anorexia e catabolismo protéico aumentado [35,36]. Deste modo, encontra-se que a maioria

dos indivíduos caquéticos são também sarcopênicos, mas nem todos os sarcopênicos são caquéticos [18].

1.4 O envelhecimento muscular

O envelhecimento do músculo estriado esquelético é um fenômeno complexo, que consiste em várias alterações fisiológicas e morfológicas. Nos humanos, tais alterações tendem a ser menores nos músculos de membros superiores e mais graves nos inferiores. No envelhecimento muscular, observam-se alterações na qualidade das fibras musculares, na efetividade neural, no controle fino do equilíbrio e na diminuição das aferências sensitivas e motoras [37]. Como já foi dito, ocorre substituição de fibras musculares por tecido adiposo e fibrótico com diminuição da síntese protéica, ocasionando redução da força e eficiência muscular [32]. Alterações complexas e interdependentes incluem diminuição de síntese protéica miofibrilar, de força de contração, de capacidade de oxidação aeróbia, da capacidade de estiramento da fibra e da capacidade de responder à contração muscular com um aumento do volume sanguíneo disponível [18].

Uma perda de motoneurônios e conseqüente desnervação na junção neuromuscular ocorre de forma desigual entre diferentes grupos musculares, acometendo preferencialmente fibras do tipo II (fibras de contração rápida - vide adiante), causando atrofia nesta população [38-41].

Alterações endócrinas também ocorrem no envelhecimento muscular, verificando-se aumento da resistência insulínica e diminuição dos níveis séricos de hormônios importantes para a manutenção da massa muscular, como o hormônio do crescimento e fatores de crescimento semelhantes à insulina, discutidos adiante. O estresse oxidativo acumulado durante toda a vida se acompanha de uma diminuição de defesas anti-oxidantes. A função mitocondrial no músculo piora [42-44], pois o estresse oxidativo leva a mutações do DNA mitocondrial, resultando em mitocôndrias defeituosas, que reduzem a eficiência de contração, que é particularmente sensível a este fenômeno [44]. Tanto o consumo de oxigênio quanto o consumo máximo de oxigênio (VO₂ max) também decrescem com a perda de massa muscular [45,46] e isto pode gerar uma percepção de maior gasto energético em baixos níveis de trabalho em indivíduos sarcopênicos fisicamente treinados [47]. Um estado inflamatório permanente também presente no músculo velho contribui para o catabolismo protéico muscular. Níveis elevados de interleucina 6 (IL-6) já foram sugeridos como preditores de declínio funcional acelerado em idosos, por meio da perda da massa e principalmente da força muscular [32].

Os músculos são, também, uma reserva de proteínas corpóreas, e podem ofertar substrato energético e aminoácidos para a síntese protéica, além da metabolização de uma série de hormônios e da produção de mecanofatores de crescimento (ver adiante) [37]. Um importante componente no declínio funcional muscular do envelhecimento envolve a sinalização dos hormônios do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). As mudanças que

ocorrem nas secreções de GH e IGF-1 durante o envelhecimento são acompanhadas de perda progressiva da massa muscular, bem como da perda de densidade óssea [48]. No músculo, o GH promove crescimento somático e desenvolvimento [49], e age sobre o metabolismo de carboidratos e lipídeos [50,51]. O GH também promove a fusão de células precursoras miogênicas em miofibras, sendo para isso necessária a ativação de fatores nucleares independentemente do IGF-1 [52]. Níveis circulantes de GH declinam progressivamente após os 30 anos de idade, em uma taxa de 1% ao ano [53], havendo uma relação inversa significativa entre os níveis máximos de GH e o índice de massa corporal [54-56].

O GH ativa diretamente seus receptores [49], ou age indiretamente através do IGF-1 [57], que é produzido principalmente no fígado, em resposta à estimulação por GH [58]. O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) também é produzido por uma variedade de tipos celulares na maioria dos tecidos sendo, provavelmente, o mais importante mediador do crescimento osteomuscular [59]. Ao contrário do GH, níveis séricos de IGF-1 são estáveis e sem variabilidade significativa entre indivíduos saudáveis [60]. O envelhecimento é associado com decréscimos nos níveis séricos de IGF-1, bem como no conteúdo e fosforilação de seus receptores no músculo [61]. Ainda, a síntese de DNA em fibroblastos e a sua resposta proliferativa ao IGF-1 diminuem com a idade, modificando a integridade do tecido conjuntivo muscular [62].

Os IGF's 1 e 2 são polipeptídeos de cadeia única, que têm uma estrutura secundária semelhante, com três alfa-hélices e três pontes dissulfeto [63]. Em roedores, o IGF-2 predomina durante a vida fetal, enquanto o IGF-1 é considerado um fator de crescimento do adulto. Este padrão não é observado em humanos, já que ambos ligantes são produzidos em múltiplos tecidos ao longo da vida, consistentemente com o conceito de que possuem papéis diversos na fisiologia humana [64]. A produção de IGF-1 e IGF-2 pelo músculo é dependente do estiramento e da sobrecarga, estando diminuída nos idosos [65]. O IGF-1 possui, pelo menos, duas isoformas obtidas por processamento diferencial do RNAm. O IGF-1Ea, produzido tanto no fígado quanto nos tecidos musculares, foi a primeira isoforma descoberta, e frequentemente é referido como tipo hepático, ou IGF-1 sistêmico. Os IGF's -1Eb (forma dos roedores) e IGF-1Ec (forma humana) são produzidos principalmente no tecido muscular esquelético, e são usualmente referidos como mecanofatores de crescimento (MGF's) [66]. Ao contrário dos MGF's, o IGF-1 hepático é glicosilado, e esta modificação o protege da proteólise, conferindo-lhe uma meia-vida mais longa [60].

A influência do IGF-1 sobre o envelhecimento muscular pode ser constatada na prática, pois IGF-1 exógeno é capaz de estimular um aumento das enzimas oxidativas e da resistência à fadiga [67]. Um recente estudo prospectivo de 8 anos conduzido em homens idosos [68] mostrou que a maior bioatividade de IGF-1 circulante foi associada a melhor sobrevivência geral, enquanto indivíduos com baixos níveis de IGF-1 apresentavam um aumento (de 1,8 vezes entre quartis mais baixo e mais alto) no risco de morrer. Outro estudo mostrou que níveis de

RNA's de IGF-1 e IGFBP5 no músculo jovem em repouso são cerca do dobro daqueles encontrados no músculo velho [69].

No envelhecimento, observa-se, ainda, um aumento da expressão da proteína muscular miostatina. Esta proteína diminui a atividade de células satélites (mioblastos), por inibir a síntese de DNA e a proliferação celular [70], e contrabalançar a estimulação pelo GH da síntese protéica e ativação de células satélites [71]. A desregulação da via IRS/PI3-K/AKT parece ser particularmente relevante para o desenvolvimento da perda muscular, pois estudos in vitro implicam esta via no controle do crescimento de miócitos e da massa muscular [72]. A inibição de PI3-K ou da AKT previne os efeitos anabólicos do IGF-1 em células em cultura [73]. O déficit de ativação pelo IGF-1 em ratos velhos tem sido demonstrado associado a uma reduzida atividade da via IRS-1/PI3-K [74]. Analogamente, hiperativação da AKT leva à hipertrofia muscular in vivo [75]. No nível molecular, o crescimento de miócitos é interpretado como sendo dependente da sinalização de MTOR e GSK-3, induzida pela AKT [76].

1.5 O Exercício Físico e Outras Terapias para a Sarcopenia

Várias estratégias têm sido propostas para prevenir, reverter ou diminuir a perda funcional do sistema muscular que ocorre no envelhecimento. Além dos exercícios físicos, tratamentos experimentais para combater a sarcopenia envolvem a reposição exógena de hormônios anabólicos, como a testosterona, estrógenos e hormônio do crescimento (GH); intervenções nutricionais, como a

leucina, a vitamina D e a creatina; e fármacos, como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e agentes antimiotatina. Novos agentes como os moduladores da miostatina e de receptores específicos de androgênios (SARMs) ainda encontram-se em fases iniciais de teste de segurança e eficácia.

1.5.1 Estratégias Nutricionais

Existe razoável consenso de que o aminoácido essencial leucina aumenta o anabolismo protéico e diminui a quebra de proteínas [77]. Fontes de comida ricas em leucina incluem grãos como a soja e o feijão fradinho, e produtos animais como carne vermelha e peixe. Suplementos aminoácidos que não contêm quantidades adequadas de leucina não estimulam a síntese protéica [78-80]. Produtos à base de carne contêm mais aminoácidos essenciais que aqueles baseados em vegetais, e já sugeriu-se que adultos mais velhos deveriam ser encorajados a comer uma dieta mais rica em carne magra ou consumir suplementos de aminoácidos essenciais, particularmente se engajados em treinamento resistido [81].

A vitamina D também vem sendo reconhecida como uma estratégia potencial para intervenção na sarcopenia. Os mecanismos de ação da vitamina D no tecido muscular incluem efeitos genômicos que modificam a transcrição gênica de RNAm e a síntese protéica, e também efeitos não genômicos rápidos, mediados diretamente por receptores de superfície para a vitamina D em células musculares [82]. Durante o envelhecimento, diminui a eficiência da pele em

sintetizar vitamina D, bem como os rins tornam-se menos capazes de convertê-la à forma ativa [83]. Indivíduos idosos têm propensão à deficiência de vitamina D, e uma revisão sistemática recente recomenda sua suplementação para auxiliar no combate à sarcopenia, ao declínio funcional e ao risco de quedas. Alguns estudos clínicos têm sido conduzidos em pacientes, em associação a outras formas de prevenção da sarcopenia, mas seus resultados ainda são aguardados [84].

A fonte de creatina dietética primária é a carne bovina, que é convertida a creatinina (1 kg de carne contém 5 g de creatina). O monidrato de creatina já foi considerado um potencial agente ergogênico, devido a sua ação tamponadora do acúmulo de prótons, e por aumentar as concentrações musculares de fosfocreatina necessárias para contrações musculares de alta intensidade [85]. A suplementação de creatina, combinada com o exercício resistido, mostrou-se efetiva para aumentar a força em adultos idosos [86-88]. A creatina foi bem tolerada, mas não há dados de estudos de longa duração. Como os mecanismos de ação da creatina ainda são pouco compreendidos, ensaios adicionais ainda são necessários.

1.5.2 Estratégias Farmacológicas

A testosterona e seus análogos vêm sendo propostos há vários anos como agentes terapêuticos para a sarcopenia, com base em premissas fundamentadas e efeitos intensos já descritos sobre a massa muscular global, incluindo nos jovens. Em homens, a testosterona biodisponível diminui 2% ao ano, a partir dos

30 anos [89-91]. Em mulheres, seus níveis caem rapidamente entre 20 e 45 anos de idade [92]. Infelizmente, os resultados de ensaios de longa duração foram desanimadores. A reposição hormonal seria considerada uma abordagem lógica, mas resultou-se não recomendada para pacientes com sarcopenia, exceto aqueles com hipogonadismo, devido à intensidade de efeitos colaterais (retenção hídrica e de sódio, hipertensão arterial, dislipidemia e aumento do risco de câncer gonadal) e baixos benefícios sobre o desempenho funcional, que não compensaram os riscos [93]. Os SARMs parecem mais promissores por possuírem efeitos anabólicos sobre o músculo esquelético, sem os mesmos efeitos colaterais, porém ainda estão em fase inicial de aplicação clínica [94].

De maneira análoga, ensaios com administração de GH recombinante (rGH) em idosos não portadores de hipopituitarismo também não sustentaram seu uso por baixa eficácia e intensos efeitos colaterais (resistência insulínica, hiperglicemia, aumento do risco de neoplasia) [95]. Múltiplos ensaios de reposição de GH, com duração de mínima de 5 anos, mostraram que o GH protege contra os declínios na força muscular, na função neuromuscular e na densidade óssea relacionados ao envelhecimento em pessoas deficientes em GH (96-98). Entretanto, em adultos com mais de 60 anos estes efeitos tornam-se ausentes, sugerindo anormalidades na sinalização GH/IGF-1 [99,100]. A Research Society in the United States contraindica formalmente, hoje, o uso de rGH, sozinho, ou em combinação com testosterona, estrógenos ou tibolona (um esteróide sintético com propriedades tanto androgênicas, quanto estrogênicas e progestágenas) [101].

Inibidores da ECA (IECAs) atuam sobre a pressão arterial, principalmente através da supressão do sistema renina-angiotensina-aldosterona, assim prevenindo a formação de angiotensina II, que age como um potente vasoconstritor [102]. Além do controle da pressão arterial, IECAs também reduzem a pré- e pós-carga cardíacas, melhorando a contratilidade miocárdica [103]. IECAs são mundialmente usados no tratamento da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca em idosos [104], e 3 estudos de coorte reportaram melhora da composição corporal e funcionamento físico associados ao uso de IECAs em idosos e diminuição de quedas [105-108]. Os mecanismos pelos quais os IECAs agem sobre o músculo são desconhecidos, mas a melhora no débito cardíaco e, portanto, na perfusão muscular, a diminuição de citocinas inflamatórias, melhora da função endotelial e uma modulação positiva do IGF-1 parecem implicados [109]. Além disso, IECAs são prescritos desde início dos anos 80, e sua segurança a longo prazo é comprovada. Assim, apesar dos mecanismos de ação sobre o músculo permanecerem incertos, são hoje considerados uma estratégia segura adicional para melhorar a composição corporal em adultos idosos.

A miostatina é um membro da superfamília do TGF-beta, conhecida como regulador negativo da miogênese [110,111]. A sua ação primária é a diminuição da ativação e proliferação de células satélites musculares [112]. No momento, seu uso experimental ainda é restrito a modelos animais.

1.5.3 Exercício Físico

Como foi apresentado anteriormente, o desenvolvimento e a progressão da sarcopenia são complexos e multifatoriais. Porém, há um corpo de evidências crescente que indica que a atividade física pode lentificar a perdas de massa muscular e funcionais. Apesar da inatividade física agravar a perda de músculo esquelético, adultos mais velhos altamente ativos continuam a sofrer diminuição do desempenho cardiovascular e da massa muscular ao longo do tempo [45,46], aumentando a importância do modo de atividade na preservação da massa muscular. Dentre todas as terapias para sarcopenia já citadas, aquela que apresenta o melhor conjunto de resultados benéficos, tanto experimentais quanto na prática médica, envolve os exercícios resistidos (vide definições no Quadro 2) [113-116].

Nos humanos, a atividade física cotidiana pode ser subdividida em 4 domínios temporais principais: no tempo livre, ocupacional, atividade de transporte e a manutenção doméstica. Para o propósito desta tese, será abordada apenas a atividade física de tempo livre, em que há dedicação exclusiva ao exercício. Exemplificando o nível de atividade necessário para compreender o foco desta tese, tomaremos por base um estudo longitudinal [117] onde o tempo médio dispendido em atividades físicas moderadas a intensas foi reportado pelos participantes do estudo como de 60 minutos ao dia. Exemplos de atividades moderadas a intensas incluíram subida de escadas, corrida, ciclismo, tênis, esqui e natação. Nenhuma destas atividades incluía treino resistido. Apesar deste nível

de atividade física atingir ou exceder as recomendações da American Heart Association para exercício cardiovascular [118] tal nível de atividade não foi suficiente para manter a massa muscular ou diminuir a gordura corporal.

Nesta tese abordamos duas modalidades de exercício, o treinamento de endurance e o treinamento resistido. O treinamento resistido, por sua vez, pode ser subdividido em duas estratégias: treinamento de força (*strength training*) e treinamento de potência (*power training*), este último melhor compreendido através do termo explosão muscular. Nem todos os trabalhos de literatura subdividem o treinamento resistido em força ou potência, o que frequentemente gera a confusão terminológica (frequentemente, treinamentos de força e resistidos são referidos como sinônimos). No entanto, a separação entre treinamentos resistidos de força ou poder, até o momento, é utilizada apenas em humanos, sendo escassa em estudos com animais (para uma revisão específica, vide [183]).

QUADRO 2. Definições e Terminologia [183]

Força muscular	total de força produzido por 1 esforço máximo
Endurance	capacidade do músculo realizar contrações repetidamente
Potência muscular	produto da força pela velocidade
Exercício	movimento que objetiva utilizar grupos musculares específicos, de grupamentos musculares maiores

Repetição	um movimento completo de um exercício
Repetição máxima (RM)	máxima carga que pode ser erguida por uma repetição, com segurança e movimento apropriado
Série	sequência de repetições contínuas (por ex., 10 repetições/série)
Intensidade	quantidade de peso erguido tanto como percentagem de 1 RM (por ex., 70 % de 1 RM) ou um número específico de repetições dentro de uma série)
Frequência	número de dias por semana em que o exercício é conduzido
Duração	tempo de cada sessão de exercícios
Volume	soma da frequência, intensidade e duração

1.5.3.1 Treinamento de força (*Strength training*)

Um número crescente de estudos mostra que o treinamento de força é cada vez mais indicado para idosos, como uma maneira eficaz e segura de melhorar a força muscular e a capacidade funcional [119-121]. Este tipo de treinamento busca a contração muscular concêntrica, ou encurtadora do comprimento da fibra muscular, e pouco influencia a força excêntrica (de aumento no comprimento da fibra) [122,123]. Submetido a sobrecargas mais elevadas do que está acostumado a suportar, o músculo sofre um aumento da síntese protéica, e ganha tamanho e força [120]. Mudanças na inervação e padrão de ativação

muscular também ocorrem com o treinamento, melhorando o desempenho motor [124]. Uma revisão sistemática [125] concluiu que a maioria dos programas descritos como treinamentos de força compreendem durações de 8-12 semanas, com movimentos em 2-3 séries de 8–10 repetições para cada grupo muscular, a 65% da repetição máxima (1 RM), realizados 2-3 dias por semana. A maioria dos estudos revisados mostrou aumentos na força. Alguns destes estudos descrevem mudanças limitadas em testes funcionais, como levantar da cadeira, a despeito do aumento de força.

Poder-se-ia assumir que o treino resistido que resultasse em melhoras na força e/ou potência também melhorariam o desempenho físico. Uma recente revisão da base Cochran incluiu 121 ensaios, com 6.700 participantes, avaliando treinos resistidos e a função física [126]. Na maioria, o treino resistido progressivo foi realizado 2-3 vezes por semana com alta intensidade. Os treinamentos causaram uma grande melhora na força muscular, porém uma pequena mas significativa melhora na habilidade física. Foi observado apenas um aumento modesto na velocidade de marcha, e uma melhora moderada a ótima em erguer-se de uma cadeira. Os autores concluíram que o treino resistido progressivo é uma intervenção efetiva para melhorar a força e o funcionamento físico de pessoas idosas, incluindo o desempenho funcional de atividades simples ou complexas. Porém, tal revisão não abordou diferenças entre treino de força ou potência. Do ponto de vista prático, idosos que treinam com carga sobre músculos da coxa, comparados a nenhum treino, ganham força no músculo quadríceps e melhoram o tempo de caminhada [127].

1.5.3.2 Treinamento de potência muscular (*power training*)

Como dito anteriormente, a potência muscular diminui com a idade avançada num ritmo mais intenso que a força, e resulta na capacidade diminuída de produzir força rapidamente [128,129]. Isto decorre da perda preferencial de fibras rápidas e unidades motoras [130-133], e tem sido associado a um pior estado funcional e a um maior risco de quedas [129,134-136].

Evidências indicam que a potência muscular tem maior impacto no funcionamento físico do que a força [114-116]. A maioria dos estudos publicados de treinamento de potência usam 3-4 séries, para cada grupo muscular, em intensidades de 20%–80% de 1 RM, 2–3 vezes por semana, por 8-16 semanas. Todos estes estudos descreveram melhora importante da força e potência musculares, com alguns descrevendo também melhoras no funcionamento físico [129,134-138]. Ao contrário, 2 estudos randomizados comparando treinamentos de força e potência [115,138] mostraram melhoras similares de força, porém maiores ganhos de performance no treinamento de potência. Por outro lado, outros ensaios [139,140] chegaram a melhoras similares em ambos. Estes dados mostram a relação simbiótica entre as respostas fisiológicas aos treinamentos resistidos de força e potência, enquanto o treinamento de potência promove tanto ganho de força quanto de potência. Analogamente, o treinamento de força melhora a força muscular, mas não melhora a potência muscular a não ser que a velocidade das contrações seja muito alta [115]. Várias investigações recentes

relataram que a funcionalidade motora humana, particularmente dos membros inferiores, tem uma relação mais intensa com a potência muscular que com a força [141-144]. Para o músculo adquirir força e potência, o treinamento resistido necessita aumentar progressivamente a carga, para manter o número de repetições de uma sequência de exercícios. O American College of Sports Medicine recentemente recomendou que exercícios resistidos tivessem um aumento de carga de 2 a 10%, quando o indivíduo puder realizar a carga corrente com 1-2 repetições além do número desejado [145]. Além disto, recomendam um treinamento de potência muscular em 2 estágios de carga: o primeiro estágio é o próprio treinamento de força, e um segundo estágio consiste em cargas leves (0% a 60% de 1 repetição máxima para membros inferiores; e 30 a 60% da RM para membros superiores e tronco) realizado em velocidades de contração rápidas com 3-5 minutos de repouso entre múltiplas sequências por exercício (3-5 sequências). A aplicabilidade de modelos de treinamento resistido torna-se complexa no uso de animais, pois a rapidez de execução de movimentos de carga envolveria manipulação coerciva demais sobre os animais, tendo sido considerado impraticável o estabelecimento de um protocolo de treinamento resistido visando a potência muscular. Por esta razão, nesta tese, o tipo de treino resistido não pode ser definido como de força, potência ou força e potência, pois a rapidez de execução da subida de grades de escalada não foi mensurada, e a carga sofreu ascendência entre semanas de treinamento, e não dentro das próprias séries realizadas.

1.5.3.2 Treinamento de endurance

Nos atletas jovens bem treinados, o débito cardíaco é capaz de aumentar rapidamente até 6 vezes os níveis de descanso durante atividade física intensa [146]. O músculo cardíaco deve manter a circulação sanguínea nos estados de repouso e demanda periférica elevada, como a desencadeada por exercício. Respostas adaptativas do coração ao treinamento de endurance incluem bradicardia de repouso e de exercício submáximo, e aumento na dimensão diastólica final. Isto leva a uma hipertrofia cardíaca não patológica, à melhoria da função ventricular e aumento da resistência cardíaca a lesões isquêmicas [147]. Isto fez do treinamento de endurance aquele mais aplicado historicamente, pelo ganho cardiovascular em pacientes propensos a doença arterial coronariana, além do benefício metabólico hipolipemiante e de gasto calórico bruto.

Nos humanos, de maneira geral, o pico de desempenho de corrida de endurance é mantido até os 35 anos de idade, sofrendo decréscimos modestos até os 50 anos de idade, com reduções mais acentuadas depois desta idade [148]. A magnitude do declínio tende a ser maior em mulheres que em homens [149-151]. Este padrão é similar para atletas amadores ou de elite [149]. Isto não leva em conta a evolução das técnicas nutricionais e de treinamento esportivo. Por exemplo, em 2005, Kozo Haraguchi (Japão) conseguiu correr 100 m em 21.69 s, à idade de 95 anos. Em 2003, Ed Whitlock (Canadá) tornou-se a pessoa mais velha da história a correr uma maratona em menos de 3h, à idade de 73. Em alguns eventos (como a maratona), atletas de mais de 70 anos têm superado os tempos

da primeira olimpíada de Atenas [148]. Isto enfatiza a questão geral de como o desempenho no exercício de endurance se modifica com a prática, ainda que sob influência da idade.

Contraditoriamente à bem descrita perda preferencial de fibras de tipo II no envelhecimento, nos atletas, os declínios na capacidade de exercício aeróbio máximo são consideravelmente maiores que aqueles observados para a potência muscular "anaeróbio". Nos atletas, estas modificações de tipos de fibras são relativamente pequenas ou inexistentes, mostrando que o exercício precoce pode ajudar a manter um fenótipo "jovem" no músculo [152-155].

Os três principais determinantes fisiológicos do desempenho de endurance são a economia de exercício (também chamada eficiência de exercício), a intensidade de exercício na qual o consumo máximo de oxigênio pode ser sustentado, tipicamente definido como limiar de lactato, e o consumo máximo de oxigênio (VO₂ máxima)[156,149].

A economia de exercício é medida como o consumo de oxigênio durante a realização de um exercício específico submáximo, abaixo do limiar de lactato. Entre atletas de endurance, a economia é um importante determinante do desempenho, particularmente nos grupos homogêneos quanto à VO₂ máxima [157]. A percentagem de fibras do tipo I é associada à economia de exercício, razão provável pela qual ela não se modifica muito em atletas idosos (másteres) treinados em endurance [158-160]. Neste contexto, atletas idosos altamente

treinados conseguem manter uma distribuição de fibras semelhante às dos atletas jovens [154,155].

O limiar de lactato é definido como a intensidade de exercício na qual o lactato sanguíneo aumenta significativamente acima da concentração usual [161,162]. Nos adultos treinados em endurance, o limiar de lactato prediz o desempenho em longas distâncias (2,5 km em diante) [156,161,149], enquanto o desempenho muscular durante o limiar de lactato é o melhor preditor de desempenho entre atletas de endurance [163]. A velocidade durante o limiar de lactato declina com o envelhecimento nos atletas . Entretanto, o limiar de lactato, quando expresso em função da VO₂ máxima, não parece se alterar com a idade [164-167]. Este achado sugere que a contribuição do decréscimo no limiar de lactato é secundária a diminuições na VO₂ máxima [148].

O consumo máximo de oxigênio estabelece o limite superior da produção máxima de energia através da fosforilação oxidativa, sendo definido pela equação de Fick: débito cardíaco máximo x diferença artério-venosa de O₂ máxima [149,162]. A VO₂ máxima cai aproximadamente 10% por década de vida após os 25-30 anos em adultos saudáveis de ambos os sexos [168-172]. O ritmo de declínio da VO₂ máxima não se altera em adultos que realizam exercício aeróbio frequente [173-175,170], a mesma queda também sendo observada em ratos [148,176]. A VO₂ máxima pode ser considerada o melhor preditor de alterações de desempenho relacionadas à idade quanto ao exercício de endurance [177]. Existe controvérsia sobre as razões principais desta diminuição na VO₂ máxima,

que incluem fatores centrais (diminuição, com a idade, da fração de ejeção ventricular e da frequência cardíaca máxima, e endurecimento dos grandes vasos) [178-180], e fatores periféricos [diminuição da capacidade muscular de extração de oxigênio, isto é, da diferença de oxigênio arterio-venosa, que remete à massa muscular, ao tipo de fibra e à substituição relacionada à idade das de miócitos por tecidos adiposo e conjuntivo propriamente dito). Dentre fatores centrais e periféricos, o mais importante e difícil de modificar é o débito cardíaco, e portanto, o provável responsável maior pela queda da VO₂ máxima durante o envelhecimento [148].

Objetivamente, quando analisamos o treinamento da capacidade aeróbia no idoso sedentário, ele se mostra efetivo para diminuir a taxa de quedas e também para modificar os seus fatores de risco, em função dos ganhos de força muscular, mobilidade articular, aumento da velocidade da marcha e melhora na qualidade do equilíbrio. A perda da capacidade aeróbia dificulta a execução das atividades rotineiras (por exemplo, subir escadas, vestir-se, atravessar a rua), pois para realizá-las é necessário o condicionamento cardiovascular. Com base nisto, o treinamento da capacidade aeróbia seria também uma estratégia de prevenção de quedas, ao lado dos exercícios resistidos. Alguns estudos têm mostrado aumento das habilidades funcionais quando o treinamento de força é combinado com outros tipos de treinamento; sua associação ao treinamento da capacidade aeróbia e do equilíbrio tem se mostrado mais eficiente para aumentar o controle do equilíbrio e a velocidade da marcha [181,182]. No entanto, como estratégia específica para a sarcopenia, há relatos de incapacidade de ganho de massa

muscular no treinamento concorrente, isto é, composto de ambas formas de exercício, e por isso o exercício concorrente não foi utilizado nesta tese [18].

1.6 Classificação de Fibras Musculares

O músculo esquelético dos mamíferos é um tecido altamente plástico, que se modifica estrutural e metabolicamente quando estimulado. Na composição dos músculos esqueléticos há um conjunto heterogêneo de fibras musculares, que lhes confere ampla variedade de características de contração e resistência à fadiga, permitindo adaptarem-se a novas exigências, modificando seu tamanho ou sua composição das proteínas associadas à contração miofibrilar. Esta plasticidade serve de base fisiológica para as intervenções visando aumento da força ou da resistência à fadiga. O inverso acontece no descondicionamento, na inatividade, na desnervação e no envelhecimento [184-186].

Historicamente, os músculos esqueléticos, inteiros, foram classificados como sendo lentos ou rápidos com base nas velocidades de contração. Nisto há também alguma correspondência morfológica direta (músculos de contração rápida com cor branca, como nas aves, em contraposição aos músculos lentos, vermelhos devido a maiores concentrações de mioglobina, mitocôndrias e capilares sanguíneos, que contribuem para maior capacidade oxidativa em relação aos músculos brancos) [186]. Posteriormente, observou-se haver correlação entre a velocidade de ação catalítica da miosina-ATPase e a velocidade de contração, e as fibras passaram a ser divididas em de tipo I (lenta), e de tipo II (rápida), que

como já foi mencionado, é o tipo de fibra cuja perda ocorre preferencialmente durante o envelhecimento.

Do ponto de vista metabólico, as fibras de contração rápida (tipo II) dependem de fontes de energia rapidamente mobilizáveis para desenvolver contrações fortes e rápidas, mas isso só é possível por curtos períodos de tempo, por causa de um estoque limitado de reservas intracelulares (principalmente fosfocreatina e glicogênio). Estes músculos são, na maioria, rapidamente fatigáveis e apresentam atraso na recuperação das suas reservas de energia, através de glicólise anaeróbia e, bem menos, através de oxidação mitocondrial. Músculos lentos, ao contrário, desenvolvem menor força contrátil, mas são capazes de atividade contrátil repetida de longa duração, dependente de fosforilação oxidativa. Esta especificidade metabólica dos tipos de músculo gera uma especificidade do tipo de substrato de utilização, com fibras oxidativas (bem como o músculo cardíaco) oxidando ácidos graxos e lactato, enquanto as fibras glicolíticas utilizam principalmente glicose como substrato [187-189].

Atualmente, as fibras musculares são classificadas usando três principais métodos, que aqui serão apenas brevemente descritos, pois não serão abordados experimentalmente nesta tese. Compreendem a atividade histoquímica da miosina-ATPase, identificação de isoformas da cadeia de miosina, e identificação bioquímica das enzimas metabólicas.

Nas miofibrilas do sarcômero, a miosina possui duas cadeias, leve e pesada, esta última possuindo um sítio de ligação para adenosina trifosfato, que atua como ATPase provendo a energia necessária para a contração muscular. Em humanos, as taxas de hidrólise da miosina-ATPase nas fibras rápidas são 2 a 3 vezes maiores do que nas fibras lentas, produzindo resultados histoquímicos distintos [190]. Avanços na identificação desta proteína levaram a 7 tipos reconhecidos de fibras [184]. Originalmente, as fibras foram identificadas como tipos I, IIA, e IIB, chamados tipos puros [184,191]. Posteriormente, acrescentaram-se os tipos IC, IIC, IIAC e IIAB, de características intermediárias. O tipo mais lento de fibra, tipo IC, assemelha-se ao tipo I, enquanto que o tipo mais rápido de fibra, IIAC, aproxima-se do tipo IIA. Fibras do tipo IIAB têm características entre tipos IIA e IIB [184,186,191].

A segunda classificação citada advém da Identificação de diferentes isoformas de cadeia pesada da miosina [184]. O fato de cada fibra muscular poder conter mais de uma isoforma de miosina de cadeia pesada explica a existência de tipos de fibras que não sejam de tipos puros I ou IIA, assim como as fibras do tipo IIB [184,191]. Como exemplo, as três isoformas da miosina originalmente identificadas foram MHC (*myosin heavy chain*) I, MHCIIa e MHCIIb, e a elas correspondiam as isoformas identificadas por coloração de miosina-ATPase como tipos I, II e IIB, respectivamente [184,186,191].

Um terceiro método de classificação reflete o metabolismo energético da fibra, com base nas enzimas das vias metabólicas anaeróbia-glicolítica ou aeróbia-

oxidativa [191]. Esta técnica leva a 3 classificações de fibras: de contração rápida glicolítica (fast-twitch glycolytic, FG), de contração rápida oxidativa (fast-twitch oxidative, FOG), e de contração lenta oxidativa (slow-twitch oxidative, SO) [185,186]. Embora haja uma boa correlação entre tipo I e fibras SO, as correlações entre o tipo IIA e FOG e tipo IIB e FG são mais incertas [186,192]. Portanto, as fibras IIB nem sempre são anaeróbio-glicolíticas, nem as fibras do tipo IIA contraem-se sempre às custas de metabolismo aeróbio-oxidativo [191].

1.7 Classificação de Unidades Motoras

Embora venhamos a discutir os tipos de fibras, a verdadeira unidade funcional do sistema neuromuscular é unidade motora [193] que consiste em um motoneurônio alfa (originário da medula espinhal) e em todas as fibras musculares que ele inerva. Com base na histoquímica da miosina-ATPase e histoquímica qualitativa para enzimas que refletem o metabolismo energético da fibra, todas as fibras musculares de uma unidade motora têm características similares [194]. As unidades motoras podem ser divididas em grupos, segundo as características contráteis do músculo e da resistência à fadiga [193]. As unidades motoras são classificadas segundo Burke et al. [193] e Gillespie et al. [195] como de contração rápida fatigáveis (FF), de contração rápida resistentes a fadiga (FR), e lentas (S) [196,197].

Independentemente do esquema de classificação usado para fibras musculares de uma unidade motora, há provas contundentes de que as fibras musculares e, portanto, as unidades motoras, não só mudam de tamanho em resposta às demandas, mas também podem converter-se de um tipo para outro [185,198,199]. Esta plasticidade nas propriedades contráteis e metabólicas em resposta a estímulos (por exemplo, treinamento e reabilitação) permite a adaptação a diferentes demandas funcionais [185]. Conversões entre fibra IIB e IIA são as mais comuns. Em animais submetidos à suspensão de membros posteriores, e em observações de humanos e ratos após a exposição a microgravidade em vôos espaciais, demonstrou-se a mudança de fibras lentas para fibras musculares rápidas [185], bem como nos casos de descondicionamento grave e em lesões de medula espinhal [185,200]. Em humanos, o destreinamento (ou seja, uma diminuição do uso de um músculo com nível prévio de atividade alta) conduz a mudanças da composição de cadeias pesadas de miosina-ATPase, de MHCIIa para MHCIIx/d e, possivelmente, de MHCI para MHCIIa. Neste mesmo contexto, há também uma diminuição concomitante das enzimas associadas com o metabolismo aeróbio-oxidativo [185]. Menos evidências existem para a conversão do tipo II para fibras tipo I, através de treinamento ou reabilitação, porém estudos com músculos desnervados cronicamente ativados por estimulação elétrica têm demonstrado que tal conversão é possível [201].

1.8 Modelos Animais Desta Tese

O desenho experimental desta tese buscou a comparação de duas formas de treinamento físico animal, de endurance e resistido, que servissem de modelo a atividades análogas em humanos. De forma geral, o objetivou-se a comparação direta entre as atividades popularmente referidas como de corrida (de longa distância) e de musculação, ou mais especificamente, exercícios de endurance (aeróbio) e resistido (de força e/ou potência). Dificuldades inerentes à escolha do protocolo para o estudo de ratos adultos jovens e adultos velhos envolveram as idades de início do exercício, o tipo de protocolo de cada modalidade de exercício, a duração do protocolo para atingir os objetivos já descritos do treinamento, quais os objetivos originais de cada protocolo, se permitiam graduação do esforço segundo a capacidade individual do animal inicial e durante o protocolo, e os parâmetros posteriores de avaliação.

Dentre uma variedade de protocolos de endurance disponíveis, selecionou-se aquele que permitiria uma graduação a partir de um teste de esforço máximo inicial (TEM). O mesmo teste deveria ser aplicável a diferentes idades, e o treino posterior teria, originalmente, progressão com base no teste e, se possível, em marcadores bioquímicos preditores de exaustão. Isto diminuiria o risco de colapso cardiovascular em animais velhos, o estresse de manipulação e o risco de coerção animal transcendendo limiares de exaustão, que poderiam representar obstáculos éticos à realização do estudo. Para o protocolo resistido, este deveria promover hipertrofia muscular histologicamente demonstrável, ser graduado a partir de

cargas iniciais pequenas, possuir um tempo de realização semelhante aquele do protocolo de endurance, sem exceder mais do que 1 ou 2 meses de realização (para evitar que a senescência dos animais durante o próprio período experimental interferisse demasiadamente no desempenho dos animais).

Numerosos modelos animais têm sido usados para induzir a hipertrofia muscular, como estiramento crônico, tenotomia e ablação sinérgica [203]. Estes modelos produzem aumentos significativos de massa muscular em períodos curtos de tempo, mas envolvem períodos de sobrecarga contínuos com pouco ou nenhum tempo para recuperação [203]. Desde meados de 1990s, o American College of Sports Medicine recomenda que indivíduos realizem treinamento resistido para cada grupo muscular 2 a 3 vezes por semana [202]. Em humanos, esta forma de treinamento está associada a significativo aumento de força, a desempenho motor aumentado e a aumentos na área transversal de miócitos, bem como à maior resistência à fadiga [202]. Como a adaptação muscular é bastante específica em relação a padrões de atividade, bem como aos períodos de recuperação, o desenvolvimento de modelos de treinamento de força que apliquem estes parâmetros tornou-se importante também nos animais-modelo.

Hornberger e Farrar [203] desenvolveram um modelo de treinamento resistido para ratos baseado em escalada de grade semelhante ao utilizado nesta tese, porém utilizando um teste de esforço máximo, sobre o qual se realizava o programa de treinamento, de 8 semanas. Entretanto, o músculo avaliado era o flexor longo do hálux de ratos Sprague-Dawley, que foi julgado um músculo

limitado dentro das funções de locomoção necessárias para avaliação de ambas as formas de exercício, de endurance e resistido, e para análise histológica. Assim, escolheu-se aqui um modelo de exercício resistido capaz de desenvolver hipertrofia dos músculos flexores da pata posterior (ver descrição na seção de materiais e métodos), que permitiu a avaliação do tríceps sural, um grupo muscular com diferentes tipos de fibras entre seus componentes sóleo e gastrocnêmio [204-206].

Os programas de treinamento de endurance em modelos animais, por sua vez, variam bastante, dependendo da espécie, gênero, idade e objetivos específicos do programa [207-211], e são normalmente baseados na avaliação do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}). Para contornar a dificuldade inerente aos equipamentos requeridos para determinação da VO_{2max} , alguns autores usam velocidades arbitrárias [212-216] enquanto outros usam o limiar sérico de lactato [217-219].

No início de um exercício de endurance progressivo, o metabolismo muscular é considerado predominantemente aeróbio. Ao incremento da intensidade de exercício, a ativação de um grande número de fibras musculares glicolíticas assume o movimento, assim aumentando as concentrações séricas de lactato. Assim, o acúmulo de lactato sérico observado durante um teste de exercício graduado é usualmente interpretado como bom indicador da maior participação de vias anaeróbias (glicolíticas) como fonte de energia [220].

O protocolo de exercício de endurance utilizado nesta tese foi originalmente desenvolvido para obedecer ao limiar de lactato em ratos, baseado em um teste de esforço que servia para se ajustar a intensidade a ambos grupos etários de ratos estudados [207]. Além disto, o período de aquecimento de 10 minutos em baixa velocidade no início das sessões permite a remoção do excesso de lactato acumulado durante as manipulações prévias a cada sessão (manejo do animal, descargas adrenérgicas) [221,222], e o aumento progressivo da velocidade é eficiente em melhorar o desempenho dos animais no período estudado, tanto do ponto de vista do metabolismo aeróbio quanto do débito cardíaco (ver descrição na seção de materiais e métodos) [207].

1.9 O Triceps Sural

Como o tríceps sural possui diferentes tipos de músculos, sendo exercitados por ambas as modalidades de exercício executadas neste estudo, sua análise histológica foi eleita como método de avaliação da sarcopenia e dos efeitos experimentais da atividade física. O grupo de músculos do tríceps sural é fácil e rapidamente ressecável, possui volume macroscópico suficiente para fornecer material para diferentes análises, e tem sido objeto de análise por décadas. Apesar dos músculos do tríceps sural, formarem uma unidade anatômica e funcional no rato, eles diferem em suas propriedades fisiológicas e histoquímicas e em seu recrutamento durante o movimento. O gastrocnêmio de ratos tem sido bem caracterizado como exemplo de músculo misto de fibras predominantemente

rápidas, que no entanto apresenta todos os tipos de fibras, distribuídos em forma de mosaico à secção transversal [193-196]. O músculo sóleo também serve de exemplo bem documentado de músculo lento e postural (antigravitacional), composto de cerca de 80% de fibras lentas (uma maioria de fibras tipo 1, e um baixo número de fibras 2A) [223-228].

1.10 O Envelhecimento e a Astrocitose do SNC

Como será discutido na segunda parte desta tese, o envelhecimento no sistema nervoso central dos mamíferos é associado a mudanças específicas na população de astrócitos. Nos mamíferos velhos, o encéfalo e a medula espinhal são caracterizados por um aumento e hipertrofia da população astrocítica [229-235]. Esta astrocitose reativa é acompanhada por aumentos nas áreas e perímetros celulares em cortes histológicos e processos astrocíticos mais espessos, que são observados próximos a sinapses atípicas ou a terminais em degeneração. Este fenômeno pode representar uma perda contínua de sinapses sem a adequada reposição [236]. Vários estudos já demonstraram que, assim como há aumento global de astrócitos, há também uma regulação para cima de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um filamento intermediário com grande especificidade para a população astrocítica, e que também tem sua expressão aumentada em muitas regiões encefálicas com o avanço da idade [238-242]. Como o GFAP possui importância na manutenção da mielinização, bem como na organização da substância branca, os níveis aumentados de GFAP podem representar uma resposta à desmielinização local ou à degeneração [238]. De

modo semelhante, a distrofia axonal ou perda de terminais axonais pode induzir a hipertrofia astrogliar e a regulação para cima na substância cinzenta [243,244].

Em ratos velhos, por exemplo, os níveis de RNAm de GFAP na medula espinhal de também tornam-se significativamente maiores que os de jovens (um aumento de até 8 vezes em ratos de 17 meses, comparados àqueles de 2 meses de idade). Entre cães de 2 meses e 18 anos, a medula espinhal de velhos apresenta aumentos de imunorreação para GFAP moderado (na substância branca), a intenso (na substância cinzenta). No mesmo estudo, a microscopia eletrônica mostrou aumento do número de perfis degenerativos dos componentes neurais nos arredores de astrócitos hipertróficos, reforçando a astrogliose como uma expressão morfológica do envelhecimento do SNC [245].

Em mamíferos, a ativação astrocitária é um fenômeno comum no SNC jovem, após lesão do nervo periférico ou do SNC [246-249]. A Hipertrofia reativa de astrócitos se acompanha de uma regulação para cima de GFAP [246,248]. Em ratos adultos jovens, por exemplo, dentro de 1 dia após corte [249] ou 3 dias após uma constrição crônica do nervo ciático [246], a imunorreatividade para GFAP aumenta no corno dorsal da medula espinhal ao nível da lesão do nervo. No entanto, em ratos velhos, axotomias do isquiático não aumentam o GFAP presumivelmente porque ratos velhos têm uma menor capacidade de regular-para-cima o RNAm de GFAP [250].

Outros estudos endossam esta diminuição de resposta astrocítica à lesão do SNC, em que a capacidade de astrócitos encontra-se diminuída ou suprimida em animais mais velhos [251], ou acontece de maneira mais lenta [252].

Na medula espinhal de ratos velhos, ao examinar-se as sinapses axossomáticas sobre corpos celulares de motoneurônios por meio de microscopia eletrônica, verificou-se uma redução (de cerca de 50%) no número de botões axossomáticos, que atinge até metade dos motoneurônios examinados. Além disso, observou-se frequentemente regiões de corpos celulares sob aposição de processos astrocíticos, de forma mais grave na medula lombar que na cervical. Os sinais de astrocitose nestes ratos foram mais pronunciados entre aqueles com pior comprometimento sensório-motor [245], sugerindo que, apesar da astrocitose no SNC de animais velhos poder ser um evento intrinsecamente relacionado ao envelhecimento, dados mostram que ela acontece em paralelo à degeneração de neurônios. Nesta primeira parte da tese coube, então, estudar-se as mudanças astrocíticas presentes especificamente na medula espinhal durante o envelhecimento e sob diferentes modalidades de exercício, para avaliar se são análogas ao encéfalo [253], objeto de estudo da segunda parte desta tese.

1.11 O Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP)

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (calcitonin gene-related peptide – CGRP) é um peptídeo de 37 aminoácidos originado do processamento (splicing) diferencial tecido-específico de RNAm transcrito a partir do mesmo gene

da calcitonina [254]. Estudos mostram que o CGRP coexiste com a acetilcolina (ACh) em motoneurônios, e está envolvido no desenvolvimento e na plasticidade da placa motora e em efeitos tróficos sobre músculos-alvo, em diversas espécies [255-260]. No músculo esquelético, o CGRP, ligando-se a receptores de alta afinidade acoplados à proteína G, age potencializando os efeitos da ACh ao nível pós-sináptico, através da fosforilação do AMP-cíclico e concomitante ativação de proteinocinase A (PKA) na célula muscular esquelética. Esta via provoca regulação para cima do receptor da ACh, aumento da taxa de dessensibilização do receptor, e regulação para baixo da expressão de acetilcolinesterase (AChE), em especial sua forma tetramérica G4 (ligada à membrana - veja adiante). O CGRP causa, ainda, vasodilatação após a contração muscular [255,256,261-265].

No entanto, a expressão de CGRP em motoneurônios não é universal. Em estudos em roedores, o CGRP pode ser encontrado em motoneurônios espinhais do corno ventral, nos núcleos faciais, hipoglosso e no núcleo motor facial acessório, com algumas variações espécie-específicas [266,267] e diferenças em alguns núcleos motores baixos que exibem dimorfismo sexual [268,269].

No motoneurônio, a expressão de CGRP exhibe grande variabilidade (podendo, inclusive, estar ausente) nos estudos mais antigos, dependendo da técnica utilizada para evidenciação. Apesar destes estudos apontarem que, tanto na placa motora quanto no corno anterior da medula espinhal, o perfil do grupo muscular-alvo influía diretamente na expressão de CGRP (maior expressão de CGRP em unidades motoras rápidas, e pouca ou nenhuma expressão basal em

unidades lentas) [270,271], um estudo mais recente defende que a expressão de CGRP em motoneurônios ocorre na maioria, senão em todos os motoneurônios, independentemente do tamanho de soma, do tipo de fibra e do número de fibras musculares por unidade motora, pelo menos no que se refere aos músculos dos membros posteriores [272].

A atividade muscular é um fator importante na expressão de CGRP no motoneurônio. Experimentos mostram aumento do conteúdo de CGRP na placa motora e em fibras nervosas de grupos musculares submetidos a atividade crônica em esteira ergométrica [272] ou ao exercício excêntrico, como a corrida em esteira ergométrica em inclinação descendente (“downhill”) [273,274]. Motoneurônios que inervam o músculo gastrocnêmio em sua porção lateral exibem variação significativa neste modelo, aumentando a expressão de CGRP ao nível espinhal e na junção neuromuscular. Outro experimento, utilizando toxina tetânica aplicada sobre músculo reto lateral do olho felino, mostrou aumento de CGRP em motoneurônios do músculo abducente diretamente proporcional à intensidade de atividade contrátil muscular [275].

Na desnervação, e em qualquer intervenção em que ocorra ruptura da conexão neuromuscular, tanto cirúrgica quanto farmacológica, o resultado é uma regulação para cima de CGRP e de seu RNAm. Tais efeitos são, aparentemente, mais universais, ocorrendo em todos os grupos musculares estudados, com numerosos estudos já realizados [275-289]. As oscilações que ocorrem na expressão de CGRP variam de acordo com o tipo de lesão, i.e., se transecção,

ligadura, congelamento ou esmagamento do nervo, bem como na transecção espinal [284,285], e são distintas para diferentes idades estudadas. Tais variações nos níveis de CGRP costumam ser paralelas às alterações nos níveis de AChE e do receptor de baixa afinidade do fator de crescimento neural p75-NGFR, sendo que a expressão deste último e do próprio CGRP têm sido consideradas os marcadores mais fidedignos de regeneração potencial ou real [289]. No entanto, não foram encontrados estudos da expressão de CGRP nestes modelos em animais de idade avançada (adultos velhos), sendo seus efeitos conhecidos, até o momento, apenas no desenvolvimento embrionário, em animais no período pós-natal e em adultos jovens [277,289].

A expressão de CGRP, como acontece com outras populações de neurônios, altera-se sob ação de neurotrofinas in vivo e in vitro, tendo sido observados aumentos do CGRP na presença de NGF (estimulando sua síntese tanto em motoneurônios quanto em neurônios sensoriais), na presença de fator de crescimento derivado do encéfalo (BDNF) e do fator de crescimento derivado de células gliais, sendo este último, aparentemente seletivo para motoneurônios [290]. Efeitos em cultura também foram observados na presença do fator de crescimento de fibroblastos [291]. Estas alterações são importantes, tendo em vista o aumento da expressão de neurotrofinas em modelos de lesão neuronal ou neuropatias, como ocorre no diabetes melito, que mostram alteração no conteúdo de BDNF no músculo esquelético [292], e nas alterações que ocorrem com o receptor p75-NGFR paralelamente aos níveis de CGRP nas lesões neuronais e nos processos de reinervação [289].

Outro fator importante no controle da expressão de CGRP é a presença de androgênios, como a testosterona, que estimula a síntese de CGRP em populações de neurônios que exibem dimorfismo sexual, como os núcleos motores que inervam os músculos bulbo-cavernoso e cremáster, com diferentes expressões de CGRP conforme o sexo do animal [293-297].

Como a força de contração de um grupo muscular é dependente da frequência de disparos do motoneurônio, e a co-liberação de neuropeptídeos por vesículas eletrondensas junto a neurotransmissores tradicionais depende da entrada maciça de cálcio junto à sinapse, e portanto, da mesma alta frequência de potenciais de ação do motoneurônio, tornou-se objetivo desta tese verificar os efeitos de diferentes padrões de atividade física sobre a expressão de CGRP na medula espinhal.

1.12 Acetilcolinesterase

A enzima acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) é um polímero protéico que apresenta-se sob formas solúveis ou ligada à membrana plasmática, e que hidrolisa a acetilcolina (ACh) em vários tecidos neurais e não neurais [298,299]. A AChE desempenha um papel crucial na terminação da transmissão sináptica colinérgica, tanto em sinapses no sistema nervoso central quanto nas junções neuromusculares (JNMs). Em decorrência de processamento diferencial (splicing) de RNAm, o polímero AChE existe em diferentes formas moleculares, hoje

subdivididas em AChE-R (de readthrough), AChE-H (hidrofóbica) e AChE-T (de tail, cauda), as três contendo o mesmo domínio catalisador, mas distintas extremidades na terminação carboxila [300].

Em mamíferos, a variante AChE-H faz homodímeros ligados a âncoras de glicosil-fosfatidilinositol, e pode ser encontrada em células do sangue; a variante AChE-R produz um monômero solúvel que, no encéfalo, é regulado-para-cima durante o estresse [301]. Entretanto, é a AChE-T a subunidade conhecida como forma hidrofílica, que forma oligômeros com colágeno (na lâmina basal da JNM) ou com lipídeos, por pontes dissulfeto, a forma mais encontrada no SNC e em músculos, [300].

Até o momento, foram identificadas seis possíveis formas poliméricas de AChE-T, que são divididas em duas classes. A AChE-T é encontrada na forma de tetrâmeros assimétricos (ligados a uma cauda de colágeno - ColQ) A4, A8, e A12, ou ocorre em forma de monômeros simétricos globulares (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4). O tetrâmero globular G4 encontra-se ligado a uma âncora de lipídeo de membrana rica em prolina (PRiMA - proline-rich membrane anchor), tanto no SNC quanto no músculo [303-305]. A AChE assimétrica, isto é, com cauda de colágeno, é a forma predominante nas JNMs. É altamente concentrada na lâmina basal juncional, e em menores concentrações ao longo do comprimento de fibras musculares [306], e responde pela maior parte da atividade enzimática juncional [307-312]. Seu surgimento no músculo ocorre com o estabelecimento de contato neuromuscular durante o desenvolvimento e na regeneração [313,314]. A

forma globular G4, entretanto, é aquela cuja produção parece ser controlada pelos níveis de atividade física. Ambas formas de AChE, globulares e assimétricas, podem ser produzidas por células musculares [315,316]. Do mesmo modo, terminais nervosos pré-sinápticos motores também sintetizam e secretam AChE em JNMs. No caso de AChE G4 ligada à PRiMA, tanto motoneurônios alfa quanto a fibra muscular pós-sináptica contribuem para sua expressão na sinapse [302].

Nos humanos e em roedores, as quantidades de G4 diferem entre grupos musculares, sendo maiores em músculos de contração rápida, e muito menores naqueles de contração lenta [317]. A regulação da AChE em músculos predominantemente rápidos, como o extensor longo dos dedos, é diferente daquela no músculo sóleo, caracteristicamente de predominância de fibras lentas [317-320]. A atividade total da AChE por unidade de massa muscular, bem como a atividade das suas formas globulares, também é maior em músculos rápidos que nos lentos [318,321], correspondendo provavelmente a um maior volume de transcrição de subunidades catalíticas em músculos rápidos [322,323].

As evidências convergem para a concepção de que o conteúdo de G4 que caracteriza músculos de contração rápida possui importantes consequências: (1) músculos rápidos adquirem seu conteúdo de G4 apenas ao fim do período pós-natal de maturação do sistema neuromuscular [324-326]; (2) na distrofia muscular murina [327,328] ou em doenças da placa motora [329,326], o conteúdo de AChE em músculos rápidos muda para aqueles de contração lenta, caracterizados por baixos níveis de G4, enquanto a forma assimétrica é pouco afetada; (3) ao impor-

se um padrão de estimulação rápida ao músculo lento sóleo induz-se a uma troca no conteúdo de AChE para aquele típico de músculos rápidos [330]; (4) a atividade da AChE do músculo sóleo que recebe inervação cruzada de um nervo motor rápido, após exibir um aumento transitório, retorna para um nível típico do sóleo normal [331]; (5) a elevação do nível de atividade muscular afeta seletivamente o conteúdo de G4, característico dos músculos rápidos [332]. Este conjunto de evidências levantou, durante algum tempo, a discussão se a atividade da fibra muscular possuía uma influência maior que sobre o conteúdo e atividade da AChE muscular do que sua inervação motora [333]. Entretanto, estudos com CGRP mostram que a inervação do músculo possui influência central sobre a atividade da AChE.

Fibras musculares esqueléticas são capazes de mudar seu fenótipo em resposta a demandas funcionais [334]. Os níveis de RNAm de acetilcolinesterase muscular dependem do padrão neural de ativação. Frequências baixas de estimulação nervosa, mimetizando o padrão de ativação de músculos lentos, quando aplicadas a músculos rápidos de ratos, fazem cair os níveis de AChE àqueles de músculos lentos. Muitos dos elementos funcionais de músculos de fibras rápidas podem ser transformados através de estimulação de baixa frequência, i.e., proteínas contráteis, e enzimas do metabolismo energético [335]. Assim, músculos rápidos, estimulados por padrão similar ao dos músculos lentos, passam a apresentar várias características de músculos lentos [336-338]. A atividade da AChE em fibras musculares também pode ser modificada por eletroestimulação ou desuso [320,330,339].

Estudos antigos já mostravam que a atividade da AChE muscular sofre forte influência de modificações crônicas na JNM. Isto pode ser verificado através de estudos com treinamento de endurance (corrida) [340,341], imobilização de membro [342,343], suspensão de membros [344] e hipertrofia compensatória [342,345,346].

Num estudo sobre expressão de G4 nos músculos rápidos gastrocnêmio, plantar, tibial anterior e extensor longo dos dedos, bem como no músculo lento sóleo, observou-se aumento preferencial do conteúdo de G4 nos músculos rápidos, quando submetidos a regime de treinamento de corrida em esteira ergométrica por 12 semanas. No caso do sóleo, a corrida gerou uma pequena diminuição no nível de AChE [347].

Nos níveis da medula espinhal e do encéfalo, a atividade colinesterásica é desempenhada por duas enzimas responsáveis pela degradação de ésteres de colina, a AChE e a butirilcolinesterase (BuChE). A representação dual de colinesterases em mamíferos ainda é um fenômeno inexplicado. Em adição à AChE, a BuChE (EC 3.1.1.8) é onipresente no SNC de mamíferos e em outras partes do organismo [348-350]. Ambas têm domínios homólogos e diferenças de poucos aminoácidos, porém são codificadas por genes distintos [351-353]. Ambas hidrolisam ACh, apesar da BuChE poder hidrolisar ésteres de colina de maior tamanho, devido a um sítio de acolhimento de substrato (pocket) maior. Isto torna a BuChE ainda mais obscura, pois nos locais do SNC onde é presente não foram

encontrados até hoje outros ésteres de colina além da ACh. Especula-se que a BuChE seja um corregulador da neurotransmissão da ACh em sinapses durante grande atividade colinérgica [349,354].

No SNC, a forma G4 da AChE é provavelmente responsável pela maioria das funções fisiológicas catalisadas por AChE. A atividade total da AChE nos tecidos neurais apresenta variações da ordem de 50 vezes entre diferentes regiões do SNC, sendo maior nas estruturas subcorticais telencefálicas (núcleo caudado e núcleo de Meynert); intermediária na substância negra, cerebelo e medula espinhal, e menor no fórnix e regiões corticais (hipocampo, córtices temporal e parietal) [355].

Na medula espinhal, quantidades de RNAm de AChE são muito maiores que de BuChE, tanto de humanos quanto de ratos [356,357], e a maior parte da atividade colinérgica está localizada em neurônios motores dos cornos ventrais, em particular as formas G4 e 16s [356]. Estas são anterogradamente transportadas ao longo de axônios motores com destino à JNM [358]. Altos níveis de mRNA de AChE e BuChE em motoneurônios sugerem que estas células necessitam mais destas enzimas que outras células da medula espinhal [359]. Como motoneurônios alfa participam da formação da JNM e de sua manutenção, a contribuição destas enzimas já foi proposta e demonstrada [360]. A AChE também é encontrada em motoneurônios pequenos do corno ventral, células de Renshaw, bem como interneurônios e neurônios vegetativos pré-ganglionares no corno lateral. Este grupo de células também produz BuChE, em quantidades muito

menores [359], estando a expressão de RNAm praticamente inexistente em células gliais da medula espinhal.

A atividade total da BuChE no SNC possui uma distribuição mais uniforme que a da AChE, com variações menores (de até 3 vezes) entre regiões do SNC. Apesar dos padrões de formas moleculares de ambas enzimas serem similares entre áreas, variações na distribuição e abundância de várias formas de AChE são muito maiores que para a BuChE. Assim, apesar da forma tetramérica G4 da AChE responder pela maior parte da atividade colinesterásica nas regiões do SNC, a razão entre as formas tetramérica G4 e monomérica G1, esta última respondendo pelo restante da atividade AChE, apresenta também grandes variações [359].

A atividade motora aumenta a presença de AChE no corno ventral da medula espinhal, em paralelo a qualquer aumento de atividade na JNM. Porém, pouco há na literatura que descreva este fenômeno em relação ao envelhecimento. Um outro aspecto, é que complexos circuitos envolvendo motoneurônios e interneurônios colinérgicos na medula espinhal, quando expostos a ACh exógena, são capazes de produzir descargas rítmicas alternadas direita-esquerda, características de geradores de padrão central de locomoção (GPCs). Estes circuitos recebem também projeções de aferentes primários contralaterais oriundos de músculos periféricos [361]. Além desta participação em circuitos segmentares e intersegmentares dentro da medula espinhal envolvidos com

GPC's, a ACh também está envolvida diretamente na modulação da atividade de aferentes primários nociceptivos no corno dorsal, o que será discutido agora.

O corno dorsal da medula espinhal é um local importante de transmissão e modulação da nocicepção [362]. O sistema colinérgico espinhal e receptores muscarínicos estão envolvidos na regulação de diferentes funções fisiológicas, incluindo a nocicepção. Receptores muscarínicos para ACh possuem a maior densidade, dentro da medula espinhal, nas lâminas superficiais dos cornos dorsais, tanto em ratos quanto humanos [363-365]. Neurônios colinérgicos intrínsecos à medula espinhal, bem como terminais expressando colinaacetiltransferase e AChE, já foram demonstrados no corno dorsal [366,367]. Agonistas muscarínicos ou inibidores da AChE administrados diretamente na medula produzem analgesia, tanto em ratos quanto humanos, e tal efeito pode ser bloqueado por antagonistas muscarínicos, como a atropina [368-370]. Estes efeitos parecem ocorrer devido a ativação de interneurônios gabaérgicos sensíveis à ACh, via receptores muscarínicos (ligados à proteína G), na substância gelatinosa do corno dorsal (lâmina II). A liberação de GABA diminui a liberação pré-sináptica de glutamato nas sinapses entre aferentes primários e secundários (neurônios de projeção ascendentes ao tálamo), atuando via receptores GABAB, e é ainda ampliada pelo efeito de derramamento (spillover) [365] sobre outras sinapses adjacentes [371].

Além disto, o corno dorsal também possui populações de neurônios com receptores nicotínicos, que apresentam efeitos opostos (mais comum quando

ativados isoladamente) ou sinérgicos aos de receptores muscarínicos. Quando ativados no corno dorsal, receptores nicotínicos causam predominante hiperalgesia, mas podem também causar analgesia, dependendo de complexa regulação de subunidades do canal de sódio, e recrutamento de outros, capazes de provocar tanto LTP quanto LTD em aferentes secundários [372].

Múltiplos subtipos de receptor nicotínico são sintetizados nos neurônios aferentes primários dos gânglios das raízes dorsais dos nervos espinhais, e expressos na superfície pré-sináptica da sinapse com os neurônios de projeção ascendentes do corno dorsal. Aferentes secundários também expressam na membrana pós-sináptica estes canais, de forma que o efeito geral da ACh através de receptores nicotínicos parece ser uma facilitação da transmissão glutamatérgica, isto é, da LTP no corno dorsal e hiperalgesia [373,374]. Corroborando esta concepção, a aplicação intratecal de agonistas nicotínicos associa-se à liberação de aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato [375], enquanto antagonistas de canais NMDA são capazes de bloquear efeitos nicotínicos no corno dorsal [376,377].

Como foi mencionado, há evidências de que a ativação conjunta de ambos receptores, nicotínicos e muscarínicos, envolvendo interneurônios e GABA, resulta paradoxalmente em aumento da liberação de glicina e GABA mediada pelo receptor nicotínico, contribuindo para uma maior analgesia [378-380], e também causando uma maior liberação de serotonina na região (vide adiante) [380]. Assim, enquanto os efeitos muscarínicos da ACh são decididamente inibitórios da

transmissão glutamatérgica nociceptiva no corno dorsal, o receptor nicotínico apresenta um comportamento dual, que depende de interação com outros sistemas de neurotransmissores e interneurônios dentro do corno dorsal.

Por conta de seus efeitos diretamente associados à atividade física, medidos ao nível do músculo periférico, ou no corno ventral da medula espinhal, e sua participação na modulação de informações sensoriais no corno dorsal, incluiu-se também a AChE como parâmetro a ser avaliado dentro deste estudo.

1.13 Serotonina

Numerosos estudos já mostraram que a atividade física regular provê vários benefícios ao organismo [382]. Existem evidências substanciais de que o exercício pode elevar o humor em pessoas normais, e apresentar efeitos antidepressivos em pacientes clinicamente deprimidos [382-385]. Tais efeitos correlacionam-se diretamente com os níveis de serotonina (5-hidroxitriptamina, ou 5-HT) e outras monoaminas, principalmente a norepinefrina (NE), no encéfalo [386,387]. Além disso, vários estudos corroboram em modelos animais que distintas modalidades de atividade física (voluntária, involuntária, de corrida, natação, etc.) são capazes de aumentar os níveis de 5-HT e NE no encéfalo, gerando um consenso de que a atividade física melhora o humor [388-391]. Na medula espinhal, a 5-HT tem sido implicada em muitas funções fisiológicas, incluindo a inibição do processamento sensorial espinhal e da atividade motora espinhal [392-395]. A maior parte da serotonina que chega à medula espinhal se origina dos núcleos da rafe no tronco

encefálico e se projeta aos cornos ventral, dorsal e lateral da medula espinhal [396,397].

Nas vias motoras, a serotonina modula amplos circuitos de interneurônios envolvidos na alternância de ativação e inativação de motoneurônios responsáveis por músculos da locomoção em ambos os lados do corpo, já mencionados como circuitos geradores de padrão centrais (ou espinhais - os GPC's) da marcha. Vias descendentes serotoninérgicas do tronco encefálico à medula espinhal têm sido implicadas na regulação do padrão e ritmogênese da marcha, de forma que as lesões de medula espinhal devem parte de seus efeitos deletérios à interrupção destas vias [398-401]. A 5-HT possui um papel na ativação e modulação da atividade do GPC, de tal modo que um padrão de locomoção (locomoção fictícia) em coelhos com secção completa de medula pode ser observado administrando-se 5-hidroxi-triptofano (5-HTP) [402]. A mesma substância, precursora direta da 5-HT, também aumenta a atividade muscular extensora [403], e a frequência e intensidade de passadas em gatos espinalizados [404,405]. Resultados de preparações de medula isoladas in vitro revelam que a 5-HT pode disparar episódios de locomoção fictícia em camundongos neonatos [406-409] e ratos [407,410,411]. Banhos de 5-HT também modulam a intensidade de locomoção fictícia espontânea ou induzida por NMDA, mostrando que a 5-HT pode disparar, modular e intensificar a atividade locomotora gerada por motoneurônios espinhais [412,413]. De particular interesse seria também o papel da 5-HT em modular a atividade espástica em animais espinalizados, nos quais as vias bulbo-espinhais estão ausentes abaixo da lesão. Administração de agonistas serotoninérgicos

nestes animais resulta em acentuado aumento da atividade espontânea eletromiográfica, e também das manifestações espásticas, como reflexos tendinosos hiperativos e nocicepção aumentada, bem como a resistência ao movimento passivo, presença de espasmos e clonus. Tais efeitos são parcialmente abolidos por antagonistas serotoninérgicos, como a ciproheptadina, inclusive já utilizada em estudos preliminares em humanos com lesões medulares e fenótipo espástico acentuado [414-417]. Evidências indicam que os efeitos da 5-HT na ritmogênese locomotora são mediados por subtipos de receptores 5-HT específicos. Antagonistas 5-HT₂, exceto 5-HT_{2C} abolem a locomoção fictícia, enquanto antagonistas 5-HT_{1a} e 1B/1D a aceleram. Além disso, agonistas 5-HT₂, como a quipazina ou hidrocloreto de R(-)-1-(2, 5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano podem disparar agudamente passadas dos membros posteriores em ratos paraplégicos [418].

Além do disparo e modulação do GPC, aferências serotoninérgicas ao corno dorsal da medula sobre as lâminas II a V, são capazes de modular as alças de informação retrógrada dos membros, influenciando sobre as informações oriundas dos sistemas musculoesquelético e nociceptivo. Aferências serotoninérgicas descendentes fazem sinapses com interneurônios encefalinérgicos na lâmina II (substância gelatinosa), que possuem dupla influência sobre as sinapses entre aferentes primários nociceptivos nas lâminas I e II com neurônios aferentes nociceptivos secundários (ou de segunda ordem, majoritariamente espinotalâmicos): hiperpolarizam terminações sinápticas primárias e aumentam o limiar de disparo de aferentes secundários. Tais neurônios encefalinérgicos

seriam, assim, um sistema antinociceptivo, modulado positivamente em níveis segmentares pelas vias serotoninérgicas descendendo ao corno dorsal [362]. Esta analgesia, além de presente em níveis basais, seria responsável pelos efeitos anestésicos obtidos nas infusões raquidianas de opióides (em conjunto com receptores opióides no próprio tronco encefálico), e também envolvida na analgesia endo-opióide promovida durante o exercício. De acordo com esta hipótese, técnicas de microdiálise mostram um aumento agudo da liberação de 5-HT no corno dorsal após atividade de corrida [419].

O envelhecimento se acompanha de diminuição da imunorreatividade serotoninérgica em todo SNC, incluindo a medula espinhal [420]. Considerando que este neurotransmissor possui várias funções direta ou indiretamente associadas à atividade física, uma resposta compensatória ao exercício nos níveis de serotonina espinhal de ratos velhos seria um efeito desejável a ser observado neste estudo, o que justificou sua inclusão.

2. OBJETIVOS - Primeira Parte

2.1) Utilizar até o término dois treinamentos distintos e graduais, de endurance e resistido, de duração de 6 semanas, em duas faixas etárias de ratos adultos machos Wistar (de 6 e 24-25 meses - nesta última, ainda não descrito).

2.2) Comparar os efeitos dos dois treinamentos através de análise morfométrica da área transversal de fibras por histogramas, e confirmar a presença de sarcopenia.

2.3) Analisar os efeitos de ambos treinamentos sobre as modificações associadas à idade do tríceps sural.

2.4) Medir a atividade colinesterásica no tríceps sural ao fim de ambos treinamentos.

2.5) Contar motoneurônios alfa corados por Nissl no corno ventral, e astrócitos GFAP+ nos cornos ventral e dorsal da medula espinhal ao fim de ambos treinamentos.

2.6) Medir, por densitometria óptica, a reação histoquímica da acetilcolinesterase na medula espinhal (nos cornos ventral e dorsal) ao fim de ambos treinamentos.

2.7) Medir, por densitometria óptica, a reação imunoistoquímica do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina na medula espinhal (nos motoneurônios alfa e no corno dorsal) ao fim de ambos treinamentos.

2.8) Medir, por densitometria óptica, a reação imunoistoquímica da serotonina na medula espinhal (nos cornos ventral e dorsal) ao fim de ambos treinamentos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Dezoito ratos Wistar de 6 meses de idade, pesando 240 g a 290 g (idade inicial e peso) e vinte e dois ratos Wistar de de 24-25 meses de idade, pesando 300 g a 410 g (sob as mesmas condições de criação) foram obtidos do Biotério do ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e mantidos em caixas padrão, sob ciclos 12:12h de claro e escuro, em ambiente com temperatura controlada ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), e com livre acesso à ração e água (24h/dia), durante todo o período do experimento. Todos os animais foram mantidos e manipulados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências (Brazilian Society for Neurosciences, Review Committee of the School of Veterinary Surgery, University of Buenos Aires), e da International Brain Research Organization, em concordância com o National Institute of Health's Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals (publicação 85:23, revisado em 1985).

3.2 Avaliações preliminares e seleção

Dois dias antes da adaptação aos treinamentos de esteira ergométrica (endurance) e resistido (força), os animais foram pesados e tentativas preliminares com cada animal for realizados com cada animal, tanto na esteira em baixa velocidade quanto na escalada de grade. Aqueles animais que recusaram a seguir adiante na esteira ou acima na grade, após repetidas tentativas, foram separados

como grupos (controles) sedentários. Assim, 6 animais adultos jovens e 6 velhos foram selecionados como controles, 6 jovens e 7 velhos foram selecionados como corredores, e 6 jovens e 7 velhos foram selecionados como escaladores. Ao fim do treino, 1 rato velho de cada grupo treinado foi descartado (um apresentou um tumor torácico, detectado durante a perfusão transcardíaca, o outro foi escolhido aleatoriamente).

3.3 Adaptação à esteira ergométrica

Os animais jovens e velhos selecionados para o treinamento de endurance foram adaptados à esteira ergométrica, durante 10 min a 5 m/min por 4 dias, antes da primeira semana de treinamento de endurance; no 5o dia, eles foram submetidos a um teste de esforço máximo (TEM) [207, 421]. O teste consistiu de um exercício graduado na esteira, com aumentos de 5 m/min a cada 3 min, iniciando-se a 5 m/min e continuando até a máxima velocidade atingida por cada rato, isto é, o platô acima do qual o animal se recusava a continuar. Valores atingidos no TEM foram usados para planejar o treinamento de endurance. Saliente-se que os animais velhos sempre atingiram velocidades máximas menores que aquelas dos jovens (geralmente 5 m/min menores as dos jovens corredores).

3.4 Treinamento de Endurance

O programa de treinamento de endurance consistiu de corrida em uma esteira ergométrica uma vez ao dia, 5 dias/semana, durante 6 semanas, iniciando-se 2 dias após o TEM. As durações dos exercícios gradualmente estendiam-se, de 20 minutos no primeiro dia a 50 minutos no quinto dia, e então gradualmente ascendendo a 60 min durante as 5 semanas seguintes. Cada sessão de treinamento dos animais corredores incluiu um período de aquecimento de 5 minutos, a 30% da velocidade máxima atingida no TEM, 10 a 50 min correndo em 45% a 55%, e os 5 min finais a 30% [207, 421-423].

3.5 Treinamento Resistido

O treinamento resistido consistiu de escalada de um grade de 1 metro de altura (8 repetições, a intervalos de 2 min, 3 dias/semana, por 6 semanas), inclinada a um ângulo de 80°, com uma carga (peso) presa à cauda do animal [204-206,421]. Este peso requeria que os animais escaladores fizessem 8 a 12 movimentos (repetições) por escalada. A cada semana, 50 g eram adicionados à carga na cauda, iniciando-se com 50 g na primeira semana e chegando-se a 300 g na última. Este programa provoca uma resposta muscular hipertrófica nos músculos do membro posterior [204,206]. Saliente-se que especial atenção foi dada a cada animal que, ocasionalmente, recusasse-se a progredir para maiores cargas. Não obstante, tantos jovens quanto velhos escaladores foram capazes de desempenhar o mesmo programa de treinamento, carregando as mesmas cargas até a última semana.

3.6 Extração de tecidos, bioquímica, histoquímica e imunoistoquímica

Um dia após o fim dos treinamentos, os ratos foram pesados e anestesiados para a perfusão cardíaca através do ventrículo esquerdo, com 400 mL de solução salina heparinizada, seguida de 400 mL de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.4, utilizando-se uma bomba peristáltica.

Após a perfusão salina, os membros posteriores foram proximalmente garroteados, e os tríceps surais foram extraídos (cada terço médio do comprimento total de cada músculo sóleo e cada músculo gastrocnêmio lateral). Os fragmentos musculares de ambos os membros posteriores, direito e esquerdo, foram então congelados em nitrogênio líquido e guardados a -80°C para subsequente medida da atividade de acetilcolinesterase (AChE) ou coletados e fixados em glutaraldeído 2,5% (Merck, Alemanha) para análise histológica da secção transversal de fibras.

Após perfusão com paraformaldeído, encéfalos e medulas espinhais foram removidos. A análise dos encéfalos será descrita na segunda seção desta tese. Para que segmentos L4-6 da medula espinhal fossem topograficamente identificados, foi realizada prévia dissecação ascendente do nervo isquiático até a emergência de suas raízes nos nervos espinhais. Tanto medulas quanto encéfalos foram removidos e deixados em pós-fixação na mesma solução de perfusão, em temperatura ambiente, por 4 h. Após este período, o material foi crioprotegido em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato a 4 °C. As medulas foram

seccionadas em (25 µm) criostato (Leitz, Alemanha) e as secções colhidas alternadamente para todas as reacções (vide a seguir).

3.7 Reacções Imunoistoquímicas

Os cortes de cada grupo experimental foram colocados em frascos para que as reacções fossem realizadas em método de flutuação livre (free-floating). Para as reacções imunoistoquímicas, os cortes foram tratados em metanol 10% e H₂O₂ 3% por 30 min. As secções foram então incubadas em albumina 2% (bovine serum albumin, BSA - Sigma) em salina com tampão fosfato (PBS) contendo Triton X-100 0.3% por 30 min, e incubados 48 h a 4 °C com os seguintes anticorpos primários: policlonal anti-GFAP de coelho, diluído em 1:200 de BSA em PBS–Triton X-100; policlonal anti-CGRP de coelho, diluído em 1:100 de BSA em PBS–Triton X-100; policlonal anti-5HT de coelho, diluído em 1:2000 em PBS–Triton X-100 (todos de Sigma, EUA). Após várias lavagens, os cortes foram incubados em IgG anti-coelho conjugado com PAP (Sigma, USA), diluído 1:50 em PBS a temperatura ambiente, por 2 h.

As reacções imunoistoquímicas foram então reveladas incubando-se os cortes em meio contendo 3,3-diaminobenzidina 0.06% (DAB, Sigma, EUA) dissolvido em PBS por 10 min, e então, à mesma solução com os cortes foi adicionado 1 µM de H₂O₂ 3% por mL de meio com DAB por 10 min. Finalizando, os cortes foram lavados com PBS, colocados em lâminas gelatinizadas, desidratados com etanol, clarificados com xilol e montados com Entellan (Merck,

Alemanha). Para controle das reações, lâminas foram montadas com controles da reação imunohistoquímica, onde os anticorpos primários foram omitidos.

3.8 Atividade da AChE

A atividade específica da AChE nos músculos tríceps surais foi determinada pelo método de Ellman [424], modificado por Pereira [425]. Homogeneizados musculares (50 mL) contendo tetraisopropilpírofosfamida (iso-OMPA, inibidor de BChE) 0.1 mM, 50 mL de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 1mM, 1 mL de tampão fosfato de potássio 24 mM foram pré-incubados por 2 min, e iniciada a adição de 25 mL de acetilticolina monitorando-se por 2min (412 nm) em espectrofotômetro. A atividade da AChE foi então expressa em mmol de acetilticolina hidrolisada/hora/mg de proteína de músculo [424,425].

3.9 Procedimento de Nissl e Detecção Histoquímica de AChE na Medula Espinhal

Para histoquímica da atividade colinesterásica, cortes de medula alternados, realizados em criostato, foram incubados em meio contendo iodeto de acetilticolina (2,1 mM, Sigma), ferricianeto e íons cobre com citrato, e protegidos da luz por 6 horas a 37°C, para ocorrer a hidrólise de iodeto de acetilticolina pela AChE tecidual, e produção de ferrocianeto cúprico, de coloração marrom [426]. Os cortes foram então colocados em lâminas gelatinizadas, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e cobertos com Entellan (Merck, Alemanha) e lamínulas, para análise de imagens. Para coloração de cortes alternados por violeta de

resina (método de Nissl), a coloração foi realizada já sobre lâminas gelatinizadas com cortes, sendo estas banhadas em concentrações padronizadas de violeta de cresila após testes com diferentes tempos de diferenciação em etanol.

3.10 Preparação dos Músculos e Análise Morfométrica

Os músculos gastrocnêmio lateral e sóleo foram seccionados em pequenas amostras (2x1mm) da sua parte central e pós-fixados na mesma solução até o processamento. As amostras foram então lavadas em tampão fosfato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (Sigma, USA) em tampão fosfato por 1 h. As amostras foram então lavadas em tampão fosfato e desidratadas em séries progressivas de álcool e óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences, USA), imersas em blocos de resina (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland), e mantidas em vácuo por 24h, e após, polimerizadas por 48h a 60 °C. Secções semifinas (1 µm) foram obtidas usando-se um ultramicrótomo MT 6000-XL, RMC, Tucson, USA) e coradas com azul de toluidina 1% (Merck, Germany) em tetraborato de sódio (Ecibra, Brazil) e colocadas em lâminas [423].

3.11 Morfometria de área transversal de músculos

Para análise morfométrica, cerca de 5 imagens digitais por rato (200x, posteriormente ampliadas por 10x) aleatórias foram usadas de cada corte, estando o examinador cegado (totalizando cerca de 100 fibras por rato), 5 animais por grupo. As áreas transversais de fibras foram estimadas utilizando-se a

contagem de pontos de grade sobreposta, com uma densidade de pontos de $62.32 \mu\text{m}^2$ e a equação $\hat{A} = \Sigma p$. (área-ponto), onde \hat{A} é a área, Σp é o total de pontos por fibra e área-ponto é a área formada por 4 pontos do grid ($62.32 \mu\text{m}^2$ - Figura 3.1) [423,427].

3.12 Análise de imagens

Exceto para contagens de motoneurônios corados por Nissl no corno ventral, todas as contagens celulares e medidas de densitometrias ópticas (ver adiante) foram feitas através de capturas digitais de imagens em formato TIFF (*tagged image file format*) a cores (RGB), utilizando-se um microscópio Nikon E600 (Japão) acoplado a uma câmera digital (USB 2.0 Digital Camera Eyepiece - DCE-2, China) com resolução de 640x480 pixels. Para as capturas, todas as condições de magnificação e luz foram mantidas constantes, e o examinador cegado quanto aos grupos. Todas as imagens foram então analisadas com ImageJ 1.40 software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

Para densitometrias ópticas, as imagens coloridas em RGB foram convertidas para escala de cinza (8 bits, isto é, 0-255 níveis de cinza). Para a correção da iluminação desigual (correção de sombra), em cada magnificação utilizada, uma imagem de referência foi capturada de um campo vazio (em lâmina com lamínula, fora da área de corte), e utilizada para divisão de cada imagem experimental pelo aplicativo acessório (chamado plugin, em linguagem Java, pode

ser incorporado por download gratuitamente ao programa original) “Calculator Plus” do programa ImageJ. A equação de divisão utilizada é:

Pixel a ser corrigido = (valor do pixel da imagem experimental : valor do pixel na mesma localização da imagem de referência) x densidade óptica média dos pixels da imagem de referência

Tal equação é uma simplificação, utilizando-se valor absoluto de preto (igual a zero), a partir de [428]:

$$C_{lx,y} = [(I_{lx,y} - \text{preto} : R_{lx,y} - \text{preto}) \times (M - \text{preto})] + \text{preto}$$

Onde $C_{lx,y}$ = pixel da imagem corrigida na no local (x,y);

$I_{lx,y}$ = pixel da imagem experimental no local (x, y);

$R_{lx,y}$ = pixel da imagem de referencia (x, y);

M = valor médio dos pixels da imagem de referência (neste caso = 125);

Preto = intensidade de cinza quando nenhuma luz atravessa o material experimental, neste caso = 0 (0–255).

Áreas de interesse retangulares (ADI) foram aplicadas nas imagens (veja Figura 3.2). As densidades ópticas para cada ADI foram medidas na forma de densidade óptica não-calibrada [$10/\log(255/255 - \text{valor do pixel})$]. A coloração de fundo foi subtraída das medidas da densidade óptica, usando-se os valores médios dos cortes de tecido onde o anticorpo primário foi omitido [428].

Para a contagem de motoneurônios corados com Nissl ou imunorreativos para CGRP, foram contados campos microscópicos sobrepostos a um corno ventral de cada corte aleatório em lâmina (magnificação 200x - Figura 3.2C), num total de 10 cornos por rato. Para inclusão na contagem, células deveriam possuir morfologia típica de grandes motoneurônios, contornos nítidos de núcleo e citoplasma, e no caso da coloração de Nissl, deveria visualizar-se nucléolo evidente [429].

Previamente à contagem de astrócitos, foi realizada uma análise semiquantitativa por densitometria óptica regional, de maneira similar àquela usada para AChE e 5HT (veja adiante). Porém, não foram encontradas diferenças significativas nas densidades ópticas de GFAP (dados não mostrados). Optou-se, então, pela contagem de células [430] GFAP-ir, em áreas de interesse sobre os cornos ventral e dorsal de cortes aleatoriamente escolhidos de cada rato (magnificação 400x), com ajuda do acessório de contagem de células (plugin Cell Counter - Image J) num total de 10 áreas ventrais e dorsais de cada rato (veja Figura 3.2B e D, e Figura 3.3). Para inclusão na contagem, as células deveriam exibir morfologia estrelada típica de astrócitos, com nítidos contornos de corpo celular e emergência de, pelo menos, dois prolongamentos nítidos de comprimento igual ou maior que o corpo da célula [430,253].

Para medida da densitometria óptica intracelular de CGRP em motoneurônios do corno ventral, 100 células foram capturadas (magnificação

1000x). Uma ADI (veja Figura 3.4) foi utilizada para medição em 4 locais distintos do citoplasma da célula, totalizando 400 medidas intracitoplasmáticas por rato [428,430]. De cada rato, então, foi obtido um número médio (média final de 400 medidas) de DO intracelular de CGRP.

Para medidas de densitometria óptica regionais de AChE e 5HT no corno ventral, uma ADI (veja Figura 3.1C e Figura 4.4) foi sobreposta ao corno ventral (magnificação 100x). De cada rato, foram capturados 10 áreas de cornos ventrais de cortes aleatórios na lâmina (1 corno ventral por corte), dos quais foi obtida uma DO média regional (média final de 10 medidas), por rato [428,420,432].

Para medidas de densitometria óptica regionais de AChE, 5HT e CGRP no corno dorsal, uma ADI (veja Figura 3.1A e Figura 3.5) foi sobreposta ao corno ventral (magnificação 100x). De cada rato, foram capturados 10 áreas de cornos dorsais aleatórios em lâmina (1 corno dorsal por corte), dos quais foi obtido-se uma DO média regional (média final de 10 medidas), por rato [432].

3.13 Análise Estatística

Os dados dos histogramas foram analisados estatisticamente utilizando-se análise multivariada (MANOVA), seguido de teste post hoc de Tukey (nível de significância estatística $P < 0.05$), no programa SPSS. Devido à rejeição da homogeneidade das amostras de histogramas no teste de Levene, valores obtidos nos intervalos de fibras de cada rato, individualmente, foram convertidos a suas

raízes quadradas (transformação estabilizadora de variância) [454]. Os demais dados foram analisados (médias \pm erro padrão médio) estatisticamente utilizando-se ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Duncan (nível de significância estatística $P < 0.05$), no programa Statistica. Apenas para os pesos dos animais, foi utilizado ANOVA para medidas repetidas.

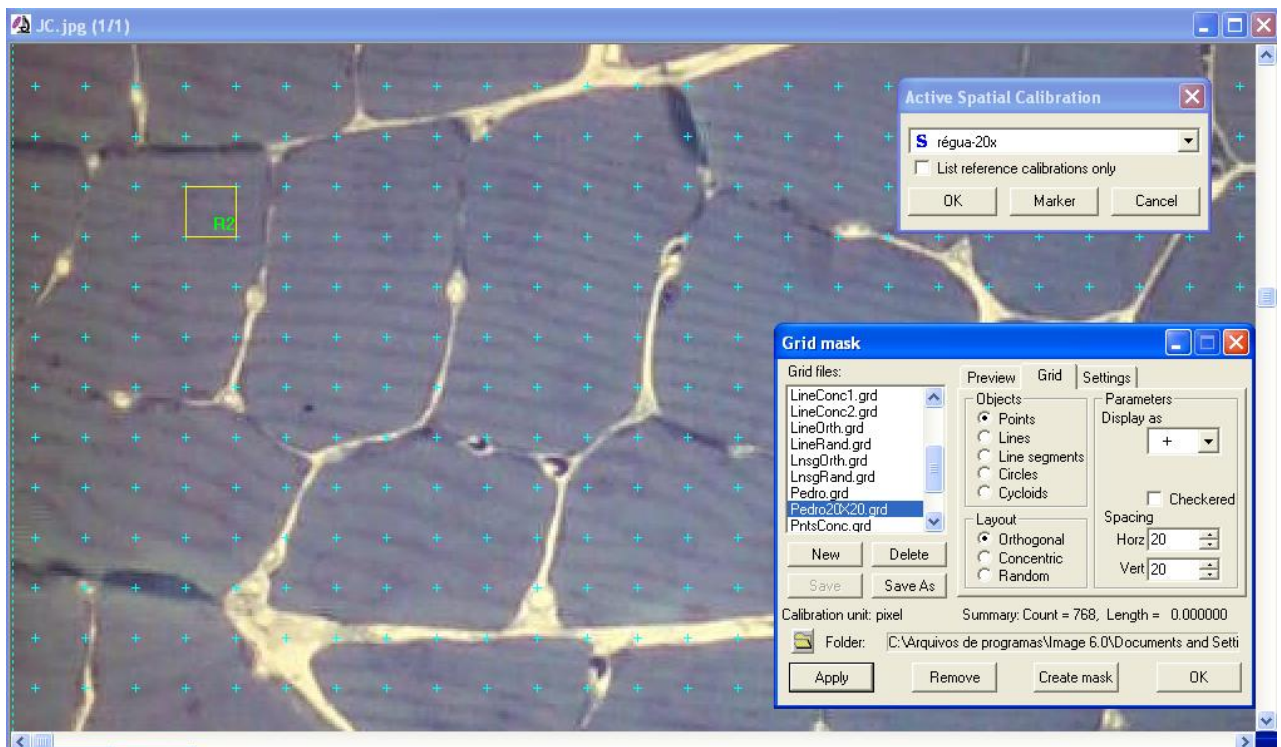


Figura 3.1: Músculo sóleo de jovens sedentários (200x; ampliação digital). Contagem de pontos para análise de área de secção transversal de fibras musculares.

L4-6

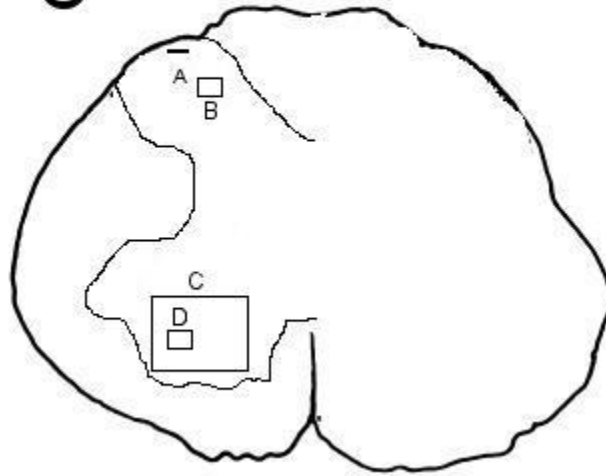


Figura 3.2: Áreas de interesse aproximadas sobrepostas para análise na medula espinhal (segmentos medulares L4-L6).

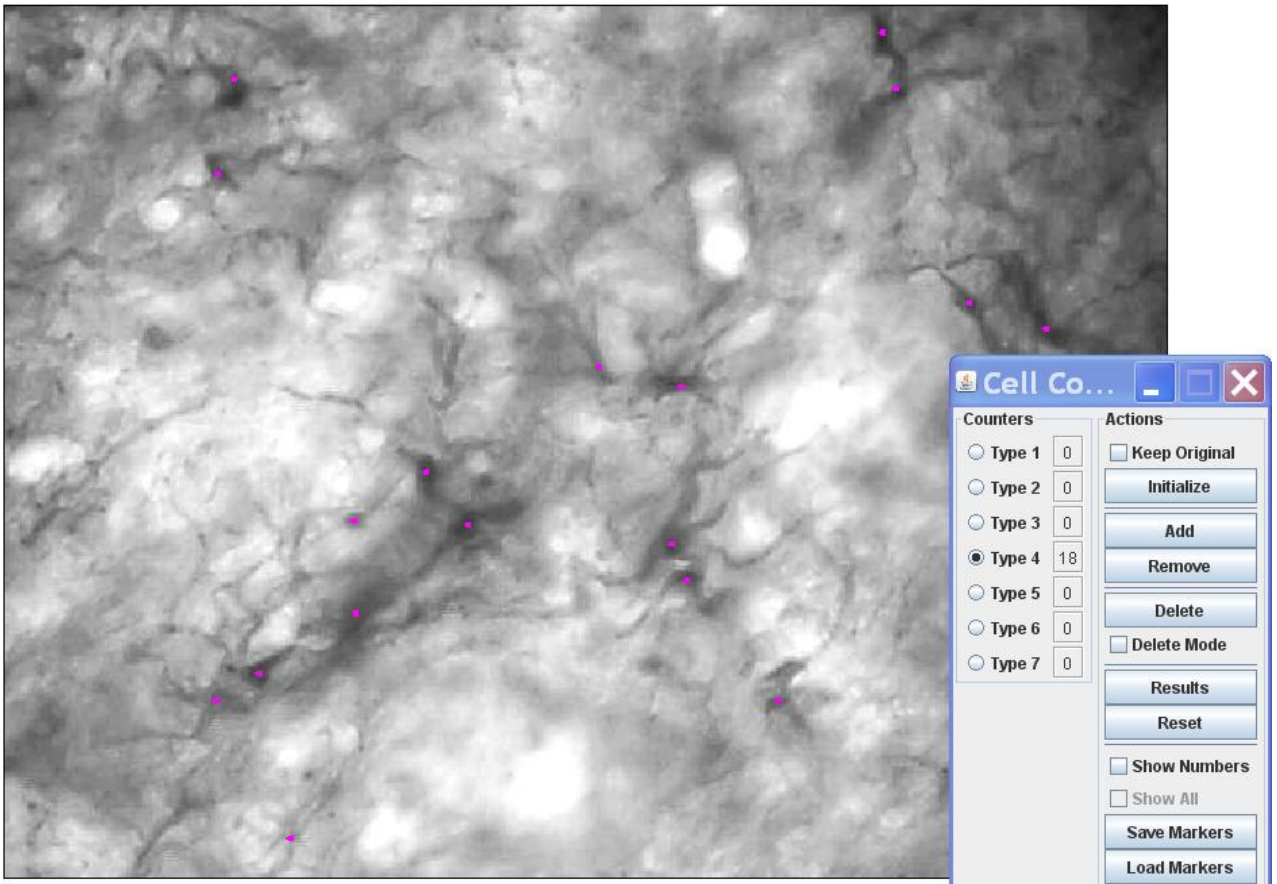


Figura 3.3: Contagem de astrócitos (400x) com auxílio do contador (*Cell Counter plugin*) do programa Image J. Astrócitos GFAP-ir marcados em rosa (jovem sedentário).

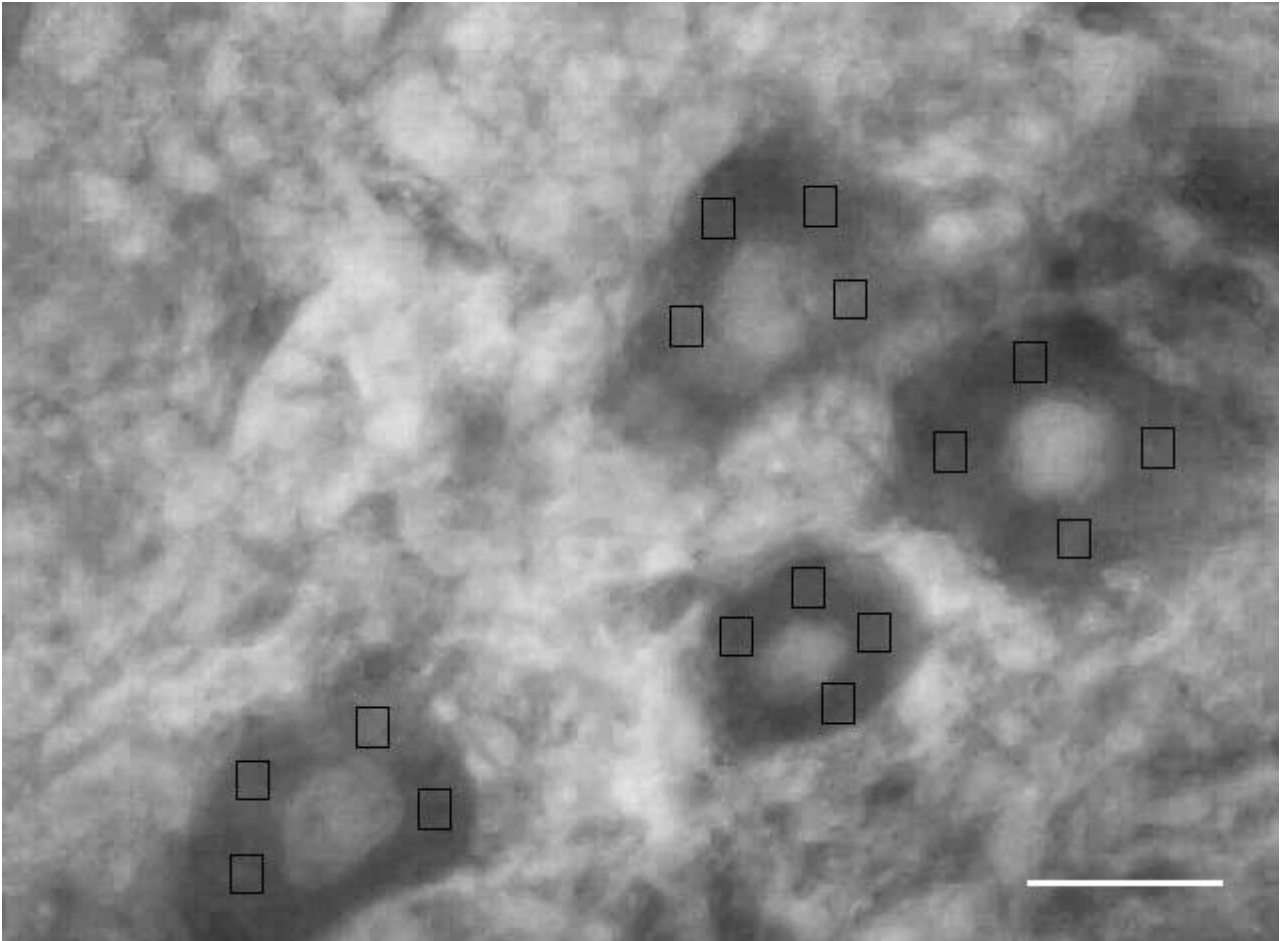


Figura 3.4: Áreas de interesse sobrepostas ao soma de motoneurônios CGRP-ir do corno ventral. Notar que regiões nucleares são evitadas. Rato jovem (1000x). Barra = 10 μ m.

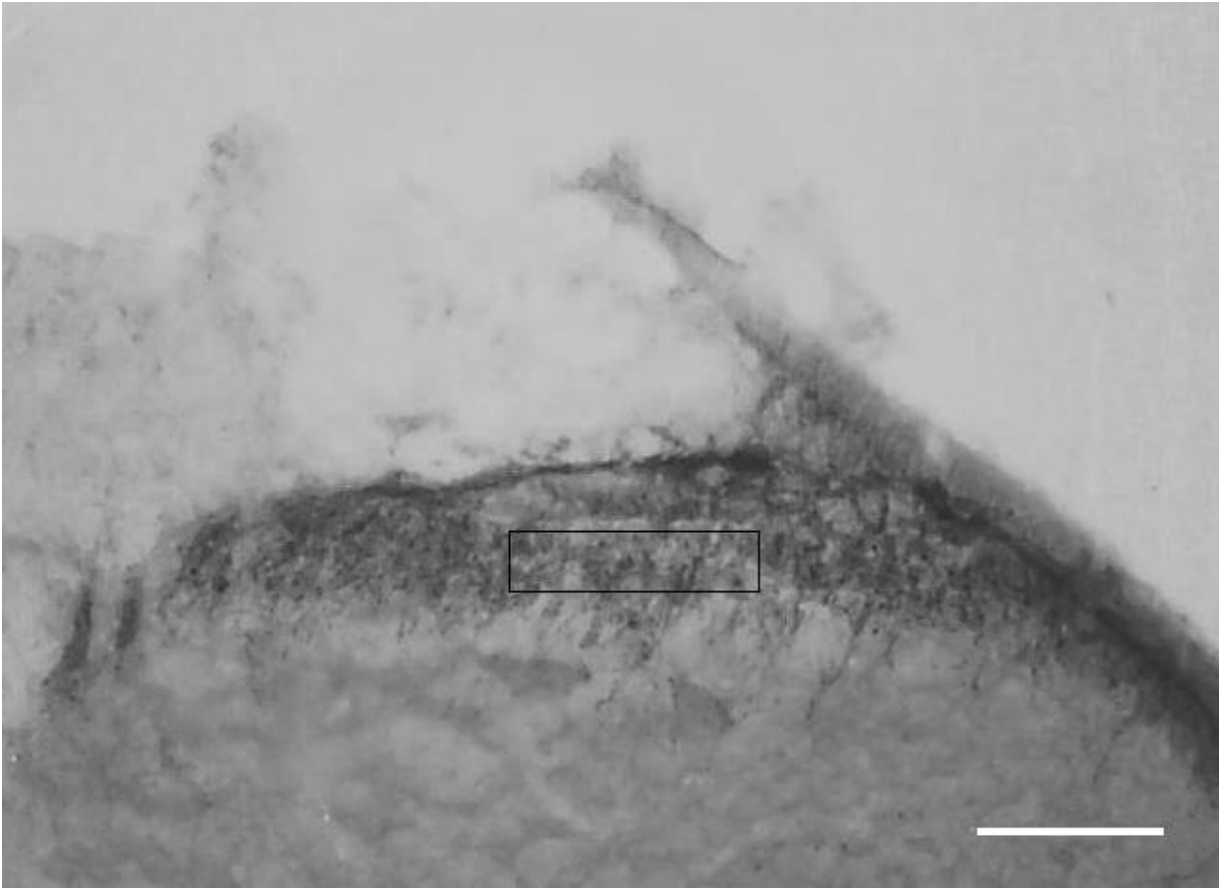


Figura 3.5: Terminações CGRP-ir nas lâminas superficiais do corno dorsal (rato jovem), com área de interesse sobreposta (100x).

4. Resultados

Todos os animais realizaram seus treinamentos até o fim, sem perdas amostrais. Não houve recusas entre os animais velhos, na corrida ou escalada, até as últimas semanas.

4.1 Pesos

ANOVA para medidas repetidas não mostrou alterações significativas de peso antes e após os treinamentos.

4.2 Análise Morfológica e Morfométrica dos Músculos

4.2.1 Morfologia

O preparo aqui utilizado não é ideal para análise quantitativa ou qualitativa de elementos do tecido conectivo entre as fibras. Na microscopia óptica de baixa resolução, pouca ou nenhuma diferença pôde ser observada entre controles e animais exercitados, quando agrupados por idade. No entanto, comparando-se jovens e velhos, foi possível distinguir-se, no últimos, um aumento, entre fibras musculares, de adensamento de matriz conectiva, uma maior heterogeneidade da substância amorfa, e maior irregularidade de contornos vasculares (Figura 4.1).

4.2.2 Histogramas

Para uma melhor ordem descritiva, mostrar-se-á o padrão observado nos jovens controles e os diferentes efeitos obtidos entre corrida e escalada nesta idade. Então, serão descritos os efeitos obtidos nos velhos, em ordem semelhante, e depois comparadas as faixas etárias. Os histogramas (Figuras 4.2 para músculo sóleo e 4.3 para músculo gastrocnêmio) encontram-se dispostos por grupos de ratos (cores), em valores médios de raízes quadradas dos percentuais iniciais de fibras em cada intervalo de secção transversal (homogeneização amostral). Os valores originais e a tabulação das raízes quadradas com respectivas médias estão dispostos nas tabelas 4.1 e 4.2, para os músculos sóleo e gastrocnêmico, respectivamente. Para valores de F e diferenças estatísticas significativas para os músculos sóleo e gastrocnêmio, veja tabelas 4.3 e 4.4.

4.2.2.1 Sóleo

O histograma de jovens controles (Figura 4.2, em azul escuro) mostra que 71,8% (31,0 + 40,8%) das fibras deste músculo apresentaram áreas transversais de diâmetro intermediário, entre 2001 μm^2 e 3000 μm^2 (com predominância no intervalo 2501-3000 μm^2). Diferenças estatísticas significativas entre os jovens controles e todos os demais grupos (velhos inclusos) foram encontradas no intervalo de área 2500-3000 μm^2 (maior que todos). Ao comparar-se jovens sedentários aos jovens corredores e escaladores (Figura 4.2, cores vermelha e amarela, respectivamente - indistintos entre si), verifica-se uma redistribuição de

fibras neste intervalo (correspondendo a uma distribuição mais uniforme, isto é, à diminuição da concentração de fibras nos intervalos intermediários). Conclui-se, assim, ter havido efeito redistributivo pelos treinamentos entre animais jovens, porém sem maiores concentrações estatisticamente significativas acima do intervalo 2501-3000 μm^2 referente aos jovens controles. Isto mostra que não houve efeito de perfil hipertrófico significativo no músculo sóleo dos animais jovens, ainda que tenham sido obtidas modificações distributivas pontuais.

Velhos sedentários (Figura 4.2, cor verde) apresentaram significativa população de fibras menores que 1500 μm^2 em comparação com todos os outros grupos (jovens inclusos), e o menor número de fibras dentro do intervalo 2501-3000 μm^2 . Relacionando este maior número de fibras de diâmetro pequeno com preponderância geral de fibras inferiores ao intervalo predominante nos jovens sedentários, observa-se um perfil atrofico esperado dentro do grupo de velhos sedentários, que foi corrigido indistintamente por ambas formas de exercício nos velhos corredores e escaladores (Figura 4.2, cores marrom e azul claro, respectivamente). Entretanto, como nos jovens, corrida e escalada não apresentaram, no músculo sóleo, redistribuição estatisticamente significativa acima do intervalo 2501-3000 μm^2 . Isto mostra que não houve efeito de perfil hipertrófico significativo no músculo sóleo dos animais velhos e que as estratégias de treinamento podem reverter a atrofia em velhos, mas não produzem efeitos histológicos distintos quanto à área transversal das fibras.

4.2.2.2 Gastrocnêmio

O histograma de jovens controles (Figura 4.3) mostra que 46,8% (22,6 + 24,2%) das fibras apresentam-se no intervalo de 2501 μm^2 e 3500 μm^2 (com predominância no intervalo 3001-3500 μm^2). À esquerda do intervalo predominante, entre 2001 μm^2 e 2500 μm^2 (Figura 4.3, cor azul escura), jovens controles apresentaram a menor média de fibras, enquanto velhos sedentários apresentaram a maior média (Figura 4.3, cor amarela). Isto mostra uma preponderância de fibras de maior diâmetro à direita do intervalo predominante em jovens controles. Ao mesmo tempo, jovens escaladores (Figura 4.3, cor amarela) obtiveram aumento significativo das fibras maiores que 4000 μm^2 (diferença de todos os animais; $p < 0,05$), revelando resposta de perfil hipertrófico nos jovens submetidos a treinamento de resistido.

Velhos controles (Figura 4.3) apresentaram a maior média de fibras no intervalo 2000-2500 μm^2 , mostrando um perfil atrófico de fibras (Figura 4.3, cor verde). Este perfil atrófico foi revertido a um padrão semelhante aos jovens, tanto pela corrida quanto pela escalada (Figuras 4.3; cores marrom e azul claro, respectivamente), exceto no grupo de fibras maiores que 4000 μm^2 , que permaneceu aquém (diferença estatística significativa, $p < 0,05$) dos percentuais alcançados neste intervalo pelos jovens escaladores. Isto revela que os treinos de corrida e resistência não apresentam diferenças entre si quanto ao perfil de redistribuição no histograma, e que ambas as modalidades de exercício revertem

o perfil atrófico das fibras, porém sem obter-se nos velhos uma resposta de perfil hipertrófico tão intensa quanto nos jovens.

4.3 Atividade da Acetilcolinestase Muscular

Extratos de homogeneizados de músculos sóleo e gastrocnêmio apresentaram os valores mais altos em jovens, significativamente diferentes de todos os animais velhos (Figura 4.4; $p < 0,05$). Em jovens corredores e escaladores, houve equivalente redução da atividade enzimática em relação aos controles ($p < 0,05$). Animais velhos, além de menores níveis de atividade colinesterásica, apresentaram o mesmo efeito aos exercícios ($p < 0,05$). Conclui-se que, além de equivalentes entre si, ambas modalidades de exercício favorecem a ação colinérgica ao diminuírem a atividade acetilcolinesterásica global de músculos sóleo e gastrocnêmio (para valor de F, veja Tabela 4.5).

4.4 Medula Espinhal

4.4.1 Nissl no Corno Ventral (contagens de células)

Em concordância com estudos prévios [253], animais jovens controles apresentaram maior número de motoneurônios no corno ventral (78,3 células:10 campos; veja Figuras 4.5 e 4.6) que velhos controles (53,8 células :10 campos; $p < 0,05$). Corrida ou escalada não mostraram efeitos significativos em nenhum grupo (para valor de F, veja Tabela 4.5).

4.4.2 Imunorreatividade para GFAP (contagens de células)

4.4.2.1 Corno Ventral

Jovens controles apresentaram as mais baixas contagens de astrócitos (206,7:10 campos; Figura 4.7). Jovens corredores e escaladores (322,5:10 campos, e 349,67:10 campos, respectivamente) não apresentaram diferença significativa entre si, porém sofreram aumento significativo do número de astrócitos em relação aos seus controles ($p < 0.001$). Velhos controles apresentaram significativa astrogliose em relação a todos os jovens (620,33:10 campos, $p < 0,001$), que foi revertida a níveis de jovens exercitados, tanto pela corrida (403,5:10 campos; $p < 0,001$), quanto pela escalada (278,17:10 campos; $p < 0,001$). Escaladores velhos apresentaram diminuição mais intensa da astrogliose, significativamente distinta de velhos corredores ($p < 0,001$), porém sem que chegassem aos níveis de jovens controles ($p < 0,001$) (para valor de F, veja Tabela 4.5).

4.4.2.2 Corno Dorsal

Como no corno ventral, jovens controles apresentaram o menor número de astrócitos, juntamente com jovens corredores (112:10 campos e 135:10 campos, respectivamente; Figura 4.8), porém a escalada aumentou significativamente o número de astrócitos no corno dorsal (176:10 campos; $p < 0,001$). Velhos controles,

corredores e escaladores não foram diferentes entre si, mas apresentaram um significativo aumento no número de astrócitos (253,17:10 campos, 262,33:10 campos e 245:10 campos, respectivamente; $p < 0,001$) em relação a todos os jovens (para valor de F, veja Tabela 4.5).

4.4.3 Imunorreatividade para CGRP (Densitometria Óptica)

4.4.3.1 Corno Ventral (densitometria óptica intracelular)

Motoneurônios alfa no corno ventral revelaram fraca marcação CGRP-ir (Figura 4.9). A densitometria óptica intracelular de motoneurônios (Figura 4.10) revelou uma clara divisão entre animais jovens (iguais entre si) e velhos (idem), os últimos apresentando maiores intensidades de imunorreatividade ($p < 0,001$). Contudo, nenhum grupo exercitado apresentou diferenças em relação a seus controles (para valor de F, veja Tabela 4.5).

4.4.3.2 Corno Dorsal

Na densitometria óptica regional do corno dorsal não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 4.11; veja valor de F, Tabela 4.5).

4.4.4 Atividade Histoquímica de Acetilcolinesterase (Densitometria Óptica)

4.4.4.1 Corno Ventral

Densitometria óptica regional do corno ventral revelou que jovens exercitados (Figura 4.12; veja valor de F, Tabela 4.5) apresentaram aumento significativo da expressão histoquímica de AChE em comparação com seus controles ($p < 0,001$). Velhos controles apresentaram níveis ainda menores que jovens controles ($p < 0,05$), enquanto velhos exercitados apresentaram aumentos equivalentes, entre si e aos jovens exercitados ($p < 0,05$).

4.4.4.2 Corno Dorsal

Na densitometria óptica regional do corno dorsal, a expressão de AChE (veja Figuras 4.13 e 4.14; veja valor de F, Tabela 4.5) sofreu diminuição significativa apenas entre jovens escaladores ($p < 0,001$). Apesar de estatisticamente iguais a jovens controles ou corredores, os velhos controles e corredores apresentaram tendências a médias menores. Velhos escaladores sofreram diminuição leve de AChE no corno dorsal (diferentes apenas de jovens controles; $p < 0,05$).

4.4.5 Imunorreatividade para 5-HT (Densitometria Óptica)

4.4.5.1 Corno Ventral

Na densitometria óptica regional do corno ventral, a expressão de 5-HT (veja Figuras 4.15 e 4.17; veja valor de F, Tabela 4.5) sofreu diminuição

significativa apenas entre jovens escaladores ($p < 0,05$). Apesar de estatisticamente iguais a jovens controles ou corredores, os velhos controles e corredores apresentaram tendências a médias menores. Velhos escaladores sofreram diminuição leve de 5-HT, analogamente aos jovens submetidos a este exercício (diferentes apenas de jovens controles; $p < 0,05$).

4.4.5.2 Corno Dorsal

Na densitometria óptica regional do corno dorsal (veja Figuras 4.16 e 4.18; veja valor de F, Tabela 4.5), apenas o grupo de jovens corredores apresentou aumento significativo de imunexpressão em relação a seus controles ($p < 0,05$).

4.5. LEGENDAS - RESULTADOS

ABREVIATÖES:

JS - jovens sedentários

JC - jovens corredores

JE - jovens escaladores

VS - velhos sedentários

VC - velhos corredores

VE - velhos escaladores

Significância estatística nos gráficos: média \pm erro médio padrão; *, P <0.05; **, P <0.01; ***, P < 0.001.

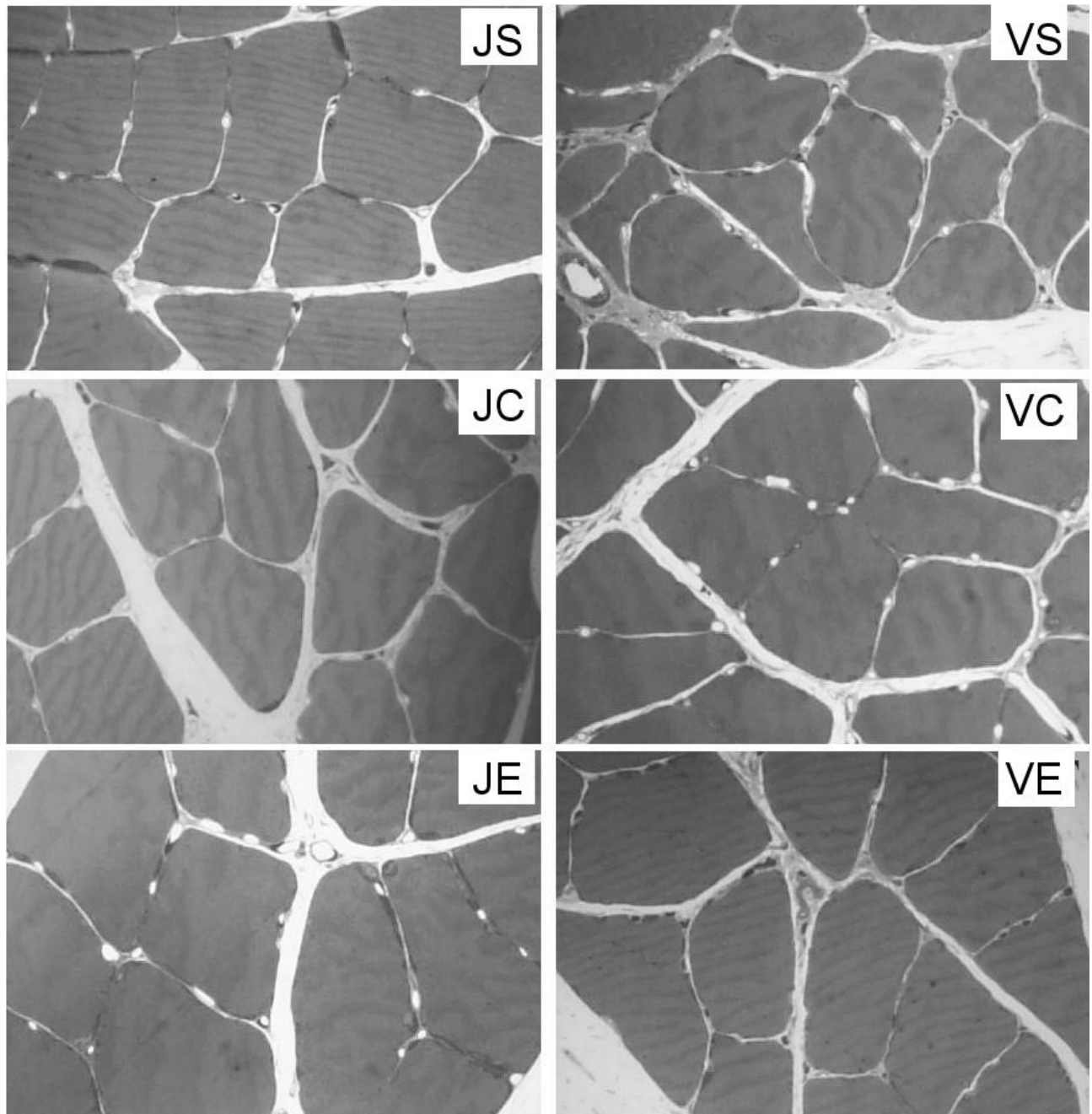


Figura 4.1: Fibras do músculo sóleo (azul de toluidina; cortes semifinos - 200x).

Figura 4.2: Histogramas do músculo sóleo. Linhas representam médias de raízes quadradas dos percentuais obtidos por 100 fibras [média ($\sqrt{\text{ % no intervalo}}$) de 5 ratos/grupo]. Jovens Sedentários (JS) = azul escuro, Jovens Corredores (JC) = vermelho, Jovens Escaladores (JE) = amarelo, Velhos Sedentários (VS) = verde, Velhos Corredores (VC) = marrom, Velhos Escaladores (VE) = azul claro. Diferenças significativas foram encontradas nos intervalos ($<1500\mu\text{m}^2$) e ($2501-3000\mu\text{m}^2$). Para consultar valores, veja tabela 4.1. Para consultar valores de F e diferenças pormenorizadas, veja tabela 4.3.

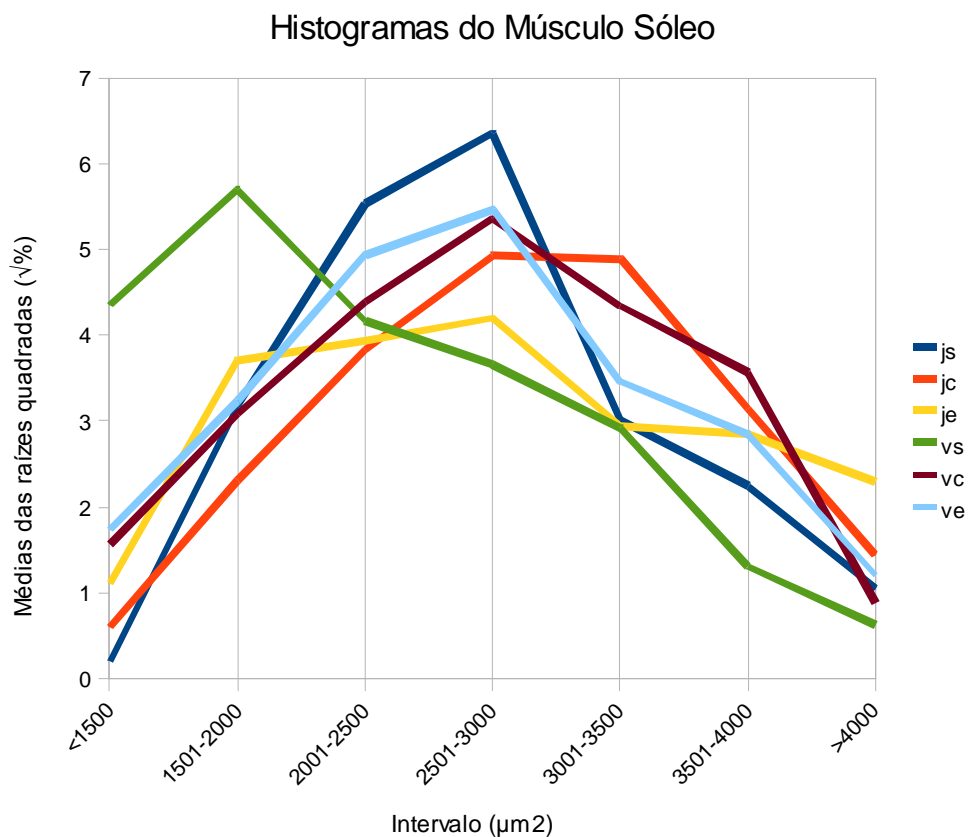


Figura 4.3: Histogramas do músculo gastrocnêmio. Linhas representam médias de raízes quadradas dos percentuais obtidos por 100 fibras [média ($\sqrt{\%}$ no intervalo) de 5 ratos/grupo]. Jovens Sedentários (JS) = azul escuro, Jovens Corredores (JC) = vermelho, Jovens Escaladores (JE) = amarelo, Velhos Sedentários (VS) = verde, Velhos Corredores (VC) = marrom, Velhos Escaladores (VE) = azul claro. Diferenças significativas foram encontradas nos intervalos (2001-2500 μm^2) e (>4000 μm^2). Para consultar valores, veja tabela 4.2. Para consultar valores de **F** e diferenças pormenorizadas, veja tabela 4.4.

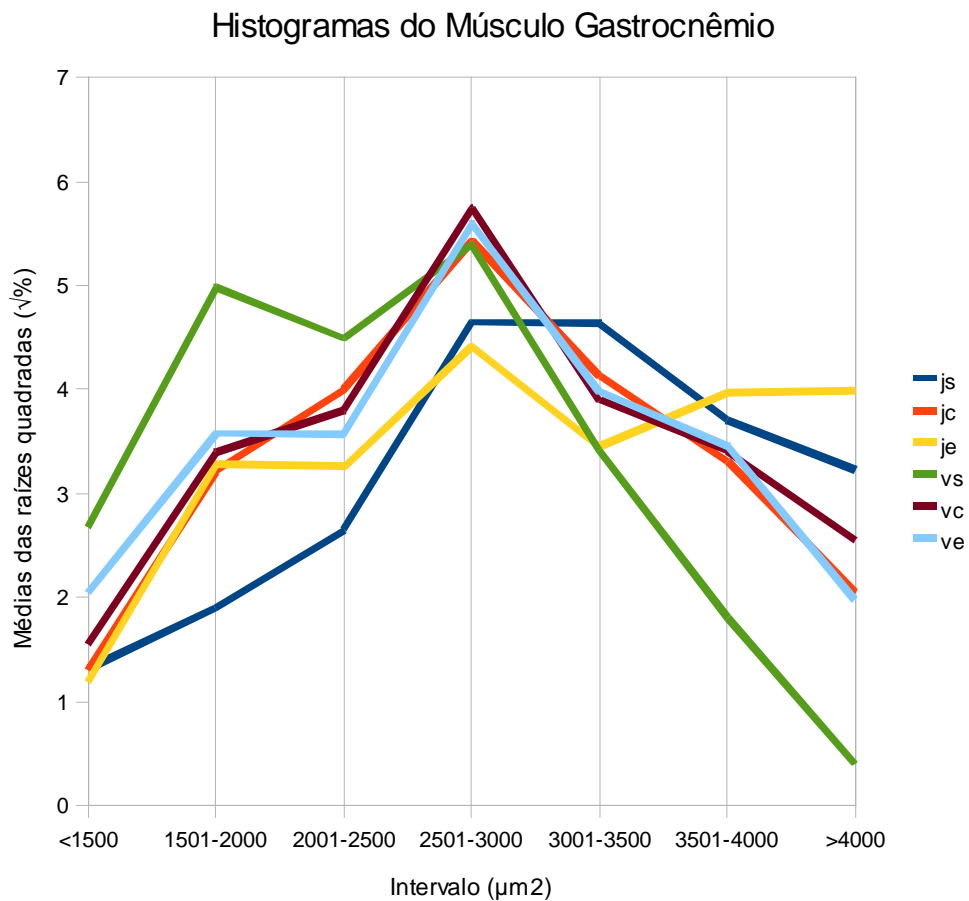


Tabela 4.1a: contagens de fibras do músculo sóleo (100 fibras por rato) por intervalos de diâmetros transversais (μm^2). Ratos por grupo = 5.

grupos	<1500	1501-2000	2001-2500	2501-3000	3001-3500	3501-4000	>4000
js	0	3	22	54	14	5	2
js	0	17	42	33	4	3	1
js	0	13	31	45	4	7	0
js	1	17	27	41	11	1	2
js	0	5	33	31	16	13	2
jc	0	5	12	30	26	18	9
jc	0	0	10	42	38	10	0
jc	0	6	27	31	25	10	1
jc	0	0	2	24	42	27	5
jc	9	47	35	5	3	0	1
je	0	0	0	5	8	26	61
je	1	14	34	27	14	8	2
je	3	43	37	15	2	0	0
je	0	2	6	41	25	21	5
je	8	47	28	11	3	3	0
vs	7	29	25	16	13	8	2
vs	47	21	17	10	5	0	0
vs	22	51	14	5	4	1	3
vs	4	36	18	28	13	1	0
vs	31	29	14	13	10	3	0
vc	0	3	14	19	34	29	1
vc	3	18	35	31	7	6	0
vc	15	22	19	24	12	7	1
vc	0	2	12	43	28	13	2
vc	5	11	20	29	20	14	1
ve	5	15	19	30	14	6	11
ve	4	8	39	41	7	1	0
ve	6	25	38	26	2	3	0
ve	0	1	8	24	33	33	1
ve	4	12	26	30	14	11	3

Tabela 4.1b: contagens de fibras do músculo sóleo (100 fibras por rato) por intervalos de diâmetros transversais (μm^2), convertidas a suas raízes quadradas para homogeneização da amostra e médias. Ratos por grupo = 5.

Ratos	$\sqrt{(<1500)}$	$\sqrt{(1501-2000)}$	$\sqrt{(2001-2500)}$	$\sqrt{(2501-3000)}$	$\sqrt{(3001-3500)}$	$\sqrt{(3501-4000)}$	$\sqrt{(>4000)}$
js	0	1,73	4,69	7,35	3,74	2,24	1,41
js	0	4,12	6,48	5,74	2	1,73	1
js	0	3,61	5,57	6,71	2	2,65	0
js	1	4,12	5,2	6,4	3,32	1	1,41
js	0	2,24	5,74	5,57	4	3,61	1,41
média	0,2	3,16	5,54	6,35	3,01	2,24	1,05
jc	0	2,24	3,46	5,48	5,1	4,24	3
jc	0	0	3,16	6,48	6,16	3,16	0
jc	0	2,45	5,2	5,57	5	3,16	1
jc	0	0	1,41	4,9	6,48	5,2	2,24
jc	3	6,86	5,92	2,24	1,73	0	1
média	0,6	2,31	3,83	4,93	4,9	3,15	1,45
je	0	0	0	2,24	2,83	5,1	7,81
je	1	3,74	5,83	5,2	3,74	2,83	1,41
je	1,73	6,56	6,08	3,87	1,41	0	0
je	0	1,41	2,45	6,4	5	4,58	2,24
je	2,83	6,86	5,29	3,32	1,73	1,73	0
média	1,11	3,71	3,93	4,2	2,94	2,85	2,29
vs	2,65	5,39	5	4	3,61	2,83	1,41
vs	6,86	4,58	4,12	3,16	2,24	0	0
vs	4,69	7,14	3,74	2,24	2	1	1,73
vs	2	6	4,24	5,29	3,61	1	0
vs	5,57	5,39	3,74	3,61	3,16	1,73	0
média	4,35	5,7	4,17	3,66	2,92	1,31	0,63
vc	0	1,73	3,74	4,36	5,83	5,39	1
vc	1,73	4,24	5,92	5,57	2,65	2,45	0
vc	3,87	4,69	4,36	4,9	3,46	2,65	1
vc	0	1,41	3,46	6,56	5,29	3,61	1,41
vc	2,24	3,32	4,47	5,39	4,47	3,74	1
média	1,57	3,08	4,39	5,35	4,34	3,57	0,88
ve	2,24	3,87	4,36	5,48	3,74	2,45	3,32
ve	2	2,83	6,24	6,4	2,65	1	0
ve	2,45	5	6,16	5,1	1,41	1,73	0
ve	0	1	2,83	4,9	5,74	5,74	1
ve	2	3,46	5,1	5,48	3,74	3,32	1,73
média	1,74	3,23	4,94	5,47	3,46	2,85	1,21

Tabela 4.2a: contagens de fibras do músculo gastrocnêmio (100 fibras por rato) por intervalos de diâmetros transversais (μm^2). Ratos por grupo = 5.

grupos	<1500	1501-2000	2001-2500	2501-3000	3001-3500	3501-4000	>4000
js	1	5	5	29	30	21	9
js	0	0	4	27	28	19	22
js	0	0	2	16	24	22	36
js	0	1	12	32	37	12	6
js	31	39	17	9	2	2	0
jc	0	0	10	38	24	19	9
jc	9	34	18	25	10	3	1
jc	0	3	14	29	32	17	5
jc	12	27	21	21	6	9	4
jc	0	11	18	36	20	11	4
je	0	8	10	16	11	18	37
je	0	3	7	18	14	26	32
je	2	6	11	16	27	24	14
je	20	41	16	18	4	1	0
je	0	9	10	31	9	21	20
vs	17	27	18	17	14	6	1
vs	10	25	19	36	7	2	1
vs	2	10	35	39	11	3	0
vs	6	28	19	25	18	4	0
vs	5	39	13	31	10	2	0
vc	1	10	17	25	16	16	15
vc	4	17	18	34	9	7	11
vc	11	23	13	31	12	8	2
vc	0	7	19	49	17	7	1
vc	2	5	7	28	24	24	10
ve	5	9	14	39	15	17	1
ve	8	19	17	39	10	4	3
ve	4	12	15	31	10	17	11
ve	10	32	17	19	15	6	1
ve	0	2	4	31	34	21	8

Tabela 4.2b: contagens de fibras do músculo gastrocnêmio (100 fibras por rato) por intervalos de diâmetros transversais (μm^2), convertidas a suas raízes quadradas para homogeneização da amostra e médias. Ratos por grupo = 5.

Ratos	$\sqrt{(<1500)}$	$\sqrt{(1501-2000)}$	$\sqrt{(2001-2500)}$	$\sqrt{(2501-3000)}$	$\sqrt{(3001-3500)}$	$\sqrt{(3501-4000)}$	$\sqrt{(>4000)}$
js	1	2,24	2,24	5,39	5,48	4,58	3
js	0	0	2	5,2	5,29	4,36	4,69
js	0	0	1,41	4	4,9	4,69	6
js	0	1	3,46	5,66	6,08	3,46	2,45
js	5,57	6,24	4,12	3	1,41	1,41	0
média	1,31	1,9	2,65	4,65	4,63	3,7	3,23
jc	0	0	3,16	6,16	4,9	4,36	3
jc	3	5,83	4,24	5	3,16	1,73	1
jc	0	1,73	3,74	5,39	5,66	4,12	2,24
jc	3,46	5,2	4,58	4,58	2,45	3	2
jc	0	3,32	4,24	6	4,47	3,32	2
média	1,29	3,22	3,99	5,43	4,13	3,31	2,05
je	0	2,83	3,16	4	3,32	4,24	6,08
je	0	1,73	2,65	4,24	3,74	5,1	5,66
je	1,41	2,45	3,32	4	5,2	4,9	3,74
je	4,47	6,4	4	4,24	2	1	0
je	0	3	3,16	5,57	3	4,58	4,47
média	1,18	3,28	3,26	4,41	3,45	3,96	3,99
vs	4,12	5,2	4,24	4,12	3,74	2,45	1
vs	3,16	5	4,36	6	2,65	1,41	1
vs	1,41	3,16	5,92	6,24	3,32	1,73	0
vs	2,45	5,29	4,36	5	4,24	2	0
vs	2,24	6,24	3,61	5,57	3,16	1,41	0
média	2,68	4,98	4,5	5,39	3,42	1,8	0,4
vc	1	3,16	4,12	5	4	4	3,87
vc	2	4,12	4,24	5,83	3	2,65	3,32
vc	3,32	4,8	3,61	5,57	3,46	2,83	1,41
vc	0	2,65	4,36	7	4,12	2,65	1
vc	1,41	2,24	2,65	5,29	4,9	4,9	3,16
média	1,55	3,39	3,8	5,74	3,9	3,4	2,55
ve	2,24	3	3,74	6,24	3,87	4,12	1
ve	2,83	4,36	4,12	6,24	3,16	2	1,73
ve	2	3,46	3,87	5,57	3,16	4,12	3,32
ve	3,16	5,66	4,12	4,36	3,87	2,45	1
ve	0	1,41	2	5,57	5,83	4,58	2,83
média	2,05	3,58	3,57	5,6	3,98	3,46	1,98

Tabela 4.3: Morfometria do Músculo Sóleo (valores não significativos foram omitidos)

Tamanho de fibras (μm^2)	Valor de F	Diferenças Significativas (grupo:grupo) (p)
<1500	$F(5,24) = 5,789$ ($p=0,001$)	VS: JS, JC, JE, VC, VE
1501-2000	—	—
2001-2500	—	—
2501-3000	$F(5,24) = 3,446$ ($p=0,017$)	JS: JC, JE, VS, VC, VE VS: JS, JC, JE, VC, VE
3001-3500	—	—
>3501	—	—

Tabela 4.4: Morfometria do Músculo Gastrocnêmio (valores não significativos foram omitidos)

Tamanho de fibras (μm^2)	Valor de F	Diferenças Significativas (grupo:grupo) (p)
<1500	—	—
1501-2000	—	—
2001-2500	$F(5,24) = 3,183$ ($p=0,024$)	JS: JC, JE, VS, VC, VE VS: JS, JC, JE, VC, VE
2501-3000	—	—
3001-3500	—	—
3501-4000	—	—
>4000	$F(5,24) = 3,097$ ($p=0,027$)	JE: JS, JC, VS, VC, VE VS: JS, JC, JE, VC, VE

Tabela 4.5: Valores de F

Reação	Valor de F
Atividade da AChE	F (5,30) = 2,534 (p=0,04)
Motoneurônios no Corno Ventral	F (5,30) = 8,581 (p=0,001)
Astrócitos no Corno Ventral	F (5,30) = 53,274 (p=0,001)
Astrócitos no Corno Dorsal	F (5,30) = 51,18 (p=0,001)
CGRP em Motoneurônios	F (5,30) = 10,746 (p=0,001)
CGRP no Corno Dorsal	----
AChE no Corno Ventral	F (5,30) = 9,586 (p=0,001)
AChE no Corno Dorsal	F (5,30) = 12,099 (p=0,001)
5-HT no Corno Ventral	F (5,30) = 2,857 (p=0,0316)
5-HT no Corno Dorsal	F (5,30) = 2,636 (p=0,0432)

Figura 4.4 - Atividade da Acetilcolinesterase Muscular

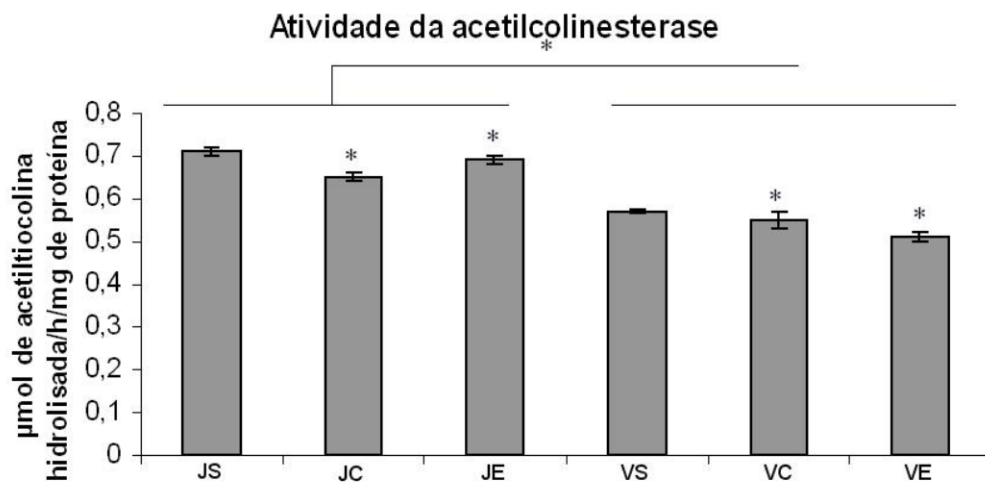
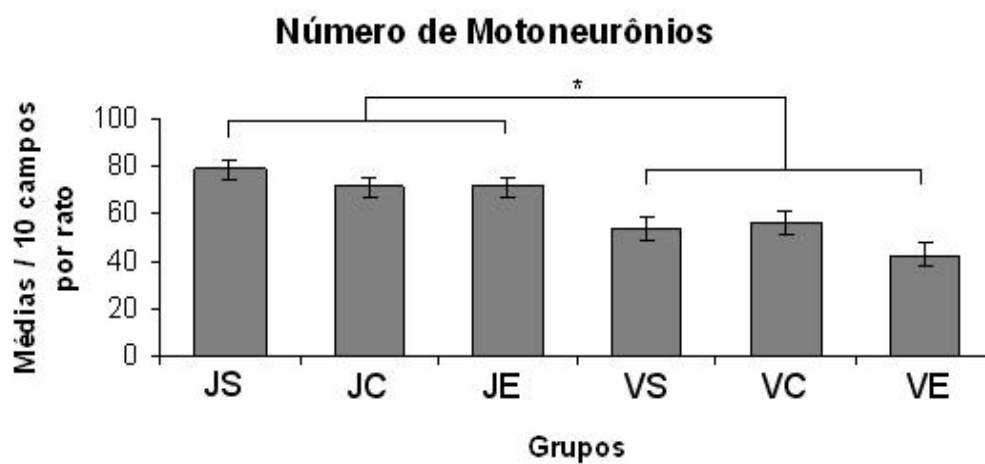


Figura 4.5 - Número de motoneurônios alfa no corno ventral.



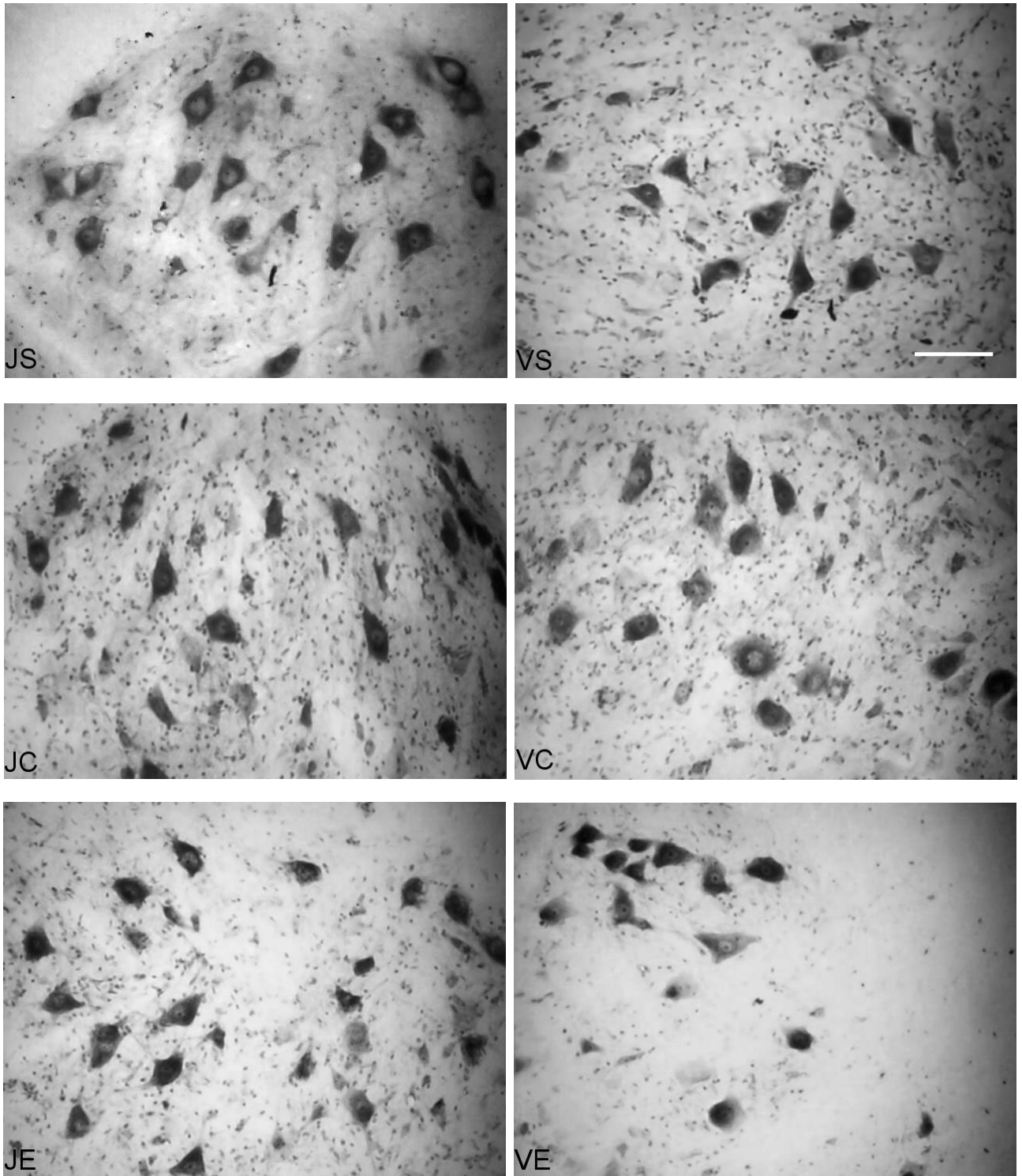


Figura 4.6: Motoneurônios no corno ventral da medula espinhal (coloração de Nissl – 100x). Notar a diminuição geral do número de motoneurônios em imagens de ratos velhos. Barra = 100 μ m.

Figura 4.7 - Número de Astrócitos no Corno Ventral

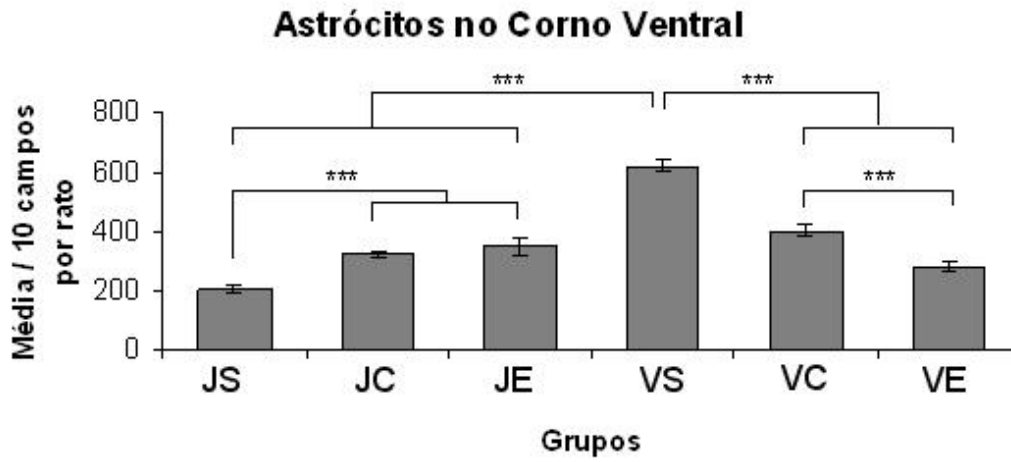
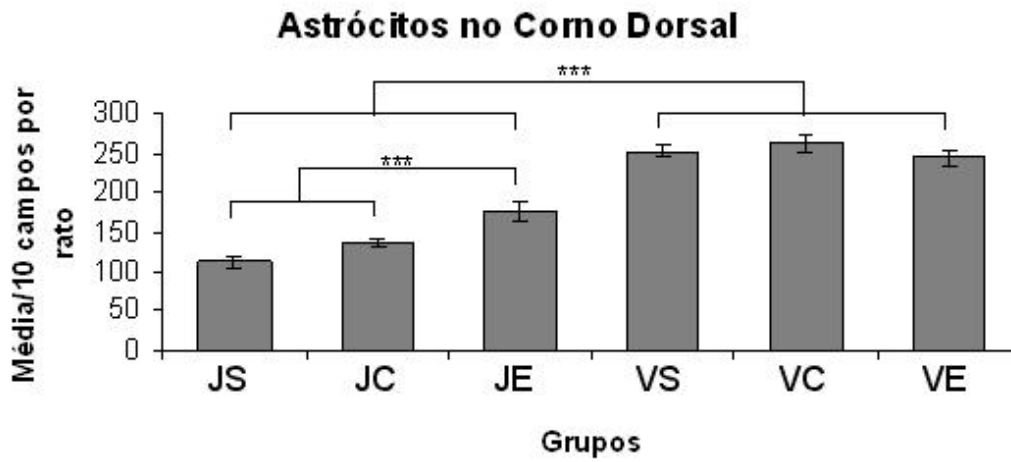


Figura 4.8 - Número de Astrócitos no Corno Dorsal



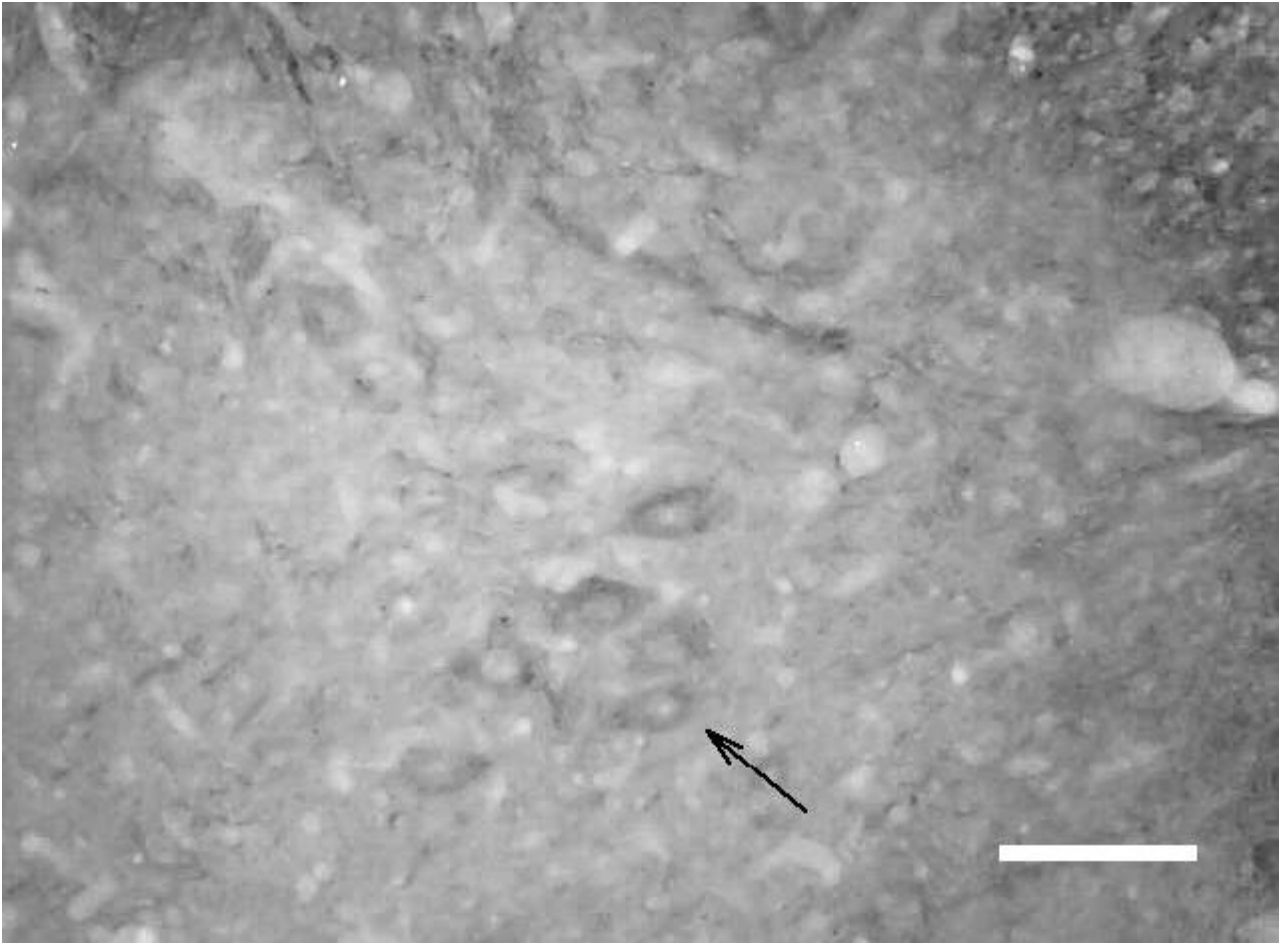


Figura 4.9: Motoneurônios CGRP-ir fracamente positivos no corno ventral, agrupados (seta). Rato velho sedentário (200x). Barra = 50 μ m.

Figura 4.10 - CGRP-ir em motoneurônios.

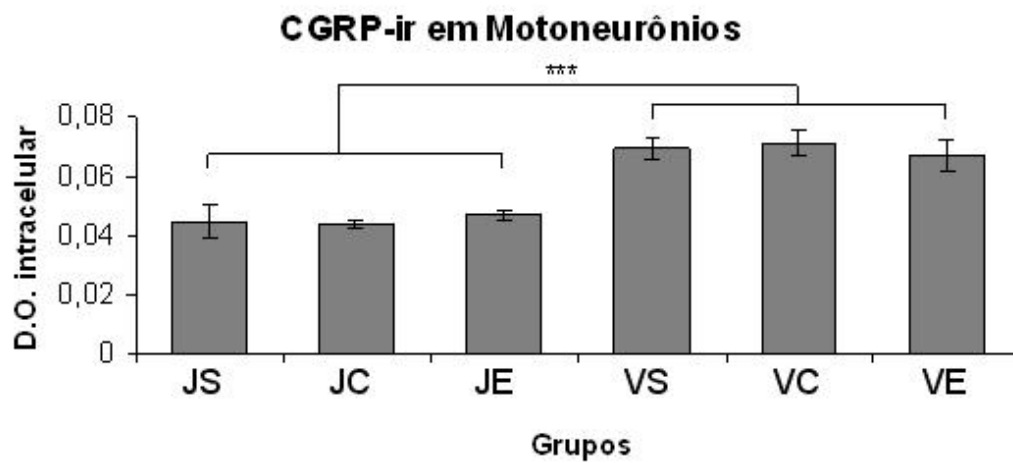


Figura 4.11 - CGRP-ir no corno dorsal.

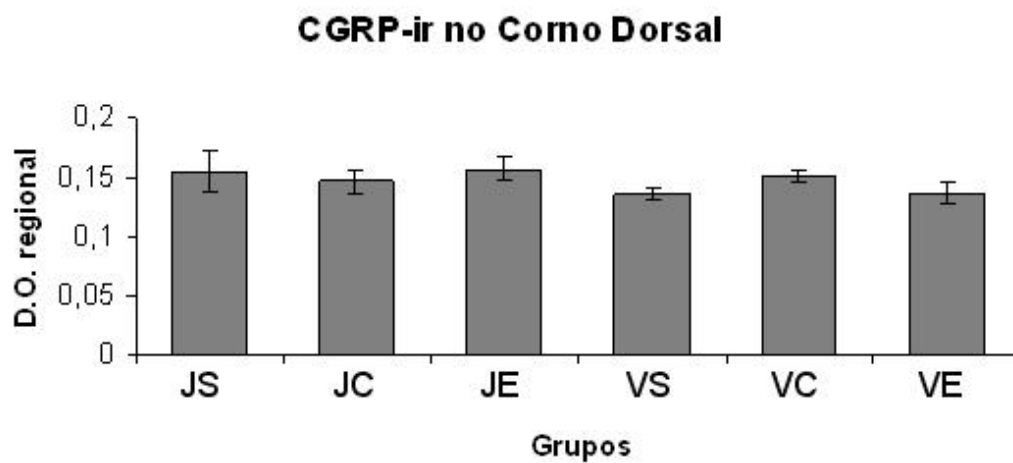


Figura 4.12 - AChE-r no corno ventral.

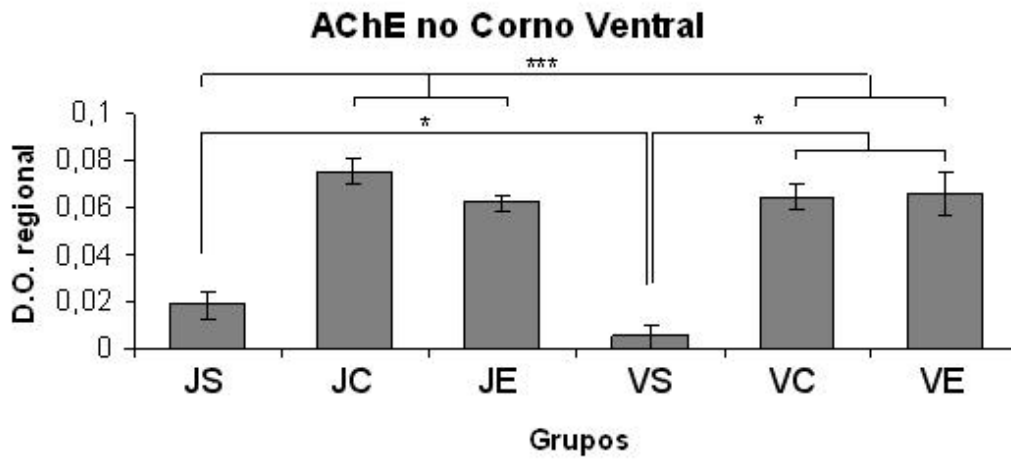
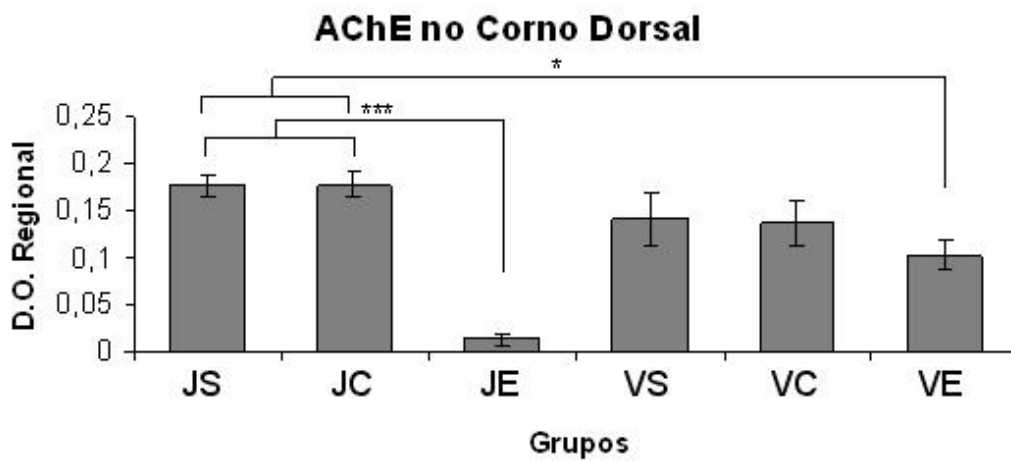


Figura 4.13 - AChE-r no corno dorsal.



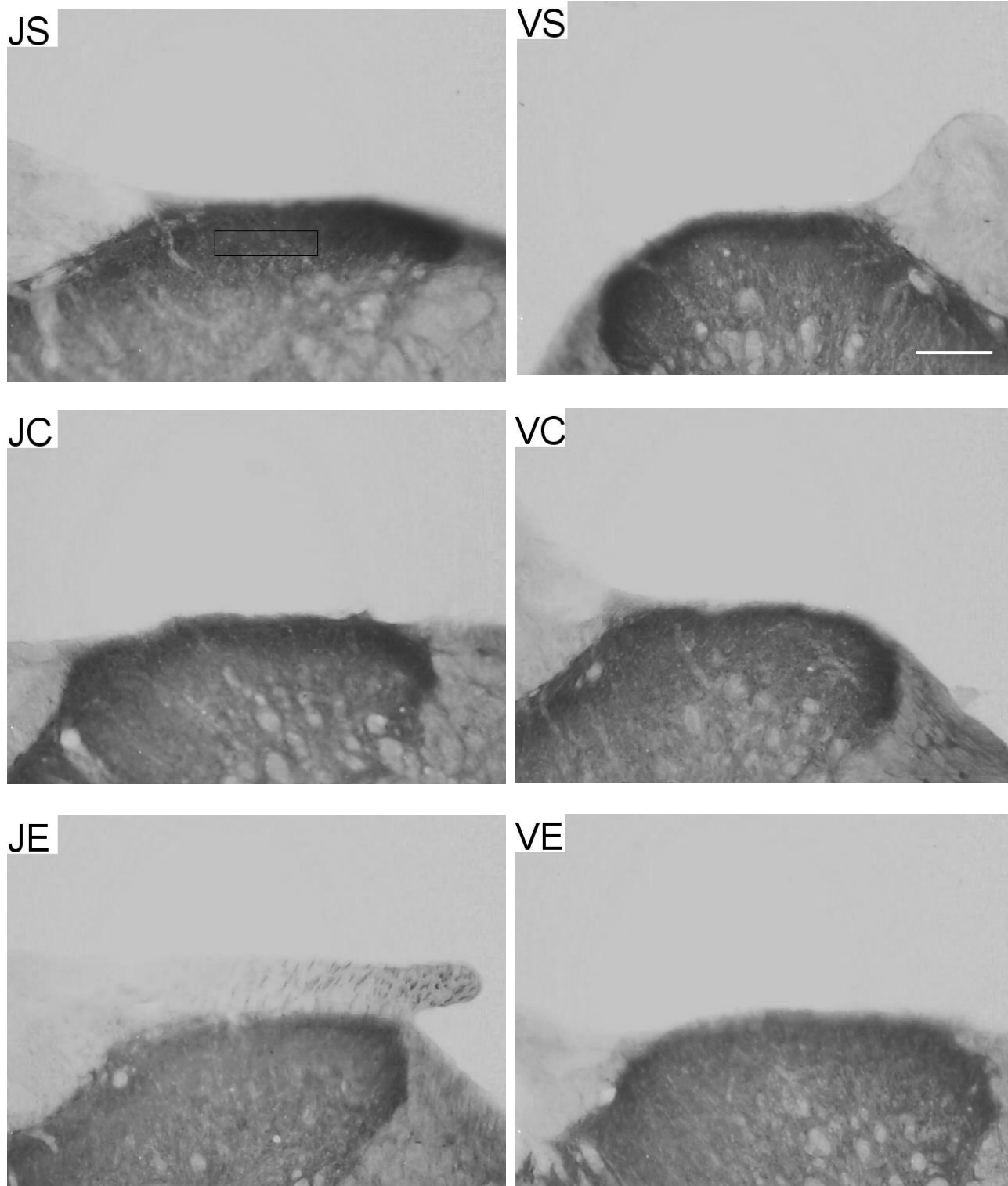


Figura 4.14: Imagens digitais AChE-r do corno dorsal (100x). Note área de interesse (ADI) para medida de densitometria óptica em JS, e diminuição da reação em JE. Barra = 100 μ m.

Figura 4.15 - 5-HT-ir no corno ventral.

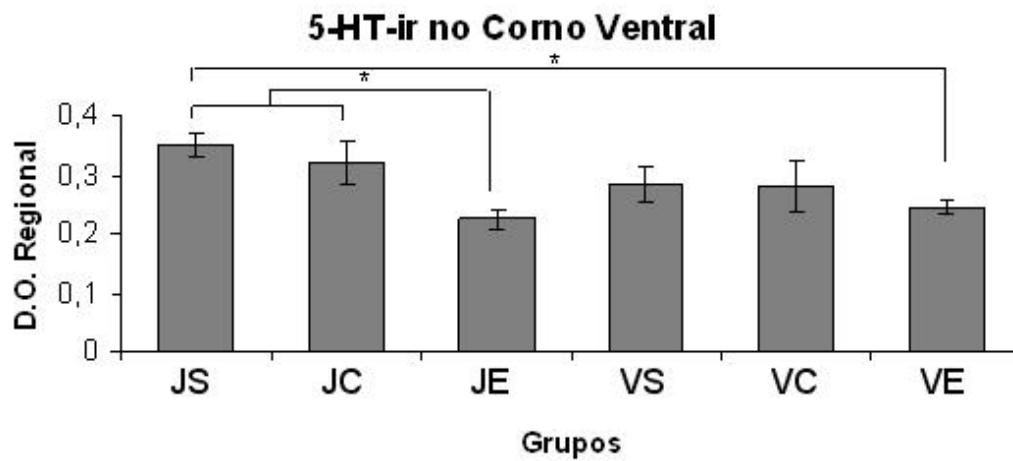
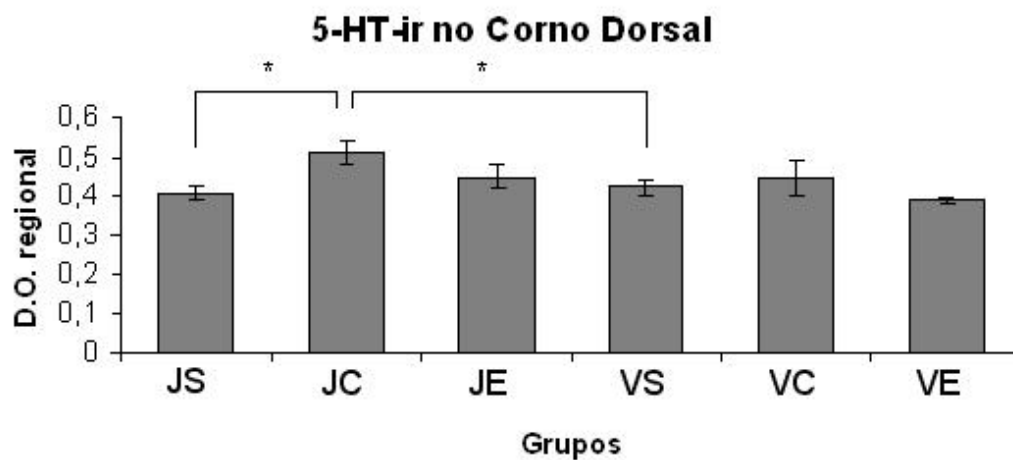


Figura 16 - 5-HT-ir no corno dorsal.



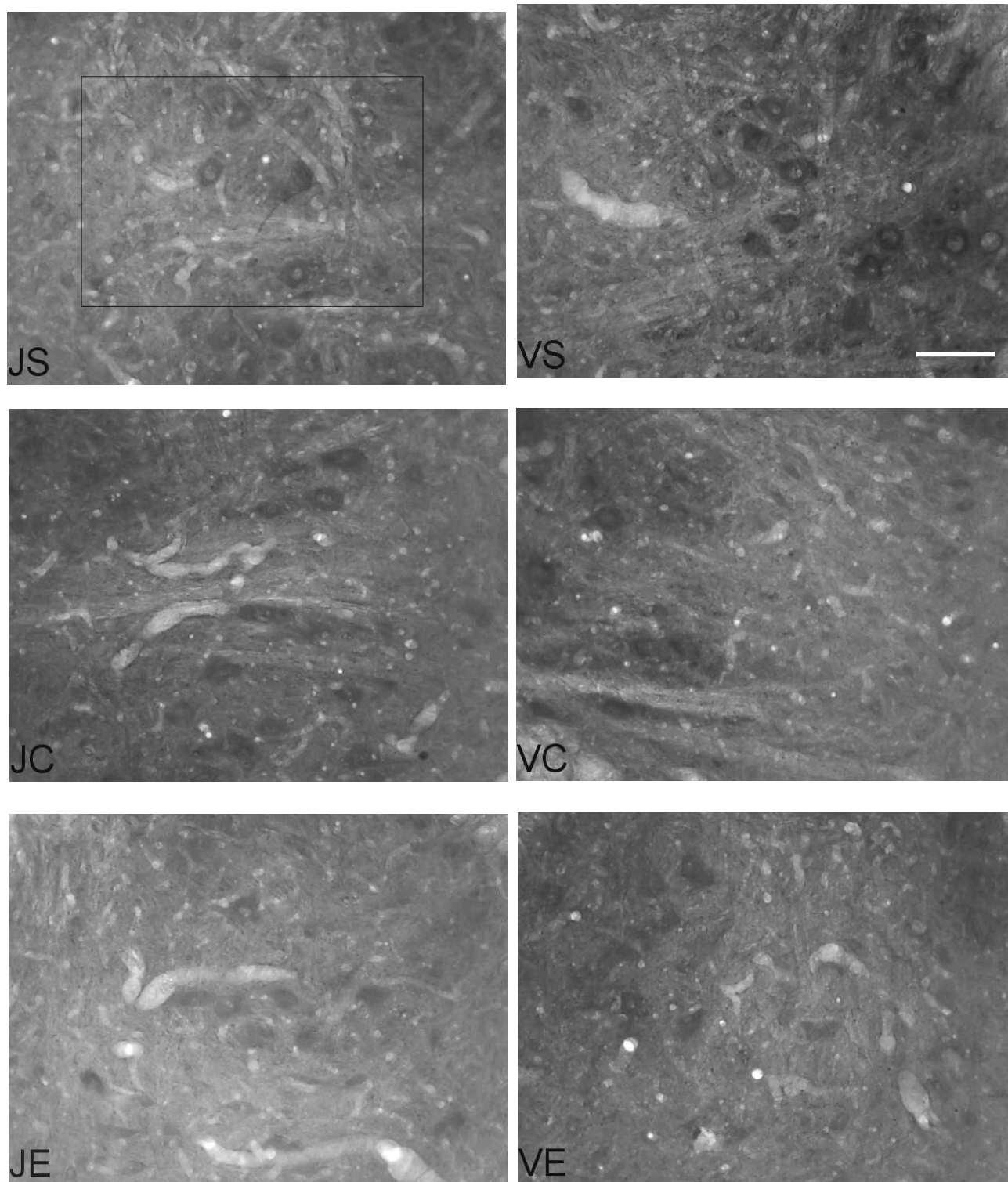


Figura 4.17: Imagens digitais 5-HT-ir do corno ventral. Note área de interesse (ADI) para medida de densitometria óptica em JS, e diminuição de imunorreação em JE (100x). Barra = 100 μ m.

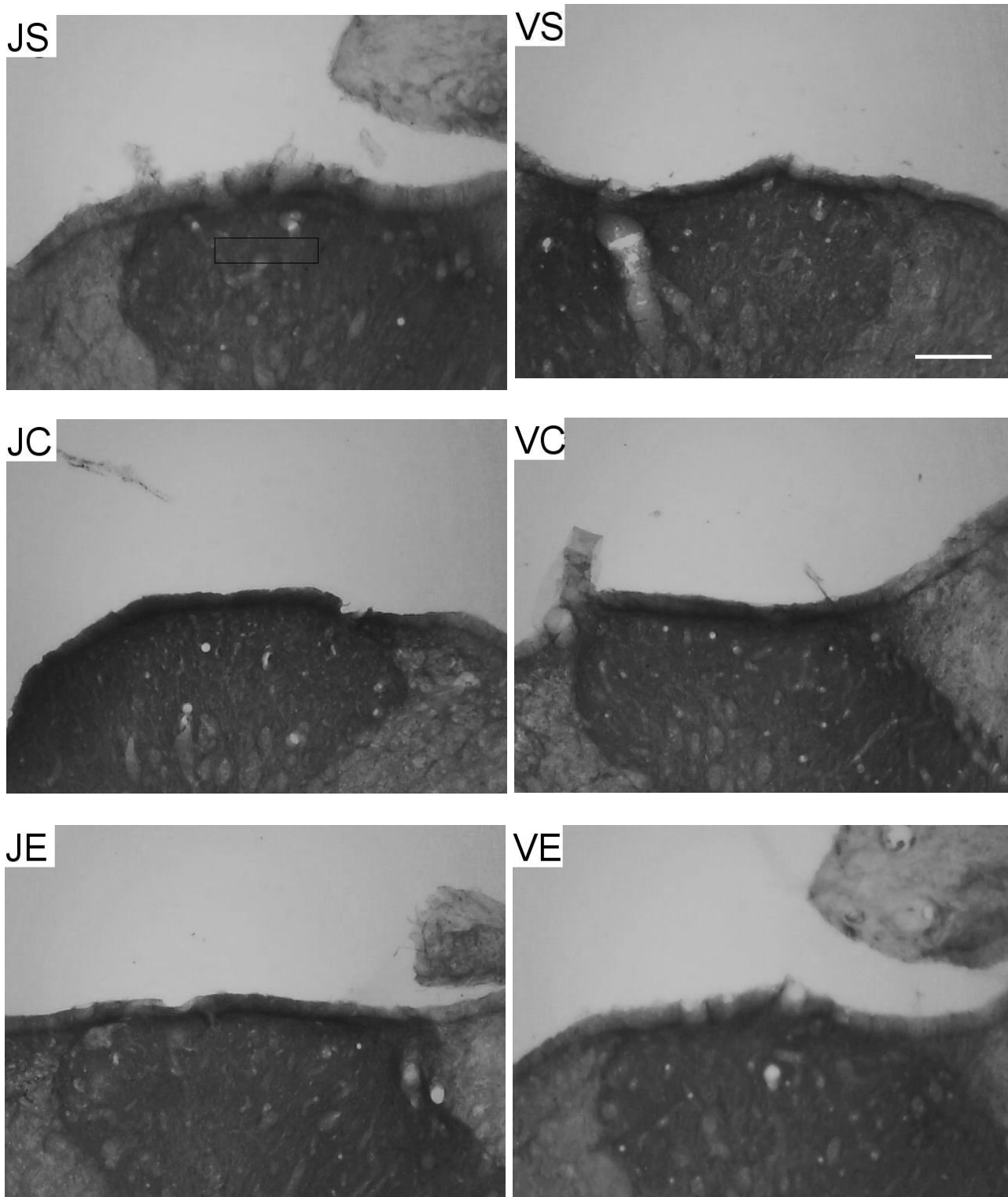


Figura 4.6: Imagens digitais 5-HT-ir do corno dorsal. Note área de interesse (ADI) para medida de densitometria óptica em JS, , e discreto aumento de imunorreação em JC (100x). Barra = 100µm.

5. Discussão

Neste estudo, submetemos duas faixas etárias de ratos adultos machos Wistar a diferentes modalidades de treinamento físico, com base em modelos de exercício já comparados anteriormente em ratos jovens em nosso próprio laboratório, para outro fim (regeneração de nervo periférico) [421]. Os modelos de treinamento mostraram-se factíveis para ambas faixas etárias, sendo realizados até o término. Apesar da ausência de realização de provas e testes funcionais nos animais antes e após o período de treinamento, a progressividade inerente e as intensidades finais de ambos treinamentos, bem como os relatos prévios na literatura para estes modelos [220, 421-423], atestam a melhora funcional final dos animais.

Comparar programas distintos de treinamento como aqueles utilizados aqui continua a ser uma tarefa complexa em desenho experimental. O treinamento de endurance foi baseado nos valores iniciais obtidos em um teste de esforço máximo (TEM), mas um teste equivalente para treinamento resistido não foi utilizado. Deste modo, animais velhos realizaram o mesmo treinamento resistido que os animais jovens, com progressão semanal fixa de cargas ao longo do experimento. Agravando possíveis vieses de desenho experimental, observou-se maiores pesos corporais nos animais velhos e menor capacidade física no TEM. Isto evidencia que os velhos escaladores iniciaram seus treinamentos com cargas proporcionalmente maiores, erguendo-se na grade, e possivelmente, com menor capacidade muscular relativa. Além disso, nem o treinamento de endurance

tampouco o treinamento resistido tiveram qualquer efeito sobre os pesos corporais nos dois grupos etários, mostrando que estas diferenças se mantiveram durante todo o experimento. Levando-se em consideração que os ratos Wistar velhos apresentavam significativo perfil atrófico dos músculos sóleo e gastrocnêmio verificado nos histogramas, seria adequado propor-se que, em condições de criação padrão, estes animais sejam melhor definidos como um modelo animal de obesidade sarcopênica, em que o peso corporal aumenta, mas a massa muscular diminui.

Por outro lado, tanto o treinamento de endurance quanto o treinamento resistido foram graduais e progressivos. Ambos foram realizados por todos os animais, sem recusas significativas ou mortes, e aparentemente bem tolerados. Do ponto de vista clínico, a avaliação de cargas em humanos é feita deste modo, em que a capacidade de realização das séries ao exercício é a principal forma de avaliação para a prescrição de intensidade. Contudo, o autor reconhece que um programa de treinamento de força com base em um teste máximo dinâmico para roedores seria desejável no futuro, para melhores comparações entre os diferentes grupos etários e/ou gêneros.

Se por um lado, comparações entre jovens e velhos (ou diferentes exercícios), quanto aos efeitos do exercício resistido entre diferentes idades, teriam análises de desfecho parcialmente comprometidas por este viés de desenho, a análise e comparação de efeitos dos treinamentos dentro das faixas etárias, e as comparações dos efeitos do treinamento de endurance entre

diferentes faixas etárias, são de maior consistência. Além disto, avaliações histológicas dos músculos gastrocnêmio e sóleo permitiram complementar as análises dos efeitos pretendidos quanto aos treinamentos de endurance e resistido isoladamente, isto é, melhora do desempenho em corrida e hipertrofia muscular. Os resultados permitem, na opinião do autor, extrapolações significativas, que serão mencionadas a seguir.

No músculo sóleo de ratos jovens, o treinamento de endurance e o treinamento resistido não causaram respostas de perfil hipertrófico que pudessem ser detectadas pelos perfis de histogramas, mostrando que estes treinamentos, no sóleo, são menos propensos a produzir efeitos diferentes no diâmetro das fibras. Isto é compatível com os dados da literatura, em que fibras predominantemente lentas no músculo sóleo são responsáveis pela manutenção da postura antigravitacional e da marcha de longa distância [197, 423], e que este músculo é pouco propenso à hipertrofia.

O treinamento resistido, portanto, não modificou nos ratos jovens a distribuição de fibras em histograma do músculo sóleo. Isto levanta a hipótese de que este músculo poderia ser menos recrutado em detrimento de outros, quando a força de impulsão (como na grade de escalada) se faz necessária. A hipótese de não-recrutamento do sóleo na grade de escalada seria confirmada se ratos velhos sedentários não tivessem apresentado um perfil atrófico significativo de fibras do músculo sóleo, que foi, de fato, revertida ao padrão de jovens sedentários pela corrida e escalada.

Esta reversão mostra que o sóleo foi recrutado nos animais velhos escaladores. Ainda assim, com base neste fato, poder-se-ia inferir que a movimentação dos velhos escaladores apresentasse um recrutamento misto de músculos gastrocnêmio e sóleo, o que não aconteceria no jovem (que utilizaria apenas o gastrocnêmio, que apresentou hipertrofia em jovens escaladores). Ou, mais provável, o sóleo seria recrutado para esta movimentação em ambas as faixas etárias, porém as mudanças causadas pelo exercício resistido envolveriam alterações bioquímicas e de eficiência de contração que não resultariam em hipertrofia e nem seriam detectadas pela simples análise de histograma, especialmente nos jovens. Isto também é sugerido pela literatura, onde diferentes isoformas de cadeias pesadas de miosina podem ser mais ou menos expressas após exercícios resistidos, sem que se encontre modificações de tamanho do músculo sóleo [185].

Outra questão envolve a sinalização sistêmica de hormônios cuja secreção encontra-se aumentada no exercício, como IGF-1, e a melhora da sensibilidade muscular aos efeitos da insulina [432]. O fato de ratos Wistar velhos terem menor sensibilidade à insulina já descrita pode ser, por si só, um fator contribuinte para a sarcopenia [54-56]. O desfecho observado nas fibras do sóleo (ausência de resposta de perfil hipertrófico em jovens treinados, correção de perfil atrófico em velhos treinados) pode ter sido influenciado através de fatores de crescimento presentes na circulação, incluindo aqueles secretados pelo próprio gastrocnêmio, por mudanças na sensibilidade à insulina no próprio músculo.

Contrariamente ao sóleo, no músculo gastrocnêmio, ratos jovens escaladores exibiram um aumento significativo na população de fibras de maior diâmetro transversal (acima de $4000 \mu\text{m}^2$), revelando uma resposta de perfil hipertrófico significativa. Por sua vez, a mesma resposta hipertrófica não foi encontrada no grupo de velhos escaladores. O fato do padrão atrófico encontrado em velhos sedentários ter sido revertido, pelo treino resistido, para o padrão de distribuição de fibras encontrado nos jovens sedentários, mostra que o músculo gastrocnêmio era recrutado para a realização da subida em grade tanto em um grupo etário quanto em outro. Porém, os velhos escaladores melhoraram seu perfil atrófico, corrigindo-o, mas não assumindo um fenótipo de perfil hipertrófico de distribuição de fibras dos jovens escaladores. Este desfecho (hipertrofia em jovens escaladores, correção de atrofia em velhos escaladores) mostra que ambas modalidades de exercício (corrida e escalada) possuíam resultados diferentes na hipertrofia muscular em jovens. E mostra também que um mesmo treinamento capaz de causar um perfil hipertrófico em jovens (e que se confirmou como estratégia adequada para se atingir hipertrofia) falhou em causá-la em velhos, apesar de corrigir o perfil atrófico. Esta mesma melhora do padrão atrófico também foi encontrada em velhos corredores.

Esta resposta para o músculo gastrocnêmio, se fosse análoga para grupos musculares semelhantes em seres humanos, estaria em contraste com relatos anteriores de que o treinamento de força é um método bem documentado para evitar sarcopenia, em comparação às estratégias de treinamento aeróbias, ou de

endurance. Por outro lado, poderia significar que as análises baseadas em respostas do tríceps sural de ratos nem sempre representam respostas musculares análogas em seres humanos. Um outro aspecto diz respeito à melhora funcional advinda do aumento da força e da potência musculares, que são proporcionais, mas não unicamente relacionados, ao diâmetro transversal das fibras musculares. Neste aspecto, seriam necessários estudos das propriedades tensionais e contráteis de fibras e tendões, e da composição de diferentes subpopulações de fibras dos músculos do tríceps sural segundo classificações histoquímicas e bioquímicas, para afirmar-se que os treinos de endurance e força não apresentam desfechos distintos sob tais critérios, o que seria improvável.

Contudo, a ausência de distinção entre histogramas do gastrocnêmio de ratos velhos entre os diferentes treinos (ainda que revertido o perfil atrófico em ambos grupos) corrobora o senso comum, de que a capacidade de hipertrofiar determinado grupo muscular sob o treino resistido decresce com a idade. Entretanto, consideradas válidas ou não estas alternativas, é exatamente na análise comparativa dos efeitos do treinamento resistido sobre gastrocnêmio entre diferentes faixas etárias que a proporcionalidade da prescrição de exercícios resistidos na ausência de um teste máximo se fragiliza. Na opinião do autor, estas hipóteses mereceriam uma confirmação cuidadosa através de um novo experimento.

O extratos musculares apresentaram maior atividade da AChE nos animais jovens, com redução em ambos os jovens corredores e escaladores. Uma redução

equivalente foi observada em velhos corredores e escaladores, quando comparados aos ratos velhos sedentários, mostrando que ambos tipos de treino diminuem a atividade da AChE nos músculos dos membros posteriores. Isto faz sentido, ao interpretar-se que uma diminuição da ação colinesterásica seria uma forma de aumentar a ação da acetilcolina na JNM. Por outro lado, no corno ventral da medula espinhal, ratos velhos sedentários apresentaram uma menor reatividade no corno ventral para a AChE do que jovens. Entretanto, ao contrário dos músculos, na medula espinhal, jovens e velhos grupos exercitados apresentaram um aumento significativo na reatividade à AChE em comparação aos seus pares. Estes dados revelam efeitos opostos do exercício sobre a ação colinesterásica no músculo em comparação à medula espinhal. Uma possível explicação é que uma parte da AChE neuronal deve ser transportada para o JNM, devido à maior atividade colinérgica na JNM. Se, aqui, encontra-se uma contradição aparente (diminui a produção muscular de AChE versus aumenta a produção neuronal de AChE), isto seria possível devido à quantidade de isoformas possíveis da AChE, em que a maior parte da AChE encontrada na JNM é do tipo assimétrica, porém aquela fração que mais aumenta com a atividade é a forma globular G4 [307,315,316]. Ao mesmo tempo, a diminuição da AChE periférica poderia, pelo menos no conteúdo dependente de síntese pré-sináptica, ser devida a retenção central da enzima, um fenômeno hipotético e não encontrado na literatura.

Por outro lado, apesar de alguma atividade colinesterásica na JNM ser de origem pré-sináptica, por transporte axonal antidrômico motoneuronal, há também

um componente bem documentado de atividade colinesterásica no corno ventral desempenhada por interneurônios, tais como as células de Renshaw. Células de Renshaw recebem aferências colinérgicas e glutamatérgicas de motoneurônios alfa e enviam terminais glicinérgicos hiperpolarizantes inibitórios a um ou mais motoneurônios alfa, a chamada inibição recorrente [433,434]. A inibição recorrente está deprimida durante fortes contrações voluntárias, ou em situações patológicas, como no espasmo tetânico. Contudo, embora seja presumível que níveis mais altos de atividade motoneuronal podem aumentar a liberação colinérgica no corno ventral, não foram encontradas diferenças entre diferentes formas de treinamento com as metodologias utilizadas neste estudo.

No corno dorsal, a reatividade da AChE mostrou uma diminuição no grupo de jovens escaladores, apenas. Uma tendência de redução análoga também foi observada em ratos velhos escaladores. O motivo para esta específica diminuição da AChE causada pelo exercício resistido é desconhecida, e mais ainda a razão de uma determinada forma de exercício associada a altas frequências de disparo motoneuronal, como é o caso do exercício resistido, promover estas alterações no corno dorsal. A neurotransmissão colinérgica no corno dorsal está no controle de vias nociceptivas diretas, ao invés de vias motoras [364-371]. Uma exceção para este modelo advém do fato de que, quando ativados aferentes nociceptivos, conexões entre os cornos dorsal e ventral da medula espinhal podem causar ativação reflexa de motoneurônios alfa [414]. Isto pode ocorrer tanto através dos arcos-reflexo segmentares (como os reflexos tendinosos profundos que, a princípio, não envolveriam circuitos complexos de interneurônios), quanto através

dos circuitos de interneurônios envolvidos no GPC [414]. Estes últimos possuem uma participação de sinapses colinérgicas do corno dorsal na geração de episódios de ativação de motoneurônios alternados direita-esquerda e marcha fictícia na medula espinhal. Se o exercício resistido, que modificou a atividade colinesterásica no corno dorsal tanto em jovens quanto em velhos, estaria relacionado a estes circuitos motores ou sensoriais é uma hipótese que permanece ainda a ser testada.

A queda do número de motoneurônios nos ratos velhos em comparação aos jovens é bem descrita na literatura [253], e os resultados aqui obtidos mostram-se coerentes. Ao contrário dos números de motoneurônios, que não foram afetados pelo exercício em qualquer idade, os números de astrócitos no corno ventral mostraram grande variação entre diferentes faixas etárias, em concordância com a literatura (vide a seção introdutória da tese), e também demonstrando que o aumento de GFAP na medula espinhal decorre do aumento do número de astrócitos GFAP-positivos. Ao mesmo tempo, as contagens astrocíticas mostraram grande plasticidade e efeitos opostos em diferentes idades. Em ratos jovens, o exercício aumentou o número de astrócitos (o grupo de jovens sedentários apresentou as menores contagens em comparação a todos os outros). Em ratos velhos, a corrida e, principalmente, o treino resistido, diminuíram a astrogliose relacionadas com a idade. No corno dorsal, ratos jovens exercitados também exibiram maior número de astrócitos, mas nos grupos velhos nenhum efeito dos treinos foi observado. Isto sugere diferentes papéis desempenhados pelos astrócitos em diferentes idades. Nos jovens, a ativação motoneuronal

poderia aumentar a demanda pelo tamponamento sináptico através da captação de íons, de glutamato e fornecimento a neurônios de glicose e lactato. Em ratos mais velhos, por sua vez, a astrogliose é onipresente em todo o sistema nervoso central, mas seu papel ainda é controverso (vide Introdução).

Nos velhos, como já foi mencionado na seção introdutória desta tese, os astrócitos estão geralmente aumentados (hipertrofiados e em maior número) em áreas de perda ou lesão neuronal ou na degeneração de sinapses. A habilidade de astrócitos de responder à lesão, contudo, é muitas vezes comprometida, e a ativação neuronal pode diminuir o número de astrócitos, em algumas áreas do SNC. Uma outra questão refere-se à diminuição de astrócitos observada no hipocampo de animais velhos exercitados, a ser descrita na segunda parte desta tese. Não é possível dizer se as respostas astrocíticas observadas no SNC de animais exercitados, isto é, a reversão de um fenótipo velho, foram causadas por fatores intrínsecos aos neurônios, ou aos circuitos diretamente relacionados à locomoção e à marcha, dos quais fazem parte. Ou se a diminuição astrocítica respondeu a fatores externos àquelas regiões. Neste aspecto, a presença de neurotrofinas, como o BDNF, tanto local quanto no líquido céfalo-raquidiano, e hormônios na circulação sistêmica, como o IGF-1, aumentam com a atividade física [435, 436] e estão envolvidos em algumas respostas favoráveis no hipocampo de mamíferos, em especial na neurogênese hipocampal. O mesmo, em teoria, poderia acontecer nos circuitos da medula espinhal. No entanto, se esta fosse uma causa da redução de astrócitos no corno ventral, assim deveria ser também no corno dorsal, o que não aconteceu. Isto complica a análise destes

dados, mas endossa que, ao menos no corno ventral, o exercício físico favorece a diminuição da astrogliose a um nível de animais mais jovens. Este é, provavelmente, um efeito benéfico, já que no envelhecimento, a astrogliose é associada à degeneração e perda de motoneurônios alfa e de sinapses no corno ventral.

E finalmente, a diminuição de células GFAP-ir na medula espinhal observada ao fim dos treinos de endurance e resistido em ratos velhos, bastante significativa, levanta a questão do destino destas células. Se estas células entram em apoptose ou apenas perdem seu conteúdo de GFAP por desfosforilação dos filamentos intermediários são questões a serem respondidas. Uma apoptose tão significativa dentro da medula espinhal, e num período de apenas poucas semanas, certamente recrutaria células fagocitárias microgliais. Um aumento microglial acompanhando a diminuição astrocítica seria uma hipótese bem plausível a ser testada futuramente.

A densidade óptica intracelular de CGRP em motoneurônios revelaram uma clara diferença de intensidade entre os animais jovens (similares entre si) e velhos (similares entre si), sendo encontradas, nos últimos, as maiores imunorreatividades. Isto está parcialmente de acordo com os dados anteriores [437], exceto que nós encontramos, paralelamente a este aumento de CGRP motoneuronal relacionado à idade, um aumento no número de motoneurônios CGRP-ir no corno ventral. No entanto, nenhum treino, fosse de endurance ou resistido, teve qualquer efeito sobre a CGRP-ir no corno ventral de ratos jovens ou velhos. Isto não está de acordo com a literatura prévia (vide Introdução), que

sugere aumento do neuropeptídeo em paralelo ao aumento de atividade motoneuronal. Uma possível explicação para esta discrepância é que não realizamos ligaduras do isquiático antes da eutanásia, o que interrompe o transporte axonal e acumula o conteúdo proximal do neuropeptídeo, aumentando a sensibilidade da detecção imunistoquímica [272-274]. Isto é corroborado pela fraca imunorreatividade intracelular de CGRP motoneuronal que foi constatada em todos os grupos estudados. Por outro lado, um aumento de neuropeptídeo também poderia ser acompanhado de aumento no fluxo de transporte axonal, o que responderia por menor quantidade detectável no soma dos jovens. O mesmo poder-se-ia dizer do acúmulo no soma de ratos velhos, mas estas hipóteses são especulativas. Como o CGRP poderia, a princípio, modular a atividade da AChE na JNM, ou mesmo na medula espinhal, e o exercício alterou níveis de colinesterase musculares e na medula neste experimento, este resultado se mostra inesperado e inexplicável. O autor considera, portanto, que a ausência de alterações na imunorreatividade do CGRP motoneuronal nesta tese se deve à técnica utilizada, pois estudos prévios indicam fortemente a participação do CGRP nos processos aqui estudados. O bom resultado da reação no corno dorsal também reforça que a imunorreatividade encontrada no corno ventral dos mesmos cortes histológicos não foi artefactual, e que a ausência de ligadura isquiática pode ter comprometido a sensibilidade de detecção das alterações pretendida aqui. Futuramente, portanto, seria pertinente a busca por possíveis modificações utilizando-se técnicas mais sensíveis, como immunoblotting ou hibridização in situ.

No corno dorsal, CGRP está presente principalmente em terminais de axônios de aferentes primários cujos corpos estão localizados nos gânglios das raízes dorsais dos nervos espinhais, e que projetam-se às lâminas I a III do corno dorsal. Alterações na CGRP-ir no corno dorsal são freqüentes em eventos neuropáticos agudos, tais como rizotomia dorsal ou lesões isquiáticas (como ligaduras crônicas - vide Introdução). O autor interpreta a ausência de alterações de CGRP-ir induzidas pelo exercício no corno dorsal como ausência simples de influência sobre neurônios pseudounipolares e seu conteúdo sináptico em condições não neuropáticas.

Até a redação desta tese, não se encontrou descrição de redução de serotonina no corno ventral causada por treinamento resistido, e a explicação para isso é apenas especulativa. A serotonina desempenha um papel na ativação do gerador de padrão central de movimentos alternados dos membros. Durante a atividade rítmica de motoneurônios na locomoção fictícia em preparados de medula espinhal, as células de Renshaw (glicinérgicas e inibitórias) no corno ventral exibem atividade elétrica rítmica após aplicação de serotonina na solução de banho, o que pode ser bloqueado tanto por inibidores de receptores serotoninérgicos, como 5-HT_{1A}, receptores glutamatérgicos, ou diretamente inibindo os receptores colinérgicos nicotínicos (para ACh liberada por motoneurônios) na superfície das células de Renshaw [415]. A razão para uma quantidade diferente de liberação de serotonina no corno ventral pode estar relacionada, como na neurotransmissão colinérgica, a uma menor inibição

recorrente de motoneurônios pelas células de Renshaw, capacitando-os a descargas motoneuronais de alta frequência.

Além disto, faz-se necessária a crítica da técnica de Steinberg (1979). A revelação com diaminobenzidina para colorações imunoistoquímicas pode ser otimizada com diminuição do tempo de reação, o que não foi feito neste estudo. Imagens saturadas de diaminobenzidina não prejudicam a especificidade da reação do anticorpo primário, e os cortes 5-HT-ir neste estudo encontram-se consideravelmente saturados, não a ponto de comprometer a visualização de varicosidades 5-HT-ir, mas, sem dúvida, aumentando a reação de fundo. Reconhece-se que isto pode ter comprometido a sensibilidade para detecção de alterações mais sutis, o que compromete a análise. Corroborando esta hipótese, não encontrou-se diminuição geral da 5-HT-ir associada à idade nos cortes, em contraste com estudos prévios [420].

Em contraste com o corno ventral, os aumentos de serotonina no corno dorsal podem ser diretamente implicados na antinocicepção. Apesar da ausência de testes sensoriais em nosso estudo, é razoável propor que o exercício de endurance possa desempenhar um papel antinociceptivo através do aumento da liberação serotoninérgica no corno dorsal e, conseqüentemente, aumentar a analgesia opióide no corno dorsal de ratos jovens. Tais efeitos estão descritos na literatura [419], e a falta de uma resposta equivalente ao treino resistido em jovens escaladores sugere que respostas analgésicas através de liberação de serotonina no corno dorsal não estão presentes nesta forma de treinamento. A base neuronal

para esta distinção de efeitos sob diferentes modalidades de exercício é desconhecida. Um outro aspecto é que, apesar de a literatura descrever menores níveis de serotonina na medula espinhal em animais velhos, não se observou esta diferença neste estudo. Todavia, velhos corredores ou escaladores não obtiveram aumento de serotonina no corno dorsal, sugerindo que ratos velhos não se beneficiariam dos mesmos efeitos. A extrapolação deste efeito seria que, durante exercícios de endurance, idosos teriam menor propensão à ativação serotoninérgica do sistema inibitório nociceptivo endo-opiídeo e, portanto, à analgesia opiídeo promovida pelo exercício físico de endurance.

6. CONCLUSÕES - Primeira Parte

2.1) Os treinamentos aqui utilizados em ratos, de endurance e resistido, podem ser aplicados à idade de 24-25 meses.

2.2) Os efeitos dos treinamentos produzem resultados distintos nos músculos sóleo e gastrocnêmio. A hipertrofia foi observada no gastrocnêmio, mas não no sóleo.

2.3) Ambos treinamentos melhoram a atrofia de fibras associada à idade do tríceps sural.

2.4) Ambos treinamentos diminuem de forma semelhante a atividade colinesterásica no tríceps sural, enquanto aumentam a reação histoquímica para acetilcolinesterase no corno ventral da medula espinhal. Modificações adicionais ocorreram tanto no cornos ventral e dorsal, porém de significado incerto.

2.5) A astrocitose, medida através de contagens de astrócitos GFAP-ir na medula espinhal, se modificou, principalmente no corno ventral. Tais modificações ocorrem em ambas idades com os treinamentos, porém em direções opostas. Nos jovens, aumentou com os treinos. Nos velhos, observou-se diminuição da astrocitose.

2.6) Apesar de confirmadas diferenças de imunorreatividade para o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina na medula espinhal nos motoneurônios de ratos em diferentes idades, não se observou modificações nos grupos treinados, em nenhuma idade, com a técnica utilizada.

2.7) Foi observada diminuição de serotonina no corno ventral da medula espinhal de jovens com o treinamento resistido. O significado desta alteração é desconhecido. Apenas os jovens treinados em endurance obtiveram aumento de serotonina no corno dorsal, o que pode significar melhor potencial para analgesia induzida pelo exercício de endurance nesta faixa etária.

7. PERSPECTIVAS - Primeira Parte

2.1) Comparar o treinamento resistido aqui, quanto aos achados musculares utilizado em ratos velhos, com outro protocolo resistido, que seja prescrito de forma proporcional segundo um teste de repetição máxima.

2.2) Investigar a contribuição de diferentes isoformas de acetilcolinesterase no tríceps sural nos treinos aqui utilizados.

2.3) Investigar a acetilcolinesterase na medula espinhal sob diferentes treinos utilizando técnicas mais específicas, como de hibridização in situ, que poderiam confirmar as diferenças aqui encontradas, e avaliar diretamente a síntese neuronal da enzima. Complementar estes estudos avaliando também a butirilcolinesterase.

2.4) Repetir os protocolos de exercício aqui utilizados, em ratos jovens, com ligadura tardia do isquiático, para verificar os níveis de CGRP nos motoneurônios da medula espinhal.

2.5) Complementar os protocolos de exercício aqui utilizados, em ratos jovens, para imunorreatividade da serotonina no corno dorsal, e confirmar a ausência de aumento no corno dorsal com testes funcionais de sensibilidade.

2.6) Avaliar, especificamente, as oscilações de população astrocítica em ratos velhos, utilizando o protocolo de exercício de endurance, em paralelo a marcadores microgliais.

SEGUNDA PARTE

Ambos Treinamentos Resistido e de Endurance em ratos velhos são capazes de diminuir GFAP hipocampal

Ambos Treinamentos Resistido e de Endurance em ratos velhos são capazes de diminuir GFAP hipocampal

Resumo

Evidências crescentes mostram que a atividade física pode melhorar o processamento de memória do hipocampo ao longo da vida. Para investigar se diferentes modalidades de exercício possuem efeitos distintos sobre a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) de astrócitos no hipocampo em diferentes idades, ratos Wistar machos adultos jovens (6 meses) e velhos (24-25 meses) foram submetidos a dois paradigmas de exercício, o treino de endurance (corrida em esteira ergométrica) e treino resistido (escalada em grade com cargas crescentes) durante 6 semanas, e comparados a controles sedentários velhos e jovens. Análise de imagens semiquantitativa de imunistoquímica para GFAP e a área total ocupada por células GFAP-ir foram determinadas usando-se o programa ImageJ (NIH). Dados foram analisados usando-se ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey. Os ratos velhos mostraram uma marcação imunistoquímica elevada de GFAP e áreas totais ocupadas por astrócitos, quando comparados aos adultos jovens sedentários ou exercitados (regiões do giro denteado, CA3 e CA1). Os exercícios de endurance ou resistido não tiveram efeito sobre a expressão de GFAP ou áreas totais astrocíticas em ratos jovens exercitados comparados aos ratos jovens sedentários. Em ratos velhos, no entanto, tanto o treino de endurance quanto o treino resistido diminuíram a expressão de GFAP aos níveis de ratos adultos jovens sedentários ou exercitados, em todas as regiões hipocampais

estudadas. Estes dados sugerem que tanto o exercício de corrida quanto o exercício resistido crônicos podem reverter os níveis aumentados de GFAP no hipocampo dorsal de ratos velhos sedentários.

Palavras-chave: envelhecimento, hipocampo, exercício, treino resistido, endurance, astrócitos.

Abstract

There is increasing evidence that physical exercise can improve hippocampal memory processing throughout life. In order to investigate whether different exercise modalities may have distinct effects on the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the hippocampus in different ages, young adult (6 months) and aged Wistar rats (24-25 months) were assigned for two exercise paradigms, endurance training (treadmill running) and resistance training (grid climbing with increasing weights) during 6 weeks, and compared to sedentary young or aged controls. Semiquantitative image analysis of GFAP immunohistochemistry and total area occupied by GFAP-labeled cells were determined using NIH ImageJ Software. Data were analysed using one-way ANOVA and Tukey post hoc. The sedentary aged rats displayed elevated GFAP immunostaining and total area occupied by astrocytes when compared to the young-adult sedentary or exercised rats in all dorsal hippocampal examined regions (dentate gyrus, CA3 and CA1). Neither endurance nor resistance exercises had a significant effect on GFAP expression or total astrocytic areas in young rats

compared to young sedentary controls. In aged rats, however, both endurance and resistance training paradigms decreased the GFAP expression to the sedentary or exercised young-adult levels in all studied hippocampal regions. These data suggest that either chronic running or strength exercises may reverse increased levels of GFAP in the dorsal hippocampus of sedentary aged rats.

Key words: aging, hippocampus, exercise, resistance training, endurance, astrocytes.

1. Introdução

Como já foi mencionado na primeira parte desta tese, o encéfalo de mamíferos é caracterizado por uma redução no número de neurônios e por aumento e hipertrofia da população astrocítica [229-235]. No hipocampo de animais velhos, tanto a neurogênese quanto a sinaptogênese estão reduzidos, concomitantes à piora da habilidade de aprender novas tarefas. A astrocitose reativa é caracterizada por aumentos nas áreas e perímetros celulares e por processos celulares espessados, que são encontrados junto a sinapses atípicas ou a terminais em degeneração. Isto pode representar um estado contínuo de perda de sinapses sem adequada reposição [236]. Aumentos na proteína ácida fibrilar glial (GFAP) também ocorrem na maior parte das regiões do encéfalo, principalmente hipocampo, estriado e nos tratos de fibras mielinizadas. Isto pode ser devido tanto ao aumento da transcrição de RNAm quanto à diminuição da degradação de GFAP [237, 438, 240, 243]. No hipocampo envelhecido, maiores níveis de GFAP correlacionam-se positivamente com prejuízos cognitivos e de aprendizado [244].

Há evidências crescentes de que o exercício de corrida, além de seus bens estudados benefícios cardiovasculares, pode melhorar o processamento de memória hipocampal e estimular a neurogênese ao longo da vida. Apesar das bases anatômicas para este efeito serem ainda especulativas, elas podem incluir aumentos induzidos pelo exercício de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) tanto no sangue quanto no encéfalo, bem como aumentos nos níveis de neurotrofinas no hipocampo [439-442]. Por outro lado, o treino resistido, na forma

de movimento com cargas, é considerado a principal abordagem terapêutica para o tratamento e reversão da sarcopenia [436]. O treino de endurance tem pouco ou nenhum efeito sobre a prevenção ou reversão da sarcopenia, mas, curiosamente, alguns estudos com humanos têm demonstrado que o treinamento resistido pode ter efeitos positivos sobre os desempenhos tanto locomotores quanto cognitivos em pacientes idosos, incluindo a melhoria da memória [443-445]. Até o momento, não há dados demonstrando se o treino resistido possuiria efeitos similares nos circuitos hipocampais do encéfalo de ratos velhos.

2. OBJETIVO: Para investigar se distintas modalidades de treinamento possuem efeitos distintos sobre o marcador de astrócitos GFAP no hipocampo de ratos velhos, os encéfalos dos animais descritos na primeira parte desta tese foram coletados, para análise de imagens semiquantitativa do hipocampo dorsal.

3. Materiais e Métodos

3.1 Imunoistoquímica

Após anestesia e perfusão transcardíaca com salina heparinizada e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.4), os encéfalos foram removidos e deixados na mesma solução fixadora (etapa de pós-fixação), em temperatura ambiente, por 4h. Os encéfalos foram então crioprotetidos imergindo-os em sacarose 30% em tampão fosfato a 4 °C. Secções em criostato (50 µm - Leitz, Alemanha) foram então tratadas em técnica de flutuação livre (free-

floating) com metanol 10% e H₂O₂ por 30 min. As secções foram então pré-incubadas em albumina sérica bovina (BSA - Sigma, EUA) 2% em PBS contendo Triton X-100 0,3% por 30 min e incubadas com soro policlonal de coelho anti-GFAP (Sigma, EUA) diluído 1:200 em 2% BSA em PBS–Triton X-100 por 48 h a 4 °C. Após várias lavagens, os cortes foram incubados com anticorpo IgG de coelho anti-coelho conjugado com PAP (Sigma, USA), diluído 1:50 em PBS a temperatura ambiente, por 2 h. As reações imunistoquímicas foram então reveladas incubando-se os cortes em meio contendo 3,3-diaminobenzidina 0,06% (DAB - Sigma, EUA) dissolvido em PBS por 10 min, e então, à mesma solução com os cortes foi adicionado 1 µM de H₂O₂ 3% por mL de meio com DAB por 10 min. Finalizando, os cortes foram lavados com PBS, montados em lâminas gelatinizadas, desidratados com etanol, clarificados com xilol e cobertos com Entellan e lamínulas, incluindo os controles de reação imunistoquímica (sem adição do anticorpo primário).

3.2 Análise de imagens

De cada rato, 10 imagens em formato TIFF (cinco de cada hemisfério; magnificação de 100x) de cada uma das sete regiões do hipocampo dorsal (hilo do giro dentado, zona subgranular, camada molecular do giro dentado, lacunosum moleculare, stratum radiatum, stratum oriens de CA1 and CA3 - 3.14 to -4.16 mm do bregma) foram obtidas. Imagens em cores RGB (24 bit) (640x480 pixels) foram convertidas a escala de cinza to 8-bit. Para as capturas, todas as condições de magnificação e luz foram mantidas constantes, e o examinador

cegado quanto aos grupos. Utilizando-se o programa ImageJ, foi realizada a correção da iluminação desigual (correção de sombra) e áreas de interesse retangulares (ADI) foram aplicadas nas imagens. As densidades ópticas para cada ADI foram medidas na forma de densidade óptica não-calibrada. Ao fim, coloração de fundo foi subtraída das medidas da densidade óptica usando os valores médios dos cortes de tecido onde o anticorpo primário foi omitido [428]. Para a zona subgranular, uma fina ADI retangular foi sobreposta à borda hilar, adjacente à lâmina superior ou inferior da camada granular do giro denteado. Para determinação da área total ocupada por astrócitos (astrócitos e seus processos), dez imagens hipocampais cinzas (8-bits, corrigidas para iluminação desigual) de cada animal foram transformadas em imagens binárias (preto-e-branco), e um valor limiar constante (threshold) foi utilizado para toda a quantificação automatizada das regiões CA1 (valores médios entre as áreas de stratum radiatum e stratum oriens), CA3 e giro denteado (hilo). Para as imagens binárias, a coloração de fundo (média de áreas sem anticorpo primário) não foi subtraída [446].

3.3 Análise Estatística

Os dados foram analisados (médias \pm erro padrão médio) estatisticamente utilizando-se ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey (nível de significância estatística $p < 0.05$), no programa Statistica.

4. Resultados

Ratos velhos sedentários apresentaram imunorreatividades aumentadas, comparados aos ratos adultos jovens sedentários ou exercitados em todas regiões do hipocampo dorsal (hilo do giro denteado, zona subgranular, camada molecular do giro denteado, lacunosum moleculare, stratum radiatum, stratum – para detalhes e valores de F, veja Tabela 1 e Figura 2). Nos ratos jovens, nem o exercício de endurance tampouco o exercício resistido tiveram efeitos significativos na expressão de GFAP comparados aos controles jovens sedentários. Nos ratos velhos, entretanto, tanto os protocolos de treinamento de endurance e resistido diminuíram a expressão de GFAP aos níveis de ratos jovens na maioria das regiões hipocampais, com pequenas variações. Diferenças significativas entre ratos velhos sedentários e ratos jovens foram encontradas na maioria das regiões, exceto entre ratos velhos sedentários e ratos jovens sedentários e jovens corredores na camada molecular. Diferenças significativas entre ratos sedentários e exercitados velhos foram encontradas na maior das regiões, exceto entre velhos sedentários e velhos corredores no hilo e na camada molecular, entre velhos sedentários e escaladores em CA3, e entre ratos velhos sedentários e velhos exercitados no stratum radiatum.

Uma maior variabilidade foi encontrada nas imagens binarizadas usadas para quantificar as áreas totais ocupadas por células GFAP-ir. Diferenças significativas entre velhos sedentários e todos os jovens, ou entre velhos sedentários e velhos exercitados, foram encontradas nas 3 regiões estudadas (hilo

do giro denteado, CA1 e CA3 - para detalhes e valores de F, veja Tabela 2 e Figura 3), exceto entre velhos sedentários e velhos escaladores em CA3.

5. Discussão

Neste estudo, observou-se que ratos velhos corredores e escaladores apresentaram diminuição da imunorreatividade de GFAP e da área total ocupada por astrócitos em graus variados nas principais áreas de cortes hipocampais. Além disto, demonstrou-se que um programa de treino resistido baseado em séries curtas de movimentos dinâmicos com cargas poderiam produzir efeitos similares àqueles atingidos por ratos submetidos à corrida, todos com livre acesso a alimentação. A redução na astrocitose relacionada à idade em ambos exercícios foi similar àquelas reduções obtidas em ratos submetidos restrição calórica ao longo da vida e ao ambiente enriquecido [447-449]. Efeitos benéficos do exercício também são relacionados a níveis séricos de IGF-1, que pode ser regulado-para-cima pelo exercício e aumentar os níveis hipocampais de BDNF. Entretanto, um estudo recente [450] demonstrou que mesmo as condições ambientais enriquecidas pela rotina de um programa de exercício podem ser responsáveis pelo aumento de neurotrofinas que medeia a neurogênese no adulto. Apesar de estudos subsequentes serem necessários para estabelecer qual paradigma poderia responder pela maior parte desses efeitos, é pertinente enfatizar que tanto o enriquecimento ambiental quanto programas de exercício têm características comuns, como a exposição a novidades e aumento da atividade. Do ponto de vista prático, é opinião do autor que tanto o exercício de endurance quanto o resistido

poderiam representar estratégias com duplos benefícios, cada uma adicionando possíveis efeitos cognitivos a diferentes desfechos sistêmicos.

Um outro aspecto remonta ao viés de desenho inerente à falta de prescrição de escalada proporcional a um TEM prévio. Como ratos de diferentes idades desempenharam o mesmo treino resistido, diferentes condições de capacidade física iniciais e durante o período de treino poderiam gerar efeitos de estresse distintos, representando um viés de confundimento, já que o estresse pode modular a neurogênese hipocampal [451] e o seu conteúdo de GFAP [452]. Por outro lado, ambos os grupos etários desempenharam as tarefas sem dificuldades maiores aparentes, o que pode significar uma menor influência do estresse como fator de confusão na análise de desfecho. Não obstante, como foi mencionado na primeira parte desta tese, num estudo subsequente em que ratos fossem submetidos a protocolos de exercício resistido proporcionais a um TEM, como o proposto por Hornberger [203] para hipertrofia do flexor longo dos dedos, poderiam dirimir estas dúvidas.

As maiores frações de áreas ocupadas por astrócitos e as bem como as reduções obtidas com os exercícios em velhos correlacionaram-se bem com os valores de densidades ópticas. Com base nas observações deste estudo, sugere-se que os efeitos nas áreas totais ocupadas por astrócitos e na imunorreatividade para GFAP podem ser tanto relacionadas a alterações de espessamento e comprimento do processo astrocítico quanto do número de astrócitos. As modalidades de densitometria óptica e análise de área de imagens binarizadas

representam uma técnica de fácil execução, dadas as possibilidades de várias etapas de análise de imagens poderem ser resumidas pelo recurso de macros, disponíveis no ImageJ, no Image ProPlus e similares. A macro permite a análise de centenas de imagens em poucos segundos, e como método inicial, permitiu verificar resultados que encontravam-se ausentes nos cortes de medula espinhal obtidos dos mesmos ratos. Entretanto, alterações dos números de astrócitos e na síntese de GFAP não podem ser descartados como responsáveis pelos resultados no hipocampo aqui obtidos. Estudos prévios e a primeira parte desta tese mostram que a astrogliose associada à idade pode ser devida, em grande extensão, a aumentos dos números na população astrocítica [234]. Além disto, uma redução da astrocitose relacionada à idade já foi descrita em ratos submetidos a condições de ambiente enriquecido [449].

A neurogênese hipocampal ocorre no giro denteado, no limite entre a camada granular e o hilo, onde neurônios são continuamente formados ao longo da vida, a partir de uma pequena subpopulação de células positivas para GFAP e doublecortin [439-442]. Neste estudo, a imunorreatividade para GFAP e as respostas induzidas pelo exercício não foram diferentes em padrão quanto às regiões hipocampais dorsais, e permanece desconhecido se o exercício resistido altera a neurogênese e o conteúdo de GFAP a partir de precursores neuronais GFAP-positivos na zona subgranular. Por outro lado, as melhoras cognitivas obtidas em pacientes idosos que realizaram programas de treinamento resistido [443-445], e os resultados aqui demonstrados, sugerem que a redução de

astrocitose relacionada à idade e as melhoras cognitivas obtidas em idosos podem estar relacionadas.

LEGENDAS

Figura 1. Imagens digitais do hipocampo dorsal (astrócitos GFAP-ir no hilo do giro denteado - 100x. Barra = 100 mm).

Figura 2. Análise semiquantitativa da intensidade (densidades ópticas) de imunorreatividade para GFAP nas regiões hipocampais e comparações post hoc. Desenho esquemático (modificado do atlas de Paxinos and Watson [27] com a forma e o tamanho relativo das áreas de interesse utilizadas para medidas de densidade óptica (SO, stratum oriens; SR, stratum radiatum; LM, stratum lacunosum moleculare; SM, camada molecular do giro denteado; HF, fissura hipocampal; SGZ, zona subgranular).

Figura 3. Áreas totais relativas (%) ocupadas por astrócitos e seus processos nas áreas hipocampais e comparações post hoc.

JS - jovens sedentários

JC - jovens corredores

JE - jovens escaladores

VS - velhos sedentários

VC - velhos corredores

VE - velhos escaladores

Significância estatística nos gráficos (média \pm erro médio padrão; *, P <0.05; **, P <0.01; ***, P < 0.001)

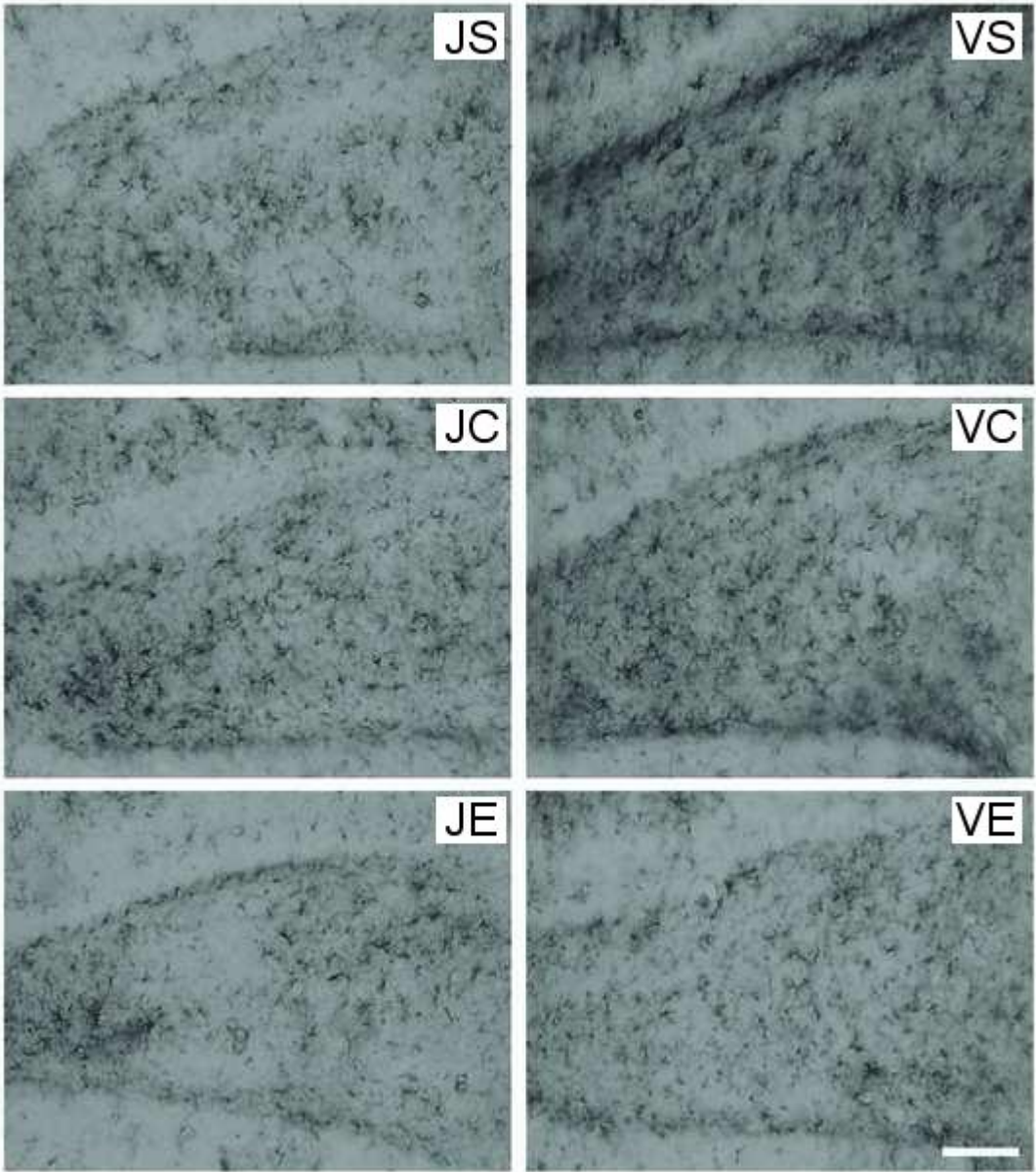
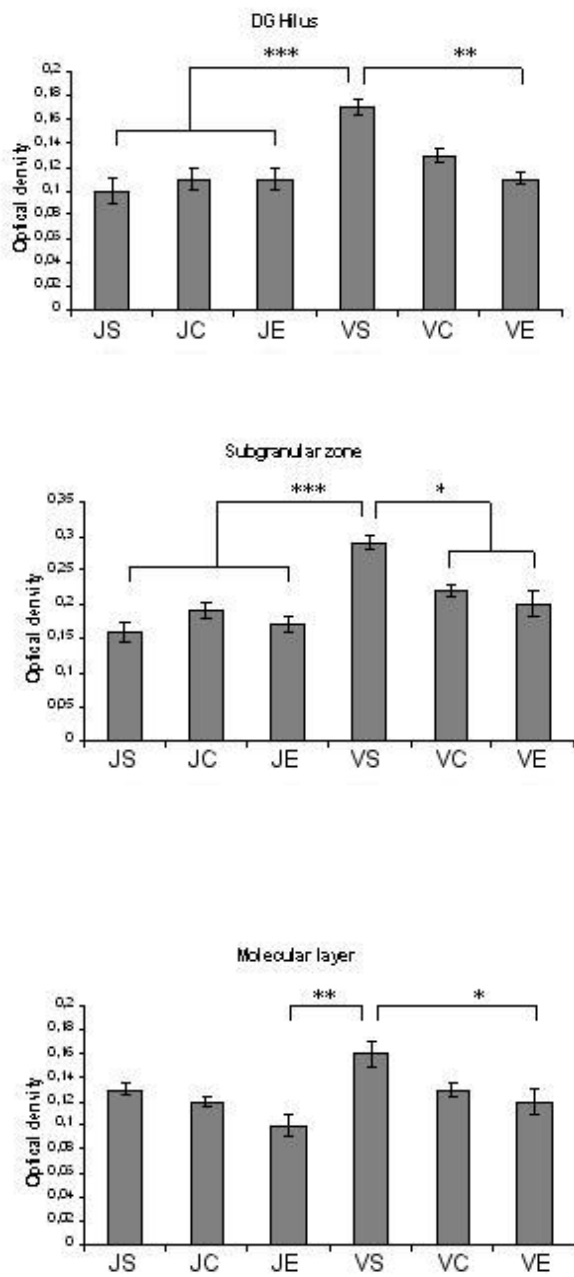
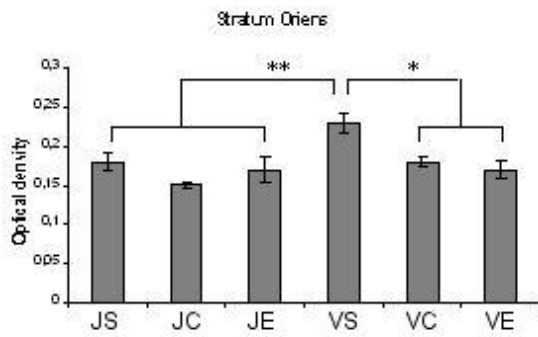
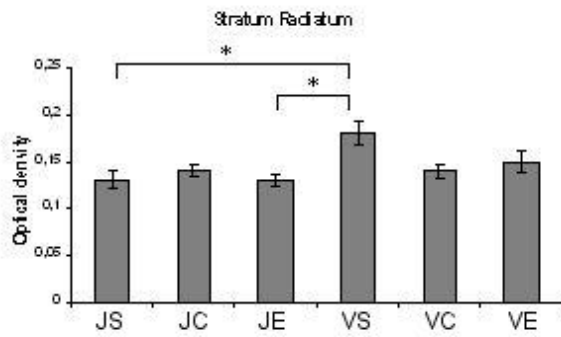
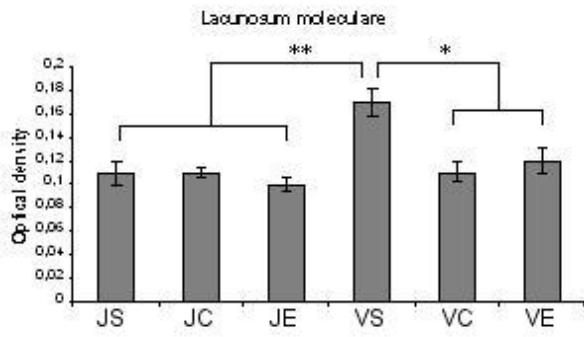


Figura 1

Figura 2





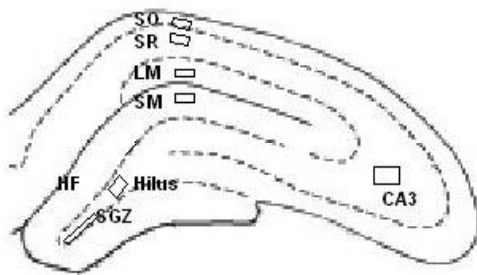
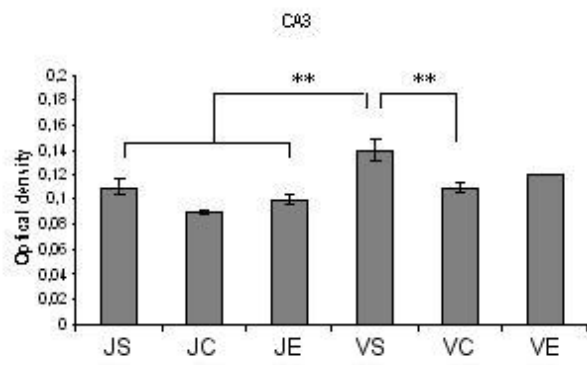
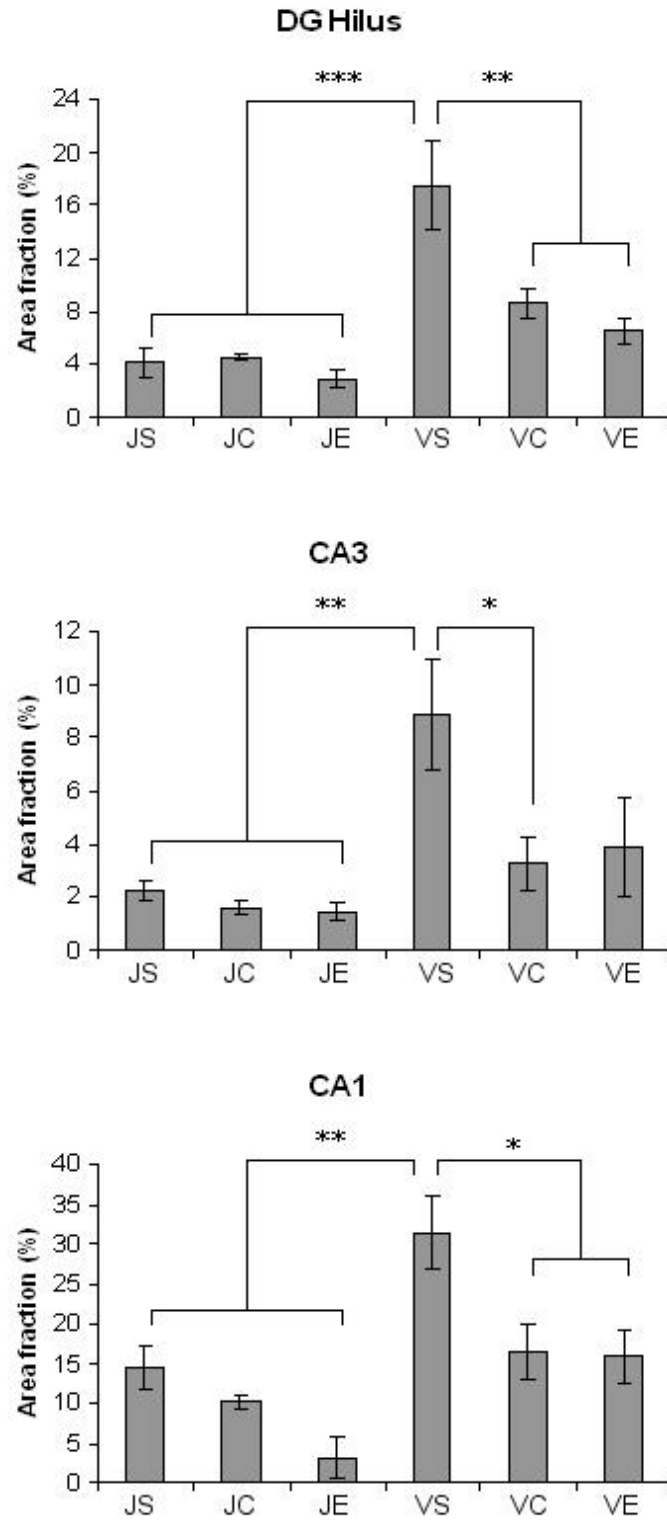


Figura 3



6. CONCLUSÕES - Segunda Parte

Os dois treinamentos distintos e graduais, de endurance e resistido, de duração de 6 semanas, foram capazes de diminuir a imunorreatividade para o GFAP nos astrócitos, a níveis semelhantes àqueles de ratos jovens, na maioria das regiões hipocampais.

7. PERSPECTIVAS - Segunda Parte

1) Avaliar, futuramente, se a diminuição de GFAP no hipocampo de animais velhos submetidos a exercícios de endurance e resistido se acompanha de aumento na neurogênese hipocampal.

2) Avaliar se estes treinamentos são capazes de aumentar os níveis de IGF sistêmico e BDNF hipocampal, sabidamente implicados na estimulação da neurogênese hipocampal.

3) Avaliar se a diminuição de GFAP no hipocampo de ratos velhos submetidos a exercícios de endurance pode ter sofrido viés por elementos inerentes aos treinamentos, como modificações metabólicas (que podem simular efeitos de restrição calórica), ambientais (que podem simular os efeitos do enriquecimento ambiental) e decorrentes da manipulação (estresse).

4) Prover base experimental plausível para os benefícios cognitivos observados em pacientes idosos submetidos a exercício resistido, complementando as análises histológicas de estudos semelhantes em modelos animais com testes funcionais específicos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Matilde Achaval, Micheli Figueiró, Érica Hermel, Jocemar Ilha, Simone Marcuzzo, Patrícia do Nascimento e Régis Mestriner, por significativas contribuições à realização deste trabalho. Financiamento: CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rosenberg I. Summary comments: epidemiological and methodological problems in determining nutritional status of older persons. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 1231–3.
2. Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr* 1997; 127: 990S–91S.
3. Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R et al. Sarcopenia. *J Lab Clin Med* 2001; 137: 231–43.
4. Sayer AA, Dennison EM, Syddall HE et al. Type 2 diabetes, muscle strength, and impaired physical function: the tip of the iceberg? *Diabetes Care* 2005; 28: 2541–2.
5. Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT et al. The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc* 2004; 52: 80–5.
6. Gale CR, Martyn CN, Cooper C et al. Grip strength, body composition, and mortality. *Int J Epidemiol* 2007; 36: 228–35.
7. Iannuzzi-Sucich M, Prestwood KM, Kenny AM. Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57: M772–7.
8. Chien MY, Huang TY, Wu YT. Prevalence of sarcopenia estimated using a bioelectrical impedance analysis prediction equation in community-dwelling elderly people in Taiwan. *J Am Geriatr Soc* 2008; 56: 1710–5.
9. Paddon-Jones D, Short KR, Campbell WW et al. Role of dietary protein in the sarcopenia of aging. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1562S–6S.
10. Sayer AA, Syddall H, Martin H et al. The developmental origins of sarcopenia. *J Nutr Health Aging* 2008; 12: 427–32.
11. Thompson DD. Aging and sarcopenia. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007; 7: 344–5.
12. Cawthon PM, Marshall LM, Michael Y et al. Frailty in older men: prevalence, progression, and relationship with mortality. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55: 1216–23.

13. Laurentani F, Russo C, Bandinelli S et al. Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1851–60.
14. Rolland Y, Czerwinski S, Abellan Van Kan G et al. Sarcopenia: its assessment, etiology, pathogenesis, consequences and future perspectives. *J Nutr Health Aging* 2008; 12: 433–50.
15. Topinkova E. Aging, disability and frailty. *Ann Nutr Metab* 2008; 526–11.
16. Hartman MJ, Fields DA, Byrne NM et al. Resistance training improves metabolic economy during functional tasks in older adults. *J Strength Cond Res* 2007; 21: 91–5.
17. Walston J, Hadley EC, Ferruci L, Guralnik JM, Newman AB, Studenski SA et al. Research agenda for frailty in older adults: toward a better understanding of physiology and etiology: summary from the American Geriatrics Society/National Institute on Aging Research Conference on Frailty in Older Adults. *J Am Geriatr Soc* 2006;54(6):991-1001.
18. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinková E, Vandewoude M, Zamboni M. European Working Group on Sarcopenia in Older People. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 2010; 39(4):412-23.
19. World Health Organization. Ageing and life course 2009. Disponível em <http://www.who.int/ageing/en/>
20. Forbes GB. Longitudinal changes in adult fat-free mass: influence of body weight. *Am J Clin Nutr* 1999;70(6):1025–1031.
21. Goodpaster BH, Park SW, Harris TB et al. The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: The health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61: 1059–64.
22. Hughes VA, Roubenoff R, Wood M et al. Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 475–82.

23. Song MY, Ruts E, Kim J et al. Sarcopenia and increased adipose tissue infiltration of muscle in elderly African American women. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 874–80.
24. Hughes VA, Frontera WR, Roubenoff R, Evans WJ, Singh MA. Longitudinal changes in body composition in older men and women: role of body weight change and physical activity. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(2):473–481.
25. Gallagher D, Ruts E, Visser M, et al. Weight stability masks sarcopenia in elderly men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279(2):E366–E375.
26. Baumgartner RN. Body composition in healthy aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 904:437–448.
27. Roubenoff R. Sarcopenia and its implications for the elderly. *Eur J Clin Nutr*. 2000; 54 Suppl 3:S40–S47.
28. Stenholm S, Harris TB, Rantanen T et al. Sarcopenic obesity: definition, cause and consequences. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 693–700.
29. Visser M, Kritchevsky SB, Goodpaster BH et al. Leg muscle mass and composition in relation to lower extremity performance in men and women aged 70 to 79: the health, aging and body composition study. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50: 897–904.
30. Bauer JM, Sieber CC. Sarcopenia and frailty: a clinician's controversial point of view. *Exp Gerontol* 2008; 43: 674–8.
31. Fried LP, Tangen CM, Walston J et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 56: M146–56.
32. Macedo C, Gazzola JM, Najas M. Síndrome da fragilidade no idoso: importância da fisioterapia. *Arq Bras Ciências da Saúde*, 33 (3):177-84.
33. Evans WJ, Morley JE, Argiles J et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* 2008; 27: 793–9.
34. Thomas DR. Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clin Nutr* 2007; 26: 389–99.
35. Morley JE, Anker SD, Evans WJ. Cachexia and aging: an update based on the Fourth International Cachexia Meeting. *J Nutr Health Aging* 2009; 13: 47–55.

36. Durham WJ, Dillon EL, Sheffield-Moore M. Inflammatory burden and amino acid metabolism in cancer cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12: 72–7.
37. Silva TAA, Frisoli Jr A, Pinheiro MM, Szejnfeld VL. Sarcopenia and aging: aspects and therapeutic options. *Rev Bras Reumatol* 2006;46(6):391-7.
38. Rosenberg I.H.; Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr.* 1997, 127: 990-1S.
39. Proctor et al. Age-related sarcopenia in humans is associated with reduced synthetic rates of specific muscle proteins. *J Nutr.* 1998; 128: 351-5S.
40. Roubenoff, R.; The pathophysiology of wasting in the elderly. *J Nutr.* 1999, 129: 256-9S.
41. Morley JE. Sarcopenia: diagnosis and treatment. *J Nutr Health Aging.* 2008;12(7):452–456.
42. Dela F, Kjaer M 2006. Resistance training, insulin sensitivity and muscle function in the elderly. *Essays in Biochem* 42 75–88.
43. Cree MG, Newcomer BR, Katsanos CS, Sheffield-Moore M, Chinkes D, Aarsland A, Urban R, Wolfe RR 2004 Intramuscular and liver triglycerides are increased in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 89 3864–3871.
44. Hagen JL, Krause DJ, Baker DJ, Fu MH, Tarnopolsky MA, Hepple RT 2004 Skeletal muscle aging in F344BN F1-hybrid rats: I. Mitochondrial dysfunction contributes to the age-associated reduction in VO₂ max. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59 1099–1110.
45. Sehl ME, Yates FE. Kinetics of human aging: I. Rates of senescence between ages 30 and 70 years in healthy people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;56(5):B198–B208.
46. van Pelt RE, Dinneno FA, Seals DR, Jones PP. Age-related decline in RMR in physically active men: relation to exercise volume and energy intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281(3): E633–E639.
47. Waters DL, Mullins PG, Qualls CR, Raj DS, Gasparovic C, Baumgartner RN. Mitochondrial function in physically active elders with sarcopenia. *Mech Ageing Dev* 2009; 130(5):315–319.

48. Bohannon RW. Comfortable and maximum walking speed of adults aged 20–79 years: reference values and determinants. *Age and Ageing* 1997; 26:15–19.
49. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 2008; 29: 535–559.
50. Perrini S, Carreira MC, Conserva A, Laviola L, Giorgino F. Metabolic implications of growth hormone therapy. *J Endocrinol Invest* 2008; 1: 79–84.
51. Moller N, Gormsen LC, Schmitz O, Lund S, Jørgensen JOL, Jessen N. Free fatty acids inhibit growth hormone/signal transducer and activator of transcription-5 signaling in human muscle: a potential feedback mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2204–2207.
52. Sotiropoulos A, Ohanna M, Kedzia C, Menon RK, Kopchick JJ, Kelly PA, Pende M. Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor 1 up-regulation. *PNAS* 2006; 103: 7315–7320.
53. Hermann M, Berger P. Hormonal changes in aging men: a therapeutic indication? *Exp Gerontol* 2001; 36: 1075–1082.
54. Bonert VS, Elashoff JD, Barnett P, Melmed S. Body mass index determines evoked growth hormone (GH) responsiveness in normal healthy male subjects: diagnostic caveat for adult GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3397–3401.
55. Corneli G, Di Somma C, Baldelli R, Rovere S, Gasco V, Croce CG, Grottoli S, Maccario M, Colao A, Lombardi G et al. The cut-off limits of the GH response to GH-releasing hormone–arginine test related to body mass index. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 257–264.
56. Franco C, Veldhuis JD, Iranmanesh A, Brandberg J, Lonn L, Andersson B, Bengtsson B, Svensson J, Johannsson G. Thigh intermuscular fat is inversely associated with spontaneous GH release in post-menopausal women with abdominal obesity. *Eur J Endocrinol* 2006; 155: 261–268.
57. Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F. The IGF-I signaling pathway. *Curr Pharm Design* 2007; 13: 663–669.

58. Ohlsson C, Mohan S, Sjogren K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, Jansson J, Svensson J. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocrine Rev* 2009; 30: 494–535.
59. Goldspink G. Loss of muscle strength during aging studied at the gene level. *Rejuvenation Res* 2007; 10: 397–405.
60. Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol* 2010; 205, 201–210.
61. Li M, Li C, Parkhouse WS. Age-related differences in the des IGF-I-mediated activation of Akt-1 and p70 S6K in mouse skeletal muscle. *Mechanisms of Ageing and Development* 2003; 124: 771–778.
62. Sell C, Ptasznik A, Chang CD, Swantek J, Cristofalo VJ, Baserga R. IGF-1 receptor levels and the proliferation of young and senescent human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Communications* 1993; 194: 259–265.
63. Mathews LS, Norstedt G, Palmiter RD. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *PNAS* 1986; 83: 9343–9347.
64. Rosenfeld RG, Hwa V. The growth hormone cascade and its role in mammalian growth. *Hormone Res* 2009; 71 (Suppl 2) 36–40.
65. Hameed M, Lange KHW, Andersen JL, Schjerling P, Kjaer M, Harridge SDR, Goldspink G. The effect of recombinant human growth hormone and resistance training on IGF-I mRNA expression in the muscles of elderly men. *J Physiol* 2004; 555: 231–240.
66. Goldspink G. Age-related loss of skeletal muscle function; impairment of gene expression. *J Musculoskeletal, Neuronal Interactions* 2004; 4: 143–147.
67. Schertzer JD, Ryall JG, Lynch GS. Systemic administration of IGF-I enhances oxidative status and reduces contraction-induced injury in skeletal muscles of mdx dystrophic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E499–E505.
68. Brugts MP, Ranke MB, Hofland LJ, van der Wanssem K, Weber K, Frystyk J, Lamberts SWJ, Janssen JAMJL. Normal values of circulating insulinlike growth

- factor-I bioactivity in the healthy population: comparison with five widely used IGF-I immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 93: 2539–2545.
69. Dennis RA, Przybyla B, Gurley C, Kortebein PM, Simpson P, Sullivan DH, Peterson CA. Aging alters gene expression of growth and remodeling factors in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. *Physiol Genomics* 2008; 32: 393–400.
 70. Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DHJ, Kull FCJ, Gonzalez-Cadavid N. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E221–E228.
 71. Marcell TJ, Harman SM, Urban RJ, Metz DD, Rodgers BD, Blackman MR. Comparison of GH, IGF-I, and testosterone with mRNA of receptors and myostatin in skeletal muscle in older men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E1159–E1164.
 72. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature Cell Biol* 2001; 3: 1009–1013.
 73. Giorgino F, Pedrini MT, Matera L, Smith RJ. Specific increase in p85alpha expression in response to dexamethasone is associated with inhibition of insulin-like growth factor-I stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity in cultured muscle cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 7455–7463.
 74. Haddad F, Adams GR. Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 2006; 100: 1188–1203.
 75. Lai KV, Gonzalez M, Poueymirou WT, Kline WO, Na E, Zlotchenko E, Stitt TN, Economides AN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9295–9304.
 76. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ et al. Akt/mTOR pathway

- is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biol* 2001; 3: 1014–1019.
77. Paddon-Jones D, Rasmussen BB. Dietary protein recommendations and the prevention of sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12(1):86–90.
 78. Rieu I, Balage M, Sornet C, et al. Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition*. 2007; 23(4):323–331.
 79. Hayes A, Cribb PJ. Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11(1):40–44.
 80. Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A, Wolfe RR. Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82(5):1065–1073
 81. Kim JS, Wilson JM, Lee SR. Dietary implications on mechanisms of sarcopenia: roles of protein, amino acids and antioxidants. *J Nutr Biochem* 2010; 21(1):1–13.
 82. Ceglia L. Vitamin D and skeletal muscle tissue and function. *Mol Aspects Med* 2008; 29(6):407–414.
 83. Need AG, Morris HA, Horowitz M, Nordin C. Effects of skin thickness, age, body fat, and sunlight on serum 25-hydroxyvitamin D. *Am J Clin Nutr* 1993; 58:882–885.
 84. Dawson-Hughes B. Serum 25-hydroxyvitamin D and functional outcomes in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(2):S537–S540.
 85. Tarnopolsky MA, Safdar A. The potential benefits of creatine and conjugated linoleic acid as adjuncts to resistance training in older adults. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008; 33(1):213–227.
 86. Brose A, Parise G, Tarnopolsky MA. Creatine supplementation enhances isometric strength and body composition improvements following strength exercise training in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003; 58(1):11–19.

87. Chrusch MJ, Chilibeck PD, Chad KE, Davison KS, Burke DG. Creatine supplementation combined with resistance training in older men. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33(12):2111–2117.
88. Gotshalk LA, Volek JS, Staron RS, Denegar CR, Hagerman FC, Kraemer WJ. Creatine supplementation improves muscular performance in older men. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34(3):537–543.
89. Feldman HA, Longcope C, Derby CA, et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(2):589–598.
90. Morley JE, Kaiser FE, Perry HM III, et al. Longitudinal changes in testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy older men. *Metabolism*. 1997; 46(4):410–413.
91. Sattler FR, Castaneda-Sceppa C, Binder EF, et al. Testosterone and growth hormone improve body composition and muscle performance in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(6):1991–2001.
92. Morley JE, Perry HM III. Androgens and women at the menopause and beyond. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003; 58(5):M409–M416.
93. Bhasin S, Buckwalter JG. Testosterone supplementation in older men: a rational idea whose time has not yet come. *J Androl* 2001; 22(5):718–731.
94. Li JJ, Sutton JC, Nirschl A, et al. Discovery of potent and muscle selective androgen receptor modulators through scaffold modifications. *J Med Chem* 2007; 50(13):3015–3025.
95. Sherlock M, Toogood AA. Aging and the growth hormone/insulin like growth factor-I axis. *Pituitary* 2007;10(2):189–203.
96. Gibney J, Wallace JD, Spinks T, Schnorr L, Ranicar A, Cuneo RC, Lockhart S, Burnand KG, Salomon F, Sonksen PH et al. The effects of 10 years of recombinant human growth hormone (GH) in adult GH-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2596–2602.

97. Svensson J, Sunnerhagen KS, Johannsson G. Five years of growth hormone replacement therapy in adults: age- and gender-related changes in isometric and isokinetic muscle strength. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2061–2069.
98. Gotherstrom G, Bengtsson B, Sunnerhagen KS, Johannsson G, Svensson J. The effects of five-year growth hormone replacement therapy on muscle strength in elderly hypopituitary patients. *Clin Endocrinol* 2005; 62:105–113.
99. Fernholm R, Bramnert M, Haˆgg E, Hilding A, Baylink DJ, Mohan S, Thore´n M. Growth hormone replacement therapy improves body composition and increases bone metabolism in elderly patients with pituitary disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4104–4112.
100. Hoffman AR, Kuntze JE, Baptista J, Baum HBA, Baumann GP, Biller BMK, Clark RV, Cook D, Inzucchi SE, Kleinberg D et al. Growth hormone (GH) replacement therapy in adult-onset gh deficiency: effects on body composition in men and women in a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 2048–2056.
101. Rolland Y, Czerwinski S, Abellan Van Kan G, et al. Sarcopenia: its assessment, etiology, pathogenesis, consequences and future perspectives. *J Nutr Health Aging*. 2008; 12(7):433–450.
102. Israili Z. Clinical pharmacokinetics of angiotensin II (AT1) receptor blockers in hypertension. *J Hum Hypertens* 2000;14 Suppl 1:S73–S86.
103. Sumukadas D, Witham MD, Struthers AD, McMurdo ME. Ace inhibitors as a therapy for sarcopenia – evidence and possible mechanisms. *J Nutr Health Aging* 2008;12(7):480–485.
104. Grady KL. Management of heart failure in older adults. *J Cardiovasc Nurs*. 2006; 21(5 Suppl 1):S10–S14.
105. Di Bari M, van de Poll-Franse LV, Onder G, et al. Antihypertensive medications and differences in muscle mass in older persons: the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* 2004; 52(6):961–966.
106. Onder G, Penninx BW, Balkrishnan R, et al. Relation between use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and muscle strength and physical

- function in older women: an observational study. *Lancet* 2002; 359(9310):926–930.
107. Strazzullo P, Lacone R, Lacoviello L, et al. Genetic variation in the renin-angiotensin system and abdominal adiposity in men: the Olivetti Prospective Heart Study. *Ann Intern Med.* 2003; 138(1):17–23.
108. Sumukadas D, Witham MD, Struthers AD, McMurdo ME. Effect of perindopril on physical function in elderly people with functional impairment: a randomized controlled trial. *CMAJ* 2007; 177(8):867–874.
109. Witham MD, Sumukadas D, McMurdo ME. ACE inhibitors for sarcopenia – as good as exercise training? *Age Ageing.* 2008; 37(4): 363–365.
110. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 2002; 277(51): 49831–49840.
111. Thomas M, Langley B, Berry C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 2000; 275(51):40235–40243.
112. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 2003;162(6):1135–1147.
113. Bross et al. Anabolic interventions for aging-associated sarcopenia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999, 84(10):3420-30 51.
114. de Vos NJ, Singh NA, Ross DA, Stavrinou TM, Orr R, Fiatarone Singh MA. Effect of power-training intensity on the contribution of force and velocity to peak power in older adults. *J Aging Phys Act* 2008; 16(4):393–407.
115. Fielding RA, LeBrasseur NK, Cuoco A, Bean J, Mizer K, Fiatarone Singh MA. High-velocity resistance training increases skeletal muscle peak power in older women. *J Am Geriatr Soc.* 2002; 50(4):655–662.
116. Misko TA, Cress ME, Slade JM, et al. Effect of strength and power training on physical function in community-dwelling older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003; 58(2):171–175.

117. Raguso CA, Kyle U, Kossovsky MP, et al. A 3-year longitudinal study on body composition changes in the elderly: role of physical exercise. *Clin Nutr* 2006;25:573–580.
118. Nelson M, Rejeski J, Blair S, et al. Physical activity and public health in older adults. Recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation* 2007;116:1094–1105.
119. Fiatarone M, Marks EC, Ryan ND, Meredith CN, Lipsitz LA, Evans WJ. High-intensity strength training in nonagenarians. Effects on skeletal muscle. *JAMA* 1990; 263(22):3029-34.
120. Tribes S, Virtuoso JS. Prescription of physical exercises for elderly. *Rev Saúde Com.* 2005: 1(12):163-72.
121. Borst SE. Interventions for sarcopenia and muscle weakness in older people. *Age Ageing* 2004; 33(6):548-55.
122. Reeves ND, Maganaris CN, Longo S, Narici MV. Differential adaptations to eccentric versus conventional resistance training in older humans. *Exp Physiol* 2009; 94(7):825–833.
123. Sayers SP. High-speed power training: a novel approach to resistance training in older men and women. A brief review and pilot study. *J Strength Cond Res* 2007; 21(2):518–526.
124. Hasten DL, Pak-Loduca J, Obert KA, Yarasheski KE. Resistance exercise acutely increases MHC and mixed muscle protein synthesis rates in 78-84 and 23-32 yr olds. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278(4):E620-6.
125. Latham NK, Bennett DA, Stretton CM, Anderson CS. Systematic review of progressive resistance strength training in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2004; 59(1):48–61.
126. Liu CJ, Latham NK. Progressive resistance strength training for improving physical function in older adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(3): CD002759.
127. Ades PA, Ballor DL, Ashikaga T, Utton JL, Nair KS. Weight training improves walking endurance in healthy elderly persons. *Ann Intern Med* 1996; 124(6):568-72.

128. Macaluso A, De Vito G. Muscle strength, power and adaptations to resistance training in older people. *Eur J Appl Physiol* 2004; 91(4): 450–472.
129. Perry MC, Carville SF, Smith IC, Rutherford OM, Newham DJ. Strength, power output and symmetry of leg muscles: effect of age and history of falling. *Eur J Appl Physiol* 2007; 100(5):553–561.
130. Vandervoort AA. Aging of the human neuromuscular system. *Muscle Nerve* 2002; 25(1):17–25.
131. Marcell TJ. Sarcopenia: causes, consequences, and preventions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003; 58(10):M911–M916.
132. Doherty TJ. Invited review: aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* 2003; 95(4):1717–1727.
133. Roubenoff R. Sarcopenia: a major modifiable cause of frailty in the elderly. *J Nutr Health Aging* 2000; 4(3):140–142.
134. Bean JF, Leveille SG, Kiely DK, Bandinelli S, Guralnik JM, Ferrucci LJ. A comparison of leg power and leg strength within the InCHIANTI study: which influences mobility more? *Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003; 58(8):728–733.
135. Foldvari M, Clark M, Laviolette LC, et al. Association of muscle power with functional status in community-dwelling elderly women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000; 55(4):M192–M199.
136. Suzuki T, Bean JF, Fielding RA. Muscle power of the ankle flexors predicts functional performance in community-dwelling older women. *J Am Geriatr Soc* 2001; 49(9):1161–1167.
137. Sayers SP. High-speed power training: a novel approach to resistance training in older men and women. A brief review and pilot study. *J Strength Cond Res* 2007; 21(2):518–526.
138. Bottaro M, Machado SN, Nogueira W, Scales R, Veloso J. Effect of high versus low-velocity resistance training on muscular fitness and functional performance in older men. *Eur J Appl Physiol* 2007; 99(3): 257–264.
139. Caserotti P, Aagaard P, Larsen JB, Puggaard L. Explosive heavy-resistance training in old and very old adults: changes in rapid muscle force, strength and power. *Scand J Med Sci Sports*. 2008; 18(6): 773–782.

140. Henwood TR, Riek S, Taaffe DR. Strength versus muscle power-specific resistance training in community-dwelling older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008; 63(1):83–91.
141. Orr R, Raymond J, Fiatarone Singh M. Efficacy of progressive resistance training on balance performance in older adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Sports Med* 2008; 38(4): 317–343.
142. Reid KF, Callahan DM, Carabello RJ, Phillips EM, Frontera WR, Fielding RA. Lower extremity power training in elderly subjects with mobility limitations: a randomized controlled trial. *Aging Clin Exp Res* 2008; 20(4):337–343.
143. Henwood TR, Taaffe DR. Improved physical performance in older adults undertaking a short-term programme of high-velocity resistance training. *Gerontology* 2005; 51(2):108–115.
144. Puthoff ML, Nielsen DH. Relationships among impairments in lower extremity strength and power, functional limitations, and disability in older adults. *Phys Ther* 2007; 87(10):1334–1347.
145. Nelson M, Rejeski J, Blair S, et al. Physical activity and public health in older adults. Recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation* 2007; 116:1094–1105.
146. Pina LL, Apstein CS, Balady GJ, Belardinelli R, Chaitman BR, Duscha BD, et al. Exercise and heart failure — a statement from the American Heart Association Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention. *Circulation* 2003; 107:1210–25.
147. Moore RL. Cellular adaptations of the heart muscle to exercise training. *Ann Med* 1998; 30:46–53.
148. Hirofumi Tanaka and Douglas R. Seals. Endurance exercise performance in Masters athletes: age-associated changes and underlying physiological mechanisms. *J Physiol* 2008; 586:55–63.
149. Joyner MJ (1993). Physiological limiting factors and distance running: influence of gender and age on record performances. In *Exercise and Sport Science Reviews*, Vol. 21, ed. Holloszy JO, pp. 103–133. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

150. Tanaka H, Seals DR. Age and gender interactions in physiological functional capacity: insight from swimming performance. *J Appl Physiol* 1997; 82:846–851.
151. Donato AJ, Tench K, Glueck DH, Seals DR, Eskurza I, Tanaka H. Declines in physiological functional capacity with age: a longitudinal study in peak swimming performance. *J Appl Physiol* 2003; 94:764–769.
152. Larsson L, Grimby G, Karlsson J (1979). Muscle strength and speed of movement in relation to age and muscle morphology. *J Appl Physiol* 1979; 46, 451–456.
153. Grimby G, Nilsson NJ, Saltin B. Cardiac output during submaximal and maximal exercise in active middle-aged athletes. *J Appl Physiol* 1966; 21:1150–1156.
154. Coggan AR, Spina RJ, Rogers MA, King DS, Brown M, Nemeth PM, Holloszy JO. Histochemical and enzymatic characteristics of skeletal muscle in master athletes. *J Appl Physiol* 1990; 68:1896–1901.
155. Trappe SW, Costill DL, Fink WJ, Pearson DR. Skeletal muscle characteristics among distance runners: a 20-yr follow-up study. *J Appl Physiol* 1995; 78:823–829.
156. Hagberg JM, Coyle EF. Physiological determinants of endurance performance as studied in competitive racewalkers. *Med Sci Sports Exerc* 1983; 15:287–289.
157. Morgan DW, Martin PE, Krahenbuhl GS. Factors affecting running economy. *Sports Med* 1989; 7:310–330.
158. Trappe SW, Costill DL, Vukovich MD, Jones J, Melham T. Aging among elite distance runners: a 22-yr longitudinal study. *J Appl Physiol* 1996; 80:285–290.
159. Robinson S, Dill DB, Robinson RD, Tzankoff SP & Wagner JA. Physiological aging of champion runners. *J Appl Physiol* 1976; 41: 46–51.
160. Horowitz JF, Sidossis LS, Coyle EF. High efficiency of type I muscle fibers improves performance. *Int J Sports Med* 1994; 15:152–157.

161. Allen WK, Seals DR, Hurley BF, Ehsani AA, Hagberg JM. Lactate threshold and distance-running performance in young and older endurance athletes. *J Appl Physiol* 1985; 58: 1281–1284.
162. Coyle EF (1995). Integration of the physiological factors determining endurance performance ability. In *Exercise and Sport Sciences Reviews*, Vol. 23, ed. Holloszy JO, pp. 25–63. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
163. Nichols JF, Phares SL, Buono MJ. Relationship between blood lactate response to exercise and endurance performance in competitive female master cyclists. *Int J Sports Med* 1997; 18:458–463.
164. Iwaoka K, Fuchi T, Higuchi M, Kobayashi S. Blood lactate accumulation during exercise in older endurance runners. *Int J Sports Med* 1988; 9:253–256.
165. Maffulli N, Testa V, Capasso G. Anaerobic threshold determination in master endurance runners. *J Sports Med Phys Fitness* 1994; 34:242–249.
166. Evans SL, Davy KP, Stevenson ET, Seals DR. Physiological determinants of 10-km performance in highly trained female runners of different ages. *J Appl Physiol* 1995; 78:1931–1941.
167. Wiswell RA, Jaque SV, Marcell TJ, Hawkins SA, Tarpenning KM, Constantino N, Hyslop DM. Maximal aerobic power, lactate threshold, and running performance in master athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32:1165–1170.
168. Heath GW, Hagberg JM, Ehsani AA, Holloszy JO. A physiological comparison of young and older endurance athletes. *J Appl Physiol* 1981; 51:634–640.
169. Buskirk ER, Hodgson JL. Age and aerobic power: the rate of change in men and women. *Federation Proc* 1987; 46:1824–1829.
170. FitzGerald MD, Tanaka H, Tran ZV, Seals DR. Age-related decline in maximal aerobic capacity in regularly exercising vs sedentary females: a meta-analysis. *J Appl Physiol* 1997; 83:160–165.
171. Eskurza I, Donato AJ, Moreau KL, Seals DR, Tanaka H. Changes in maximal aerobic capacity with age in endurance-trained women: 7-year follow-up. *J Appl Physiol* 2002; 92:2303–2308.

172. Pimentel AE, Gentile CL, Tanaka H, Seals DR, Gates PE. Greater rate of decline in maximal aerobic capacity with age in endurance-trained vs. sedentary men. *J Appl Physiol* 2003; 94:2406–2413.
173. Hodgson JL, Buskirk ER. Physical fitness and age, with emphasis on cardiovascular function in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 1977; 25: 385–392.
174. Wilson TM, Tanaka H. Meta-analysis of the age-associated decline in maximal aerobic capacity in men: relation to training status. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H829–H834.
175. Fleg JL, Morrell CH, Bos AG, Brant LJ, Talbot LA, Wright JG, Lakatta EG. Accelerated longitudinal decline of aerobic capacity in healthy older adults. *Circulation* 2005; 112: 674–682.
176. Zimmerman SD, McCormick RJ, Vadlamudi RK, Thomas DP. Age and training alter collagen characteristics in fast and slow-twitch rat limb muscle. *J Appl Physiol* 1993; 75:1670–1674.
177. Marcell TJ, Hawkins SA, Tarpenning KM, Hyslop DM, Wiswell RA. Longitudinal analysis of lactate threshold in male and female master athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35:810–817.
178. Rivera AM, Pels AE, Sady SP, Sady MA, Cullinane EM, Thompson PD. Physiological factors associated with the lower maximal oxygen consumption of master runners. *J Appl Physiol* 1989; 66:949–954.
179. Ogawa T, Spina RJ, Martin WH III, Kohrt WM, Schechtman KB, Holloszy JO, Ehsani AA. Effects of aging, sex, and physical training on cardiovascular responses to exercise. *Circulation* 1992; 86, 494–503.
180. Chen CH, Nakayama M, Talbot M, Nevo E, Fetters B, Gerstenblith G, Becker LC, Kass DA. Verapamil acutely reduces ventricular-vascular stiffening and improves aerobic exercise performance in elderly individuals. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:1602–1609
181. Lord SR, Sherrington C, Menz HB. Falls in older people: risk factors and strategies for prevention. United Kingdom: Cambridge University; 2001.
182. Judge JO, Underwood M, Gennosa T. Exercise to improve gait velocity in older persons. *Arch Phys Med Rehabil* 1993;74(4):400-6.

183.WATERS

- 184.Staron RS. Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Can J Appl Physiol* 1997 ;22:307–327.
- 185.Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol*1997 ;170:143–223.
- 186.McComas AJ. *Skeletal Muscle: Form and Function*. Champaign, Ill: Human Kinetics,1996.
- 187.Ventura-Clapier R, Mettauer B, Bigard X. Beneficial effects of endurance training on cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure. *Cardiovasc Res* 2007; 73:10–18.
- 188.Holloszy JO, Booth FW. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol* 1976; 38:273–91.
- 189.Dyck DJ, Glatz PJ, Keizer GH, Kiens B, Liu S, Richter EA, et al. Functional differences in lipid metabolism in resting skeletal muscle of various types. *Am J Physiol* 1997; 272:E340–51.
- 190.Taylor AW, Essen B, Saltin B. Myosin ATPase in skeletal muscle of healthy men. *Acta Physiol Scand*1974; 91:568–570.
- 191.Pette D, Peuker H, Staron RS. The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiol Scand* 1999; 166:261–277.
- 192.Hamalainen N, Pette D. Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibRes *Microsc Res Tech* 1995 ; 30:381–389.
- 193.Burke RE. Revisiting the notion of“motor unit types.” *Prog Brain Res* 1999; 123:167–175.
- 194.Burke RE, Levine PN, Zajac FE III. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* 1971; 174:709–712.
- 195.Gillespie MJ, Gordon T, Murphy PR. Motor units and histochemistry in rat lateral gastrocnemius and soleus muscles: evidence for dissociation of physiological and histochemical properties after reinnervation. *J Neurophysiol* 1987; 57(4):921-37.

196. Burke RE. Motor unit types of cat triceps surae muscle. *J Physiol* 1967; 193:141–160.
197. Sieck GC, Prakash YS. Morphological adaptations of neuromuscular junctions depend on fiber type. *Can J Appl Physiol* 1997; 22:197–230.
198. Grossman EJ, Roy RR, Talmadge RJ, et al. Effects of inactivity on myosin heavy chain composition and size of rat soleus fibers. *Muscle Nerve* 1998; 21:375–389.
199. Ricoy JR, Encinas AR, Cabello A, et al. Histochemical study of the vastus lateralis muscle fibre types of athletes. *J Physiol Biochem* 1998; 54:41–47.
200. Roy RR, Talmadge RJ, Hodgson JA, et al. Differential response of fast hindlimb extensor and flexor muscles to exercise in adult spinalized cats. *Muscle Nerve* 1999; 22:230–241.
201. Eken T, Gundersen K. Electrical stimulation resembling normal motor-unit activity: effects on denervated fast and slow rat muscles. *J Physiol* 1988; 402:651–669.
202. Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FAMS. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp Biochem Physiol Part A* 2005; 140:409–413.
203. Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression in Resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34: 364-80.
204. Hornberger TA, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol* 29(1):16-31.
205. Deschenes MR, Maresh CM, Armstrong LE, Covault J, Kraemer WJ, Crivello. Endurance and Resistance exercise induce muscle fiber type specific responses in androgen binding capacity. *J Steroid Biochem* 1994; 50 (3/4):175-9.
206. Herbert M, Roy R, Edgerton V. Influences of one-week hindlimb suspension and intermittent high load exercise on rat muscle. *Expl Neurol* 1988; 102:190-8.

207. Yarasheski K, Lemon P, Gilloteaux J. Effect of heavy-resistance exercise training on muscle fiber composition in young rats. *J Appl Physiol* 1990; 69:434-7.
208. Thomas DP, McCormick KM, Jenkins RR. Effects of beta-adrenergic blockade on training-induced structural adaptations in rat left ventricle. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1988; 57 (6) 671– 676.
209. Musch TI, Moore RL, Smaldone PG, Riedy M, Zelis R. Cardiac adaptations to endurance training in rats with a chronic myocardial infarction. *J Appl Physiol* 1989; 66 (2), 712– 719.
210. Buckenmeyer PJ, Goldfarb AH, Partilla JS, Pineyro MA, Dax EM. Endurance training, not acute exercise, differentially alters betareceptors and cyclase in skeletal fiber types. *Am J Physiol* 1990; 258 (1 (Pt 1)), E71– E77.
211. Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 54 (1): 162– 174.
212. Ji LL, Lennon DLF, Kochan RG, Nagle FJ, Lardy HA. Enzymatic adaptation to physical training under h-blockade in the rat *J Clin Invest* 1986; 78, 771–778.
213. Kainulainen H, Komulainen J, 1989. Effects of training on regional substrate oxidation in the hearts of ageing rats. *Gerontology* 35: 289– 296.
214. Paulson DJ, Mathews R, Bowman J, Zhao J. Metabolic effects of treadmill exercise on the diabetic heart. *J Appl Physiol* 1992; 73 (1): 265– 271.
215. Arida RM, Vieira AJ, Cavalheiro EA, 1998. Effect of physical exercise on kindling development. *Epilepsy Res* 30 (2): 127– 132.
216. Hall JL, Sexton WL, Stanley WC 1995. Exercise training attenuates the reduction in myocardial GLUT-4 in diabetic rats. *J Appl Physiol* 78 (1), 76– 81.
217. Bosquet L, Leger L, Legros P, 2002. Methods to determine aerobic endurance. *Sports Med.* 32 (11): 675– 700.
218. Wasserman K, Beaver WL, Whipp BJ, 1990. Gas exchange theory and the lactic acidosis (anaerobic) threshold. *Circulation* 81 (Suppl. II), II-14 –II-30.

219. Smekal G, Von Duvillard SP, Pokan R, Tschan H, Baron R, Hofmann P, Wonisch M, Bachi N, 2003. Changes in blood lactate and respiratory gas exchange measures in sports with discontinuous load profiles. *Eur J Appl Physiol* 89: 489– 495.
220. Simoes HG, Grubert Campbell CS, Kokubun E, Denadai BS, Baldissera V, 1999. Blood glucose responses in humans mirror lactate responses for individual anaerobic threshold and for lactate minimum in track tests. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80 (1): 34– 40.
221. Hughson KL, Green HJ, Sharratt MT, 1995. Gas exchange, blood lactate, and plasma catecholamines during incremental exercise in hypoxia and normoxia. *J Appl Physiol* 79 (4): 1134– 1141.
222. Langfort J, Zarzeczny R, Pilis W, Kaciuba-Uscitko H, Nazar K, Porta S, 1996. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. *Comp Biochem Physiol A* 114 (1): 51–55.
223. Novak P, Zacharova G, Soukup T. Individual, Age and Sex Differences in Fiber Type Composition of Slow and Fast Muscles of Adult Lewis Rats: Comparison With Other Rat Strains. *Physiol Res* 59: 783-801, 2010.
224. Ariano MA, Armstrong RB, Edgerton VR. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J Histochem Cytochem* 1973; 21: 51-55.
225. Armstrong RB, Phelps RO.: Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* 1984; 171: 259-272, 1984.
226. Chamberlain S, Lewis DM: Contractile characteristics and innervation ratio of rat soleus motor units. *J Physiol Lond* 1989; 412: 1-21.
227. Eng CM, Smallwood LH, Rainiero MP, Lahey M, Ward SR, Lieber RL. Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. *J Exp Biol* 211: 2336-2345.
228. Staron R, Kraemer W, Hikida R, Fry A, Murray J, Campos G. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem. Cell Biol* 1999; 111: 117-123.

229. Björklund H, Eriksdotter-Nilsson M, Dahl D, Rose G, Hoffer B, Olson L. Image analysis of GFA-positive astrocytes from adolescence to senescence. *Exp Brain Res* 1985; 58: 163-70.
230. Geinisman Y, Bondareff W, Dodge JT. Hypertrophy of astroglial processes in the dentate gyrus of the senescent rat. *Am J Anat* 1978; 153:537-43.
231. Landfield PW, Rose G, Sandles L, Wohlstadter TC, Lynch G. Patterns of astroglial hypertrophy and neuronal degeneration in the hippocampus of ages, memory-deficient rats, *J Gerontol* 1977; 32: 3-12.
232. Lindsey JD, Landfield PW, Lynch G. Early onset and topographical distribution of hypertrophied astrocytes in hippocampus of aging rats: a quantitative study, *J Gerontol* 1979; 34: 661-71.
233. Mouton PR, Long JM, Lei DL, Howard V, Jucker M, Calhoun ME, Ingram DK. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res* 2002; 956: 30-5.
234. Pilegaard K, Ladefoged O. Total number of astrocytes in the molecular layer of the dentate gyrus of rats at different ages, *Anal. Quant. Cytol Histol* 1996; 18: 279-85.
235. Sloane JA, Hollander W, Rosene DL, Moss MB, Kemper T, Abraham CR. Astrocytic hypertrophy and altered GFAP degradation with age in subcortical white matter of the rhesus monkey. *Brain Res* 2000; 862: 1-10.
236. Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain, *Science* 1997; 278: 412-9.
237. Goss JR, Finch CE, Morgan DG. Age-related changes in glial fibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain. *NeuroBiol Aging* 1991; 12:165–170.
238. Kullberg S, Aldskogius H, Ulfhake B. Microglial activation, emergence of ED1-expressing cells and clusterin upregulation in the aging rat CNS, with special reference to the spinal cord. *Brain Res* 2001; 899: 169–186.
239. Linnemann D, Skarsfelt T. Regional changes in expression of NCAM, GFAP, and S100 in aging rat brain. *NeuroBiol Aging* 1994; 15:651–655.
240. N.R. Nichols, J.R. Day, N.J Laping, S.A. Johnson, C.E. Finch, GFAP mRNA increases with age in rat and human brain, *Neurobiol Aging* 14 1993.421–429.

241. O'Callaghan JP, Miller DB. The concentration of glial fibrillary acidic protein increases with age in the mouse and rat brain. *NeuroBiol Aging* 1991; 12:171–174.
242. Wagner AP, Reck G, Platt D. Evidence that Vq fibronectin, GFAP and S100b mRNAs are increased in the hippocampus of aged rats, *Exp. Gerontol* 1993; 28:135–143.
243. Kohama SG, Goss JR, Finch CE, McNeill TH. Increases of glial fibrillary acidic protein in the aging female mouse brain. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 59-67.
244. Sugaya K, Chouinard M, Greene R, Robbins M, Personett D, Kent C, Gallagher M, McKinney M. Molecular indices of neuronal and glial plasticity in the hippocampal formation in a rodent model of age-induced spatial learning impairment. *J Neurosci* 1996; 16: 3427-43.
245. Shimada A, Kuwamura M, Awakura T, Umemura T, Itakura C. An immunohistochemical and ultrastructural study on age-related astrocytic gliosis in the central nervous system of dogs. *J Vet Med Sci* 1992; 54(1):29-36.
246. Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res* 1991; 565:1–7.
247. Gilmore SA, Sims YJ, Leiting JE. Astrocytic reactions in spinal gray matter following sciatic axotomy. *Glia* 1990; 3:342–349.
248. Aldskogius H, Kozlova EN. Central neuron-glial and glial-glial interactions following axon injury. *Prog Neurobiol* 1998; 55:1–26
249. Eriksson NP, Persson JK, Aldskogius H, Svensson M. A quantitative analysis of the astroglial cell reaction in primary sensory termination areas following sciatic nerve injury and treatment with nerve growth factor. *Exp Brain Res* 1997; 114:393–404.
250. Gilmore SA, Kane CJM. Microglia, but not astrocytes, react to sciatic nerve injury in aging rats. *Brain Res* 1998; 806:113–116.
251. S.W. Scheff, L.S. Bernardo, C.W. Cotman, Decline in reactive fiber growth in the dentate gyrus of aged rats compared to young adult rats following entorhinal cortex removal, *Brain Res* 1980; 199: 21–38.

252. J.R. Goss, D.G. Morgan, Enhanced glial fibrillary acidic protein RNA response to fornix transection in aged mice, *J Neurochem.* 1995; 64:1351–1360.
253. Cruz-Sánchez FF, Moral A, Tolosa E, de Belleruche J, Rossi ML. Evaluation of neuronal loss, astrocytosis and abnormalities of cytoskeletal components of large motor neurons in the human anterior horn in aging. *J Neural Transm* 1998;105(6-7):689-701.
254. Rosenfeld et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 1983, 304(5922):129-35.
255. New et al. Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. *Nature* 1986; 323(6091):809-11.
256. Popper et al. Localization of calcitonin gene-related peptide and its receptors in a striated muscle. *Brain Res* 1989; 496(1-2):180-6.
257. Roberts et al. Coexistence of calcitonin gene-related peptide and choline acetyltransferase in eel efferent neurons. *Hear Res* 1994, 74 (1-2): 231-7.
258. Henry et al. Light microscopic localization of calcitonin gene-related peptide in the normal feline trigeminal system and following retrogasserian rhizotomy. *J Comp Neurol* 1996; 365(4):526-40.
259. Peng et al. Development of calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in relationship to the formation of neuromuscular junctions in *Xenopus* myotomal muscle. *J Comp Neurol* 1989, 290(4):533-43.
260. Villar et al. Immunoreactive calcitonin gene-related peptide, vasointestinal polypeptide, and somatostatin in developing chicken spinal cord motoneurons. *Eur J Neurosci.* 1989; 1(3):269-87.
261. Laufer et al. calcitonin gene-related peptide and cyclic AMP stimulate phosphoinositide turnover in skeletal muscle cells. Interaction between two second messenger systems. *J Biol Chem* 1989, 264(5):2683-9.
262. Fontaine et al: calcitonin gene-related peptide and muscle activity regulate Acetylcholine receptor alpha-subunit mRNA levels by distinct intracellular pathways. *J Cell Biol* 1987; 105:1337-42.

263. Mülle et al: calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured muscle cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 85:5728-32.
264. Fernandez et al: Physiological regulation of G4 AChE in fast-twitch muscle: effects of exercise and CGRP. *J Appl Physiol* 1996; 80(1):357-62.
265. Rossi et al: Localization of the calcitonin gene-related peptide receptor complex at the vertebrate neuromuscular junction and its role in regulating acetylcholinesterase expression. *J Biol Chem* 2003; 278(27):24994-5000.
266. Cortes et al. In situ hybridization studies on mRNAs for cholecystokinin, calcitonin gene-related peptide and choline acetyltransferase in the lower brain stem, spinal cord and dorsal root ganglia of rat and guinea pig with special reference to motoneurons. *J Chem Neuroanat.* 1990; 3(6):467-85.
267. Rethelyi et al. Distribution of neurons expressing calcitonin gene-related peptide mRNAs in the brain stem, spinal cord and dorsal root ganglia of rat and guinea-pig. *Neuroscience.* 1989; 29(1):225-39.
268. Newton et al. Calcitonin gene-related peptide and somatostatin immunoreactivities in the rat lumbar spinal cord: sexually dimorphic aspects. *Neuroscience.* 1990; 37(2):471-89.
269. Popper et al. Steroid regulation of calcitonin gene-related peptide mRNA expression in motoneurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus. *Brain Res Mol Brain Res* 1990; 8(2):159-66.
270. Piehl et al. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in motoneuron pools innervating different hind limb muscles in the rat. *Exp Brain Res* 1993; 96(2):291-303.
271. Forsgren et al. Calcitonin gene-related peptide expression at endplates of different fibre types in muscles in rat hind limbs. *Cell Tissue Res* 1993; 274(3):439-46.
272. Gharakhanlou et al: Increased activity in the form of endurance training increases calcitonin gene-related peptide content in lumbar motoneuron cell bodies and in sciatic nerve in the rat. *Neuroscience.* 1999; 89(4):1229-39.

- 273.Homonko et al. Downhill running preferentially increases CGRP in fast glycolytic muscle fibers. *J Appl Physiol* 2000; 89(5):1928-36.
- 274.Homonko et al. Calcitonin gene-related peptide is increased in hindlimb motoneurons after exercise. *Int J Sports Med.* 1997, 18(7):503-9.
- 275.Gonzalez-Forero et al: Correlation between CGRP immunoreactivity and firing activity in cat abducens motoneurons. *J Comp Neurol* 2002; 451(3):201-12.
- 276.McWilliam et al: Influence of peripheral targets on the expression of calcitonin gene-regulated peptide immunoreactivity in rat cranial motoneurons. *J NeuroBiol* 1995; 28(4):506-14.
- 277.Blake-Bruzzini et al. Calcitonin gene-related peptide and alpha-CGRP mRNA expression in cranial motoneurons after hypoglossal nerve injury during postnatal development. *J NeuroCytol* 1997; 26(3):163-79.
- 278.Streit et al. Rat facial motoneurons express increased levels of calcitonin gene-related peptide mRNA in response to axotomy. *J Neurosci Res* 1990; 27(3):270-5.
- 279.Tarabal et al. Regulation of motoneuronal calcitonin gene-related peptide (CGRP) during axonal growth and neuromuscular synaptic plasticity induced by botulinum toxin in rats. *Eur J Neurosci.* 1996; 8(4):829-36.
- 280.Arvidsson et al. Peripheral nerve section induces increased levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in axotomized motoneurons. *Exp Brain Res* 1990; 79(1):212-6.
- 281.Haas et al. Rat facial motoneurons express increased levels of calcitonin gene-related peptide mRNA in response to axotomy. *J Neurosci Res* 1990; 27(3):270-5.
- 282.Caldero et al. Calcitonin gene-related peptide in rat spinal cord motoneurons: subcellular distribution and changes induced by axotomy. *Neuroscience.* 1992; 48(2):449-61.
- 283.Grothe, C.; Biphasic increase of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in rat hypoglossal motoneurons after nerve transection. *Acta Histochem.* 1993; 94(1):20-4.

284. Arvidsson et al. Altered levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity of cat lumbar motoneurons after chronic spinal cord transection. *Brain Res* 1989; 489(2):387-91.
285. Melinek et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in motoneurons of the human spinal cord following injury. *J Neurotrauma*. 1994; 11(1):63-71.
286. Borke et al. Choline acetyltransferase and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in motoneurons after different types of nerve injury. *J NeuroCytol* 1993; 22(3):141-53.
287. Wang et al. Calcitonin gene-related peptide increases following axotomy of trochlear motoneurons. *Exp Neurol* 1993; 123(1):157-66.
288. Snyder et al. Quantitation of calcitonin gene-related peptide mRNA and neuronal cell death in facial motor nuclei following axotomy and 633 nm low power laser treatment. *Lasers Surg Med*. 2002; 31(3):216-22.
289. Piehl et al. Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury. *Exp Brain Res* 1998; 119(2):191-204.
290. Ramer et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in sensory and motoneurons in vivo. *Eur J Neurosci*. 2003; 18(10):2713-21.
291. Piehl et al. Fibroblast growth factors regulate calcitonin gene-related peptide mRNA expression in rat motoneurons after lesion and in culture. *Eur J Neurosci*. 1995; 1;7(8):1739-50.
292. Fernihough et al. Brain-derived neurotrophic factor mRNA levels are up-regulated in hindlimb skeletal muscle of diabetic rats: effect of denervation. *Exp Neurol* 1996; 141(2):297-303.
293. Popper et al. The role of target muscles in the expression of calcitonin gene-related peptide mRNA in the spinal nucleus of the bulbocavernosus. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;13(1-2):43-51.
294. Popper et al. Differential regulation of alpha-calcitonin gene-related peptide and preprocholecystinin messenger RNA expression in alpha-motoneurons:

- effects of testosterone and inactivity induced factors. *Neuroscience*. 1992; 51(1):87-96.
295. Forger et al. Ontogeny of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in rat lumbar motoneurons: delayed appearance and sexual dimorphism in the spinal nucleus of the bulbocavernosus. *J Comp Neurol* 1993; 330(4):514-20.
296. Wagner et al. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in spinal motoneurons of the male mouse is affected by castration and genotype. *Brain Res* 1994; 647(1):37-43.
297. Monks et al. Direct androgenic regulation of calcitonin gene-related peptide expression in motoneurons of rats with mosaic androgen insensitivity. *J Neurosci* 1999; 19(13):5597-601.
298. Marnay A, Nachmansohn D. Choline esterase in voluntary muscle. *J Physiol (Lond)* 1938; 92:37– 47.
299. Eccles JC, Katz B, Kuffler SW. Effect of eserine on neuromuscular transmission. *J Neurophysiol* 1942; 5:211–230.
300. Massoulie´ J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* 2002; 11: 130–143.
301. Pick M, Flores-Flores C, Soreq H. From brain to blood: alternative splicing evidence for the cholinergic basis of mammalian stress responses. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1018: 85–98.
302. K. Wing Leung, Heidi Q. Xie, Vicky P. Chen, Mokka K. W. Mok, Glanice K. Y. Chu, Roy C. Y. Choi and Karl W. K. Tsim. (PRiMA) of globular form acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions – contribution and expression from motor neurons. *FEBS Journal* 2009 276: 3031–3042.
303. Dvir H, Harel M, Bon S, Liu WQ, Vidal M, Garbay C, Sussman JL, Massoulie´ J, Silman I. The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix. *EMBO J* 2004; 23: 4394–4405.
304. Falasca C, Perrier N, Massoulie´ J, Bon S. Determinants of the t peptide involved in folding, degradation and secretion of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 2005; 280: 878–886.

305. Perrier AL, Massoulie J, Krejci E. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain *Neuron* 2002; 33: 275–285.
306. Sketelj J. Neural regulation of acetylcholinesterase in skeletal muscles. *BAM* 1994; 4:281–291.
307. Hall ZW. Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle. *J Neurobiol* 1973; 4:343–361.
308. Fernandez HL, Inestrosa NC, Stiles JR. Subcellular localization of acetylcholinesterase molecular forms in endplate regions of adult mammalian skeletal muscle. *Neurochem Res* 1984; 9:1211–1230.
309. Sketelj J, Brzin M. Asymmetric molecular forms of acetylcholinesterase in mammalian skeletal muscle. *J Neurosci Res* 1985;14:95–103.
310. Inestrosa NC, Parelman A. Association of acetylcholinesterase with the cell surface. *J Membr Biol* 1990; 118:1–9.
311. Rossi SG, Rotundo RL. Transient interactions between collagen-tailed acetylcholinesterase and sulfated proteoglycans prior to immobilization on the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1996; 271:1979–1987.
312. Rotundo RL, Rossi SG, Anglister L. Transplantation of quail collagen-tailed acetylcholinesterase molecules onto the frog neuromuscular synapse. *J Cell Biol* 1997; 136:367–374.
313. Lyles JM, Silman I, Barnard EA. Developmental changes in levels and forms of cholinesterases in muscles of normal and dystrophic chickens. *J Neurochem* 1979; 33: 727–738.
314. Massoulie J. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 1993; 41: 31–91.
315. Koenig J, Vigny M. Neural induction of the 16S acetylcholinesterase in muscle cell culture. *Nature* 1978; 271: 75–77.
316. De La Porte S, Vallette FM, Grassi J, Vigny M, Koenig J. Pre-synaptic or post-synaptic origin of acetylcholinesterase at neuromuscular junctions? An immunological study in heterologous nerve-muscle cultures *Dev Biol* 1986; 116: 69–77.

317. Bacou F. Acetylcholinesterase forms in fast and slow rabbit muscle. *Nature* 1982; 296: 661–664.
318. Groswald DE, Dettbarn W-D. Characterization of acetylcholinesterase molecular forms in slow and fast muscle of rat. *Neurochem Res* 1983; 8: 983–995.
319. Lai J, Jedrzejczyk J, Pizzey JA, Green D, Barnard EA. Neural control of the forms of acetylcholinesterase in slow mammalian muscles *Nature* 1986; 321:72–74.
320. Sketelj J, Črne-Finderle N, Brzin M (1992a) Influence of denervation on the molecular forms of junctional and extrajunctional acetylcholinesterase in fast and slow muscles of the rat. *Neurochem Int* 1992; 21:415–421.
321. Sketelj J, Črne-Finderle N, Dolenc I (1992b) Factors influencing acetylcholinesterase regulation in slow and fast skeletal muscles. In: *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions* (Shafferman A, Velan B, eds), pp 209–216. New York: Plenum.
322. Čresnar B, Črne-Finderle N, Breskvar K, Sketelj J. Neural regulation of muscle acetylcholinesterase is exerted on the level of its mRNA. *J Neurosci Res* 1994; 38:294–299.
323. Michel RN, Vu CQ, Tetzlaff W, Jasmin BJ. Neural regulation of acetylcholinesterase mRNAs at mammalian neuromuscular synapses. *J Cell Biol* 1994; 127:1061–1069.
324. Brzin, M, J. Sketelj, V. M. Tennyson, T. Kiauta, M. Budininkas- Schoenebeck (1981) Activity, molecular forms, and cytochemistry of cholinesterases in developing rat diaphragm. *Muscle Nerve* 1981; 4: 505-513.
325. Skau, K. A.. The acetylcholinesterase abnormality in dystrophic mice is a reflection of a maturational defect. *Brain Res* 1983; 276: 192- 194.
326. Yeakley, J. M, J. L. Janavs, C. G. Reiness. Muscle activity pattern regulates postnatal development of acetylcholinesterase molecular forms in normal mice and mice with motor endplate disease. *J Neurosci* 1987; 7: 4084-4094.

327. Skau, K. A., S. Brimijoin (1981) Abnormal distribution of skeletal muscle acetylcholinesterase molecular forms in dystrophic mice. *Exp Neurol* 1981; 74: 111-121.
328. Gisiger, V, H. R. Stephens. Asymmetric and globular forms of AChE in slow and fast muscles of 129/ReJ normal and dystrophic mice. *J Neurochem* 1983; 41: 919-929.
329. Rieger, F, M. L. Shelanski, R. L. Sidman. The multiple molecular forms of acetylcholinesterase in "motor end-plate disease" in the mouse (med and med allelic forms): Sensitivity of the 10 S form to partial or total loss of muscle activity. *Exp Neurol* 1983; 79: 299- 315.
330. Lomo, T, J. Massoulit, M. Vigny (1985) Stimulation of denervated rat soleus muscle with fast and slow activity patterns induces different expression of acetylcholinesterase molecular forms. *J Neurosci* 1985; 5: 1180-1187.
331. Muntener, M, W. Zenker (1986) Fiber type and non-endplate acetylcholinesterase in normal and experimentally altered muscles *Anat. Embryol* 1986; 173: 377-383.
332. Fernandez, H. L, J. A. Donoso (1988) Exercise selectively increases G, AChE activity in fast-twitch muscle. *J Appl Physiol* 65: 2245-2252.
333. Gisiger, V, H. R. Stephens (1988) Localization of the pool of G, acetylcholinesterase characterizing fast muscles and its alteration in murine muscular dystrophy. *J Neurosci. Res* 19: 62-78.
334. Pette D, Staron RS (1997) Mammalian skeletal muscle fiber type transitions *Int Rev Cytol* 170:143–223.
335. Pette D, Vrbova` G (1992) Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 120:115–220.
336. Westgaard RH, Lømo T (1988) Control of contractile properties within adaptive ranges by patterns of impulse activity in the rat. *J Neurosci* 8:4415– 4426.
337. Termin A, Staron RS, Pette D (1989) Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulations of rat fast hind limb muscles: a single fiber study. *Eur J Biochem* 186:749 –754.

338. Pette D, Vrbova` G (1994) Transformation of skeletal muscle induced by electrical stimulation. *Ann Card Surg* 7:14 –21.
339. Sketelj J, Leisner E, Gohlsch B, Škorjanc D, Pette D (1997) Specific impulse patterns regulate acetylcholinesterase activity in skeletal muscles of rats and rabbits. *J Neurosci Res* 47:49 –57.
340. Crockett, J. L, V. R. Edgerton, S. R. Max, R. J. Barnard (1976) The neuromuscular junction in response to endurance training. *Exp Neurol* 51: 207-215.
341. Gardiner, P. F, M. Lapointe, D. Gravel (1982a) Exercise effects on recovery of muscle acetylcholinesterase from reduced neuromuscular activity. *Muscle Nerve* 5: 363-368.
342. Snyder, D. H, D. H. Rifenberick, S. R. Max (1973) Effects of neuromuscular activity on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase *Exp Neurol* 40: 36-42.
343. Butler, I. J, D. B. Drachman, A. M. Goldberg (1978) The effect of disuse on cholinergic enzymes. *J Physiol (Lond.)* 274: 593-600.
344. Gupta, R. C, K. E. Misulis, W. D. Dettbam (1985) Changes in the cholinergic system of rat sciatic nerve and skeletal muscle following suspension-induced disuse. *Exp Neurol* 89: 622-633.
345. Guth. L.. W. C. Brown. J. D. Ziemnowicz (1966) Changes in cholinesterase activity of rat muscle during growth and hypertrophy. *Am J Physiol* 211: 1113-1116.
346. Granbacher, N. (1971) Relation between the size of muscle fibers, motor endplates and nerve fibers during hypertrophy and atrophy. *Z Anat. Entwickl-Gesch.* 135: 76-87.
347. Bernard J. Jasmin Victor Gisiger Regulation by Exercise of the Pool of G, Acetylcholinesterase Characterizing Fast Muscles: Opposite Effect of Running Training in Antagonist Muscles. *The J Neuroscience*, May 1990, 10(5): 1444-1454.
348. Chatonnet A, Lockridge O (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 260:625–634.

349. Taylor P, Radic Z (1994) The cholinesterases: from genes to proteins *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:281–320.
350. Darvesh S, Hopkins DA, Geula C (2003) Neurobiology of butyrylcholinesterase *Nature Rev Neurosci* 4:131–138.
351. Harel M, Sussman JL, Krejci E, Bon S, Chanal P, Massoulié J, Silman I (1992) Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10827–10831.
352. Vellom DC, Radic Z, Li Y, Pickering NA, Camp S, Taylor P (1993) Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochem* 32:12–17.
353. Legay C (2000) Why so many forms of acetylcholinesterase? *Microsc Res Tech* 49:56–72.
354. Golicnik M, Fournier D, Stojan J (2001) Interaction of *Drosophila* acetylcholinesterases with D-tubocurarine: an explanation of the activation by an inhibitor. *Biochemistry* 40:1214–1219.
355. John R. Atack, Elaine K. Perry, James R. Bonham, John M. Candy, and Robert H. Perry. Molecular Forms of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Aged Human Central Nervous System. *J Neurochem.* 47, 263-277 (1986).
356. Fernandez H. L, Duell M. J, Festoff B. W. (1979) Cellular distribution of 16s acetylcholinesterase. *J. NeurocrcheFn.* 32, 58 1-585.
357. Gillberg P.-G, Aquilonius S.-M, Eckernas S.-A., Lundqvist G, Winblad B. (1982) Choline acetyltransferase and substance P-like immunoreactivity in the human spinal cord: changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 250, 394-397.
358. Massoulié J Bon S. (1982) The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu. Rev Neurosci.* 5, 57- 106.
359. Katarina Mis, Tomaz Mars, Marko Jevsek, Martina Brank, Katarina Zajc–Kreft, Zoran Grubic. Localization of mRNAs Encoding Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Rat Spinal Cord by Nonradioactive In Situ Hybridization. *The J Histochemistry, Cytochemistry* 51(12): 1633–1644, 2003.

360. Anglister L (1991) Acetylcholinesterase from the motor nerve terminal accumulates on the synaptic basal lamina of the myofiber. *J Cell Biol* 115:755–764.
361. L. Anglister, A. Etlin, E. Finkel, A.R. Durrant, A. Lev-Tov. Cholinesterases in development and disease. *Chemico-Biological Interactions* 175 (2008) 92–100.
362. Basbaum AI, Fields HL (1984) Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7:309–338.
363. Yamamura HI, Wamsley JK, Deshmukh P, Roeske WR (1983) Differential light microscopic autoradiographic localization of muscarinic cholinergic receptors in the brainstem and spinal cord of the rat using [3H]pirenzepine. *Eur J Pharmacol* 91:147–149.
364. Villiger JW, Faull RL (1985) Muscarinic cholinergic receptors in the human spinal cord: differential localization of [3H]pirenzepine and [3H]quinuclidinylbenzilate binding sites. *Brain Res* 345:196–199.
365. Li DP, Chen SR, Pan YZ, Levey AI, Pan HL (2002) Role of presynaptic muscarinic and GABA(B) receptors in spinal glutamate release and cholinergic analgesia in rats. *J Physiol (Lond)* 543:807–818.
366. Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC (1990) Choline acetyltransferase-immunoreactive profiles are presynaptic to primary sensory fibers in the rat superficial dorsal horn. *J Comp Neurol* 295:370–384.
367. Wetts R, Vaughn JE (1994) Choline acetyltransferase and NADPH diaphorase are co-expressed in rat spinal cord neurons. *Neuroscience* 63:1117–1124.
368. Baba H, Kohno T, Okamoto M, Goldstein PA, Shimoji K, Yoshimura M (1998) Muscarinic facilitation of GABA release in substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn. *J Physiol* 508:83–93.
369. Naguib M, Yaksh TL (1994) Antinociceptive effects of spinal cholinesterase inhibition and isobolographic analysis of the interaction with mu and alpha 2 receptor systems. *Anesthesiology* 80:1338–1348.
370. Naguib M, Yaksh TL (1997) Characterization of muscarinic receptor subtypes that mediate antinociception in the rat spinal cord. *Anesth Analg* 85:847–853.

- 371.Chen SR, Pan HL. Activation of muscarinic receptors inhibits spinal dorsal projection neurons: role of GABA_B receptors. *Neuroscience* 125 (2004) 141–148.
- 372.Genzen JR, McGehee DS. Short- and long-term enhancement of excitatory transmission in the spinal cord dorsal horn by nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Nat Acad Sci* 2003 vol. 100 (1):6807–6812.
- 373.Genzen, J. R, Van Cleve, W, McGehee, D. S. (2001) *J NeuroPhysiol* 86, 1773–1782.
- 374.Ninkovic, M, Hunt, S. P. (1983) *Brain Res* 272, 57–69.
- 375.Khan, I. M, Marsala, M, Printz, M. P, Taylor, P, Yaksh, T. L. (1996) *J Pharmacol. Exp Ther.* 278, 97–106.
- 376.Khan, I. M, Taylor, P, Yaksh, T. L. (1994) *J Pharmacol. Exp Ther.* 271, 1550–1557.
- 377.Khan, I. M, Stanislaus, S, Zhang, L, Taylor, P, Yaksh, T. L. (2001) *J Pharmacol. Exp Ther.* 297, 230–239.
- 378.Damaj, M. I, Meyer, E. M, Martin, B. R. (2000) *Neuropharmacology* 39, 2785–2791.
- 379.Kiyosawa, A, Katsurabayashi, S, Akaike, N, Pang, Z. P. (2001) *J Physiol* 536, 101–110.
- 380.Takeda, D, Nakatsuda, T, Papke, R, Gu, J. G. (2003) *Pain* 101, 13–23.
- 381.Cordero-Erausquin, M, Changeux, J. P. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2803–2807.
- 382.Dishman RK. Medical psychology in exercise and sports. *Med Clin North Am* 69:123-43;1985.
- 383.Delgado PL, Charney DS, Price LH, Aghajanian GK, Landis H, Heninger GR. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. *Arch Gen Psychiatry.* 47:411-8; 1990.
- 384.Jefferson JW, Griest JH, Glagnaz PS, et al. Effect of strenuous exercise on serum lithium level in man. *Am J Psychiatry* 139:1593-5; 1982.
- 385.Ransford CP. A role for amines in the antidepressant effect of exercise: A review. *Med Sci Sports Exerc* 14:1-10; 1982.

- 386.Charney DS, Heninger GR, Sternberg DE. Serotonin function and the mechanism of action of antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry.* 41:359-65; 1984.
- 387.Hellhammer DH, Rea MA, Bell M, Belkein L, Ludwig M. Learned Helplessness; Effect on brain monoamines and pituitary gonadal axis. *Pharmacol Biochem Behav* 21:481-5; 1984.
- 388.Barchas JD, Freedman DX,. Brain amines: Response to physiological stress. *Biochem Pharmacol.* 12:1232-5; 1963.
- 389.Chaouloff F, Elghozi JL, Guezennec Y, Laude D. Effects of conditioned running on plasma, liver and brain tryptophan and on brain 5-hydroxytryptamine metabolism of the rat. *Br J Pharmacol.* 86:33-41;1985.
- 390.Aoworth I, Nicholass J, Morgan B, Neweholme EA. Effect of sustained exercise on concentrations of plasma aromatic branched-chain aminoacids and brain amines. *Biochem Biophys Res Comm* 137:149-53; 1986.
- 391.Brown BS, Huss WV. Exercise and rat brain catecholamines. *J Appl Physiol* 34(5):664-9; 1973.
- 392.Hammond DL, Control systems for nociceptive afferent processing. The descending inhibitory pathways. In: Yaksh TL, ed. *Spinal Afferent Processing.* New York: Plenum Press 1986: 363-90.
- 393.Aghajanian GK, Vandermaelen CP. Specific systems of the reticular core: serotonin. In: Mountcastle VB, Bloom FE, Geiger SR, eds. *The Nervous System Vol 4. Intrinsic regulatory systems of the brain.* Bethesda: Amer Physiol Soc 1986:237-56.
- 394.Myslinski NR, Anderson EG. The effect of serotonin precursors on alpha and gamma motoneuron activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; 204:19-26.
- 395.White GR, Newman RS. Facilitation of spinal motoneurons excitability by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Brain Res* 1980; 188:119-27.
- 396.Dalstrom A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. II. Experimentally induced changes in the intraneural amine levels of bulbospinal neuron systems. *Acta Physiol Scand* 1965;64: 1-85.

397. Segu L, Calas A. The topographical distribution of serotonergic terminals in the spinal cord of the cat: quantitative radioautographic studies. *Brain Res* 1978;153:449-64.
398. Cazalets, J.R, Sqalli-Houssaini, Y, Clarac, F, 1995. Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in the neonatal rat. *J Physiol (London)* 455, 187–204.
399. Kjaerulff, O, Keihn, O, 1996. Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord in vitro. *J Neurosci.* 16, 5777–5794.
400. Rossignol, S, Giroux, N, Chau, C, Marcoux, J, Brustein, E, Reader, T.A, 2001. Pharmacological aids to locomotor training after spinal injury in the cat. *J Physiol* 533, 65–74.
401. Schmidt, B.J, Jordan, L.M, 2000. The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull.* 53 (5), 689–710.
402. Viala, D, Buser, P, 1971. Methods of obtaining locomotor rhythms in the spinal rabbit by pharmacological treatments (DOPA, 5-HTP, D-amphetamine) *Brain Res* 35, 151–165.
403. Grillner, S, Shik, M.L, 1973. On the descending control of the lumbosacral spinal cord from the “mesencephalic locomotor region”. *Acta Physiol Scand.* 87, 320– 333.
404. Barbeau, H, Rossignol, S, 1990. The effects of serotonergic drugs on the locomotor pattern and on cutaneous reflexes of the adult chronic spinal cat. *Brain Res* 514, 55– 67.
405. Cowley, K.C, Schmidt, B.J, 1994. A comparison of motor patterns induced by N-methyl-D-aspartate, acetylcholine and serotonin in the in vitro neonatal rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 171, 147– 150.
406. Branchereau, P, Morin, D, Bonnot, A, Ballion, B, Chapron, J, Viala, D, 2000. Development of lumbar rhythmic networks: from embryonic to neonate locomotor-like patterns in the mouse. *Brain Res Bull.* 53, 711 –718.

- 407.Cazalets, J.R, Gardette, M, Hilaire, G, 2000. Locomotor network maturation is transiently delayed in the MAOA-deficient mouse. *J NeuroPhysiol* 83, 2468–2470.
- 408.Nishimaru, H, Takizawa, H, Kudo, N, 2000. 5-Hydroxytryptamine-induced locomotor rhythm in the neonatal mouse spinal cord in vitro. *Neurosci. Lett.* 280, 187–190.
- 409.Whelan, P, Bonnot, A, O'Donovan, M.J, 2000. Properties of rhythmic activity generated by the isolated spinal cord of the neonatal mouse. *J NeuroPhysiol* 84, 2821–2833.
- 410.Cina, C, Hochman, S, 2000. Diffuse distribution of sulforhodamine-labeled neurons during serotonin-evoked locomotion in the neonatal rat thoracolumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 423, 590– 602.
- 411.Kjaerulff, O, Barajon, I, Kiehn, O, 1994. Sulphorhodamine-labelled cells in the neonatal rat spinal cord following chemically induced locomotor activity in vitro. *J Physiol* 478 (Pt 2), 265– 273.
- 412.Zhang, W, Grillner, S, 2000. The spinal 5-HT system contributes to the generation of fictive locomotion in lamprey. *Brain Res* 879, 188– 192.
- 413.Beato, M, Nistri, A, 1998. Serotonin-induced inhibition of locomotor rhythm of the rat isolated spinal cord is mediated by the 5-HT₁ receptor class. *Proc. R. Soc. Lond, B. Biol Sci.* 265, 2073– 2080.
- 414.Hand GH, Vrettakos PJ, Treuhart BS, Shealy WD, Wilson LB. Spinal cholinergic inhibition of the pressor response to skeletal muscle activation. *Brain Research* 837 :143–151.
- 415.Hayes HB, Chang Y, Hochman S. An In Vitro Spinal Cord–Hindlimb Preparation for Studying Behaviorally Relevant Rat Locomotor Function. *J Neurophysiol* 101: 1114–1122, 2009.
- 416.Barbeau H, Richards CL, Bedard P. Action of cyproheptadine in spastic paraparetic patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1982;45:923-6.
- 417.Wainberg M, Barbeau H, Gauthier S. Quantitative assessment of the effect of cyproheptadine on spastic paretic gait: A preliminary study. *J Neurol* 1986;233:311-4.

418. Tina Kao, Jed S. Shumsky, Stacy Jacob-Vadakot, B. Timothy Himes, Marion Murray, Karen A. Moxon. Role of the 5-HT_{2C} receptor in improving weight-supported stepping in adult rats spinalized as neonates. *Brain Res* 1112 (2006) 159 – 168.
419. Gerin C, Teilhac JR, Smith K, Privat A. Motor activity induces release of serotonin in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci Lett*. 2008 May 9; 436(2): 91–95.
420. Ranson RN, Dodds AL, Smith MJ, Santer RM, Watson AH. Age-associated changes in the monoaminergic innervation of rat lumbosacral spinal cord. *Brain Res*. 2003 May 16; 972(1-2):149-58.
421. Ilha J, Araujo RT, Malysz T, Hermel EE, Rigon P et al. (2008) Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil Neural Repair* 22: 355-66.
422. Melo RM, Martinho E, Michelini LC (2003) Training-induced, pressure lowering effect in SHR. Wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension* 42: 851-857.
423. **Marcuzzo S, Dutra MF, Stigger F, do Nascimento PS, Ilha J, Kalil-Gaspar PI, Achaval M. Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: walking pattern and soleus quantitative histology.** *Brain Res*. 2008 Jul 30; 1222:129-40. Epub 2008 May 27.
424. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95.
425. Pereira ME, Adams AIH, Silva NS. 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicol Lett* 146:269-74.
426. Karnovsky M, Roots J. A "direct-coloring" method for cholinesterase. *J Histochem Cytochem* (1964) 12:219-21.
427. Coq J, Strata F, Russier M, Safadi F, Merzenich MM, Byld NN, Barbe MF. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal

- tissues and S1 map organization: Implications for cerebral palsy. *Experimental Neurology* 210 (2008) 95–108.
- 428.Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Da Cunha C, Deonizio JM et al. (2005) A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Protoc* 16: 58-64.
- 429.Kurita N, Kawaguchi M, Horiuchi T, Inoue S, Sakamoto T, Nakamura M, Konishi N, Furuya H. An Evaluation of White Matter Injury After Spinal Cord Ischemia in Rats: A Comparison with Gray Matter Injury. *Anesth Analg* 2005;100:847–54.
- 430.Stuesse SL, Crisp T,· McBurney DL, Schechter JB, Lovell JA, Cruce WLR. Neuropathic pain in aged rats: behavioral responses and astrocytic activation. *Exp Brain Res* (2001) 137:219–227.
- 431.Partata WA, Krepsky AM, Xavier LL, Marques M, Achaval M.Distribution of glycogen phosphorylase and cytochrome oxidase in the central nervous system of the turtle *Trachemys dorbigni*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2002 Apr;131(4):807-14.
- 432.Escriva´ F, Gavete ML, Fermin Y, Pe´rez C, Gallardo N, Alvarez C, Andre´A, Ros M, Carrascosa JM. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol* (2007) 194, 131–141.

433. Nishimaru H, Restrepo CE, Kiehn O. Activity of Renshaw cells during locomotor-like rhythmic activity in the isolated spinal cord of neonatal mice. *J Neurosci*. 2006 May 17;26(20):5320-8.
434. Quinlan KA, Buchanan JT. Cellular and Synaptic Actions of Acetylcholine in the Lamprey Spinal Cord. *J Neurophysiol* 100: 1020–1031, 2008.
435. M. J. Chen, A.A. Russo-Neustadt, Running exercise- and antidepressant-induced increases in growth and survival-associated signaling molecules are IGF-dependent, *Growth Factors* (2007) 25:118-31.
436. M.L. Adamo, R.P. Farrar, Resistance training, and IGF involvement in the maintenance of muscle mass during the aging process, *Ageing Res Rev*. 5 (2006) 310-31.
437. Johnson H, Mossberg K, Arvidsson Ulf, Piehl F, Hökfelt T, Ulfhake B. Increase in α -CGRP and GAP-43 in aged motoneurons: A study of peptides, growth factors, and ChAT mRNA in the lumbar spinal cord of senescent rats with symptoms of hindlimb incapacities. *The J Com Neurology* 359 (1) 69–89.
438. Hwang IK, Choi JH, Li H, Yoo KY, Kim DW et al. (2008) Changes in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the dentate gyrus and hippocampus proper of adult and aged dogs. *J Vet Med Sci* 70: 965-9.
439. Kronenberg G, Bick-Sander A, Bunk E, Wolf C, Ehninger D et al. (2006) Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging* 27: 1505-13.
440. Uda M, Ishido M, Kami K, Masuhara M (2006) Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Res* 1104: 64-72.
441. van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2: 266-270.
442. van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. *J Neurosci* 25: 8680-5.
443. Brown AK, Liu-Ambrose T, Tate R, Lord S (2008) The Effect of Group-Based Exercise on Cognitive Performance and Mood in Seniors Residing in

- Intermediate Care and Self-Care Retirement Facilities: A Randomized Controlled Trial. *Br J Sports Med* [Epub ahead of print]
- 444.Lachman ME, Neupert SD, Bertrand R, Jette AM (2006) The effects of strength training on memory in older adults. *J Aging Phys Act* 14: 59-73.
- 445.Perrig-Chiello P, Perrig WJ, Ehram R, Staehelin HB, Krings F (1998) The effects of resistance training on well-being and memory in elderly volunteers. *Age Ageing* 27: 469-75.
- 446.Rennaker RL, Miller J, Tang H, Wilson DA (2007) Minocycline increases quality and longevity of chronic neural recordings. *J Neural Eng* 4:L1-5.
- 447.Major DE, Kesslak JP, Cotman CW, Finch CE, Day JR (1997) Life-long dietary restriction attenuates age-related increases in hippocampal glial fibrillary acidic protein mRNA. *Neurobiol Aging* 18: 523-6.
- 448.Morgan TE, Rozovsky I, Goldsmith SK, Stone DJ, T. Yoshida et al. (1997) Increased transcription of the astrocyte gene GFAP during middle-age is attenuated by food restriction: implications for the role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 23: 524-8.
- 449.Soffié M, Hahn K, Terao E, Eclancher F (1999) Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. *Behav Brain Res* 101: 37-49.
- 450.O'Callaghan RM, Griffin EW, Kelly AM: Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. *Hippocampus* 2009; Mar 23 [Epub ahead of print].
451. Kannangara TS, Webber A, Gil-Mohapel J, Christie BR (2008) Stress differentially regulates the effects of voluntary exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of mice. *Hippocampus*. [Epub ahead of print].
- 452.Gosselin RD, Gibney S, O'Malley D, Dinan TG, Cryan JF (2008) Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression, *Neuroscience*. [Epub ahead of print]
- 453.Paxinos G, Watson D (1st edition): *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, Academic Press, 1997.
- 454.Montgomery DC (2nd edition). *Design and Analysis of Experiments*, pp. 90-93 (Model Adequacy Checking), New York, Wiley & Sons, 1984.

