



**Treinamento de força e o envelhecimento alteram a atividade das metalopeptidases de matriz (MMPs) em músculos esqueléticos e em soro de ratos**

Aluna: Gleyce Pires Gonçalves do Prado

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia  
Marqueti Durigan

GLEYCE PIRES GONÇALVES DO PRADO

**Treinamento de força e o envelhecimento alteram a atividade das metalopeptidases de matriz (MMPs) em músculos esqueléticos e em soro de ratos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação *Strictus Sensu* em Ciências e Tecnologias em Saúde para a obtenção do título de Mestre pela Universidade de Brasília

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Rita de Cássia Marqueti Durigan

Brasília  
2016

**Membros da banca examinadora**

Presidente da banca: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Marqueti Durigan – Graduação em fisioterapia pela Universidade do Vale do Itajaí – UNIVAL; Especialização em Fisiologia do Exercício pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar; Mestrado em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar; Doutorado em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar; Pós- Doutorado em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

Membro interno: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Gerson Cipriano Júnior – Graduação em fisioterapia pela Universidade do Oeste Paulista; Mestrado em Ciências da Saúde (Cardiologia) pela Universidade Federal de São Paulo; Doutorado em Ciências da Saúde (Cirurgia Vasculuar) pela Universidade Federal de São Paulo; Pós- Doutorado em Fisioterapia pela University of New Mexico (USA).

Membro externo: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Guilherme Borges Pereira - Graduação em fisioterapia pelo Centro Universitário do Cerrado Patrocínio – UNICERP; Especialização em Fisiologia do Exercício pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar; Mestrado em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar; Doutorado em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

**Dedicatória e agradecimentos**

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me apoiou em toda esta trajetória; especialmente aos meus pais que sempre lutaram para me dar uma educação de qualidade, ao meu filho Lucas que encheu a minha vida de alegria, às minhas irmãs por todo companheirismo e amizade e ao meu marido, que também agradeço por toda paciência pelos momentos de ausência e incentivo nos momentos de dificuldade. Dedico a todos os professores que colaboraram com meu aprendizado e me instigaram a crescer cada dia mais. Agradeço a Professora Rita e ao Professor João por terem aberto as portas do conhecimento para que eu pudesse realizar o meu sonho do mestrado e agradeço acima de tudo a Deus que me deu forças e perseverança para chegar até o final desta caminhada.

**Sumário**

Relação de tabelas, figuras e anexos	06
Relação de siglas	08
Resumo	09
Palavras-chave	09
Abstract	10
Key words	10
Introdução	11
Objetivos	15
Metodologia	16
Resultados	19
Discussão	43
Conclusão	47
Referências	48
Anexos	
1. Artigo	50
2. Fator de impacto do periódico	63
3. Normas de publicação da revista	64
4. Documento de aprovação no comitê de ética	69

## **Relação de tabelas, figuras e anexos**

### **Lista de Ilustrações**

Figura 1: Zimografia - Densitometria óptica das bandas de MMP-2 em unidade arbitrária do músculo Gastrocnêmio Medial.

Figura 2: Zimografia - Densitometria óptica das bandas de MMP-2 em unidade arbitrária do músculo Gastrocnêmio Lateral.

Figura 3: Zimografia - Densitometria óptica das bandas de MMP-2 em unidade arbitrária do músculo Flexor Profundo dos Dedos.

Figura 4: Zimografia - Densitometria óptica das bandas de MMP-2 em unidade arbitrária do músculo Sóleo.

Figura 5: Zimografia - Densitometria óptica das bandas de MMP-2 e MMP-9 em unidade arbitrária de Soro.

Tabela Peso muscular, peso do animal e peso relativo - ratos jovens -1 a 7

Tabela Peso muscular, peso do animal e peso relativo - treinados jovens -1 a 7

Tabela Peso muscular, peso do animal e peso relativo - ratos velhos -1 a 7

Tabela Peso muscular, peso do animal e peso relativo - treinados velhos -1 a 7

Gráfico Média de peso e desvio padrão – Gastrocnêmio Medial

Gráfico Média de peso e desvio padrão – Gastrocnêmio Lateral

Gráfico Média de peso e desvio padrão – Sóleo

Gráfico Média de peso e desvio padrão – Flexor Profundo dos Dedos

**Anexos**

- 1- Artigo
- 2- Fator de impacto do periódico
- 3- Normas de publicação da revista
- 4- Aprovação no comitê de ética

**Relação das siglas ou símbolos empregados e abreviaturas no texto**

FPD- Flexor profundo dos dedos

GA- Gastrocnêmio

IL-6- Interleucina

MEC- Matriz extracelular

MMPs- Metaloproteínas de matriz

SDS- *Sodium Dodecyl Sulfate*

SO- Sólido

TNF  $\alpha$ - Fator  $\alpha$  de necrose tumoral



**Resumo**

O envelhecimento é um processo multifatorial complexo, no qual as propriedades mecânicas do músculo se deterioram o que contribui para perda de função e independência dos idosos, essa deterioração é principalmente devido à perda de massa muscular. É possível que as alterações no músculo esquelético também possam estar relacionadas a matriz extracelular. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do TF sobre a atividade das MMP-2 e MMP-9 em músculos esqueléticos e soro de ratos jovens e velhos. Vinte e oito ratos Wistar foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n = 7 por grupo): jovem (J); jovens que realizam o treinamento (TJ); velho (V); velho que realizam o treinamento (TV). Foi realizado um período de treinamento de força de 12 semanas, durante o qual os animais subiram uma escada vertical 1.1- usando pesos fixados em suas caudas. As sessões foram realizadas 3 vezes por semana, com 8-12 movimentos dinâmicos por escalada. A atividade da MMP-2 e MMP-9 foram analisadas por zimografia. Houve maior atividade de MMP-2 no gastrocnêmio lateral e músculo flexor profundo dos dedos no grupo TV comparado com o V, J e TJ ( $p \leq 0,001$ ). Além disso, houve maior atividade da MMP-2 no músculo gastrocnêmio medial no grupo TV em comparação com o J e TJ ( $p \leq 0,001$ ). O grupo J apresentou menor atividade de MMP-2 no músculo sóleo do que o TJ, V e TV ( $p \leq 0,001$ ). Com relação à MMP 2/9 no soro, o grupo TV apresentou atividade significativamente reduzida ( $p \leq 0,001$ ) em comparação com J e TJ. Estes resultados sugerem que o TF promove um aumento do conteúdo de MMP-2 no músculo envelhecido, enquanto demonstrou uma redução do conteúdo de MMP-2 e MMP-9 na circulação de animais jovens, o que pode favorecer a manutenção de tecido saudável e a imunidade, concluindo assim que o TF é um mecanismo importante para a adaptação do músculo e pode ser fundamental para atenuar os efeitos deletérios associados à idade.

**Palavras-chave:** metalopeptidases de matriz; músculo esquelético; treinamento de força; soro.

**Abstract**

Aging is a complex multifactorial process characterized by accumulation of deleterious, including extracellular matrix. The aim of this study was to investigate the effects of twelve weeks of RT on MMP-2 and MMP-9 activity in skeletal muscles and serum of young and old rats. Twenty eight Wistar rats were randomly divided into four groups (n=7 per group): young (J); young that perform the training (JT); old (O); old that perform the training (OT). A 12-week resistance training period, during which the animals climbed a 1.1-m vertical ladder with weights secured to their tails, was used. The sessions were performed once every 3 days, with 8–12 dynamic movements per climb. The MMP-2 and MMP-9 activity was analyzed by zymography. There was higher active MMP-2 activity in lateral gastrocnemius and flexor digitorum profundus muscle in the OT group compared with the O, Y and YT ( $p \leq 0.001$ ). Moreover, there was higher active MMP-2 activity in medial gastrocnemius muscle in the OT group compared with the Y and YT ( $p \leq 0.001$ ). The Y group presented lower active MMP-2 activity in solues muscle than the YT, O, OT ( $p \leq 0.001$ ). With respect to serum active MMP-2/9 activity, OT group was significantly reduced ( $p \leq 0.001$ ) compared to Y and YT. These results suggest that RT up-regulates MMP-2 activity in aging muscle, while down regulating MMP-2 and MMP-9 in the circulation, which can favor to the maintenance of healthy tissue and immunity.

**Key words:** matrix metalloproteinase, skeletal muscle, strength training, serum.

## **Introdução**

A transição demográfica na qual populações caracteristicamente jovem e adulta tornam-se gradualmente envelhecida é um fenômeno que vem acontecendo nas últimas décadas em diversas regiões do mundo (Silveira et al., 2016). Mais de 1 em cada 5 pessoas tem mais de 60 anos em um número cada vez maior de países (HWO, 2015). O objetivo de prolongar a vida é observado em qualquer sociedade, porém essa conquista deve acrescentar qualidade aos anos de vida do idoso. (Silva et al., 2012).

Na velhice a qualidade de vida está relacionada com fatores como independência e autonomia (Silva et al., 2012). Um fator que pode afetar a qualidade de vida do idoso é a sarcopenia, que é um fenômeno nos músculos esqueléticos definido como a perda de massa muscular, resultando em importantes mudanças de composição e função corporal (Pauline e Bautmans, 2014). Recentemente critérios clínicos estão sendo propostos para diagnóstico de sarcopenia, com base na associação de atrofia e fraqueza muscular e redução da função física (Cruz-Jentoft, Baeyens et al., 2010).

De maneira geral a perda é dependente da idade da massa muscular e força contrátil, incluindo desnervação associada à atrofia muscular, desacoplamento excitação-contração, diminuição da capacidade de regeneração da fibra, alterações nas principais vias metabólicas, síntese de proteína muscular alterada, desequilíbrio de fatores de crescimento e hormônios envolvidos na manutenção da fibra (Rullman et al., 2007). As propriedades mecânicas do músculo se deterioram com o envelhecimento o que contribui para perda de função e independência dos idosos, essa deterioração é principalmente devido à perda de massa muscular. (Kragstrup et al., 2011).

É possível que as alterações no músculo esquelético também possam estar relacionadas a matriz extracelular (MEC) (Kragstrup et al., 2011). Poucos estudos demonstraram a alteração da matriz extracelular no envelhecimento, como o de Kragstrup et al. 2011 e o Ramaswamy et al. 2011. A MEC circunda as fibras musculares e proporciona suporte estrutural, proteção e manutenção da integridade funcional muscular através da atividade de enzimas proteolíticas, chamadas de metaloproteinases de matriz (MMPs), no qual promovem uma degradação de componentes como colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos durante o remodelamento tecidual (Marqueti et al., 2008).

A MEC do músculo esquelético está organizada em três camadas de interconexão: o epimísio em torno do músculo inteiro, o perimísio dividindo os fascículos dentro do músculo, e o endomísio em torno das fibras musculares individuais. A matriz de todas as três camadas

consiste essencialmente em proteínas colagenosas estruturadas por moléculas de ligação cruzada, em conjunto com uma série de outras proteínas do tecido conjuntivo, tais como fibras elásticas, proteoglicanos e diferentes tipos de células (Kragstrup et al., 2011). As MMPs possuem funções na homeostase das fibras musculares e da sua MEC (Kragstrup et al., 2011). No músculo esquelético, elas participam de processos fisiológicos e patológicos, desde a liberação de fatores de crescimento locais até a reparação de lesão traumática ou desuso (Kjaer, 2004).

O estudo de Ramaswamy et al. 2011 realizado com ratos jovens (3 meses de idade) e velhos (30-33 meses de idade) e outro grupo com ratos mais velhos (36-38 meses) para investigar o efeito da falta de distrofina na transmissão lateral da força, além de determinar as influências relacionadas com a idade, a inclusão dos dois grupos de "velhice" baseou-se no declínio linear nos músculos esqueléticos de humanos, do número de unidades motoras e o número de fibras musculares, mostrou que alterações foram observadas na deposição da MEC em músculos muito velhos. Além disso, as ligações mediadas pela integrina pareciam ser preservadas, ou mesmo aumentadas. Estas observações, combinadas com os resultados de que a perda de distrofina foi suficiente para causar uma diminuição na transmissão da força lateral destes grupos amostrais.

Embora existam várias MMPs no músculo, duas MMPs tem a função de desempenhar um importante papel na adaptação do músculo esquelético para novas exigências contráteis e respostas à lesões que são a MMP-2 e a MMP-9. Ambas estas MMPs degradam o colágeno tipo IV e pertencem a um grupo de endoproteínases que têm funções importantes na homeostase da MEC durante a morfogênese, proliferação e apoptose celular numa vasta gama de tecidos (Carmeli, 2005). Além disso, as MMPs degradam a matriz extracelular durante o desenvolvimento embrionário, migração celular, morfogênese e remodelamento de tecidos, sendo a MMP-2 a mais associada ao músculo esquelético e a MMP-9 associada a processos inflamatórios (Carmeli, 2004).

Novas demandas no músculo esquelético como, por exemplo, o aumento ou diminuição da atividade contrátil, promovem o remodelamento da MEC e em particular o colágeno tipo IV que é um componente importante no arranjo celular das fibras do músculo esquelético (Carmeli, 2005). As MMPs contribuem para o remodelamento de tecidos tanto normal como patológico, como por exemplo nos tumores. Cada MMP tem um substrato específico, assim a MMP deve ser lançada em um tempo e local específico para orquestrar o remodelamento e adaptação da membrana alvo (Urso et al., 2009). No processo de envelhecimento, além do aumento de *cross-links* de colágeno, diminuição de citocinas, como

TNF $\alpha$ , IL6 e fatores de crescimento, a expressão de genes de MMP-2 são reduzidas, levando ao desequilíbrio do processo de remodelamento em humanos (Richard et al., 2009).

Fortes evidências mostram que o treinamento de força é a estratégia mais eficaz para combater e prevenir a fraqueza muscular relacionada com a idade (Peterson et al., 2010). Ganho de força importante (> 50%) foram relatados depois de um período relativamente curto de treinamento de força (6-9 semanas) mesmo em pessoas acima dos 60 anos (Pauline e Bautmans, 2014). Estudos tem demonstrado que o treinamento de força (TF) pode promover adaptações na MEC, proporcionando um aumento na expressão, síntese e acúmulo de colágeno I e III, além do aumento da expressão de MMP-2 (Marqueti et al., 2008) e (Heinemeier et al. 2009), e níveis séricos de MMP-9 após o treinamento (Urso et al., 2009).

O estudo realizado por Urso em 2009 mostrou que as MMPs na circulação modulam a ativação de fatores de crescimento, citocinas e angiogênese, facilitando a adaptação muscular ao exercício. Foi pesquisado as concentrações séricas de MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9 pré e pós-oito semanas de treinamento físico. Testou-se a hipótese de que o treinamento físico influenciaria as concentrações séricas de MMP em resposta a um teste de resistência aguda. Os participantes do estudo foram randomizados em um programa de treinamento de 8 semanas (5 dias por semana) que fizeram exercício calistênico (chamado também de streetworkout) (CT, N = 8) ou exercício resistido (RT, N = 8). As concentrações séricas de MMP (MMP-1, -2, -3, -9) foram avaliadas em homens (N = 16) em resposta a um ataque agudo de exercício de resistência de alta intensidade (seis conjuntos de agachamento de 10-RM com 2 min entre as séries) antes e após 8 semanas de treinamento. Após o treino, as concentrações de MMP-9 foram aumentadas imediatamente após o teste de resistência aguda no grupo CT em comparação com as concentrações de pré-treino. Esses dados sugerem a resposta de MMP a um ataque agudo de exercício, revelando um possível papel das MMPs no início das adaptações do treinamento. (Urso et al., 2009).

Além disso o TF pode reduzir a presença dos chamados *cross-links* de fibras de colágeno presentes na MEC no processo de envelhecimento, o qual ainda auxilia na diminuição da rigidez muscular e eleva a funcionalidade em idosos (Kragstrup et al., 2011). Em estudo com ratos Prestes et al. 2009 observou aumento significativo da atividade de MMP-2 no músculo sóleo após TF. Porém não foi descrito se o TF modula o processo de remodelamento da MEC por meio das MMPs no envelhecimento.

Baseado em estudos prévios a hipótese do presente trabalho é de que o envelhecimento acarrete aumento da MMP-2 devido ao processo de inflamatório crônico podendo culminar num processo de reparo muscular incompleto. No entanto, o TF poderá aumentar à atividade da MMP-2 no intuito de favorecer o remodelamento da MEC muscular.

Diante disso, o TF pode ser uma alternativa interessante e eficaz no processo de atenuação da degradação da MEC por meio das MMPs durante o envelhecimento. Com relação às MMPs sistêmicas esperava-se que o TF fosse capaz de mobilizar o conteúdo dessas proteases para os músculos uma vez que a demanda local estaria aumentada.

## **Objetivos**

### *Geral*

- Analisar os efeitos do envelhecimento e do TF sobre o remodelamento de músculos esqueléticos de ratos.

### *Específico*

- Avaliar os efeitos de envelhecimento, assim como do TF sobre a atividade das MMPs nos músculos: gastrocnêmio (porção medial e lateral), sóleo e flexor profundo dos dedos de ratos.
- Avaliar os efeitos de envelhecimento, bem como do TF sobre a atividade das MMPs no soro de ratos.

## **Metodologia**

### *Animais e Grupos Experimentais*

Foram utilizados 28 ratos, *Wistar Novergicus* albinos de 3 meses (jovens, n = 14) e 20 meses (senis, n = 14). Os animais foram mantidos em temperatura ambiente, entre 22 e 24°C, com luz controlada em ciclo de 12 horas (claro/escuro), com água e a comida *ad libitum*. O experimento foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (National Research Council, 1996), bem como aprovação no comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) (protocolo número 056/2010). Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (7 animais/grupo), na seguinte ordem: jovens (J); velho (V); jovens que realizaram o treinamento de força (TJ); velhos que realizaram o treinamento de força (TV).

### *Protocolo de Treinamento*

**Familiarização:** O treinamento de força de 12 semanas seguindo o modelo proposto por Hornerberg e Farrar (2004) e adaptado foi realizado 3x por semana. Inicialmente, os ratos foram adaptados e familiarizados ao protocolo de treinamento de força que exigiu que os animais escalassem uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2 cm, inclinação de 80°) com pesos presos as suas caudas. O tamanho da escada fez com que os animais realizassem 8 a 12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi preso na porção proximal da cauda com uma fita auto- adesiva. Com o aparato fixado à cauda, os ratos foram colocados na parte inferior da escada e familiarizados com a mesma. Quando necessário, um estímulo de pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento. No topo da escada os ratos alcançaram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram por um período de 2 minutos. Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem, voluntariamente, escalar três vezes consecutivas e sem estímulo.

**Treinamento:** Três dias após esta familiarização, a primeira sessão de treinamento consistiu de 4-8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas.

**Determinação da carga máxima:** A escalada inicial consistiu em carregar uma carga de 75% do peso corporal do animal. Em seguida, foi adicionado um peso de 30g até uma carga com a qual o rato não consiga escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguia progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos



na cauda. A maior carga carregada em uma escalada completa foi considerada como a capacidade máxima de carregamento do rato para aquela sessão de treinamento. As sessões de treinamento consistiram de quatro escaladas na escada com 65%, 85%, 95% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subsequentes foram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada (adaptado de Prestes et al. 2009).

### *Eutanásia*

Após 48h do término do período experimental, os animais foram eutanasiados utilizando-se injeção intraperitoneal de solução de xilazina (12mg/Kg/peso corporal) e ketamina (95 mg/Kg/peso corporal). Todos os procedimentos foram preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### *Determinação da atividade de MMPs por zimografia no músculo e soro*

As amostras de músculo e soro foram testadas para identificar a atividade proteolítica das MMPs.

### *Preparação de Amostra de Músculos*

Após eutanásia, os músculos gastrocnêmio, sóleo e flexor profundo dos dedos foram removidos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Para posterior análise, as amostras de músculo foram homogeneizadas e incubadas em 0,5 ml de tampão de extração (ácido cacodílico 10mM pH 5,0; NaCl 0,15 M; ZnCl<sub>2</sub> 1mM, aCl<sub>2</sub> 20mM, NaN<sub>3</sub> 1,5 mM; Triton X-100 0,01% [v / v]), a 4°C por 24h. Após este período a solução foi centrifugada (10 min., 13.000xg a 4 °C).

### *Preparação de Amostra de Soro*

A amostra contendo 0,5 uL de soro foi adicionada a 0,5 uL de SDS (8%) (v:v). Em seguida as amostras foram passadas no vórtex e após foi adicionado 10 µL de tampão de amostra sem β-mercaptoetanol (agente redutor) contendo SDS (20%).

Ambas as amostras de músculo e soro foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e gelatina na concentração final de 1mg/ml. Após a corrida, os géis foram lavados 2 vezes durante 40 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. Os géis foram incubados no tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0,

CaCl<sub>2</sub>.5mM; NaN<sub>3</sub> 0,02% e ZnCl<sub>2</sub> 10 mM), a 37°C, por 20 horas. Após este tempo, os géis foram corados com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) e descorados com ácido acético: metanol: água (1:4:5) para visualização das áreas de atividade.

Foi utilizado o software “Kodak Digital Science 1 D” para fotografar o gel e visualizar a atividade proteolítica das bandas. A análise densitométrica das bandas foi realizada usando o software de imagem GeneTools v3.06 software (Syngene, Cambridge, UK).

#### *Análise Estatística*

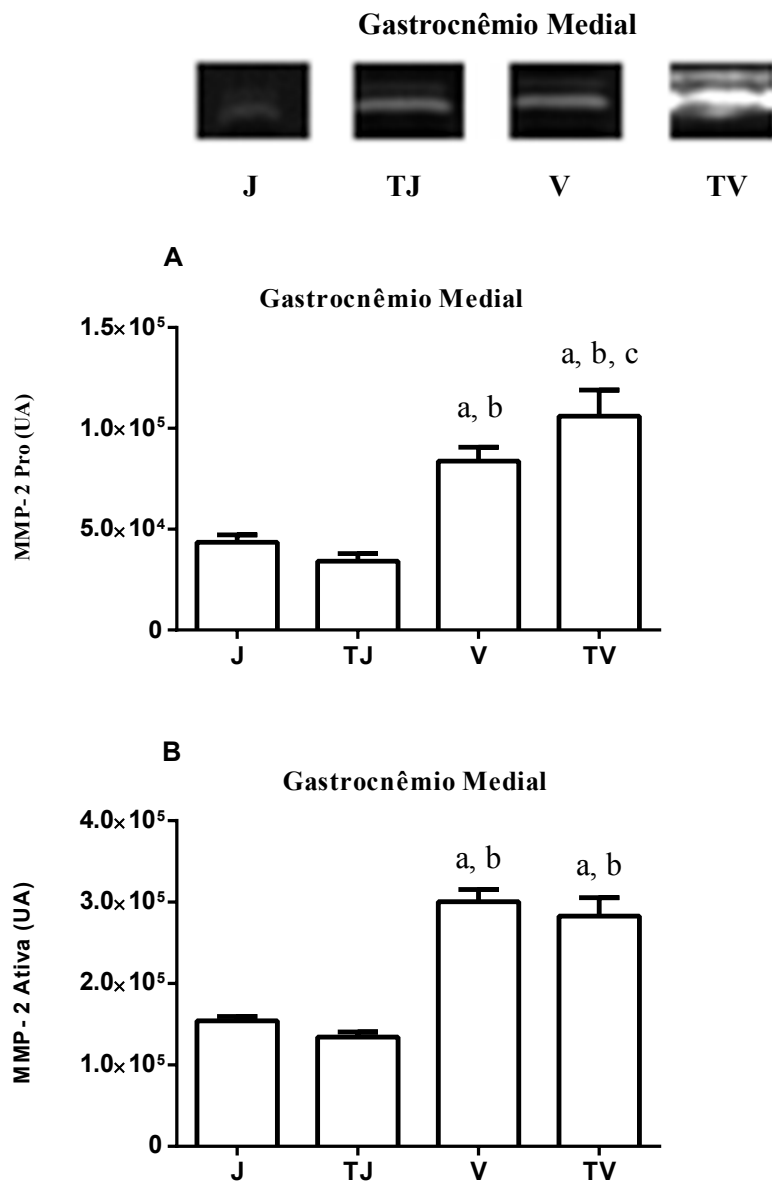
Para verificar a normalidade dos dados, foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov e o teste de Levene foi utilizado para verificar a homogeneidade. Após a verificação da normalidade, foi aplicado uma ANOVA Tow-Way com *post hoc* de Tukey. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

#### *Expressão dos dados*

Os dados foram expressos por gráficos utilizando o programa GraphPad Prism 6.

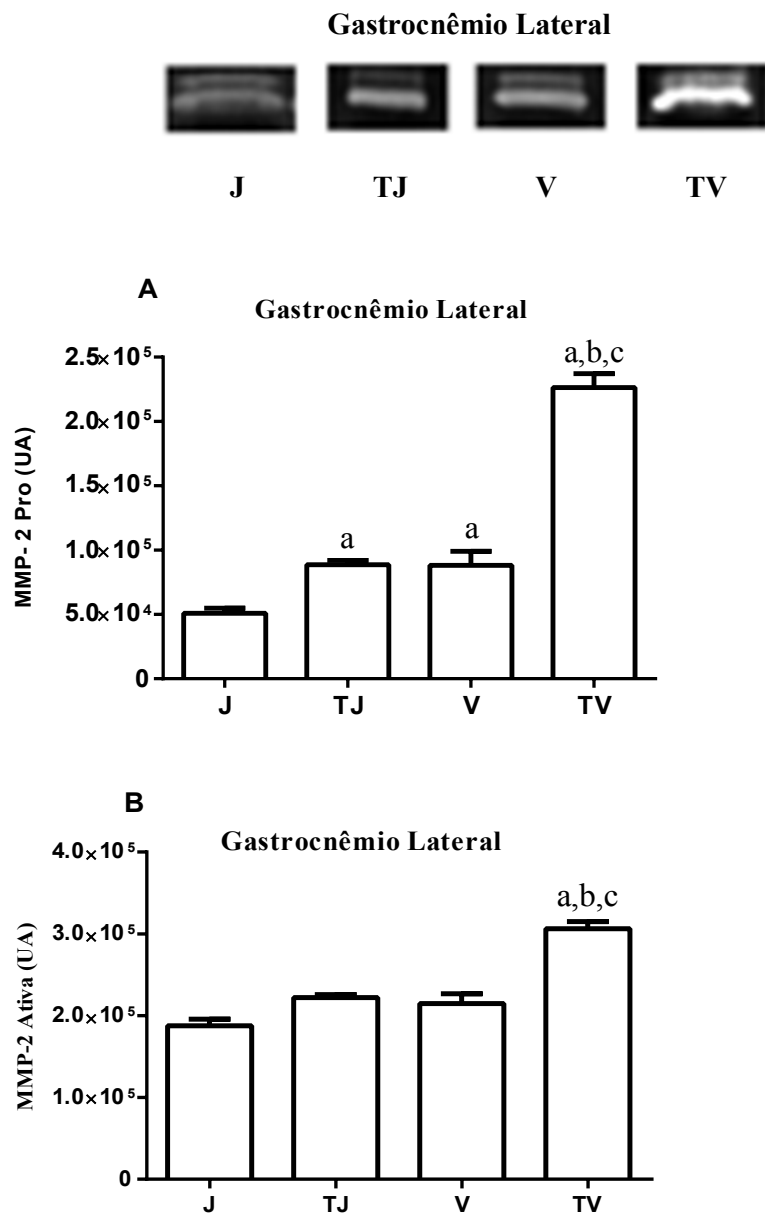
## **Resultados**

No músculo gastrocnêmio medial (GAM) foi observado aumento da atividade das MMP-2 nos grupos V ( $p < 0,01$ ) e TV ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo J, sendo que o grupo TV ( $p < 0,001$ ) apresentou os maiores valores de atividade em relação aos outros grupos experimentais. A análise da MMP-2 ativa mostrou aumento de atividade no grupo V quando comparado ao J ( $p < 0,001$ ). (Figura 1) A atividade de MMPs no grupo TV foi maior quando comparado aos grupos TJ ( $p < 0,001$ ) e J ( $p < 0,001$ ), ocorrendo também, diferença significativa quando comparado o grupo TV ao TJ ( $p < 0,001$ ).



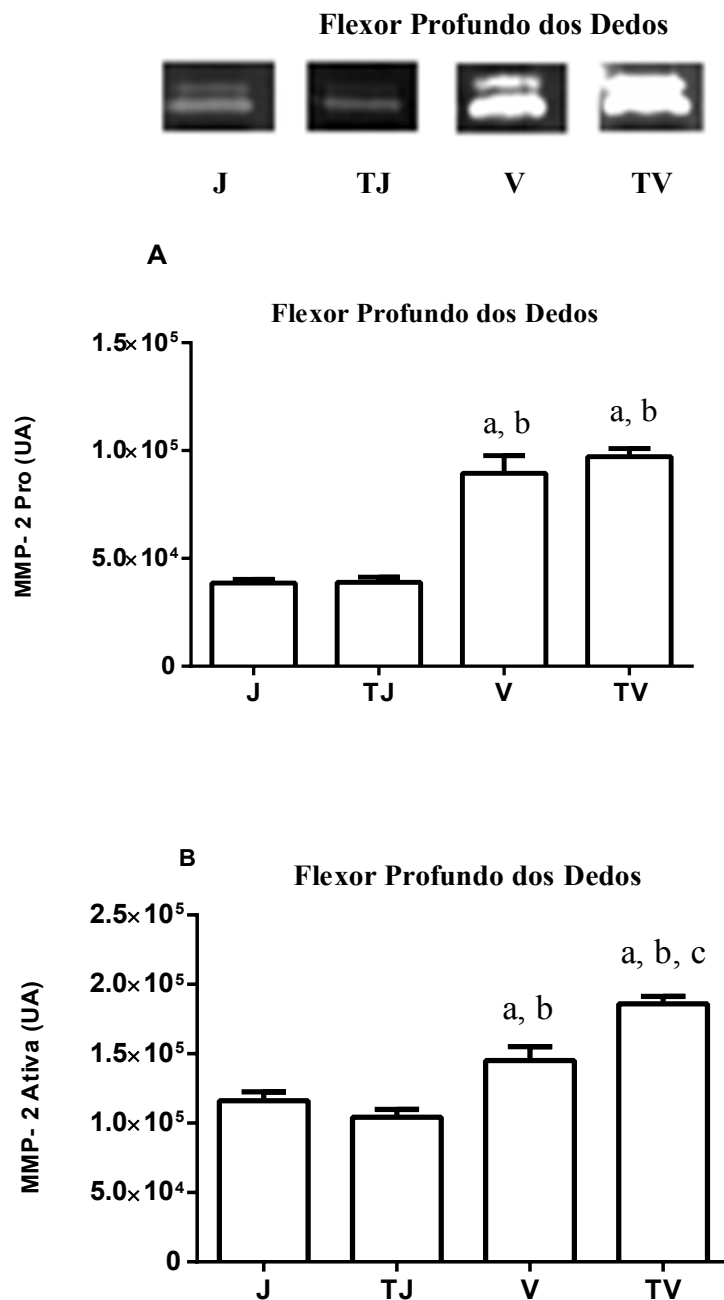
**Figura 1.** Densitometria óptica das bandas de MMP-2 em unidade arbitrária dos músculos Gastrocnêmio Medial. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Os grupos experimentais representados foram jovem (J), treinado jovem (TJ), velho (V) e treinado velho (TV). A figura 1A representa MMP-2 pro (72 kDa); Figura 1B MMP-2 ativa (64 kDa). a=  $p < 0,05$ : comparado ao grupo jovem; b=  $p < 0,05$ : comparado ao grupo treinado jovem, c=  $p < 0,05$ : comparado ao grupo velho.

No músculo gastrocnêmio lateral (GAL) o estudo mostrou que o grupo V aumentou significativamente ( $p = 0,01$ ) a atividade de MMP-2 pro quando comparado ao grupo J. O treinamento aumentou significativamente o nível de MMP-2 pro nos grupos TJ ( $p = 0,01$ ) e TV ( $p = 0,01$ ) em comparação com J e V, respectivamente, e o grupo TV foi diferente das outras ( $p = 0,01$ ). A MMP-2 ativa aumentou significativamente apenas no grupo TV em comparação com os outros grupos experimentais ( $p = 0,001$ ; Fig.2).



**Figura 2.** Densitometria óptica das bandas de MMP-2 em unidade arbitrária dos músculos gastrocnêmio lateral. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Os grupos experimentais representados foram jovem (J), treinado jovem (TJ), velho (V) e treinado velho (TV). A figura 2A representa MMP-2 pro (72 kDa); Figura 2B MMP-2 ativa (64 kDa). a=  $p < 0,05$ : comparado ao grupo jovem; b=  $p < 0,05$ : comparado ao grupo treinado jovem, c=  $p < 0,05$ : comparado ao grupo velho.

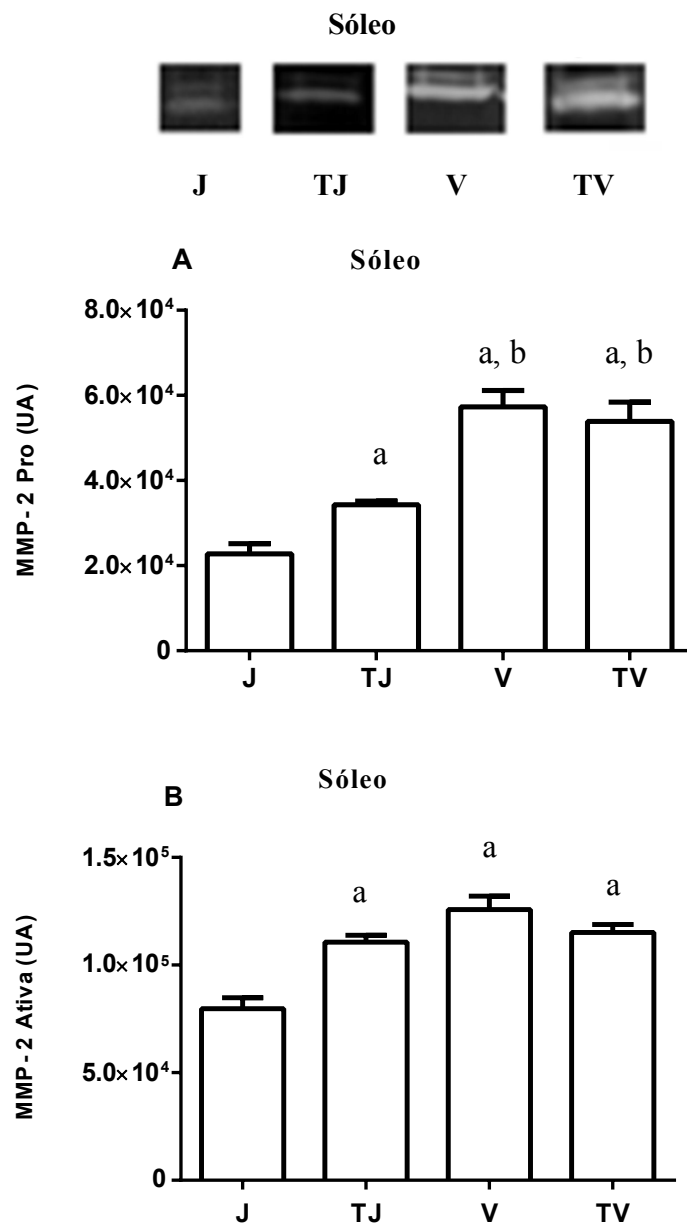
Resultados similares foram encontrados no músculo flexor profundo dos dedos (FPD) onde não foi observado diferenças quando comparados a atividade de MMP-2 pro nos grupos treinados TV e TJ aos seus respectivos grupos controles V e J ( $p>0,05$ ). Observou-se aumento de MMP-2 no grupo V e TV quando comparados ao grupo J ( $p<0,001$ ). O treinamento do grupo TV promoveu maior atividade quando comparado ao grupo TJ ( $p<0,001$ ). A análise da MMP-2 ativa, ocorreu aumento da atividade dos grupos V ( $p<0,01$ ) e TV ( $p<0,001$ ) quando comparados ao J, ocorrendo aumento também nos grupos TV ( $p<0,001$ ) e V ( $p<0,001$ ) quando comparados ao grupo TJ. (Fig. 3)



**Figura 3.** Densitometria óptica de bandas de MMP-2 em unidades arbitrárias no músculo flexor profundos dos dedos (FDP). Os dados são  $\pm$  desvio padrão. Os grupos experimentais representados foram jovem (J) treinado jovem (TJ), velho (V) e treinado velho (TV). A Figura 3A representa MMP-2 pro (72 kDa), Figura 3B: representa MMP-2 ativa (64 kDa). a =  $p < 0,05$ : comparação com jovem, b =  $p < 0,05$ : comparação com o grupo treinado jovem, c =  $p < 0,05$ : comparação com grupo velho.

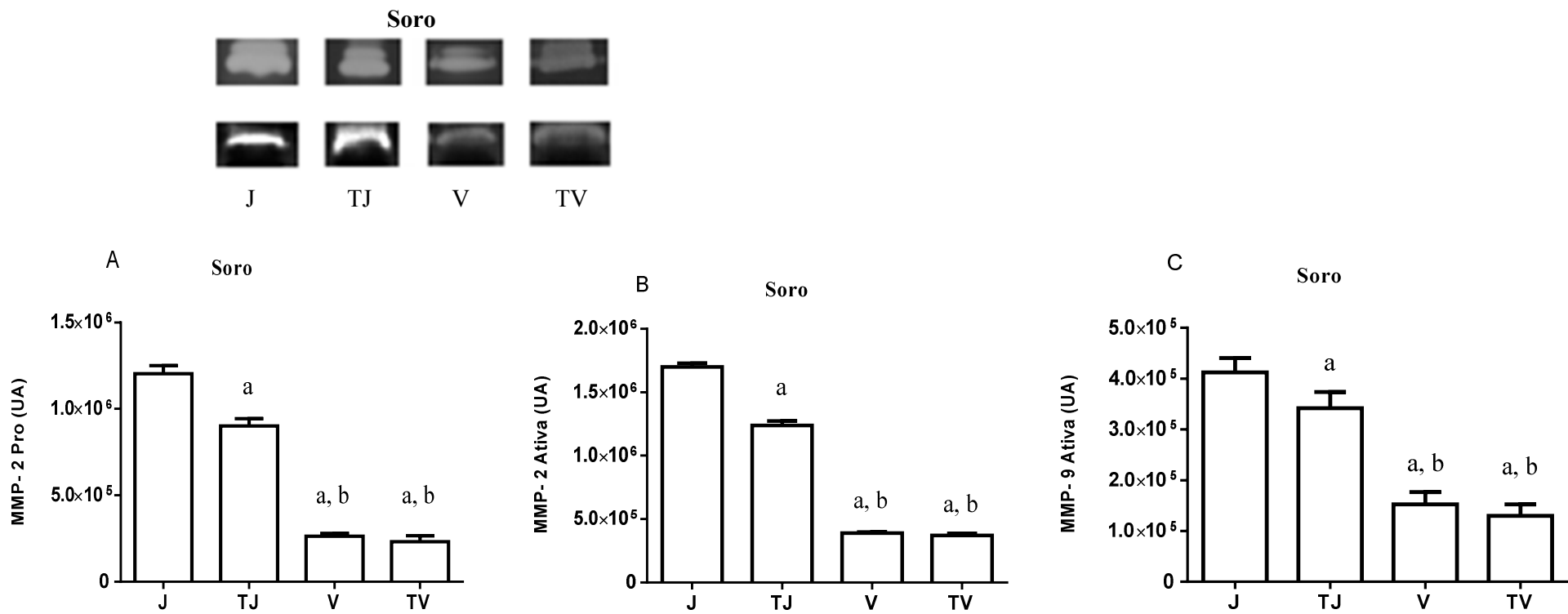


O músculo sóleo (SO) apresentou aumento da atividade de MMP-2 pro em todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo J ( $p < 0,001$ ). O grupo treinado TV apresentou aumento quando comparado ao grupo TJ ( $p < 0,001$ ), V ( $p < 0,01$ ) e J ( $p < 0,001$ ). Na atividade de MMP ativa, observou se diferença nos grupos V ( $p < 0,001$ ), TV ( $p < 0,05$ ) e TJ ( $p < 0,01$ ) comparados ao J. Além disso, a atividade da MMP-2 ativa reduziu significativamente no grupo TV comparado ao V ( $p < 0,01$ ). Não se observaram diferença entre os grupos treinados TJ e TV ( $p > 0,05$ ). (Fig.4)



**Figura 4.** Densitometria óptica de bandas de MMP-2 em unidades arbitrárias no músculo sóleo (SO). Os dados são  $\pm$  desvio padrão. Os grupos experimentais representados foram jovem (J) treinado jovem (TJ), velho (V) e treinado velho (TV). A Figura 4A representa MMP-2 pro (72 kDa), Figura 4B: representa MMP-2 ativa (64 kDa). a =  $p < 0,05$ : comparação com jovem.

Com relação a análise de MMP-2 pro no soro a atividade do grupo TJ foi reduzida significativamente ( $p=0,001$ ) em relação ao J. Os grupos V e TV também reduziram a atividade quando comparado aos grupos J e TJ ( $p=0,001$ ). Resultados similares foram encontrados na atividade do MMP-2 ativa. O grupo TJ reduziu a atividade significativamente ( $p=0,001$ ) em relação ao J. Os grupos V e TV também reduziram a atividade quando comparados aos grupos J e TJ ( $p=0.001$ ). A atividade da MMP-9 no soro apresentou redução significativa ( $p=0,001$ ) no TJ comparada ao J, assim como no V e TV quando comparados ao J e TJ, respectivamente ( $p=0,001$ ). (Fig.5)



**Figura 5.** Densitometria óptica das bandas de MMP-2 e MMP-9 em unidade arbitrária de soro. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Os grupos experimentais representados foram jovem (J), treinado jovem (TJ), velho (V) e treinado velho (TV). A figura 5A representa MMP-2 pro (72 kDa); Figura 5B MMP-2 ativa (64 kDa); Figura 5C MMP-9 ativa (64 kDa). a=  $p < 0,05$ : comparado ao grupo jovem; b=  $p < 0,05$ : comparado ao grupo treinado jovem, c=  $p < 0,05$ : comparado ao grupo velho.

## Peso muscular, peso do animal e peso relativo

### Ratos Jovens

<b>Rato 1 - nº 7 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,306	332	3,934
<i>GAL</i>	1,644	332	4,952
<i>SO</i>	0,3266	332	0,984
<i>FPD</i>	0,6755	332	2,035

<b>Rato 1 - nº 7 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,2261	332	3,693
<i>GAL</i>	1,5757	332	4,746
<i>SO</i>	0,2942	332	0,886
<i>FPD</i>	0,7066	332	2,128

<b>Rato 2 - nº 15 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,0249	264	3,882
<i>GAL</i>	1,2655	264	4,794
<i>SO</i>	0,2215	264	0,839
<i>FPD</i>	0,584	264	2,212

<b>Rato 2 - nº 15 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,1248	264	4,261
<i>GAL</i>	1,1601	264	4,394
<i>SO</i>	0,2215	264	0,839
<i>FPD</i>	0,6016	264	2,279

<b>Rato 3 - nº 17 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,0527	304	3,463
<i>GAL</i>	1,3984	304	4,600
<i>SO</i>	0,2677	304	0,881
<i>FPD</i>	0,722	304	2,375

<b>Rato 3 - nº 17 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,2137	304	3,992
<i>GAL</i>	1,3275	304	4,367
<i>SO</i>	0,2857	304	0,940
<i>FPD</i>	0,758	304	2,493

<b>Rato 4 - nº 19 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,1086	280	3,959
<i>GAL</i>	1,1294	280	4,034
<i>SO</i>	0,2608	280	0,931
<i>FPD</i>	0,5974	280	2,134
<b>Rato 4 - nº 19 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,1841	280	4,229
<i>GAL</i>	1,1593	280	4,140
<i>SO</i>	0,2662	280	0,951
<i>FPD</i>	0,6257	280	2,235

<b>Rato 5 - nº 3 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,070	256	4,180
<i>GAL</i>	1,151	256	4,495
<i>SO</i>	0,241	256	0,941
<i>FPD</i>	0,627	256	2,449
<b>Rato 5 - nº 3 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,127	256	4,400
<i>GAL</i>	1,090	256	4,258
<i>SO</i>	0,245	256	0,957
<i>FPD</i>	0,546	256	2,131

<b>Rato 6 - nº 28 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,4486	338	4,286
<i>GAL</i>	1,4968	338	4,428
<i>SO</i>	0,3038	338	0,899
<i>FPD</i>	0,7663	338	2,267
<b>Rato 6 - nº 28 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,4343	338	4,243
<i>GAL</i>	1,4887	338	4,404
<i>SO</i>	0,2793	338	0,826
<i>FPD</i>	0,7618	338	2,254

<b>Rato 7 - n° 24 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,316	316	4,165
<i>GAL</i>	1,486	316	4,703
<i>SO</i>	0,3292	316	1,042
<i>FPD</i>	0,7003	316	2,216
<b>Rato 7 - n° 24 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,3119	316	4,152
<i>GAL</i>	1,5698	316	4,968
<i>SO</i>	0,3236	316	1,024
<i>FPD</i>	0,8096	316	2,562

### **Treinados Jovens**

<b>Rato 1 - n° 48 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,2309	310	3,971
<i>GAL</i>	1,4355	310	4,631
<i>SO</i>	0,2569	310	0,829
<i>FPD</i>	0,7056	310	2,276
<b>Rato 1 - n° 48 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,1759	310	3,793
<i>GAL</i>	1,2973	310	4,185
<i>SO</i>	0,2502	310	0,807
<i>FPD</i>	0,8365	310	2,698

<b>Rato 2 - nº 37 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,9488	278	3,413
<i>GAL</i>	1,178	278	4,237
<i>SO</i>	0,2476	278	0,891
<i>FPD</i>	0,6235	278	2,243
<b>Rato 2 - nº 37 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,0675	278	3,840
<i>GAL</i>	1,1299	278	4,064
<i>SO</i>	0,2239	278	0,805
<i>FPD</i>	0,7247	278	2,607

<b>Rato 3 - nº 41 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,2535	342	3,665
<i>GAL</i>	1,2053	342	3,524
<i>SO</i>	0,2825	342	0,826
<i>FPD</i>	0,735	342	2,149
<b>Rato 3 - nº 41 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,165	342	3,406
<i>GAL</i>	1,1272	342	3,296
<i>SO</i>	0,2442	342	0,714
<i>FPD</i>	0,7816	342	2,285

<b>Rato 4 - nº 43 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,0486	260	4,033
<i>GAL</i>	1,1814	260	4,544
<i>SO</i>	0,2264	260	0,871
<i>FPD</i>	0,7373	260	2,836
<b>Rato 4 - nº 43 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,0581	260	4,070
<i>GAL</i>	1,0673	260	4,105
<i>SO</i>	0,2388	260	0,918
<i>FPD</i>	0,7425	260	2,856



<b>Rato 5 - nº 44 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,2341	298	4,141
<i>GAL</i>	1,4448	298	4,848
<i>SO</i>	0,2677	298	0,898
<i>FPD</i>	0,703	298	2,359
<b>Rato 5 - nº 44 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,1964	298	4,015
<i>GAL</i>	1,465	298	4,916
<i>SO</i>	0,2326	298	0,781
<i>FPD</i>	0,9779	298	3,282

<b>Rato 6 - nº 61 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,0605	322	3,293
<i>GAL</i>	1,1766	322	3,654
<i>SO</i>	0,2149	322	0,667
<i>FPD</i>	0,6382	322	1,982
<b>Rato 6 - nº 61 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,9842	322	3,057
<i>GAL</i>	1,0224	322	3,175
<i>SO</i>	0,2004	322	0,622
<i>FPD</i>	0,6794	322	2,110

<b>Rato 7 - nº 42 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,0717	314	3,413
<i>GAL</i>	1,0415	314	3,317
<i>SO</i>	0,242	314	0,771
<i>FPD</i>	0,6467	314	2,060
<b>Rato 7 - nº 42 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,962	314	3,064
<i>GAL</i>	1,114	314	3,548
<i>SO</i>	0,2406	314	0,766
<i>FPD</i>	0,6314	314	2,011

## Velhos

<b>Rato 1 - nº 1 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,17	504	2,321
<i>GAL</i>	1,01	504	2,004
<i>SO</i>	0,317	504	0,629
<i>FPD</i>	0,602	504	1,194
<b>Rato 1 - nº 1 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,322	504	2,623
<i>GAL</i>	0,910	504	1,806
<i>SO</i>	0,2788	504	0,553
<i>FPD</i>	0,613	504	1,216

<b>Rato 2 - nº 5 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,109	660	1,680
<i>GAL</i>	1,126	660	1,706
<i>SO</i>	0,292	660	0,442
<i>FPD</i>	0,705	660	1,068
<b>Rato 2 - nº 5 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,521	660	2,305
<i>GAL</i>	1,222	660	1,852
<i>SO</i>	0,313	660	0,474
<i>FPD</i>	0,643	660	0,974

<b>Rato 3 - nº 23 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,982	484	2,029
<i>GAL</i>	0,907	484	1,874
<i>SO</i>	0,210	484	0,434
<i>FPD</i>	0,548	484	1,132
<b>Rato 3 - nº 23 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,023	484	2,114
<i>GAL</i>	0,882	484	1,822
<i>SO</i>	0,255	484	0,527
<i>FPD</i>	0,463	484	0,957

<b>Rato 4 - nº 26 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,917	445	2,061
<i>GAL</i>	0,620	445	1,393
<i>SO</i>	0,207	445	0,465
<i>FPD</i>	0,509	445	1,144
<b>Rato 4 - nº 26 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,919	445	2,065
<i>GAL</i>	0,834	445	1,874
<i>SO</i>	0,207	445	0,465
<i>FPD</i>	0,449	445	1,009

<b>Rato 5 - nº 9 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,184	477	2,482
<i>GAL</i>	0,789	477	1,654
<i>SO</i>	0,181	477	0,379
<i>FPD</i>	0,575	477	1,205
<b>Rato 5 - nº 9 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,000	477	2,096
<i>GAL</i>	0,820	477	1,719
<i>SO</i>	0,163	477	0,342
<i>FPD</i>	0,394	477	0,826

<b>Rato 6 - nº 10 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,154	480	2,404
<i>GAL</i>	0,846	480	1,763
<i>SO</i>	0,237	480	0,494
<i>FPD</i>	0,593	480	1,235
<b>Rato 6 - nº 10 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,008	480	2,100
<i>GAL</i>	0,882	480	1,838
<i>SO</i>	0,257	480	0,535
<i>FPD</i>	0,558	480	1,163

<b>Rato 7 - nº 18 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,987	446	2,213
<i>GAL</i>	0,893	446	2,002
<i>SO</i>	0,217	446	0,487
<i>FPD</i>	0,445	446	0,998
<b>Rato 7 - nº 18 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,912	446	2,045
<i>GAL</i>	0,993	446	2,226
<i>SO</i>	0,226	446	0,507
<i>FPD</i>	0,472	446	1,058

### Treinados Velhos

<b>Rato 1 - nº 1 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,032	504	2,048
<i>GAL</i>	0,994	504	1,972
<i>SO</i>	0,241	504	0,478
<i>FPD</i>	0,682	504	1,353
<b>Rato 1 - nº 1 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,010	504	2,004
<i>GAL</i>	0,932	504	1,849
<i>SO</i>	0,237	504	0,470
<i>FPD</i>	0,690	504	1,369

<b>Rato 2 - nº 18 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,149	586	1,961
<i>GAL</i>	1,205	586	2,056
<i>SO</i>	0,251	586	0,428
<i>FPD</i>	0,674	586	1,150
<b>Rato 2 - nº 18 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,184	586	2,020
<i>GAL</i>	1,179	586	2,012
<i>SO</i>	0,240	586	0,410
<i>FPD</i>	0,697	586	1,189

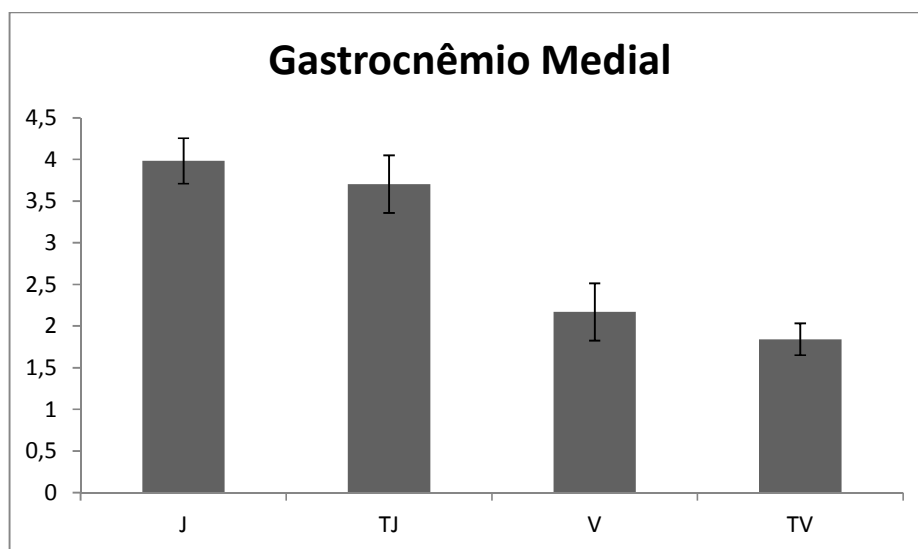
<b>Rato 3 - nº 3 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,886	556	1,594
<i>GAL</i>	1,294	556	2,327
<i>SO</i>	0,241	556	0,433
<i>FPD</i>	0,733	556	1,318
<b>Rato 3 - nº 3 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,000	556	1,799
<i>GAL</i>	1,050	556	1,888
<i>SO</i>	0,190	556	0,342
<i>FPD</i>	0,691	556	1,243
<b>Rato 4 - nº 27 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,855	427	2,002
<i>GAL</i>	1,091	427	2,555
<i>SO</i>	0,274	427	0,642
<i>FPD</i>	0,707	427	1,656
<b>Rato 4 - nº 27 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,934	427	2,187
<i>GAL</i>	1,069	427	2,504
<i>SO</i>	0,267	427	0,625
<i>FPD</i>	0,575	427	1,347

<b>Rato 5 - nº 10 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,996	627	1,589
<i>GAL</i>	1,384	627	2,207
<i>SO</i>	0,294	627	0,469
<i>FPD</i>	0,883	627	1,408
<b>Rato 5 - nº 10 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,051	627	1,676
<i>GAL</i>	1,365	627	2,177
<i>SO</i>	0,273	627	0,435
<i>FPD</i>	0,804	627	1,282

<b>Rato 6 - nº 8 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,825	464	1,778
<i>GAL</i>	1,032	464	2,224
<i>SO</i>	0,232	464	0,500
<i>FPD</i>	0,571	464	1,231
<b>Rato 6 - nº 8 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	0,941	464	2,028
<i>GAL</i>	1,013	464	2,183
<i>SO</i>	0,201	464	0,433
<i>FPD</i>	0,766	464	1,651

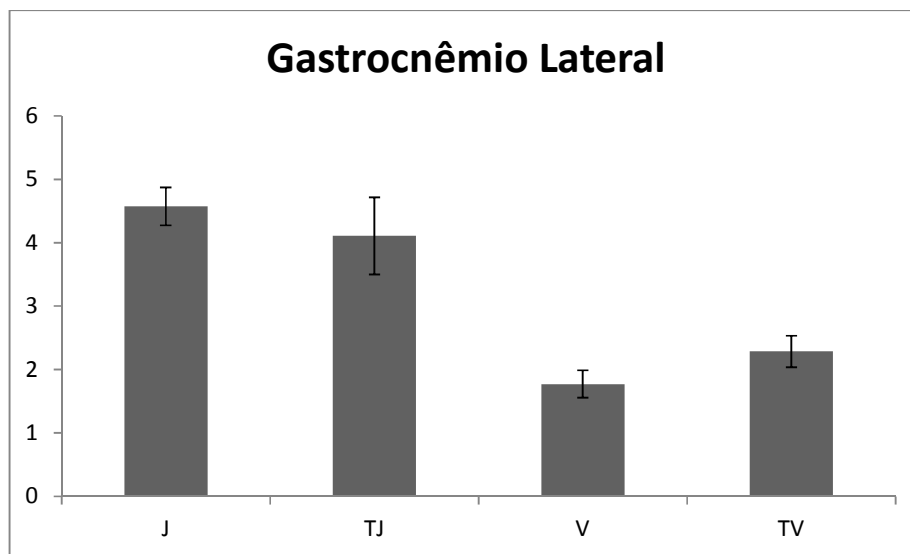
<b>Rato 7 - nº 14 - Pata direita</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso rato</b>	<b>Peso relativo</b>
<i>GAM</i>	1,091	568	1,921
<i>GAL</i>	1,506	568	2,651
<i>SO</i>	0,285	568	0,502
<i>FPD</i>	0,700	568	1,232
<b>Rato 7 - nº 14 - Pata esquerda</b>			
<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Músculo</b>	<b>Peso (g)</b>
<i>GAM</i>	1,083	568	1,907
<i>GAL</i>	1,433	568	2,523
<i>SO</i>	0,277	568	0,488
<i>FPD</i>	0,650	568	1,144

<b>Gastrocnêmio Medial</b>		
	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>J</b>	3,981	0,273
<b>TJ</b>	3,704	0,344
<b>V</b>	2,170	0,344
<b>TV</b>	1,842	0,191



Média de peso muscular com desvio padrão

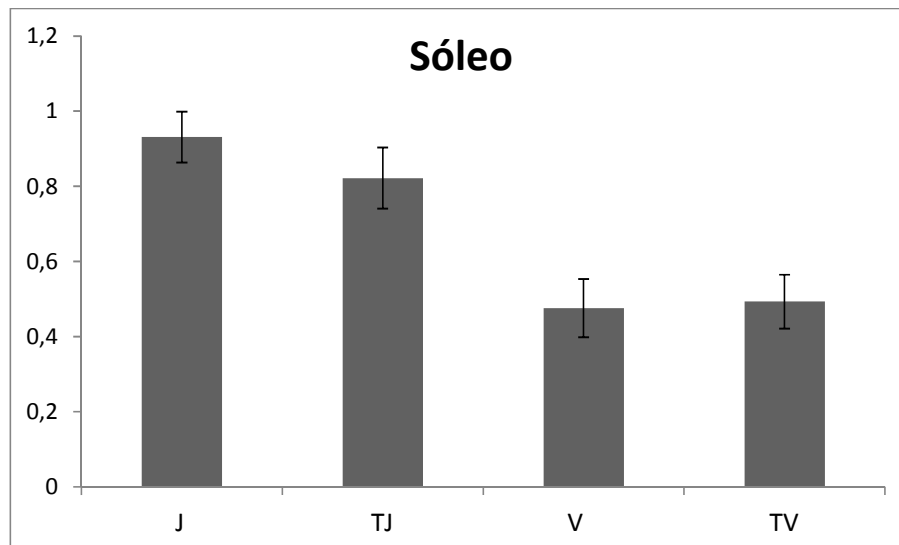
<b>Gastrocnêmio Lateral</b>		
	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>J</b>	4,572	0,297
<b>TJ</b>	4,108	0,606
<b>V</b>	1,771	0,216
<b>TV</b>	2,285	0,248



Média de peso muscular com desvio padrão

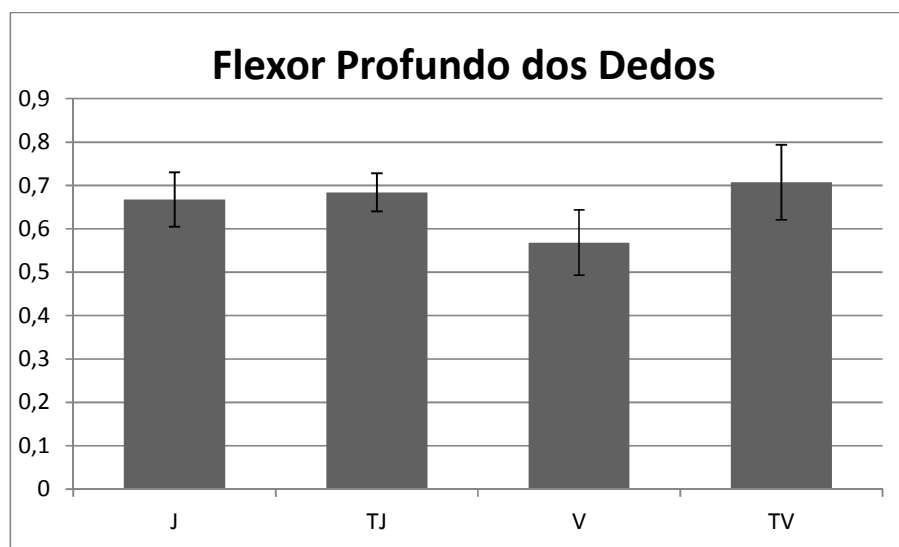


Sóleo		
	Média	Desvio Padrão
<b>J</b>	0,931	0,067
<b>TJ</b>	0,822	0,081
<b>V</b>	0,476	0,078
<b>TV</b>	0,493	0,072



Média de peso muscular com desvio padrão

<b>Flexor Profundo dos Dedos</b>		
	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>J</b>	0,668	0,063
<b>TJ</b>	0,684	0,044
<b>V</b>	0,568	0,075
<b>TV</b>	0,707	0,086



Média do peso muscular com desvio padrão

## Discussão

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de doze semanas de TF sobre a atividade das MMPs em músculos esqueléticos e soro de ratos jovens e velhos. Os principais resultados estão relacionados ao recrutamento da MMP-2 do soro para o músculo atendendo à demanda e a favor de um melhor remodelamento local nos grupos que realizaram treinamento. No entanto, foi observado que esse aumento da MMP-2 foi muito mais proeminente nos animais velhos treinados que jovens treinados. Essa resposta parece estar associada à presença acentuada de MMP-2 local durante o processo de envelhecimento, que quando adicionado o estímulo mecânico aumenta ainda mais o conteúdo de MMP-2.

A expressão gênica, realizada em outro estudo usando o mesmo modelo experimental (dados não publicados ainda), mostrou aumento nos níveis de MMP-2 no músculo gastrocnêmico de ambos os grupos treinados, porém de forma exacerbada no do grupo TV. Enquanto no músculo sóleo, ocorreu aumento da expressão de MMP-2 apenas nos grupos envelhecidos, porém, novamente com aumento pronunciado no grupo TV. Ao lado dessa resposta, alta expressão de colágeno do tipo I e III foi observada em ambos os grupos treinados, sinalizando a melhora do *turnover* tecidual.

A relevância clínica deste estudo baseia-se no fato dos efeitos deletérios do envelhecimento promover a perda de massa e a deterioração da função fisiológica no músculo esquelético, bem como um pobre remodelamento dos tecidos. Sendo assim a compreensão do papel das MMPs no músculo esquelético é de fundamental importância para elucidar as funções fisiológicas na homeostase de fibras musculares e da matriz extracelular (Prestes et al., 2009).

Este é o primeiro estudo a analisar o efeito do treinamento de força sobre a atividade das MMP-2 no músculo esquelético de ratos velhos, no entanto nossos resultados corroboram com outras investigações que avaliaram a influência do treinamento sobre a atividade MMP-2 em músculo esquelético de modelos patológicos de ratos. Por exemplo, Souza et al. 2014 relataram que o TF (12 semanas, 3 vezes por semana) contribuem para aumentar a atividade de MMP-2 nos bíceps e músculos gastrocnêmios de ratos obesos, que impedem os efeitos deletérios do consumo de uma dieta rica em gorduras em músculo esquelético. Da mesma forma, Prestes et al. 2009 observou um benefício adicional do TF (12 semanas, 3 vezes por semana) sobre a atividade de MMP-2 no sóleo, tibial anterior, extensor longo dos dedos e gastrocnêmio em um modelo com hipoestrogenismo.

Em outro estudo, Kim e Yi. 2015 investigaram os efeitos do treinamento único (30 min / dia, 5 dias / semana, durante 6 semanas) e do treinamento intermitente (três vezes

durante 10 min / dia, 5 dias / semana, durante 6 semanas) sobre a expressão de MMP-2 no extensor longo dos dedos e músculo sóleo de ratos jovens e velhos. O treinamento físico foi realizado numa esteira a uma velocidade de 15 m / min (jovens) ou 10 m / min (velhos) com uma inclinação de 5 °. Os autores demonstraram um aumento da expressão de MMP-2 em todos os grupos de exercício em comparação com grupos controle (Kim e Yi, 2015). No entanto, as discrepâncias metodológicas entre os atuais estudos devem ser destacados, como diferenças de intensidade, volume, tipo e duração dos protocolos de treinamento empregados, além de Kim e Yi. 2015 utilizarem diferentes graus de estimulação mecânica entre ratos jovens e velhos.

Várias evidências científicas têm mostrado que a desorganização do colágeno da lâmina basal no músculo envelhecido fornece uma reduzida resistência de elasticidade e de miofibrilas, o que pode comprometer a transmissão da força de tração do músculo para os tendões (Kragstrup et al., 2011), (Zotz et al. 2016) e (Wood e Brooks, 2016). Neste aspecto, a MMP-2 desempenha um papel central no modelamento das funções fisiológicas e a homeostase do tecido, indicando um remodelamento favorável das fibras musculares e de tecido conjuntivo. Esta enzima é responsável por mudanças no colágeno tipo IV da lâmina basal, que é fundamental para o movimento articular, resposta elástica passiva do tecido na contração muscular (Pette, 2001) e apoiar o desenvolvimento da força muscular após aplicação de carga mecânica (Takala e Virtanen, 2000). Portanto, o aumento local da atividade de MMP-2 induzida por TF é considerado mecanismo importante para a adaptação do músculo e pode ser importante para atenuar efeitos deletérios associados à idade.

A MMP-2 está envolvida no crescimento e desenvolvimento de miofibrilas. Carmeli et al. 2004 relataram que esta enzima é importante para a reparação de micro-traumas e liberação de fatores de crescimento locais associados com matriz de proteoglicano (Carmeli et al., 2004) e (Tidball, 2005). Além disso, a estimulação da proliferação, diferenciação e migração de células satélite para os locais de lesão, onde elas se fundem uns aos outros permitindo a regeneração do tecido (Yamada et al., 2008). No entanto, a ligação entre a atividade de MMP-2 no envelhecimento muscular e ativação de células satélites em resposta ao TF continuam a ser determinados.

O estado inflamatório do envelhecimento influencia a inibição das células responsáveis pela hipertrofia, que contribuem para a sarcopenia. A perda de músculos esqueléticos relacionados à idade é resultado de múltiplos e complexos sistemas proteolíticos. Vários agentes inflamatórios tais como, citocinas (fator de necrose tumoral-alfa); produtos de glicação avançados (AGEs); MMPs, em conjunto com células de armazenamento de mediadores inflamatórios (mastócitos) estão associados com um "baixo grau de inflamação

crônica" inerente ao processo de envelhecimento (Payne, 2016). Dessa forma, esse mecanismo pode explicar o elevado conteúdo de MMP-2 no músculo de animais velhos. Essa informação pode ser complementada, pois Barani e colaboradores 2003 relatam que a manutenção de expressão de proteases com o envelhecimento pode garantir uma resposta adequada do músculo esquelético a insultos prejudiciais.

Podemos observar a diminuição do peso muscular comparando os ratos jovens com os velhos caracterizando assim a sarcopenia. Observamos melhora da sarcopenia associando os dados relativos a MMP-2 e o peso muscular, sendo que houve aumento do peso muscular (gastrocnêmio lateral, sóleo e flexor profundo dos dedos) nos animais treinados velhos comparando com os animais que só tem o fator envelhecimento como influencia.

Interessantemente, a MMP-9 não apresentou atividade local (nos músculos), sendo encontrada apenas no soro de todos os animais do grupo experimental, porém em menor atividade nos animais velhos. Nesse ponto de vista uma descoberta importante do presente estudo foi que os ratos velhos demonstraram uma menor atividade tanto da MMP-2 quanto da MMP-9 no soro, em comparação com ratos jovens. Atividade das gelatinases na circulação é importante para o envelhecimento, uma vez que está associado com a imunidade, progressão de tumores e apoptose (Nascimento et al., 2016). Em estudos clínicos em humanos, maiores níveis no soro de MMP-2 e 9 estão associados com a obesidade (Erman et al., 2016) o envelhecimento (Nascimento et al., 2016) e condições patológicas, tais como o diabetes Tipo 2, com ou sem doença arterial periférica (Signorelli et al., 2005) e câncer de colo-retal (Tutton et al., 2003). Estudos prévios revelaram que o exercício de forma aguda e crônica modifica a atividade de MMP-2 e MMP-9 no soro (Nascimento et al., 2016). Em modelos animais, recentemente Posa e colaboradores (2015) demonstraram que o exercício de corrida durante 6 semanas induziu uma diminuição da atividade de MMP-2 na circulação, melhorou a perfusão isolada do coração e a relação do tamanho do enfarte, o que pode ter efeitos benéficos para o envelhecimento.

Por outro lado, sugere-se, no atual estudo, que músculos de animais velhos estejam mais debilitados e por isso sujeito a uma maior demanda quando comparado com músculos de animais jovens, o que ajuda a esclarecer direção e maior fluxo das MMPs para o músculo esquelético dos grupos velhos treinados. Além disso, os granulócitos, neutrófilos e monócitos podem migrar a partir da circulação sanguínea para o tecido que necessita de uma maior atividade de MMP, atribuindo uma diminuição da secreção de MMP por estas células na circulação (Posa et al., 2015).

Algumas limitações do presente estudo devem ser destacadas, tais como a falha em não analisar citocinas inflamatórias, além de outras análises, como alterações morfológicas/ conteúdo de colágeno por já ter sido demonstrado em outro estudo.

## Conclusão

Este estudo propõe um entendimento do mecanismo de regulação das MMP-2 e 9 no músculo e no soro associado aos efeitos deletérios do envelhecimento. Por um lado, observamos que a MMP-2 aumenta seu conteúdo no músculo em detrimento ao envelhecimento e ao TF. Os músculos de animais velhos, foram mais sensíveis ao TF, com relação ao aumento do conteúdo de MMP-2 que os músculos de animais jovens. Talvez pelo fato da disponibilidade de MMP-2 ser maior nos músculos dos animais velhos que nos músculos dos animais jovens. Além disso, acredita-se que nos animais velhos o TF seja capaz de sessar a via proteolítica mediada pelo imobilismo e sarcopenia característica, além de estimular o *turnover* e remodelamento tecidual. O TF foi capaz de promover uma mobilização de proteases sistêmicas para os músculos em atividade nos animais jovens, indicando um mecanismo para otimizar e/ou manter o remodelamento muscular adequado.

## Referências

- 1- Aude E. Barani,<sup>1</sup> Anne-Cécile Durieux,<sup>1</sup> Odile Sabido,<sup>2</sup> and Damien Freyssenet. Age-related changes in the mitotic and metabolic characteristics of muscle-derived cells. *J Appl Physiol.* 2003; 95(5):2089-98.
- 2- Carmeli, E.; Moas, M.; Reznick, A,Z .; Coleman, R. Matrix Metalloproteinases And Skeletal Muscle: A Brief Review. *Muscle Nerve.* 2004; 29: 191–197.
- 3- Carmeli, E; Moas, M; Lennon, S; Powers, SK. High Intensity Exercises Increases Expression of Matrix Metaloproteinases in Fast Skeletal Muscle Fibras. *Exp Physiol.* 2005; 90(4): 613-619.
- 4- Cruz-Jentoft, A.J.,Baeyens, J.P., et al.. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing.* 2010; 39 (4), 412–423.
- 5- Da silveira barroso, D, Serrano barbosa, M.T, Caffarena, E.R, Sousa da silva, A. Caracterização do envelhecimento populacional no município do Rio de Janeiro: contribuições para políticas públicas sustentáveis . *Cad saúde colet.* 2016;24(1): 63-69.
- 6- Erman, H; Gelisgen, R; Cengiz, M; Tabak, O; Erdenen, F; Uzun, H. The association of vascular endothelial growth factor, metalloproteinases and their tissue inhibitors with cardiovascular risk factors in the metabolic syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(6):1015-1022.
- 7- Heinemeier KM, et al. Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. *J Appl Physiol.* 2009; 106: 178–186.
- 8- HWO. Relatório Mundial de Envelhecimento e Saúde, 2015
- 9- Kim, JS; Yi, HK. Intermittent bout exercise training down-regulates age-associated inflammation in skeletal muscles. *Exp Gerontol.* 2015;72:261-268.
- 10- Kjaer, M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiol Rev.* 2004; 84: 649-698.
- 11- Kragstrup, TW.; Kjaer, M.; Mackey A, L. Structural, biochemical, cellular, and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with aging. *Scand J Med Sci Sports,* 2011; 21: 749-757.
- 12- Marqueti, RC; Prestes, J; Stotzer,US; Paschoal, M; Leite, RD; Perez, S.E.A; H. S. Selistre de A HS. MMP-2, Jumping Exercise and Nandrolone in Skeletal Muscle. *Int J Sports Med.* 2008; 29: 559–563.
- 13- Michele silva, L, Oliveira silva, A, Rangel tura, L.F, Silva paredes moreira, M.A, Partezani rodrigues, R.A. Representações sociais sobre qualidade de vida para idosos. *Rev Gaucha Enfermagem.* 2012;33(1): 109-115.
- 14- Nascimento, Dda C; Navalta, JW; Durigan, JL; Marqueti, RC; Tibana, RA; Luiz Franco, O; et al. Acute eccentric resistance exercise decreases matrix metalloproteinase activity in obese elderly women. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2016; 36(2):139-145.
- 15- Pauline, A, Bautmans, I. The influence of strength training on muscle activation in elderly persons: A systematic review and meta-analysis. *Experimental Gerontology.* 2014;58(1): 58-68.
- 16- Payne GW. Effect of inflammation on the aging microcirculation: impact on skeletal muscle blood flow control. *Microcirculation.* 2016; 13(4): 343-52.
- 17- Peterson, M.D.,Rhea, M.R., et al. Resistance exercise for muscular strength in older adults: a meta-analysis. *Ageing Res. Rev.*2010; 9 (3), 226–237.
- 18- Pette, D. Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2001; 90(3):1119-1124.



- 19- Posa, A; Szabo, R; Kupai, K; Barath, Z; Szalai, Z; Csonka, A; et al. Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:876805.
- 20- Prestes, J; Marqueti, RC; Shiguemoto,GE; Leite, RD; et al. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*. 2009; 34: 700–706.
- 21- Ramaswamy KS<sup>1</sup>, Palmer ML, van der Meulen JH, Renoux A, Kostrominova TY, Michele DE, Faulkner JA. Lateral transmission of force is impaired in skeletal muscles of dystrophic mice and very old rats. *J Physiol*. 2011, 589(Pt 5):1195-208
- 22- Richard, D, Haiyan, Z. et al. Muscle expression of genes associates with inflammation, growth and remodeling is strongly correlated in older adults with resistance training outcomes. *Physiol Genomics*. 2009;38(1): 169-175.
- 23- Rullman, E; Rundqvist, H.; Wagsater,D.; Fischer,H.; Eriksson, P.; Sundberg, C,J.; Jansson, E.; Gustafsson, T. A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2007; 102: 2346–2351.
- 24- Signorelli, SS; Malaponte, G; Libra, M; Di Pino, L; Celotta, G; Bevelacqua, V; et al. Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. *Vasc Med*. 2005; 10(1):1-6.
- 25- Souza MV, Leite RD, Souza Lino AD, Marqueti Rde C, Bernardes CF, Araujo HS, et al. Resistance training improves body composition and increases matrix metalloproteinase 2 activity in biceps and gastrocnemius muscles of diet-induced obese rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2014;69(4):265-70.
- 26- Takala, TE; Virtanen, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports*. 2000; 10(6):321-325.
- 27- Tidball, JG. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *J Appl Physiol (1985)*. 2005; 98(5):1900-1908.
- 28- Tutton, MG; George, ML; Eccles, SA; Burton, S; Swift, RI; Abulafi, AM. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2003; 20;107(4):541-550.
- 29- Urso, M.L.; Pierce, J, R.; Alemany, J,A.; Harman, E,A.; Nindil, B,C. Effects of exercise training on the matrix metalloprotease response to acute exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2009; 106:655–663.
- 30- Wood, LK; Brooks, SV. Ten weeks of treadmill running decreases stiffness and increases collagen turnover in tendons of old mice. *J Orthop Res*. 2016; 34(2):346-53.
- 31- Yamada, M; Sankoda, Y; Tatsumi, R; Mizunoya, W; Ikeuchi, Y; Sunagawa, K; et al. Matrix metalloproteinase-2 mediates stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells in a nitric oxide-dependent manner. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(10):2183-2191.
- 32- Zotz, TG; Capriglione, LG; Zotz, R; Noronha, L; Viola De Azevedo, ML; Fiuza Martins, HR; et al. Acute effects of stretching exercise on the soleus muscle of female aged rats. *Acta Histochem*. 2016; 118(1):1-9.

**Anexos***1- Artigo***Resistance training promotes changes on matrix metalloproteinase activity in skeletal muscles and blood stream of old rats****ABSTRACT**

Aging is a complex multifactorial process characterized by accumulation of deleterious, including extracellular matrix. The aim of this study was to investigate the effects of twelve weeks of RT on MMP-2 and MMP-9 activity in skeletal muscles and serum of young and old rats. Twenty eight Wistar rats were randomly divided into four groups (n=7 per group): young (J); young that perform the training (JT); old (O); old that perform the training (OT). A 12-week resistance training period, during which the animals climbed a 1.1-m vertical ladder with weights secured to their tails, was used. The sessions were performed once every 3 days, with 8–12 dynamic movements per climb. The MMP-2 and MMP-9 activity was analyzed by zymography. There was higher active MMP-2 activity in lateral gastrocnemius and flexor digitorum profundus muscle in the OT group compared with the O, Y and YT ( $p \leq 0.001$ ). Moreover, there was higher active MMP-2 activity in medial gastrocnemius muscle in the OT group compared with the Y and YT ( $p \leq 0.001$ ). The Y group presented lower active MMP-2 activity in solues muscle than the YT, O, OT ( $p \leq 0.001$ ). With respect to serum active MMP- 2/9 activity, OT group was significantly reduced ( $p \leq 0.001$ ) compared to Y and YT. These results suggest that RT up-regulates MMP-2 activity in aging muscle, while down regulating MMP-2 and MMP-9 in the circulation, witch can favor to the maintenance of healthy tissue and immunity.

Keywords: aging, muscle remodeling, matrix metallopeptidase, exercise training, skeletal muscle.

## INTRODUCTION

Aging is a complex multifactorial process characterized by accumulation of deleterious changes at the cellular level in multiple systems including skeletal muscle, promoting loss of mass and deterioration of physiological function<sup>(1)</sup>. Amongst these deleterious changes, there is an increase in collagen concentration and the emergence of crosslinks between collagen fibers in the extracellular matrix (ECM)<sup>(2, 3)</sup>. The ECM surrounding skeletal muscle fibers provides structural support, protection and maintenance of the functional integrity of skeletal muscle through several mechanisms, including transmission of lateral strength between fibers and fascicles and passive elastic response in muscle contraction process<sup>(4)</sup>.

The modulation of ECM functions is controlled by matrix Metalloproteins (MMPs). MMPs are a family of enzyme Zn<sup>-</sup> or Ca<sup>2+</sup> dependent, that promote degradation and synthesis components of ECM, such as collagen, proteoglycans and glycoproteins during normal and pathological tissue remodeling<sup>(5)</sup>. Remodeling of the ECM surrounding skeletal muscle depends on the action of MMPs, specifically MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B), which promotes morphogenesis and angiogenesis<sup>(4, 6)</sup>. These enzymes stimulate release of local growth factors<sup>(7)</sup>, proliferation, differentiation and migration of satellite cells after damage<sup>(8)</sup> and local connective tissue homeostasis<sup>(9)</sup>. With respect to circulation, MMPs may be related with inflammatory condition, tumor progression and apoptosis<sup>(10)</sup>.

Nevertheless, it has been demonstrated that a increased collagen cross-links and possible reduction the expression or activity of MMP-2 in skeletal muscle, may result in an unfavorable imbalance in the remodeling process and favoring collagen disorganization in the aging<sup>(2)</sup>. Furthermore, the inflammatory profile of aging influences the inhibition of cells responsible for hypertrophy, which contribute to sarcopenia<sup>(1, 11)</sup>. Therefore, are necessary investigations of experimental strategies that prevent or attenuate these negative effects of aging on muscle physiology and immunity.

In this context, resistance training (RT) modulates MMP activity. Souza et al. 2014<sup>(12)</sup> and Prestes et al.2009<sup>(13)</sup> showed the increase in MMP-2 activity induced by RT in skeletal muscles in a model of obesity and hypoestrogenism. In addition, previous studies demonstrated that mechanical load promotes positive adaptations in the ECM and partially reverses the deleterious effects of aging through increased synthesis and accumulation of collagen I and III<sup>(14, 15)</sup>. Finnaly, Kragstrup et al.,2011<sup>(2)</sup> reported that RT contribute for

decreased the presence of crosslinks in the ECM brought about during the aging process, preserving cross-sectional area and force production. Although evidences indicate that RT favorably alters the remodeling of ECM, no studies have investigated the effects of RT on MMP activity in muscle skeletal and blood stream of old rats. This is information would be valuable to elucidate possible adaptive mechanisms induced by RT in the aging.

Thus, the aim of the present study was to investigate the effects of twelve weeks of RT on MMP-2 and MMP-9 activity in skeletal muscles and serum of young and old rats. Our hypothesis was that resistance exercise may minimize the deleterious effects of aging on skeletal muscle remodeling

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals and Experimental Groups**

All experiments were conducted in accordance with the principles and care procedures of the National Research Council (1998) to use of experimental animals and were approved by the Ethics Committee on Animal Research from the local University. We used 28 rats *Wistar Norvegicus* albinos 3 months (young, n = 14) and 20 months (old, n = 14) were kept at room temperature, between 22 and 24 ° C, with controlled light cycle 12 h (light / dark) with food and water ad libitum.. The rats were randomly divided into 4 groups (7 animals / group), in the following order: young (J); young that perform the training (JT); old (O); old that perform the training (OT).

### **Training Protocol**

During the 12 weeks of resistance training, climbing sessions were performed once every. Initially, the rats were adapted to the RT protocol, which required that the animals to climb a vertical ladder (1.1m X 0.18 m, 2-cm grid, 80° incline) with weights attached to their tails<sup>(16)</sup>. The size of the ladder induced the animals to perform 8–12 dynamic movements per climb. The load apparatus was secured to the tail by wrapping the proximal portion of the tail with a self-adhesive foam strip. With the load apparatus secured to the tail, the rats were placed at the bottom of the ladder and familiarized with climbing. If necessary, a stimulus was applied, with tweezers, to the animal's tail to initiate the movement. At the top of the ladder, the rats reached a housing chamber (20 x 20 x 20 cm), where they were allowed to rest for 120s. This procedure was repeated until the rats would voluntarily climb the ladder three

consecutive times without stimuli. Three days after familiarization, the first training session consisted of 4–8 ladder climbs with progressively heavier loads. The initial climb consisted of a load that was 75% of the animal's body mass. After this, an additional 30 g weight was added until a load was reached with which the rat could not climb the entire ladder. Failure was determined when the animal could not progress up the ladder after three successive stimuli to the tail. The highest load successfully carried the entire length of the ladder was considered to be the rat's maximal carrying capacity. After determining the maximum load capacity, training sessions consisted of four ladder climbs with 50%, 75%, 90%, and 100% of their maximal carrying capacity interspersed by 120 s of interval between each set. The resistance training protocol was adapted from Prestes et al., 2009<sup>(13)</sup>.

### **Euthanasia**

After 48h the end of the experimental period, the animals were euthanized using intraperitoneal injection of xylazine solution (12mg/Kg/peso body) and ketamine (95 mg/ kg / body weight).

### **Zymography**

**Muscles:** After euthanasia, the lateral and medial gastrocnemius, soleus, superficial and deep flexor of the fingers were removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 ° for later analysis. Muscle samples were homogenized and incubated in 0.5 ml extraction buffer (10mM cacodilic acid pH 5.0, 0.15 M NaCl, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.5 mM NaN<sub>3</sub>, Triton X-100 0, 01% [v / v]) at 4°C for 24 hours. After this period the solution was centrifuged (10 min., 13.000xg at 4 ° C).

**Blood Plasma:** The blood species are removed from the rat inferior vena cava and mixed with 3.2% solution of sodium citrate in a volume of 9:1. After 15 min centrifugation at 3000 rpm, the supernatant was recuperate. The samples containing 0.5 uL of plasma were added to 0.5 ul of SDS (8%) (v: v). Posteriorly, were passed in the vortexing and further added 10 uL of sample buffer without β-mercaptoethanol (reducing agent), containing SDS (20%).

The samples were resolved by electrophoresis in polyacrylamide gel containing SDS 10% and gelatin at a final concentration of 1mg/ml. After electrophoresis, the gels were washed twice in 2.5 % Triton X-100 to remove SDS and incubated in substrate buffer (50mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.02% NaN<sub>3</sub> ) at 37 °C for 20 h. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio -Rad ) for 1 ½ h and destained with acetic acid, metanol and water. The gelatinolytic activity was visualized as clear bands in the stained gel.

The gels were photographed with a Canon Power Shot G6 7.1 mega pixels and the average intensity of the bands will be analyzed using the software Gene Tools. Pro (latent), intermediate and active bands were identified via standard techniques using molecular weight criteria<sup>(5)</sup>.

### Statistical Analysis

The results were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). Kolmogorov - Smirnov and Levene's test were used to analyze the homogeneity of the variance. Then, we performed ANOVA two- way was used to compare skeletal muscles and plasma MMPs activity between the groups. When a significant difference was detected, the Tukey post hoc test was applied to identify the differences. An alpha level of  $p \leq 0.05$  was considered significant. The software package Statistica 6.1 (StatSoft Inc., Tulsa, Okla.) was used to statistical analysis. In addition, GraphPad Prism 6.0 software (San Diego, California) was also used for the graphics design.

## RESULTS

Medial gastrocnemius muscle (GAM) significant increase ( $p = 0.001$ ) MMP-2 Pro was observed in the O group compared to Y and YT, and the OT group showed the highest activity values when purchased with the other groups ( $p = 0.001$ ). The activity of active MMP-2 was increased in O and OT groups compared to Y and TY ( $p = 0.001$ ) groups (Fig. 1).

Lateral gastrocnemius muscle (GAL) showed that the O group significantly ( $p = 0.01$ ) increased the activity of MMP-2 pro when compared to group Y. Training significantly increased the level of pro-MMP groups YT ( $p = 0.01$ ) and OT ( $p = 0.01$ ) compared to Y and O, respectively, and the OT group was different from the others ( $p = 0.01$ ). Active MMP2 increased significantly only in the OT group compared to the other experimental groups ( $p = 0.001$ ; Fig.2).

Flexor Digitorum Profundos (FPD) increased activity of MMP2 pro in the O group compared to Y and YT ( $p = 0.001$ ) was observed. In the OT group, there was increased activity in relation to YT and Y ( $p = 0.001$ ). Regarding Active MMP, we observe significant increase in the OT group compared to all experimental groups ( $p = 0.001$ ) and higher activity of O ( $p = 0.04$ ) group compared to the group Y and YT (fig.3).

The Soleus (SO) muscle showed high activity of MMP2 Pro ( $p = 0.01$ ) in the YT group compared to Y, as in O and OT compared to Y and YT ( $p = 0.01$ ). All experimental

groups increased ( $p = 0.001$ ) the activity of active MMP-2 compared to group Y, with no difference between them ( $p > 0.05$ ) (Fig.4).

With respect to the analysis of serum pro MMP2 activity YT group was significantly reduced ( $p = 0.001$ ) compared to Y. The groups O and OT activity also reduced compared to Y and YT ( $p = 0.001$ ) groups. Similar results were found in the active MMP-2 activity. YT group reduced the activity significantly ( $p = 0.001$ ) compared to Y. The groups O and OT activity also reduced compared to Y and YT ( $p = 0.001$ ) groups. The activity of MMP-9 in the serum showed a significant reduction ( $p = 0.001$ ) compared to the YT, Y, as well as O and OT compared to the Y and YT, respectively ( $p = 0.001$ ) (Fig. 5).

## DISCUSSION

The objective of the present study was to investigate the effects of twelve weeks of RT on MMP-2 and MMP-9 activity in skeletal muscles and serum of young and old rats. The main findings confirmed the initial hypothesis, revealing that RT resulted in increased activity of active-MMP-2 activity in skeletal muscle of old rats. In addition, RT promote in old rats a lower activity of MMP-2 and -9 in serum as compared with young rats.

The clinical relevance of our findings is based on the fact that effects deleterious of aging promoting loss of mass and deterioration of physiological function in skeletal muscle, as well an unfavorable tissue remodeling. In the aspect, the understanding of MMPs in skeletal muscle is of fundamental importance to elucidate the physiological functions in the homeostasis of muscle fibers and of the extracellular matrix.

To the best of our knowledge, this is the first study to analyze the effects resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle of old rats, however ours results corroborate with other investigations that evaluated the influence of training on activity MMP-2 in skeletal muscles of pathological rat models. For example, Souza et al. 2014<sup>(12)</sup> reported that RT (12 weeks, 3 times per week) RT contribute to increase of MMP-2 activity in the biceps and gastrocnemius muscles of obese rats, which preventing the deleterious effects of consumption of a high-fat diet in skeletal muscle. Similarly, Prestes et al. 2009<sup>(13)</sup> observed an additional benefit of RT (12 weeks, 3 times per week) on MMP-2 activity in soleus, tibial anterior and extensor digitorum longus muscles in a model of hypoestrogenism.

In another study, Kim and Yi. 2015<sup>(17)</sup> investigated the effects of single bout (30 min/day, 5 days/week for 6 weeks) and intermittent bout (three times for 10 min/day, 5 days/week for 6 weeks) on expression of MMP-2 in extensor digitorum longus and soleus muscle of young and old rats. The exercise training was carried out a treadmill at a speed of

15 m/min (young) or 10 m/min (old) with a slope of 5°. The authors demonstrated an increased expression of MMP-2 in all exercise groups as compared with control groups. However, the discrepancies methodological between the present studies should be highlighted, such as differences in intensity, volume, type and duration of the training protocols employed, besides Kim and Yi. 2015<sup>(17)</sup> used different degrees of mechanical stimulation between young and old rats.

The sarcolemma has an associated external basal lamina that provides structural support and maintaining the physiological integrity of the myofibers, moreover has a major role in muscle fiber repair after injury or exercise<sup>(4)</sup>. However, several scientific evidences have shown that the collagen disorganization of basal lamina in aging muscle provides reduced elasticity and resistance of myofibrils, which may compromise the transmission of tensile muscle strength to the tendons<sup>(2, 14, 15)</sup>. In this aspect, MMP-2 plays a central role on modulation of physiological functions and tissue homeostasis, indicating a favorable remodeling of muscle fibers and connective tissue. This enzyme is responsible for changes in type IV collagen of the basal lamina, which is fundamental to joint movement, the passive elastic response of the tissue in muscle contraction<sup>(18)</sup> and assisting muscle force development after mechanical loading<sup>(19)</sup>. Therefore, the local increase of MMP-2 activity induced by RT is considered substantial mechanisms to muscle adaptation and can be important to attenuate deleterious effects age-associated.

Additionally, inflammatory state in aging influence the inhibition of cells responsible for hypertrophy, which contribute to sarcopenia. The loss of age-related skeletal muscles are results from multiple and complex proteolytic systems. MMP-2 is involved in growth and development of myofibrils. Carmeli et al. 2004<sup>(4)</sup> reported that this enzyme is important to repair of micro-traumas and release of local growth factors associated with proteoglycan matrix<sup>(20)</sup>. In addition, stimulating the proliferation, differentiation and migration of satellite cells to sites of injury, where they fuse to each other or to damaged fibrils, which allows tissue regeneration<sup>(21)</sup>. However, the link between MMP-2 activity in muscle aging and state activation of satellite cells in response RT remain to be determined.

An important finding of the present study was that old rats demonstrated a lower activity of MMP-2 and -9 in serum as compared with young rats. Activity of gelatinases in circulation is important for aging, since it is associated with immunity, tumor progression and apoptosis<sup>(22)</sup>. In clinical human studies, higher levels serum of MMP-2 and 9 are associated with obesity<sup>(23)</sup>, aging<sup>(22)</sup> and pathological conditions such as type II diabetic patients with and without peripheral arterial disease<sup>(24)</sup> and colorectal cancer<sup>(25)</sup>. Previous investigations revealed that exercise acutely and chronically modifies MMP-2 and MMP-9 serum



activity<sup>(22)</sup>. In animal models, recently Posa et al. 2015<sup>(26)</sup> demonstrated that voluntary wheel-running exercise for 6 weeks induced a decreased of MMP-2 activity in circulation, improved the isolated heart perfusion and the ratio of infarct size, which can have beneficial effects for aging.

On the other hand, the training requires more of muscle aging when compared with young, which clarifies a direction of flow of MMPs for skeletal muscle. In addition, neutrophil granulocytes and monocytes can migrate from the bloodstream into tissue that requires greater activity of MMPs, attributing a decrease of MMP secretion by these cells in the circulation.

Some limitations of the present study should be highlighted, such as the inability to analyze protein expression levels of MMP and inflammatory cytokines. Additionally, other analyses, such as gene expression and morphological changes of collagen and cross-sectional was demonstrated in other studies.

In summary, this study proposes an additional mechanism for prevented of effects deleterious associate with the aging. These results suggest that RT upregulates MMP-2 activity in gastrocnemius, flexor digitorum profundos and soleus muscles, however downregulates MMP-2 and MMP-9 activity in circulation of old rats. Future studies that include mechanism related the hypertrophy and human subjects are necessary to increase our understanding of the effects of modified MMP-2 activity on aging and exercise.

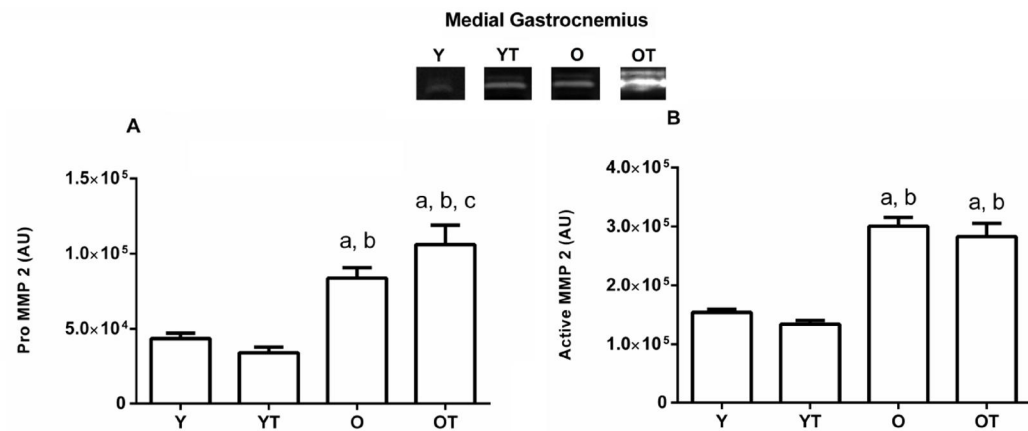
## References

1. Joannisse S, Nederveen JP, Snijders T, McKay BR, Parise G.(2016) Skeletal Muscle Regeneration, Repair and Remodelling in Aging: The Importance of Muscle Stem Cells and Vascularization. *Gerontology*.
2. Kragstrup TW, Kjaer M, Mackey AL. (2011) Structural, biochemical, cellular, and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with aging. *Scand J Med Sci Sports*. 21(6):749-57.
3. Doria E, Buonocore D, Focarelli A, Marzatico F.(2012) Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxid Med Cell Longev*.830257.
4. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. (2004) Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve*. 29(2):191-7.
5. Marqueti RC, Prestes J, Stotzer US, Paschoal M, Leite RD, Perez SE, et al. (2008) MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. *Int J Sports Med*. 29(7):559-63.
6. Deus AP, Bassi D, Simoes RP, Oliveira CR, Baldissera V, Marqueti Rde C, et al. (2012) MMP(-2) expression in skeletal muscle after strength training. *Int J Sports Med*. 33(2):137-41.
7. Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Schjerling P, Baldwin KM, Kjaer M. (2009) Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. *J Appl Physiol* (1985). 106(1):178-86.
8. Kjaer M. (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev*. 84(2):649-98.
9. Chen X, Li Y. (2009) Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr*. 3(4):337-41.

10. Nascimento Dda C, Durigan Rde C, Tibana RA, Durigan JL, Navalta JW, Prestes J. (2015) The response of matrix metalloproteinase-9 and -2 to exercise. *Sports Med.* 45(2):269-78.
11. Jang YC, Van Remmen H. (2011) Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol.* 46(2-3):193-8.
12. Souza MV, Leite RD, Souza Lino AD, Marqueti Rde C, Bernardes CF, Araujo HS, et al. (2014) Resistance training improves body composition and increases matrix metalloproteinase 2 activity in biceps and gastrocnemius muscles of diet-induced obese rats. *Clinics (Sao Paulo).* 69(4):265-70.
13. Prestes J, de Cassia Marqueti R, Shiguemoto GE, Leite RD, Pereira GB, Selistre-de-Araujo HS, et al. (2009) Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 34(4):700-6.
14. Zotz TG, Capriglione LG, Zotz R, Noronha L, Viola De Azevedo ML, Fiuza Martins HR, et al. (2016) Acute effects of stretching exercise on the soleus muscle of female aged rats. *Acta Histochem.* 118(1):1-9.
15. Wood LK, Brooks SV. (2016) Ten weeks of treadmill running decreases stiffness and increases collagen turnover in tendons of old mice. *J Orthop Res.* 34(2):346-53.
16. Prestes J, Leite RD, Pereira GB, Shiguemoto GE, Bernardes CF, Asano RY, et al. (2012) Resistance training and glycogen content in ovariectomized rats. *Int J Sports Med.* 33(7):550-4.
17. Kim JS, Yi HK. (2015) Intermittent bout exercise training down-regulates age-associated inflammation in skeletal muscles. *Exp Gerontol.* 72:261-8.
18. Pette D. (2001) Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 90(3):1119-24.
19. Takala TE, Virtanen P. (2000) Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports.* 10(6):321-5.
20. Tidball JG. (2005) Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *J Appl Physiol* (1985). 98(5):1900-8.
21. Yamada M, Sankoda Y, Tatsumi R, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Sunagawa K, et al. (2008) Matrix metalloproteinase-2 mediates stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells in a nitric oxide-dependent manner. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(10):2183-91.
22. Nascimento Dda C, Navalta JW, Durigan JL, Marqueti Rde C, Tibana RA, Luiz Franco O, et al. (2016) Acute eccentric resistance exercise decreases matrix metalloproteinase activity in obese elderly women. *Clin Physiol Funct Imaging.* 36(2):139-45.
23. Erman H, Gelisgen R, Cengiz M, Tabak O, Erdenen F, Uzun H. (2016) The association of vascular endothelial growth factor, metalloproteinases and their tissue inhibitors with cardiovascular risk factors in the metabolic syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 20(6):1015-22.
24. Signorelli SS, Malaponte G, Libra M, Di Pino L, Celotta G, Bevelacqua V, et al. (2005) Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. *Vasc Med.* 10(1):1-6.
25. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, Abulafi AM. (2003) Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 20;107(4):541-50.
26. Posa A, Szabo R, Kupai K, Barath Z, Szalai Z, Csonka A, et al. (2015) Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2. *Oxid Med Cell Longev.* 876805.

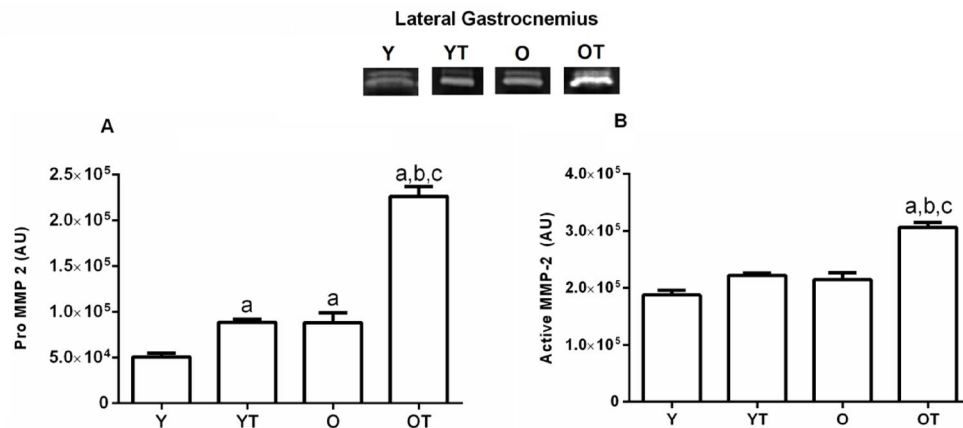
## FIGURES

Figure 1



**Fig. 1** Optical densitometry of zymographic bands of MMP-2 in arbitrary units in muscle medial gastrocnemius (MG). The data are mean  $\pm$  standard deviation. The experimental groups were represented young (Y) trained young (TY), senile (S) and senile trained (TS). Figure 4A represents Pro MMP-2 (72 kDa), Figure 4B: represents active MMP-2 (64 kDa). a =  $P < 0,05$ : Compared to Young, b =  $p < 0,05$ : compared to the group trained yang, c =  $p < 0,05$ : compared to senile.

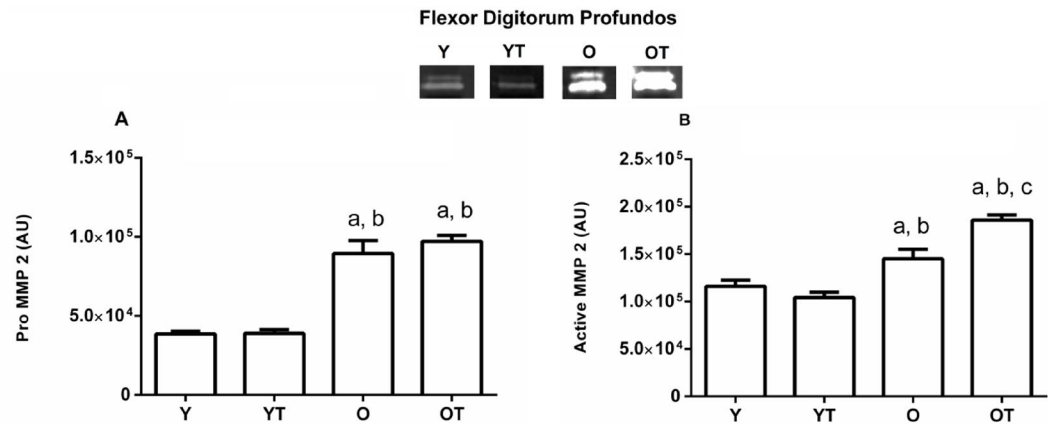
Figure 2



**Fig. 2** Optical densitometry of zymographic bands of MMP-2 in arbitrary units (AU) in muscle lateral gastrocnemius (LG). The data are mean  $\pm$  standard deviation. The experimental

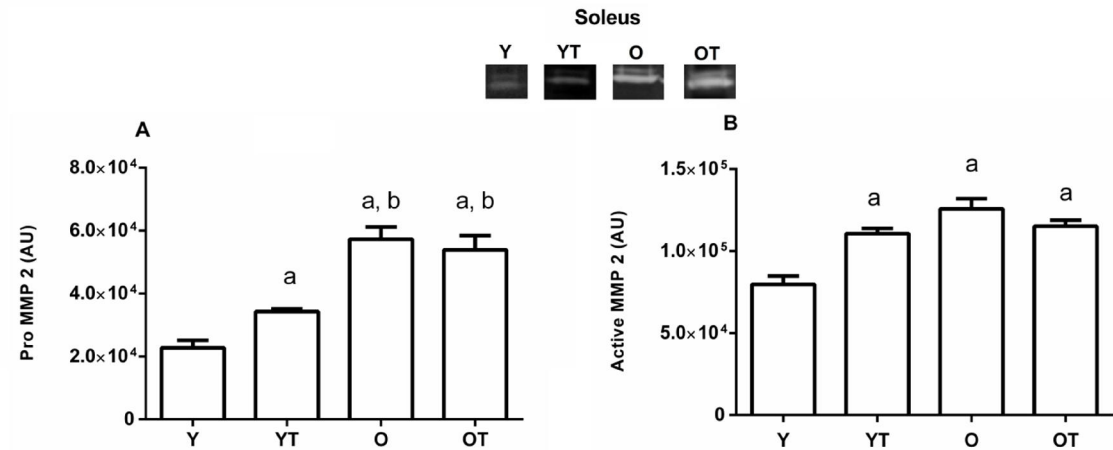
groups were represented young (Y) trained young (TY), senile (S) and senile trained (TS). Figure 1A represents Pro MMP-2 (72 kDa), Figure 1b: represents active MMP-2 (64 kDa). a =  $P < 0,05$ : Compared to Young, b =  $p < 0,05$ : compared to the group trained yang, c =  $p < 0,05$ : compared to senile.

**Figure 3**



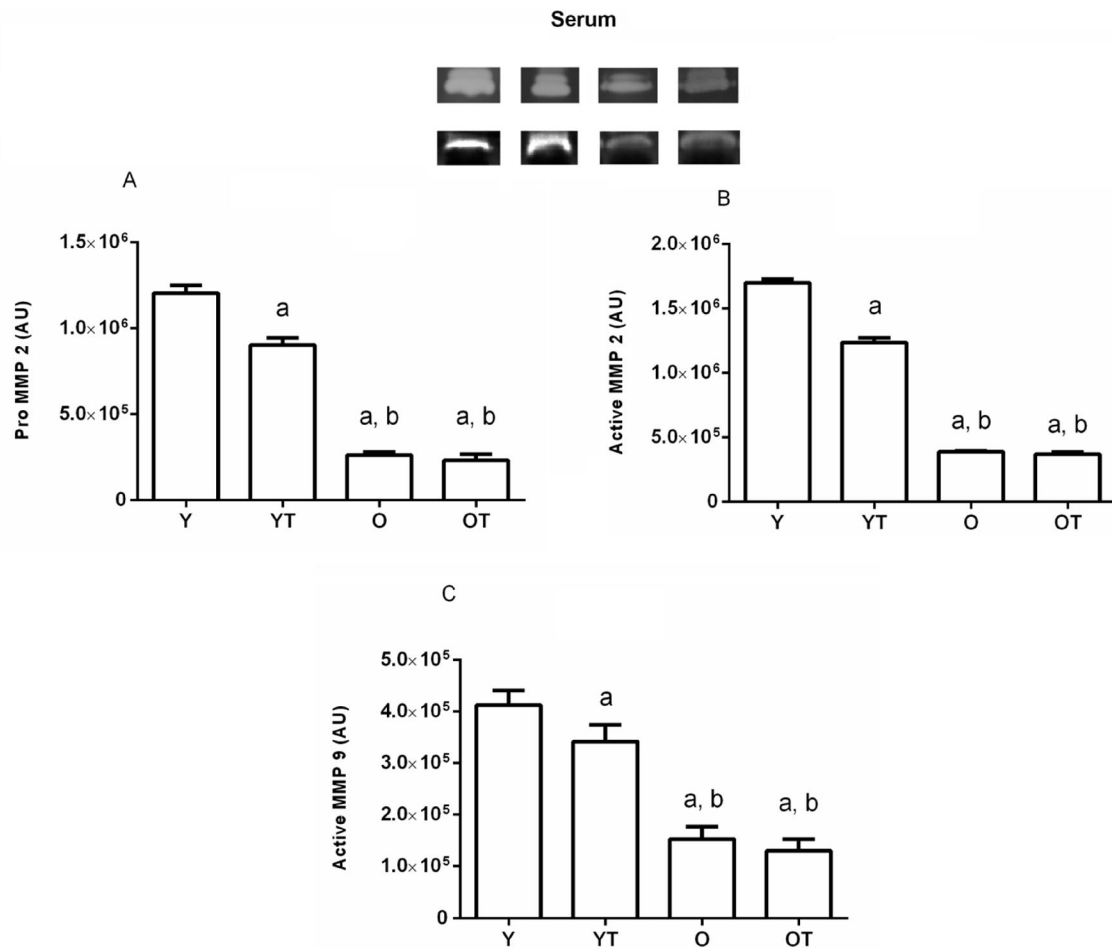
**Figure 3** Optical densitometry of zymographic bands of MMP-2 in arbitrary units in muscle flexor digitorum profundus (FDP). The data are mean  $\pm$  standard deviation. The experimental groups were represented young (Y) trained young (TY), senile (S) and senile trained (TS). Figure 2A represents Pro MMP-2 (72 kDa), Figure 2b: represents active MMP-2 (64 kDa). a =  $P < 0,05$ : Compared to Young, b =  $p < 0,05$ : compared to the group trained yang, c =  $p < 0,05$ : compared to senile.

Figure 4



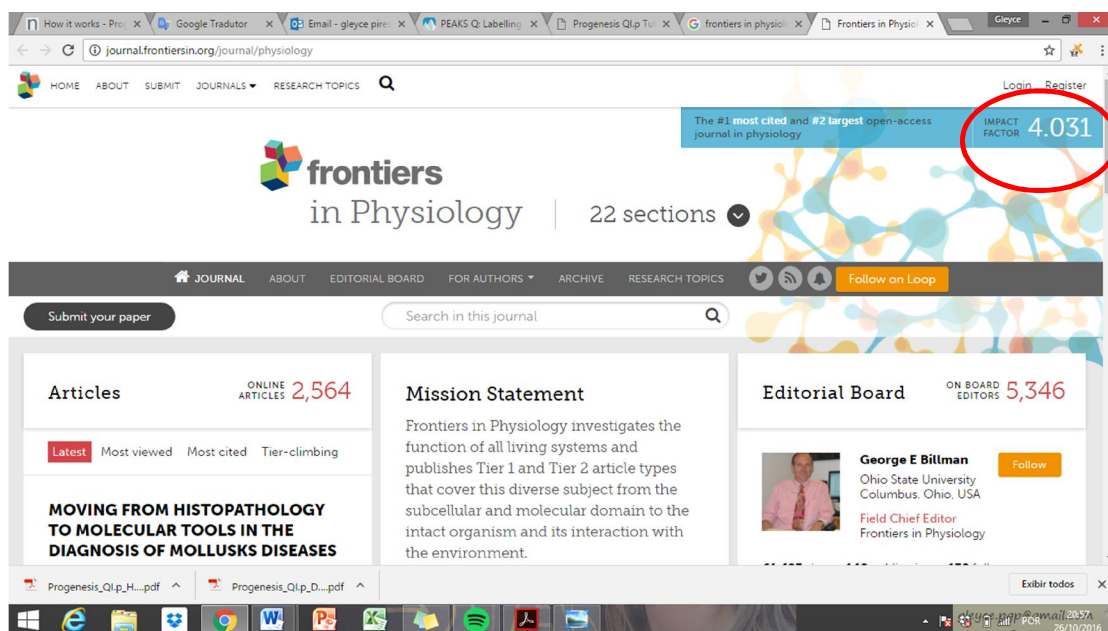
**Figure 4** Optical densitometry of zymographic bands of MMP-2 in arbitrary units in muscle Soleus (S). The data are mean  $\pm$  standard deviation. The experimental groups were represented young (Y) trained young (TY), senile (S) and senile trained (TS). Figure 3A represents Pro MMP-2 (72 kDa), Figure 3B: represents active MMP-2 (64 kDa). a =  $p < 0,05$ : Compared to Young.

Figure 5



**Fig. 5** Optical densitometry of zymographic bands of MMP-2 and MMP-9 in arbitrary units in Serum. The data are mean  $\pm$  standard deviation. The experimental groups were represented young (Y) trained young (TY), senile (S) and senile trained (TS). Figure 4A represents Pro MMP-2 (72 kDa), Figure 4B: represents active MMP-2 (64 kDa). a = P <0,05: Compared to Young, b= p <0,05: compared to the group trained yang.

## 2. Fator de impacto do Periódico



The screenshot displays the homepage of the journal "Frontiers in Physiology". The URL in the browser is [journal.frontiersin.org/journal/physiology](http://journal.frontiersin.org/journal/physiology). The page features a navigation bar with links for HOME, ABOUT, SUBMIT, JOURNALS, and RESEARCH TOPICS. A prominent blue banner at the top right states "The #1 most cited and #2 largest open-access journal in physiology" and displays the "IMPACT FACTOR 4.031", which is circled in red. Below the banner, the journal's logo and "22 sections" are visible. A secondary navigation bar includes links for JOURNAL, ABOUT, EDITORIAL BOARD, FOR AUTHORS, ARCHIVE, and RESEARCH TOPICS, along with social media icons and a "Follow on Loop" button. A search bar is located below the navigation bar. The main content area is divided into three columns: "Articles" with 2,564 online articles, "Mission Statement" describing the journal's focus on living systems, and "Editorial Board" with 5,346 on-board editors. A featured article titled "MOVING FROM HISTOPATHOLOGY TO MOLECULAR TOOLS IN THE DIAGNOSIS OF MOLLUSKS DISEASES" is highlighted. The bottom of the page shows a Windows taskbar with various application icons and a system tray with the date 26/10/2016.

### 3. Normas de publicação da revista

Revista: *Frontiers in Physiology*

#### Author Guidelines

#### Article Type

Frontiers requires authors to carefully select the appropriate article type for their manuscript, and to comply to the article type descriptions defined in the journal's "Article Types", which can be seen from the "For Authors" menu on any Frontiers journal page. **Please pay close attention to the word count limits.** *Focused Reviews, Frontiers Commentaries and Grand Challenge articles* are invited by the chief editor and cannot be part of any Frontiers Research Topic. Unless you were contacted by the chief editor or the editorial office regarding the submission of a paper selected for tier 2 promotion, do not submit a Focused Review or a Frontiers Commentary - instead, submit a Review or a General Commentary.

#### Manuscript Length

Frontiers encourages its authors to closely follow the article word count lengths given in the Summary Table. The manuscript length includes only the main body of the text, footnotes and all citations within it, and excludes abstract, section titles, figure and table captions, funding statements, acknowledgements and references in the bibliography. Please indicate the number of words and the number of figures included in your manuscript on the first page.

#### Language Editing

Frontiers requires manuscripts submitted to meet international standards for English language to be considered for publication.

#### Language Style

Authors are requested to follow American English spelling. For any questions regarding style Frontiers recommends authors to consult the Chicago Manual of Style.

#### Title

The title is written in title case, centered, and in 16 point bold Times New Roman font at the top of page.

The title should be concise, omitting terms that are implicit and, where possible, be a statement of the main result or conclusion presented in the manuscript. Abbreviations should be avoided within the title.



Witty or creative titles are welcome, but only if relevant and within measure. Consider if a title meant to be thought-provoking might be misinterpreted as offensive or alarming. In extreme cases, the editorial office may veto a title and propose an alternative.

#### Authors and Affiliations

All names are listed together and separated by commas. Provide exact and correct author names as these will be indexed in official archives. Affiliations should be keyed to the author's name with superscript numbers and be listed as follows: Laboratory, Institute, Department, Organization, City, State abbreviation (USA, Canada, Australia), and Country (without detailed address information such as city zip codes or street names).

**Example:** Max Maximus, Department of Excellence, International University of Science, New York, NY, USA.

The Corresponding Author(s) should be marked with an asterisk. Provide the exact contact email address of the corresponding author(s) in a separate section.

#### Correspondence:

Max

Maximus

[maximus@gmail.com](mailto:maximus@gmail.com)

If any authors wish to include a change of address, list the present address(es) below the correspondence details using a unique superscript symbol keyed to the author(s) in the author list.

#### Headings and Sub-headings

Except for special names (e.g. GABAergic), capitalize only the first letter of headings and subheadings. Headings and subheadings need to be defined in Times New Roman, 12, bold. You may insert up to 5 heading levels into your manuscript (not more than for example: 3.2.2.1.2 **Heading title**).

#### Abstract

As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. In the abstract, minimize the use of abbreviations and do not cite references. The text of the abstract section should be in 12 point normal Times New Roman. See Summary Table for abstract requirement and length according to article type.

For Clinical Trial article types, please include the Unique Identifier and the URL of the publicly accessible website on which the trial is registered.

#### Keywords

**All article types:** you may provide up to 8 keywords; at least 5 are mandatory.

## Text

The body text is in 12 point normal Times New Roman. New paragraphs will be separated with a single empty line. The entire document should be single-spaced and should contain page and line numbers in order to facilitate the review process. Your manuscript should be written using either LaTeX or MS-Word.

## Sections

Your manuscript is organized by headings and subheadings. For Original Research Articles, Clinical Trial Articles, and Technology Reports the section headings should be those appropriate for your field and the research itself.

For Original Research Articles, it is recommended to organize your manuscript in the following sections or their equivalents for your field:

- 1. Introduction**

Succinct, with no subheadings.

- 2. Material and Methods**

This section may be divided by subheadings. This section should contain sufficient detail so that when read in conjunction with cited references, all procedures can be repeated. For experiments reporting results on animal or human subject research, an ethics approval statement should be included in this section.

- 3. Results**

This section may be divided by subheadings. Footnotes should not be used and have to be transferred into the main text.

- 4. Discussion**

This section may be divided by subheadings. Discussions should cover the key findings of the study: discuss any prior art related to the subject so to place the novelty of the discovery in the appropriate context; discuss the potential short-comings and limitations on their interpretations; discuss their integration into the current understanding of the problem and how this advances the current views; speculate on the future direction of the research and freely postulate theories that could be tested in the future.

## References

All citations in the text, figures or tables must be in the reference list and vice-versa. The references should only include articles that are published or accepted. Data sets that have been deposited to an online repository should be included in the reference list, include the version and unique identifier when available. For accepted but unpublished works use "in press" instead of page numbers. Unpublished data, submitted manuscripts, or personal communications should be cited within the text only, for the article types that allow such inclusions. Personal communications should be documented by a letter of permission. Website urls should be included as footnotes. Any inclusion of verbatim text must be contained in quotation marks and clearly reference the original source.

The following formatting styles are meant as a guide, as long as the full citation is complete and clear, Frontiers referencing style will be applied during typesetting.

- **SCIENCE, ENGINEERING, and HUMANITIES: For articles submitted in the domains of SCIENCE, ENGINEERING and HUMANITIES please apply Author-Year system for in-text citations.**

Reference list: provide the names of the first six authors followed by et al and doi when available.

In-text citations should be called according to the surname of the first author, followed by the year. For works by 2 authors include both surnames, followed by the year. For works by more than 2 authors include only the surname of the first author, followed by *et al.*, followed by the year. For Humanities and Social Sciences articles please include page numbers in the in-text citations.

**Article in a print journal:**  
Sondheimer, N., and Lindquist, S. (2000). Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell*.5, 163-172.

**Article in an online journal:**  
Tahimic, C.G.T., Wang, Y., Bikle, D.D. (2013). Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front. Endocrinol.* 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

**Article or chapter in a book:**  
Sorenson, P. W., and Caprio, J. C. (1998). "Chemoreception," in *The Physiology of Fishes*, ed. D. H. Evans (Boca Raton, FL: CRC Press), 375-405.

**Book:**  
Cowan, W. M., Jessell, T. M., and Zipursky, S. L. (1997). *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press.

**Abstract:**  
Hendricks, J., Applebaum, R., and Kunkel, S. (2010). A world apart? Bridging the gap between theory and applied social gerontology. *Gerontologist* 50, 284-293. Abstract retrieved from Abstracts in Social Gerontology database. (Accession No. 50360869)

**Patent:**

Marshall, S. P. (2000). *Method and apparatus for eye tracking and monitoring pupil dilation to evaluate cognitive activity*. U.S. Patent No 6,090,051. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

**Data:**

Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of Ulms minor's transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository. (2015) <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

**Theses****and****Dissertations:**

Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

#### 4 Aprovação no Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[ceua@ufscar.br](mailto:ceua@ufscar.br) - [www.propq.ufscar.br](http://www.propq.ufscar.br)

---

Protocolo nº. 056/2010

A Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos – CEUA/UFSCar analisou e **APROVOU** “ad referendum” o pedido formulado pelo (a) pesquisador (a) *Rita de Cassia Marqueti* referente ao projeto “*Matriz extracelular no envelhecimento e suas adaptações ao treinamento de força no tendão calcâneo de ratos: abordagem molecular, celular e biomecânica.*”.

São Carlos, 1 de março de 2011.

  
Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais