

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA**

**CARLOS HENRIQUE DE LEMOS MULLER**

**RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO E DA RAZÃO HSPA1A  
EXTRA/INTRACELUAR EM LEUCÓCITOS DE INDIVÍDUOS IDOSOS E DE MEIA  
IDADE SUBMETIDOS A TREINAMENTO DE FORÇA**

**PORTO ALEGRE  
2018**

**CARLOS HENRIQUE DE LEMOS MULLER**

**RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO E DA RAZÃO HSPA1A  
EXTRA/INTRACELULAR EM LEUCÓCITOS DE INDIVÍDUOS IDOSOS E DE  
MEIA IDADE SUBMETIDOS A TREINAMENTO DE FORÇA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Maurício da Silva Krause

**PORTO ALEGRE  
2018**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família pelo apoio em todos os momentos dessa caminhada.

Agradeço as pessoas que desde a graduação me incentivaram para seguir a carreira acadêmica, em especial, ao Jerri, Thiago Ramis e Francesco Bueno. Sem o incentivo deles provavelmente não estaria aqui hoje.

As pessoas que, de alguma forma, auxiliaram na execução do projeto. Nas coletas de sangue, ao Francesco, Rodrigo e aos técnicos da UFRGS, e nas avaliações, ao Pedro e Juliano.

Ao meu orientador, Maurício Krause, por ter me aceito como aluno sem me conhecer e pela confiança depositada em mim.

A todas as pessoas do laboratório que, de alguma forma, me ajudaram na realização do projeto, em especial, a Helena, Gisele, Marcela, Jerônimo e Maria Inês. A ajuda de todos eles foi fundamental para o andamento do projeto.

## Resumo

**Justificativa:** O processo de envelhecimento está associado com o aumento demasiado na produção das espécies reativas de oxigênio (EROS). Dentre as estratégias que as células desenvolveram ao longo da evolução para combater o estresse celular, destacam-se as proteínas de choque térmico (HSP). Em especial, a HSPA1A (HSP72) é importante para recuperação de proteínas danificadas, impedindo a agregação das mesmas no citoplasma. O processo de envelhecimento parece estar associado a um declínio nos níveis das HSPs, resultando na perda do controle da proteostase, atrofia muscular, resistência à insulina e incapacidade de reparo após dano. Já é demonstrado na literatura que o exercício físico aumenta a expressão de HSPA1A, o que, possivelmente, exerce função protetora durante o envelhecimento e reduz a inflamação sistêmica clássica encontrada em idosos. Mais recentemente, tem se verificado que HSPA1A pode ser encontrada tanto dentro quanto fora das células, apresentando funções diferentes. Intracelularmente (iHSP70), apresenta função protetora, anti-inflamatória e anti-apoptótica, enquanto que no meio extracelular (eHSP70) apresenta um importante papel imunológico, com função pró-inflamatória e pró-apoptótica.

**Objetivos:** A presente dissertação está dividida em três partes distintas, denominados como estudos 1, 2 e 3. No primeiro estudo, o objetivo foi comparar a resposta ao choque térmico (leucócitos expostos a temperatura elevada – 42° C por 2 horas) em diferentes populações: indivíduos de meia-idade, idosos e idosos com diabetes do tipo 2. No segundo estudo, o objetivo foi verificar a influência de um protocolo de treinamento de força na relação da HSPA1A extra e intracelular em leucócitos, do dano oxidativo, das adaptações neuromusculares e morfológicas, em indivíduos de meia-idade. Finalmente, no último estudo, serão mostrados dados preliminares da resposta de indivíduos idosos ao mesmo protocolo e parâmetros do estudo dois.

**Metodologia:** No primeiro estudo os voluntários foram divididos em três grupos: Meia Idade (49,36±3,61 anos), Idosos (63,57±3,25 anos) e Idosos Diabéticos (68,9± 7,8 anos; HbA1c 7±0,67 %). Foram realizadas coletas de sangue para posterior indução ao choque térmico e avaliação da eHSP70. Nos estudos dois e três, indivíduos de meia-idade (40-59 anos) e idosos (60-75 anos), respectivamente, foram randomicamente alocados nos grupos Controle ou Treinado. O treinamento durou doze semanas com frequência de três vezes por semana. Cada sessão de treinamento incluía nove exercícios de força tanto para membros inferiores quanto superiores e três exercícios funcionais (subir um lance de escadas, sentar e levantar e subir e descer de uma caixa). Antes e após esse período foram realizadas coletas de sangue para posterior análise da HSPA1A extracelular e intracelular em leucócitos, avaliação de peroxidação lipídica (TBARS), atividade antioxidante (SOD e CAT), nitritos e do perfil lipídico. Foram realizadas avaliações de composição corporal, força e teste de consumo máximo de oxigênio.

**Resultados:** A resposta ao choque térmico (avaliada pela capacidade das células em exportar eHSP70 quando submetidas a uma temperatura elevada) parece ser igual entre indivíduos de meia-idade e idosos saudáveis. Curiosamente, em indivíduos idosos e com diabetes, esta resposta parece estar bloqueada, indicando que a resistência à insulina e o diabetes tem um papel dominante na capacidade da resposta ao estresse. Quando indivíduos de meia-idade (estudo 2) foram submetidos ao treinamento de força, os mesmos responderam com ganhos de força, melhora da capacidade funcional e aumentos na massa muscular. No entanto, a resposta ao choque térmico (eHSP70 e iHSP70) não foi modificada pelo treinamento, possivelmente pelo fato de que esta se

encontrava normal. Os dados preliminares do estudo 3 mostram que, em idosos saudáveis, ocorreram ganhos de força, melhora da capacidade funcional, redução do tecido adiposo visceral (VAT) e melhora da resposta ao choque térmico após o treinamento, no entanto, considerando o baixo n amostral, essa resposta ainda deve ser confirmada em estudos posteriores. **Conclusão:** A ausência de resposta ao choque térmico em Diabéticos está relacionada com resistência à insulina e inflamação, de modo que o treinamento de força parece ser uma alternativa eficaz para contornar esse quadro. Em relação ao efeito do treinamento, em sujeitos de Meia Idade, ele mostra-se eficaz para reduzir as chances de sarcopenia e dinapenia e possíveis doenças relacionadas ao processo do envelhecimento. Os dados preliminares em idosos saudáveis demonstram que, além de diminuir as chances de sarcopenia e dinapenia, o treinamento parece eficaz para reduzir inflamação sistêmica, visto que houve redução do VAT e aumento da resposta ao choque pós-treinamento. Este projeto é financiado pelo CNPq, Edital Universal (Processo nº 482398/2013-2).

## Abstract

**Introduction:** The aging process is associated with increase in the production of reactive oxygen species (ROS). Among the strategies that the cells developed during the evolution to counteract the cellular stress, we highlight the heat shock proteins (HSP). In particular, HSPA1A (HSP72) is important for the recovery of damaged proteins, preventing them from aggregating into the cytoplasm. The aging process appears to be associated with a decline in HSP levels, resulting in loss of proteostasis control, muscle atrophy, insulin resistance, and inability to repair after damage. It has been demonstrated in the literature that exercise increases the expression of HSPA1A, which possibly exerts protective function during aging and reduces the classical systemic inflammation found in the elderly. More recently, it has been found that HSPA1A can be found both inside and outside the cells, exhibiting different functions. Intracellularly (iHSP70), it has a protective, anti-inflammatory and anti-apoptotic function, whereas in the extracellular environment (eHSP70) it has an important immunological role, with pro-inflammatory and pro-apoptotic function. **Objectives:** This dissertation is divided into three distinct parts, called studies 1, 2 and 3. In the first study, the objective was to compare the response to heat shock (leukocytes exposed to high temperature - 42° C for 2 hours) in different populations: middle-aged, elderly and elderly individuals with type 2 diabetes. In the second study, the objective was to verify the influence of a resistance training protocol on the relationship of extra and intracellular HSPA1A in leukocytes, oxidative damage, neuromuscular and morphological adaptations in middle-aged individuals. Finally, in the last study, preliminary data from the response of elderly subjects to the same protocol and parameters of study two will be shown. **Methods:** In the first study the volunteers were divided into three groups: Middle Age ( $49.36 \pm 3.61$  years), Elderly ( $63.57 \pm 3.25$  years) and Diabetic Elderly ( $68.9 \pm 7.8$  years; HbA1c  $7 \pm 0.67\%$ ). Blood samples were collected for further induction of heat shock and evaluation of eHSP70. In studies two and three, individuals of middle age (40-59 years) and elderly (60-75 years), respectively, were randomly assigned to the Control or Trained groups. The training lasted twelve weeks three times a week. Each training session included nine strength exercises for both lower and upper limbs and three functional exercises (climbing a flight of stairs, sitting and getting up and going up and down a box). Blood samples were collected for analysis of extracellular and intracellular HSPA1A in leukocytes, lipid peroxidation (TBARS), antioxidant activity (SOD and CAT), nitrite and lipid profile. Body composition, strength and maximal oxygen consumption tests were performed. **Results:** The response to heat shock (assessed by the ability of cells to export eHSP70 when submit to elevated temperature) appears to be equal between middle-aged and healthy elderly individuals. Interestingly, in elderly individuals with diabetes, this response appears to be blocked, indicating that insulin resistance and diabetes play a dominant role in the ability to respond to stress. When middle-aged individuals (study 2) underwent strength training, they responded with strength gains, improved functional capacity, and increases in muscle mass. However, the response to heat shock (eHSP70 and iHSP70) was not modified by training, possibly because the response was normal. Preliminary data from study 3 show that, in healthy elderly, strength gains, functional capacity improvement, visceral adipose tissue (VAT) reduction and improved heat shock response after training occurred, however, considering the low n sample, this response has

yet to be confirmed in later studies. **Conclusion:** The lack of response to heat shock in diabetics is related to insulin resistance and inflammation, so resistance training seems to be an effective alternative to circumvent this condition. Regarding the training effect, in middle-aged subjects, it is effective in reducing the chances of sarcopenia and dynapenia and possible diseases related to the aging process. Preliminary data in healthy older adults demonstrate that, in addition to decreasing the chances of sarcopenia and dynapenia, training seems effective in reducing systemic inflammation, since there was a reduction in VAT and increased post-training shock response. This project is funded by the CNPq, Edital Universal (Process nº 482398/2013-2).

## **LISTA DE FIGURAS**

### **ESTUDO 1**

Figura 1. Heat shock response.

Figura 2: Valores para o delta da Heat shock response.

### **ESTUDO 2**

Figura 3: Desenho experimental.

Figura 4: Escala de OMNI. Seleção de voluntários

Figura 5: Seleção de voluntários para inclusão no estudo.

Figura 6: Efeito do treinamento nos valores do VO<sub>2</sub> pico

Figura 7: Efeito do treinamento na espessura muscular do quadríceps.

Figura 8: Efeito do treinamento no teste de subir um lance de escadas.

Figura 9: Efeito do treinamento no teste de sentar e levantar em 30 segundos.

Figura 10: Valores da Heat shock response em sujeitos de Meia Idade após o treinamento.

Figura 11: Efeito do treinamento nos níveis basais da HSP70 intracelular.

Figura 12: Efeito do treinamento na Heat shock response em leucócitos.

Figura 13: Relação da HSP70 extra/intracelular (Índice H).

### **ESTUDO 3**

Figura 14: Desenho experimental.

Figura 15: Seleção de voluntários para inclusão no estudo.

Figura 16: Efeito do treinamento nos valores do VO<sub>2</sub> pico em idosos.

Figura 17: Efeito do treinamento nos valores do SAT em idosos.

Figura 18: Efeito do treinamento nos valores do VAT em idosos.

Figura 19: Efeito do treinamento no teste de subir um lance de escadas em idosos.

Figura 20: Efeito do treinamento no teste de sentar e levantar em 30 segundos em idosos.

Figura 21: Efeito do treinamento no delta da variação da Heat shock response em idosos.



## **LISTA DE TABELAS**

### **ESTUDO 1**

Tabela 1: Caracterização da amostra.

Tabela 2: Valores de perfil lipídico e glicose.

### **ESTUDO 2**

Tabela 3: Caracterização da amostra dos sujeitos de Meia Idade.

Tabela 4: Valores perfil lipídico e glicose.

Tabela 5: Periodização do treinamento.

Tabela 6: Escala de Lombardi.

Tabela 7: Registro alimentar anterior a coleta de sangue.

Tabela 8: Lista de medicamentos utilizados pelos voluntários.

Tabela 9: Efeito do treinamento nos valores de Eco-intensidade.

Tabela 10: Efeito do treinamento no SAT e VAT.

Tabela 11: Efeito do treinamento nos parâmetros de força.

Tabela 12: Efeito do treinamento nos parâmetros de estresse oxidativo e nitritos.

### **ESTUDO 3**

Tabela 13: Caracterização da amostra dos idosos treinados.

Tabela 14: Valores de perfil lipídico e glicose.

Tabela 15: Registro alimentar anterior a coleta de sangue.

Tabela 16: Lista de medicamentos utilizados pelos voluntários.

Tabela 17: Efeito do treinamento nos valores de espessura muscular.

Tabela 18: Efeito do treinamento nos valores de Eco-intensidade.

Tabela 19: Efeito do treinamento nos parâmetros de força.

Tabela 20: Efeito do treinamento nos parâmetros de estresse oxidativo e nitritos.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CAT: catalase.

DM2: diabetes mellitus tipo 2

eHSP70: Proteína de choque térmico 70 kDa extracelular.

EI: eco-intensidade.

EROS: espécies reativas ao oxigênio.

ERNS: espécies reativas ao nitrogênio.

GPx: glutathione peroxidase.

GSK-3B: glicogênio sintase kinase 3.

HSF-1: fator de transcrição do choque térmico-1.

HSR: resposta ao choque térmico.

IRS-1: substrato do receptor de insulina-1.

iHSP70: Proteína de choque térmico 70kDa intracelular

Ikk: Ikb kinase.

Ik-B: inibidor do kb.

IL-6: interleucina-6.

IL-10: interleucina-10.

JNK: c-Jun NH2- terminal kinase.

MDA: malondialdeído.

NF-kB: nuclear factor transcription factors of the kappa light chain enhancer of activated B cells – (kB) family.

PBMC: células mononucleares.

SAT: tecido adiposo subcutâneo

SOD: superóxido dismutase.

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ .

VAT: tecido adiposo visceral.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. ESTUDO 1- COMPARAÇÃO DA RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO EM DIFERENTES POPULAÇÕES .....	19
2.1 METODOLOGIA .....	19
2.2 RESULTADOS .....	21
2.3 DISCUSSÃO.....	23
3. ESTUDO 2- RESPOSTA AO TREINO EM SUJEITOS SAUDÁVEIS DE MEIA-IDADE.....	27
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
3.2 METODOLOGIA .....	28
3.3 RESULTADOS .....	37
3.4 DISCUSSÃO.....	47
4 ESTUDO 3- DADOS PRELIMINARES DA RESPOSTA AO TREINO EM IDOSOS.....	53
4.1 METODOLOGIA .....	53
4.2 RESULTADOS PRELIMINARES.....	56
5. DISCUSSÃO FINAL.....	64
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	67
7. REFERÊNCIAS .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

### **Envelhecimento, tecido adiposo e “oxi-inflamm-aging”**

O processo de envelhecimento está relacionado com declínio na capacidade funcional, além de tornar o indivíduo mais suscetível a doenças crônicas, como diabetes, hipertensão arterial e câncer (Stout et. al., 2016). A redução de força (dinapenia) e massa muscular (Clark; Manini, 2008) e aumento do tecido adiposo visceral (VAT), e intramuscular (IMAT) (Palmer; Kirkland, 2016) estão diretamente ligados a isso.

O tecido adiposo (TA) é considerado um dos principais reguladores dos processos envolvidos no envelhecimento, visto que, muitas vezes, é o maior órgão em humanos (Tchkonina et. al., 2010). Em idosos, a disfunção do TA, está relacionada, entre outras coisas, com a redistribuição de gordura da região subcutânea (SAT) para região do VAT (Tchkonina et.al., 2010) e aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, IL-1 $\beta$  e IL-6 que acarretam, com o passar do tempo, em uma inflamação crônica de baixo grau (Starr et. al., 2015). Esse processo inflamatório duradouro, em conjunto com o aumento do estresse oxidativo, causado pelo desequilíbrio redox (diminuição da atividade antioxidante e aumento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) acarreta em um processo chamado de “oxi-inflamm-aging” (do inglês: oxi=oxidação + inflamm = inflamação + aging = envelhecimento) (De Toda; De la Fuente; 2015).

No envelhecimento, o músculo esquelético estaria mais exposto ao aumento do estresse oxidativo, mediando, dessa forma, a perda de massa muscular associada à sarcopenia (Bouzig et. al, 2015). Contribuindo com isso, o aumento de algumas citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, TNF- $\alpha$  e Proteína C-reativa (PC-r), estariam relacionados com menor sensibilidade a insulina e, por consequência, com diabetes (Henstridge et. al. 2014; Stout et. al, 2017).

### **Resistência à insulina, sarcopenia e relação com o diabetes**

A resistência à insulina (RI) está relacionada com a sarcopenia. Isso se justifica, a partir do momento em que, além da insulina estimular a captação de glicose pelo músculo, ela também inibe a proteólise muscular. Além da ação da insulina, um adequado suprimento de aminoácidos tanto inibe a proteólise quanto estimula a síntese de proteínas (Cleasby et. al., 2011). Entretanto, com o envelhecimento acontece uma “resistência anabólica”, de modo que a síntese de proteínas em resposta aos nutrientes e a ação da insulina encontram-se reduzidas (Breen, Philips, 2011). Uma possibilidade é que a sinalização intramuscular, nos idosos, não seria tão sensível e/ou responsiva aos aminoácidos quanto em jovens (Breen, Philips, 2011)

Em idosos, foi demonstrado que a resistência anabólica à insulina ocorre em indivíduos com massa muscular normal, de modo que ela poderia preceder a manifestação clínica da sarcopenia (Rasmussen et. al., 2006). Como resultado da mesma, os idosos perdem fibras de contração rápida concomitante com a disfunção neuromuscular, tornando-os frágeis e suscetíveis a quedas súbitas, perdendo, assim, sua independência funcional (Lynch et. al., 2011).

Como a RI precede ao quadro clínico de Diabetes Mellitus 2 (DM2) e ao mesmo tempo é um fator associado à sarcopenia, esses dois distúrbios parecem estar relacionados (Kim et. al., 2010; Koo et. al. 2015). Um estudo mostrou que sujeitos diabéticos com mais de 60 anos têm maior predomínio de sarcopenia do que pessoas não diabéticas da mesma idade, o que se mantém quando os dados são estratificados por sexo. Ainda mostraram que, na amostra avaliada, idosos diabéticos teriam um risco três vezes maior para sarcopenia do que os idosos sem diabetes (Kim et. al., 2010). Corroborando esses dados, outro estudo encontrou maior prevalência de sarcopenia em sujeitos recém-diabéticos tanto na faixa etária entre 45-65 anos quanto em maiores de 75 anos quando comparado ao grupo controle (não diabéticos). Na faixa etária acima de 75 anos associação se mostrou mais relevante. Além disso, em idosos diabéticos (considerado no estudo > 75 anos) a prevalência de sarcopenia Classe II (estágio mais avançado da doença) foi mais frequente que nos idosos não diabéticos (Koo et. al. 2015).

Como mencionado anteriormente, o aumento do TA é um fator preponderante para desencadear a RI e, portanto, o processo de sarcopenia e DM2. Em especial, o aumento do tecido adiposo visceral (VAT) e o depósito de lipídeos intramusculares (IMAT) são cruciais para esse processo. Em um estudo realizado na Holanda com 2253 voluntários (homens e mulheres) com idade entre 45-65 anos, verificou-se associação do VAT e SAT com RI em homens, e nas mulheres, apenas associação do VAT com RI, indicando que os mesmos, quando aumentados, são fatores de risco para DM2 (Mutsert et. al., 2018). Um estudo de coorte com duração de cinco anos mostrou que sujeitos com maior ganho de VAT e de massa muscular no quadríceps estariam mais propensos ao desenvolvimento de DM2. O aumento de massa muscular estar relacionado com esse maior risco seria justificado pelo fato de que pessoas com maior índice de massa corporal (IMC) teriam maior massa muscular (Han et. al., 2017).

Em virtude de todas essas complicações associadas ao envelhecimento, buscam-se estratégias para alcançar um “envelhecimento saudável” ou que, no mínimo, retarde-as. Ao encontro disso, o exercício físico e intervenções nutricionais se mostram eficazes para

combater, ou minimizar, as complicações relacionadas ao envelhecimento (Newsholme; Krause, 2014).

### **Envelhecimento e exercício físico**

O exercício físico, de modo mais específico, o treinamento de força vem se mostrando uma ferramenta eficiente, visto que aumenta a força muscular (Aagaard et. al., 2002, Häkkinen et. al., 1998), a massa muscular (Häkkinen et. al., 1998) e melhora a qualidade muscular (Pinto et. al. 2014). Ademais, programas de treinamento de força parecem melhorar a capacidade funcional do idoso (Bautmans et. al., 2005; Njemini et. al., 2017)

Por outro lado, o treinamento de força melhora qualidade muscular (avaliada pela força por unidade muscular), auxilia na diminuição de tecido não contrátil no músculo avaliada pela eco-intensidade, que estaria relacionada com depósito de lipídeos intramusculares (Radelli et. al. 2013). Portanto, os efeitos do treinamento de força também estariam relacionados com diminuição do processo inflamatório, reduzindo, assim, as chances de apresentação de distúrbios relacionados com o avançar da idade. Outro ponto importante é que o treinamento de força parece diminuir o dano relacionado às espécies reativas de oxigênio (EROS) que estão aumentadas com o envelhecimento (Bouzid et. al., 2015). Entretanto, poucos estudos têm verificado aumento da atividade antioxidante que pudesse justificar essa redução das EROS (Parise et. al., 2005). Um desses estudos, utilizando um protocolo de treinamento de força de doze semanas foi capaz de aumentar atividade da Cu-znSOD (cobre-zinco SOD) e Catalase no músculo esquelético em sujeitos idosos (Parise et. al., 2005). Uma das possibilidades para esses resultados poderia estar vinculada ao fenômeno de “resistência anabólica”, que aconteceria nos idosos, e estaria dificultando a resposta do músculo ao treinamento de força (Bouzid et. al., 2015). Apesar dessa baixa resposta da atividade antioxidante ao treinamento de força, outros mecanismos poderiam estar atuando para reduzir o dano oxidativo. Dentre as defesas celulares podem-se destacar as Proteínas de Choque Térmico (do inglês, Heat Shock Proteins).

### **Funções das HSPs e indução da HSP70**

As HSPs são, basicamente, proteínas induzidas por estresse homeostático capazes de reverter danos celulares. Dessa forma, são importantes para manutenção do “controle de qualidade das proteínas”, podendo atuar na reconformação de proteínas danificadas e, em alguns casos, na degradação das mesmas, para que não promovam agregação de polipeptídeos citotóxicos (Calderwood et. al., 2009). As HSPs são codificadas por genes altamente conservados e classificadas de acordo com o peso molecular (Noble et. al., 2008). Nesse estudo iremos abordar especificamente a família da HSP de 70 kDa (HSP70) (ao longo do

texto trataremos como HSP70, no entanto, a nova nomenclatura seria HSPA1A – referindo-à forma induzível, a HSP72) (Kapinga et. al., 2009).

A HSP70 intracelular é considerada um marcador universal de estresse celular, cuja expressão é induzida por diferentes agentes estressores, como o calor, privação metabólica, desbalanço redox e exercício físico. A ativação da iHSP70 é crítica para promoção de reparo tecidual, uma vez que esse tipo de proteína, uma chaperona molecular, confere citoproteção e apresenta efeitos anti-inflamatórios (Krause et al, 2015b). Em repouso, ela se mantém ligada ao seu fator de transcrição (HSF-1) em estado monomérico sem a capacidade de se ligar ao DNA. Quando há uma situação de estresse, a iHSP70 desliga-se do HSF-1 podendo, então, ligar-se a proteínas desnaturadas e realizar sua função de chaperona, permitindo que a proteína volte a sua conformação nativa. A partir disso, não há mais efeito inibitório sobre HSF-1, de modo que há sua trimerização e ligação ao DNA no seu elemento responsivo (HSE) e transcrição do mRNA da HSP70. (Krause; Rodrigues-Krause, 2011). Após a situação de estresse, a HSP70 se liga novamente ao HSF-1 impedindo sua ligação ao DNA. O resultado desse processo é o aumento na produção de iHSP70 que acarreta em uma resposta adaptativa ao estresse (Krause; Rodrigues-Krause, 2011).

Considerando que o envelhecimento está associado com a inflamação de baixo grau e o reparo muscular está comprometido, a ativação dessa proteína e a sua resposta ao estresse pode representar uma ferramenta chave contra a disfunção celular que ocorre com o envelhecimento. Interessantemente, diversas intervenções têm demonstrado que a expressão normal ou a superexpressão de HSP70 está associada a melhoras na função e no tamanho muscular (Senf, 2013). Além disso, a regulação à maior da HSP70 contribui para a manutenção da integridade das fibras e melhora a regeneração e recuperação do músculo esquelético após dano (Senf, 2013). Dessa forma, parece possível que o exercício além de minimizar os efeitos da sarcopenia, poderia fazê-lo aumentando a expressão de HSP70.

### **Exercício físico e indução da HSP70**

De modo geral, estudos vêm demonstrando que o exercício resulta em aumento da HSP70, tanto em leucócitos (Fehrenbach, et. al. 2000; Walsh et. al., 2001) quanto no músculo esquelético (Febbraio; Koukoulas, 2000). Idosos octogenários ativos, após um teste máximo em esteira apresentaram aumento da HSP70 em linfócitos (Simar et al., 2004). Por outro lado, um estudo do mesmo autor demonstrou que idosos ativos possuem menor expressão de HSP70 do que idosos sedentários depois de um teste incremental em esteira. Nesse estudo, os autores sugerem que o aumento da atividade antioxidante nos participantes ativos pode ter reduzido o estresse oxidativo que é um dos fatores que influenciam no aumento da HSP70.

Portanto, um aumento da capacidade antioxidante ou redução da produção de EROS limitaria a indução de HSP70. Apesar disso, em idosos sedentários o aumento dessa proteína em resposta ao exercício é importante para conter o dano oxidativo e prevenir disfunção celular (Simar et. al., 2007). Dessa forma, sugere-se que a HSP70 participe como modulador em um mecanismo complementar de defesa contra o EO (Fittipaldi et. al., 2013). Em relação ao treinamento de força, seis semanas reduziram os níveis basais de HSP70 em linfócitos de idosos. Quando avaliado a resposta ao choque térmico houve aumento da indução de HSP70 tanto em linfócitos quanto em monócitos. Os ganhos de força nesses indivíduos foram relacionados com as alterações na indução da HSP70. Ademais, as modificações na expressão da HSP70 podem indicar um aprimoramento na proteção celular frente a condições patológicas (Bautmans et. al., 2005). Outro estudo também verificou redução nos níveis basais de HSP70 após doze semanas de treinamento de força em idosos (Valls et. al., 2014). Dessa forma, parece que o treinamento de força possibilitaria uma adaptação ao estresse, reduzindo os valores basais de HSP70 (Valls et. al., 2014). A ativação da HSP70 com o exercício teria função protetora contra doenças relacionadas à desnaturação de proteínas ou durante o envelhecimento, regulando a inflamação sistêmica e preservando a função muscular (Fittipaldi et. al., 2013).

#### **Efeitos da HSP70 na resistência à insulina**

Na literatura, tem-se verificado que a iHSP70 está relacionada com preservação e melhora da sensibilidade à insulina tanto no músculo esquelético (Geiger; Grupte; 2011) quanto no endotélio vascular (Karpe; Tikoo, 2014), estando associada ao Diabetes. Essa associação torna-se mais evidente quando sujeitos com RI e DM2 possuem menor expressão de HSP70 no músculo esquelético (Henstridge et. al., 2014). Além disso, estudos mostram que a HSP70 inibiria ação de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a inflamação e melhorando a sensibilidade do receptor de insulina com a mesma (Geiger et. al.; 2011; De Toda; De la Fuente, 2015). Mais especificamente, ela inibiria ação do NFk-B por bloquear a degradação do seu inibidor, o Ikb. Isso ocorre, pois a HSP70 inibe ação do IkkB, que tem a função de desfazer o complexo inibitório NFk-B-Ikb (De Toda; De la Fuente, 2015) De outra forma, ela melhora a interação da insulina com seu receptor (IRS-1) no músculo esquelético por inibir ação da JNK (Geiger; Grupte; 2011). A partir desses achados, a compreensão de como a HSP70 é estimulada torna-se relevante.

#### **Modulação da HRS: efeito do óxido nítrico**

Um dos principais moduladores da HSR seria o óxido nítrico (NO) (Krause et. al., 2015a). Em resumo, o calor aumentaria o fluxo sanguíneo levando ao aumento da vasodilatação para



que o calor seja dissipado. Esse aumento do shear stress (tensão de cisalhamento), em virtude do aumento do fluxo sanguíneo induz a produção e liberação de NO. Com elevações transitórias crônicas de NO, ocorreria um ciclo que induziria maior expressão de iHSP70. Além disso, aumentos na expressão dessa chaperona induziriam maior fosforilação da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) possibilitando maior produção de NO promovendo maior vasoproteção contra a RI e DM2 (Krause et. al., 2015a). Dessa forma, a partir do aprimoramento da HSR seria possível reduzir as complicações associadas ao RI e DM2.

### **HSP70 intra e extracelular e o índice H**

Mais recentemente, tem-se verificado que HSP70 intracelular e extracelular possuem funções antagônicas. A primeira tem função protetora, anti-inflamatória e anti-apoptótica. A segunda possui função pró-inflamatória, pró-apoptótica e inibe a expressão da HSP70 intracelular.

De modo mais específico, maiores valores de eHSP70, cronicamente elevados, foram relacionados com a duração de DM2 e sujeitos com DM2 tem maiores valores de eHSP70 em comparação a sujeitos sem Diabetes (Nakhjavani et. al., 2010). Além disso, níveis aumentados de eHSP70 seriam um marcador de mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca (Jenei et. al., 2013), também podendo ser considerada como um marcador para sarcopenia (Ogawa et. al., 2012) e declínio cognitivo em idosos saudáveis (Son et. al., 2015). Por outro lado, níveis mais baixos de eHSP70 estariam relacionados com aumento da longevidade (Terry et. al., 2006).

A liberação da HSP70 para o meio extracelular pode acontecer de duas formas: passiva (necrose celular) e ativa (secreção). No último, ela seria exportada ligada a membrana de vesículas extracelulares (De Maio; Vazquez., 2013). Ativando o sistema imune e agindo como molécula sinalizadora. Pode, por exemplo, estimular atividade microbicida em neutrófilos (Ortega et. al., 2006) e desencadear atividade citotóxica das células Natural Killers (NK) (De Toda; De la Fuente, 2015). Sua sinalização pró-inflamatória seria mediada por meio dos Toll-like receptors (TLR) 2 e 4 (Asea et. al., 2002).

Dessa forma o resultado entre a relação da HSPA1Ae sobre HSPA1Ai poderia indicar o estado inflamatório, chamado de índice H. Assim, valores de H acima de cinco indicariam um estado pró-inflamatório, valores entre 1 e 5 seriam normalmente observados em humanos e experimentos animais e valores de H entre 0 e 1 indicariam um estado anti-inflamatório (Heck et. al., 2017). O raciocínio do índice Heck é que maiores quantidades de eHSP70 aumentariam a sinalização pró-inflamatória, porque eHSP70 é pró-inflamatória em sua natureza. Por outro lado, para cada situação em particular, se as células são capazes de

responder ao estímulo estressante pelo aprimoramento da iHSP70, então elas tendem, ao mesmo tempo, a entrar em um estado anti-inflamatório. Além disso, considerando que  $R_c = [eHSP70]_c/[iHSP70]_c$  como a relação da HSP70 na situação controle, independente das técnicas usadas para avaliar eHSP70 e iHSP70, então o índice H pode ser calculado como coeficiente de qualquer  $R_j = [eHSPA]_j/[iHSPA]_j$  pelo  $R_c$ , que será considerado como a unidade ( $R_c=1$ ), normalizando todos os resultados restantes na situação “j”. Então, índice  $H = R_j/R_c$  permitiria comparações entre qualquer condição de estresse “j” e a situação assumida como controle (Heck et. al., 2017) .

O processo de envelhecimento parece aumentar o estresse oxidativo e reduzir a síntese de HSP70 acarretando em elevação do estado pró-inflamatório e piora do controle da qualidade das proteínas (Leite et. al., 2016). O exercício parece modificar esse quadro mantendo a relação da eHSP70 sobre iHSP70 em um estado anti-inflamatório devido ao aumento da HSP70. Como o exercício de força em idosos parece aumentar a expressão dessa proteína, além de ser efetivo para manutenção da independência do idoso esse estudo pretende verificar a influência de um protocolo de treinamento de força na relação da HSP70 extracelular e intracelular em células mononucleadas e do dano oxidativo em participantes de meia-idade e idosos.

O presente estudo será dividido em três partes (estudos), cada um com seus próprios objetivos. No primeiro, o objetivo foi comparar a resposta ao choque térmico em diferentes populações. Para tanto, serão utilizados dados de dois projetos diferentes, conforme será explicado posteriormente. No segundo experimento o objetivo foi verificar a resposta a um protocolo de treinamento de força na relação da HSPA1A extra e intracelular em leucócitos, do dano oxidativo, das adaptações neuromusculares e morfológicas em indivíduos de meia-idade. Na última parte serão mostrados dados preliminares da resposta de indivíduos idosos a um protocolo de treinamento de força na relação da HSPA1A extra e intracelular em leucócitos, do dano oxidativo e das adaptações neuromusculares e morfológicas. Inicialmente, os dados dos experimentos dois e três seriam analisados juntos, entretanto, pelo número de voluntários idosos ter sido menor, os mesmos serão apresentados separadamente e como resultados preliminares.

## **2. ESTUDO 1- COMPARAÇÃO DA RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO EM DIFERENTES POPULAÇÕES**

### **2.1 METODOLOGIA**

#### **Local de estudo e participantes**

Com o intuito de avaliar a resposta ao choque térmico em populações diferentes, este experimento foi composto por amostras de dois projetos distintos: um composto por voluntários saudáveis de 40-59 anos (meia-idade) e idosos (60-75 anos), e outro por idosos diabéticos tipo dois (DM2) (acima de 60 anos). Todas as coletas e procedimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), no Laboratório de Pesquisa e Exercício (LAPEX) na Escola de Educação Física, Fisioterapia e Dança (ESEFID) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A amostra desse experimento se caracteriza por conveniência com um total de 30 sujeitos entre homens e mulheres (tabela 1). Os sujeitos de Meia Idade e Idosos Saudáveis deveriam ser fisicamente ativos avaliados pelo IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) versão longa validado para a população brasileira (Matsudo et. al. 2001) e pelo PARQ (Physical Activity Readiness Questionnaire). Os mesmos não eram fumantes, deveriam ter índice de massa corporal (IMC) menor que 29 kg/m<sup>2</sup> e não deveriam estar praticando exercício físico nos últimos seis meses. Para os Idosos com DM2, os critérios de inclusão eram possuir um IMC entre 18,5- 34,9 kg/m<sup>2</sup> (levando em consideração, também, sujeitos com obesidade grau I, conforme a Organização Mundial da Saúde), não estarem praticando exercício físico nos últimos seis meses, não serem fumantes nos últimos seis meses, não fazerem uso de insulina, concentração de hemoglobina glicada (HbA1c)  $\geq 7,5\%$  (de acordo com exame laboratorial de no máximo seis meses antes do início do estudo) e caso tivessem hipertensão, que a mesma fosse controlada.

Os sujeitos de Meia Idade e Idosos Saudáveis foram excluídos do estudo caso fossem diabéticos, com hipertensão não controlada ou que possuíssem alguma limitação osteomuscular que impedisse a prática de exercícios. Para os Idosos Diabéticos foram considerados como critérios de exclusão a presença das seguintes comorbidades: neuropatia autonômica ou neuropatia periférica severa, retinopatia diabética proliferativa, retinopatia diabética não proliferativa, insuficiência cardíaca não compensada, angina instável, amputações periféricas, insuficiência renal crônica, depressão clínica. Além disso, qualquer limitação músculo-esquelética que impedisse a prática dos exercícios. Os sujeitos incluídos nos dois estudos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme a Resolução CNS nº 196/1996 do Ministério da Saúde. O estudo com os sujeitos de Meia

Idade e Idosos Saudáveis e o estudo envolvendo Idosos com DM2 foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS sob o número de parecer 1.614.907 e 1139454, respectivamente.

### Desenho do estudo

Em um primeiro momento, os sujeitos foram até o Lapex-UFRGS para esclarecimento sobre os projetos de pesquisa, para responderem os questionários e para que fossem colhidos os dados antropométricos. Nessa primeira visita, os indivíduos de Meia Idade e Idosos Saudáveis responderam ao IPAQ e PARQ, e os Idosos com DM2 responderam uma ANAMNESE (para identificar critérios de exclusão), o IPAQ e o Diabetes Quality of Life Measure- DQOL Brasil. Na segunda visita foi realizada a coleta de sangue em jejum para posterior análise do perfil lipídico, glicose e da HSP70 extracelular. Para os sujeitos de Meia Idade e Idosos Saudáveis, a mesma foi realizada no Lapex-UFRGS, e dos idosos com DM2 no HCPA.

Tabela 1. Caracterização da amostra (n=30). Média  $\pm$  dp.

Variável	Meia Idade Saudável (n=11)	Idoso Saudável (n=7)	Idoso Diabético (n=12)
Idade (anos)	49,36 $\pm$ 3,61†	63,57 $\pm$ 3,25†	68,9 $\pm$ 7,8†
Estatura (m)	1,66 $\pm$ 0,07	1,61 $\pm$ 0,08	1,66 $\pm$ 0,08
Massa Corporal (kg)	70,07 $\pm$ 11,39	67,68 $\pm$ 9,1	79,12 $\pm$ 10,85
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,3 $\pm$ 2,9*	25,78 $\pm$ 1,9	28,7 $\pm$ 3*

Diferença do grupo Meia Idade (†). Na variável idade  $p < 0,0001$  para ambos. Diferença entre Meia Idade e Idoso Diabético (\*) no IMC ( $p = 0,0180$ ).

Tabela 2. Valores para perfil lipídico, glicose e HbA1c. Média  $\pm$  dp.

Variável	Meia Idade Saudável	Idoso Saudável	Idoso Diabético
Colesterol Total (mg/dL)	162,75 $\pm$ 35,03	194,17 $\pm$ 37,69	160,33 $\pm$ 33,07
Triglicerídeos (mg/dL)	85,38 $\pm$ 26,70	131,49 $\pm$ 33,92	133,25 $\pm$ 65,70
HDL (mg/dL)	49,58 $\pm$ 10,72	42,52 $\pm$ 11,13	47,91 $\pm$ 8,46
LDL (mg/dL)	103,37 $\pm$ 43,35	112,19 $\pm$ 38,33	88,18 $\pm$ 35,65
Glicose (mg/dL)	100,12 $\pm$ 13,06*	105,75 $\pm$ 16,39‡	133 $\pm$ 21,42*‡
HbA1c (%)	-	-	7 $\pm$ 0,67

Diferença entre Meia Idade e Idoso Diabético (\*) e Idoso Saudável e Idoso Diabético (‡). Valor de  $p = 0,0004$  e  $p = 0,0083$ , respectivamente.

### **Obtenção das amostras biológicas**

O procedimento de coleta de sangue foi realizado por um profissional devidamente qualificado e habilitado, sempre na presença do responsável pelo projeto. O sangue foi coletado na região antecubital, com o local previamente preparado e higienizado para a realização do procedimento. Em todas as coletas, foram retirados oito mL de sangue através de punção venosa por meio de seringas e agulhas descartáveis. A agulha foi descartada imediatamente em recipientes apropriados para materiais perfurocortantes, adotando todos os cuidados de biossegurança de acordo com a resolução 358/05 CONAMA. O sangue foi coletado em tubos com EDTA e o mesmo foi aliquoteado e incubado a duas temperaturas distintas em banho-maria (37 e 42 °C) por duas horas. O objetivo desta estratégia foi verificar a habilidade das células em responder ao estresse (42 °C) expressando (iHSP70) e exportando HSP70 (eHSP70).

### **Análises bioquímicas**

A mensuração HSPA1A extracelular foi feita através de um kit ELISA de alta sensibilidade para HSP70 (Amp'd HSP70 High Sensitivity ELISA kit; Enzo Life Sciences, Nova Iorque, Estados Unidos). Os resultados foram expressos por ng/ml.

Para avaliação do perfil lipídico e da glicose, em plasma, foi utilizado o aparelho Cobas C111 (Roche, São Paulo, Brasil) com kits específicos para cada análise. Os resultados foram expressos em mg/dL. Os valores para hemoglobina glicada (HbA1c) foram dados em porcentagem de HbA1c em relação à hemoglobina total medida.

### **Análise estatística**

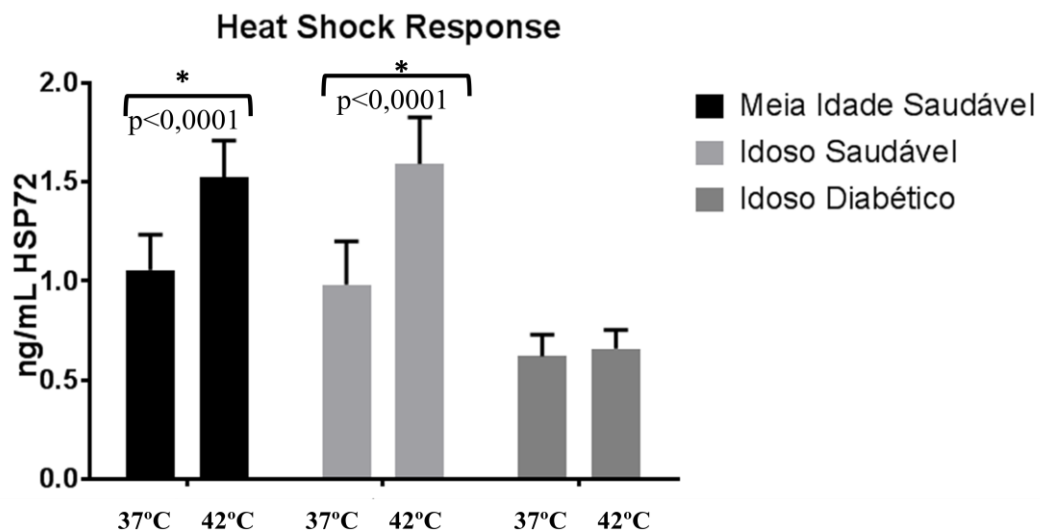
Foi utilizado o teste de Shapiro Wilk para verificação da normalidade das variáveis, assumindo uma distribuição normal homogênea. Posteriormente, foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Tukey. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados pelo programa estatístico Graphpad Prim 7.

## **2.2 RESULTADOS**

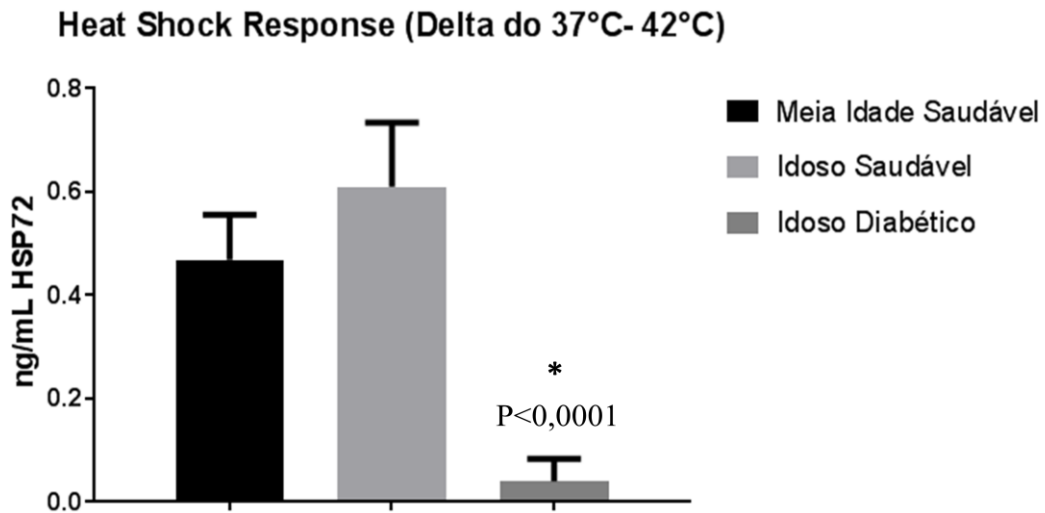
Em sujeitos saudáveis esperava-se que, os leucócitos, em resposta ao estresse térmico deveriam responder aumentando a expressão de HSP70 intracelular e a quantidade exportada para o meio extracelular. O aumento da expressão da intracelular pode demorar algumas horas enquanto da extracelular parece imediata. Ao contrário dos sujeitos de Meia Idade e Idosos saudáveis, os Diabéticos não foram responsivos ao choque térmico (Figura 1 e 2). Isso

indicaria que os leucócitos, em diabéticos, possuem menor capacidade de exportar HSP70 para o meio extracelular.

Esses resultados são verificados ao comparar o 37 °C com 42 °C nos grupos e o delta da variação (37 °C vs. 42 °C). Em relação ao primeiro, houve diferença significativa ao comparar os valores de 37 °C com 42 °C nos grupos Meia Idade e Idosos Saudáveis ( $p < 0,0001$  para ambos). Os valores da HSP72 no grupo Meia Idade foram:  $1,06 \pm 0,56$  ng/mL (37 °C) e  $1,52 \pm 0,58$  ng/mL (42 °C). Para o grupo Idoso Saudável:  $0,981 \pm 0,58$  ng/mL (37 °C) e  $1,59 \pm 0,62$  ng/mL (42 °C). E para o grupo Idoso Diabético:  $0,621 \pm 0,37$  (37 °C) e  $0,66 \pm 0,32$  ng/mL (42 °C). Ao analisar o delta da variação entre 37 °C e 42 °C houve diferença significativa dos Idosos Diabéticos para os outros dois grupos ( $p < 0,0001$ ). Os valores para o delta da variação no grupo Meia Idade:  $0,46 \pm 0,27$  ng/mL, para o grupo Idoso Saudável:  $0,6 \pm 0,32$  ng/mL, e para o grupo Idoso Diabético:  $0,04 \pm 0,148$  ng/mL. Os gráficos abaixo ilustram esses resultados.



**Figura 1.** Comparação da resposta ao choque térmico (HSR) entre indivíduos de Meia Idade e Idosos Saudáveis e Idosos Diabéticos. O sangue de cada sujeitos foi exposto a duas temperaturas distintas (37°C e 42°C) por duas horas. Posteriormente, os níveis da HSP70 extracelular foram avaliados com um kit ELISA de alta sensibilidade para HSP70 (Amp'd HSP70 High Sensitivity ELISA kit; Enzo Life Sciences, Nova Iorque, Estados Unidos). Os resultados foram expressos por ng/ml.



**Figura 2.** Delta da variação (37°C e 42°C) da resposta ao choque térmico em sujeitos de Meia Idade, Idosos Saudáveis e Idosos Diabéticos. Após duas horas de exposição das amostras a duas temperaturas distintas (37°C e 42°C) a HSP70 extracelular foi avaliada com um kit ELISA de alta sensibilidade para HSP70.

### 2.3 DISCUSSÃO

Os achados do presente estudo demonstram que não parece haver diferença na resposta ao choque térmico entre sujeitos de Meia Idade e Idosos saudáveis. Esses resultados são verificados tanto na diferença da resposta entre 37 °C e 42 °C quanto ao analisar o delta da diferença entre as temperaturas. Avaliando os resultados dessa forma, parece não existir uma redução na resposta ao choque térmico como resultado do envelhecimento. Por outro lado, nos Idosos com DM2 não foi verificada resposta ao choque, comparando os valores de 37 °C vs. 42 °C e isso se confirma quando analisado o delta da variação entre as temperaturas, onde há diferença significativa desse grupo em comparação aos outros dois pela inexistência de resposta ao choque térmico.

Ao nosso conhecimento, há poucos estudos avaliando a liberação de HSP para o meio extracelular após o choque térmico e nenhum avaliando essa resposta em diferentes populações. A maioria dos estudos avalia eHSP70 em situação basal (não estimulada) (Nakhjavani et. al., 2010), em cultura de células (Krause et. al., 2014) ou após uma sessão aguda de exercício (Ortega et.al. ,2006; Hinchado et. al., 2011). Em realidade, os estudos encontrados na literatura que avaliaram a liberação de HSP70 após o choque térmico o fizeram mensurando exossomos exportados de células mononucleares (Lancaster et. al., 2005) e de Linfócitos-B (Clayton et. al., 2005). Os dois estudos, independente das diferenças dos

protocolos para indução do choque térmico, demonstraram aumento da liberação de HSP70 para o meio extracelular via exossomos (Clayton et. al.; 2005; Lancaster et. al., 2005).

Diferente da condição basal, onde os níveis aumentados dessa chaperona estão relacionados com maior risco de doenças (Nakhjavani et. al., 2010; Ogawa et. al. 2012), seus níveis aumentados em condições de estresse transitório, como o choque térmico, parecem ter efeito distinto (De Toda; De la Fuente, 2015; Krause et. al., 2015c). Nesse último caso, mesmo que a eHSP70 induza produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1, as mesmas são conhecidas indutoras do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) que estimularia liberação de glicocorticoides que são agentes anti-inflamatórios. Dessa forma, ocorreria um mecanismo de feedback anti-inflamatório (Ortega et. al., 2012; De Toda, De la Fuente, 2015). Além desse efeito inibitório na liberação de citocinas pró-inflamatórias, os glicocorticoides também aumentariam liberação de Interleucina-10 (IL-10), uma citocina conhecida pelos seus efeitos anti-inflamatórios (Ortega et. al., 2012; De Toda, De la Fuente, 2015). Portanto, essa relação glicocorticóides-IL-10 seria importante para manter o estado inflamatório sobre controle (Ortega et. al., 2012).

Ao considerar, as alterações provocadas pela liberação da eHSP70 de maneira aguda, parece que a mesma estimularia a resposta imune inata e adaptativa (Ortega et. al., 2012). Ela estaria envolvida com aumento da quimiotaxia, da fagocitose e da capacidade microbicida aumentada em neutrófilos (Ortega et. al., 2006; Giraldo et. al., 2013). Esses efeitos seriam estimulados por adrenoreceptores (Inchado et. al., 2011; Ortega et. al., 2006). Complementando esses achados, uma possível explicação para eHSP70 ser liberada pelas células imunes, via exossomos, seria o aumento do tônus simpático, em virtude do estresse, que aumentaria produção de catecolaminas, que se ligariam em adrenoreceptores  $\alpha$ -1 das células imunes, de modo a estimular liberação da eHSP70 (KRAUSE et. al., 2015c). Dessa maneira, quando avaliada no meio extracelular após o choque térmico, a HSP70 teria efeitos de controle da inflamação e na resposta imune inata e adaptativa. Sendo assim, nossos resultados demonstram que sujeitos Diabéticos não teriam uma resposta adequada para controle da inflamação e das respostas imunes como comparada com sujeitos saudáveis.

Ao considerar que os níveis de eHSP70 são consequência da sua liberação por células imunes (Hunter-Lavin, 2004) e da região hepatosplênica (De Maio; Vazquez, 2013), via exossomos, seus valores liberados na circulação na HSR parecem refletir aumentos na sua capacidade de produção intracelular, quando a célula sofre o estresse térmico. Portanto, para efeito de comparação serão considerados estudos que avaliaram a HSR no meio intracelular.



Ao contrário do que foi encontrado no presente estudo, na literatura tem-se verificado redução da resposta ao choque térmico em idosos (Njemini et., 2002; Rao et. al., 1999). Avaliando-se a resposta ao choque em monócitos e linfócitos após a incubação por uma hora a 37 °C e 42 °C foi demonstrado que os níveis de indução de HSP70 tiveram um declínio relacionado à idade dos voluntários, tanto em linfócitos quanto em monócitos. Além disso, em monócitos houve correlação inversa entre a produção de HSP70 e os níveis basais de TNF- $\alpha$  e IL-6. Considerando que o aumento das citocinas pró-inflamatórias cronicamente está relacionado com a idade, parece que as mesmas estariam envolvidas na regulação da produção de HSP70, reduzindo sua capacidade de indução. (Njemini et. al., 2002). Outro estudo comparando a resposta ao choque térmico entre jovens e idosos verificou que os níveis de indução foram maiores nos linfócitos dos voluntários jovens. Essa diferença entre as faixas etárias foi de três a seis vezes maior em sujeitos jovens (Rao et. al., 1999). Parece que as células perdem a capacidade de ativar os mecanismos transcricionais que possibilitam a síntese de HSP. De modo mais específico, no envelhecimento existiria expressão reduzida do HSF-1 e menor capacidade de sua ligação ao DNA. Assim, sua resposta estaria abaixo de um limiar básico para ativação (Calderwood, et. al., 2009).

Importante salientar que esses estudos verificaram menor indução da HSP70 e não ausência da indução da HSP70 em idosos após o estresse térmico. O que poderia explicar essa diferença na indução da HSP70, nos idosos, do nosso experimento para os outros seria a média de idade desses sujeitos. No presente experimento a média de idade dos idosos foi de 63 anos, enquanto nos outros estudos foram de 75 anos (Njemini, et. al., 2002) e 80 anos (Rao et. al., 1999). Isso poderia indicar que idosos mais velhos teriam menor indução da HSP70, ainda que mantivessem a mesma.

O processo de envelhecimento está relacionado com diminuição da sensibilidade à insulina (Chichester et. al., 2014) e, portanto, idosos são mais propensos ao Diabetes. Na literatura, estudos demonstram redução da expressão de HSP70 associado a RI, de modo que Diabéticos teriam expressão diminuída dessa proteína (Archer et. al., 2018; Henstridge et. al., 2014).

Pode-se dizer que esse processo seria um ciclo vicioso no qual a piora da sensibilidade à insulina, no músculo esquelético, associada à inatividade física, obesidade e envelhecimento, estaria relacionada com ativação da GSK-3 $\beta$  que acarreta na fosforilação do HSF-1, inativando-o e, por consequência, reduzindo expressão de HSP70. Isso gera aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias levando, com o passar do tempo, a disfunção das células beta do pâncreas, estimulação da atividade do GSK-3 $\beta$  e contínua inativação do HSF-1 (Hooper, 2007). Além disso, o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como JNK e NFk-B,

reduz ainda mais a sensibilidade à insulina por fosforilar o substrato do receptor de insulina (IRS-1) em serina (Geiger; Gupte, 2011; Hooper, 2007). Nas células beta do pâncreas essas citocinas pró-inflamatórias causam disfunção das mesmas estimulando as espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROS e ERNS) tanto quanto inibindo ativação do HSF-1 do mesmo modo que no músculo esquelético (Krause et. al., 2015c).

O primeiro estudo a demonstrar relação entre RI e expressão de HSP70 foi o de Kurucz e colaboradores (2002). Foi realizada biópsia muscular antes de um clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico que demonstrou menor expressão de HSP70 em pacientes diabéticos comparados a controles (não diabéticos) com uma aparente relação entre a captação de glicose estimulada pela insulina e os níveis aumentados de HSP70. Nesse estudo os sujeitos do grupo controle não tinham histórico de diabetes na família. De maneira semelhante, um estudo posterior verificou menor expressão de HSP70 antes de um clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico em diabéticos comparado a dois grupos controles (idade semelhante e jovens). Foi encontrado também correlação entre expressão de HSP70 e os níveis de eliminação de glicose após o clamp e com enzimas oxidativas (citrate sintase e  $\beta$ -HAD) (Bruce, 2003). Esses achados demonstram que há uma relação causal entre a RI e a expressão da HSP70, principalmente no músculo esquelético, que está ligado com a piora da capacidade oxidativa do músculo.

Ainda que os resultados dos estudos citados não tenham mensurado a HSP70 após o choque térmico, como fez o presente experimento, é possível encontrar relação entre a reduzida expressão de HSP70 no músculo esquelético em condições basais (como avaliado nesses estudos) e a falta de resposta ao choque vista em diabéticos nesse experimento. Isso pode ser explicado pelo fato de que sujeitos obesos com DM2 parecem ter menor expressão de HSP70 e do seu fator de transcrição (HSF-1) no músculo esquelético em comparação a obesos controles, ao passo que os primeiros têm elevados níveis de eHSP70 no plasma em comparação ao segundo grupo e que isso está diretamente relacionado com o acúmulo de tecido adiposo (Rodrigues-Krause et. al., 2012). É possível que a maior presença de HSP70 no plasma seja uma tentativa de contrapor os danos oxidativos induzidos pelas EROS/ERNS contra as proteínas, visto sua ação de chaperona (Rodrigues-Krause et. al., 2012; Krause et. al., 2014). Ao encontro desses achados, foi verificado, em condições basais, níveis aumentados de eHSP70 no plasma que estariam relacionados com a duração do diabetes (Nakhjavani et. al., 2010). Parece que os níveis elevados de maneira crônica da eHSP70 estariam ligados com menor expressão da iHSP70, correspondendo também a menor HSR, principalmente nas células- $\beta$  do pâncreas (Krause et. al., 2015c).

A partir disso, pode-se cogitar que a ausência de resposta ao choque térmico visto nos diabéticos do presente experimento, estaria conectada ao processo inflamatório desencadeado no diabetes que aumentaria de modo crônico os níveis de eHSP70, visto que nessa situação as células estão em contínuo estresse. É possível que ação da eHSP70 de contrapor o dano oxidativo seja sobreposta pelos elevados níveis de EROS/ERNS e da inflamação. De certa forma, isso resultaria em menor expressão de iHSP70. Assim, quando a célula sofre um estresse agudo (como o choque térmico), ela torna-se incapaz de responder. Ademais, corroborando com os nossos achados e contrariando outros estudos (Njemini,2002; Rao,1999) parece que o processo de envelhecimento por si só não é capaz de reduzir os níveis de HSP70 e, por consequência, uma redução da HSR. Para que haja redução da HSP70 com o envelhecimento parece necessário que exista de modo concomitante resistência à insulina (Kavanagh, 2012).

Dessa forma, sujeitos saudáveis tanto de Meia Idade quanto Idosos teriam uma HSR adequada, em virtude de suas células não estarem sobre estresse contínuo. Além disso, o envelhecimento associado à RI acarretaria em incapacidade da célula em responder ao estresse, levando, então, ao processo de agregação de proteínas e, por consequência, perda de função celular.

### **3. ESTUDO 2- RESPOSTA AO TREINO EM SUJEITOS SAUDÁVEIS DE MEIA-IDADE**

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar e comparar a resposta de sujeitos saudáveis de Meia Idade a um programa de treinamento de força, de doze semanas, para as seguintes variáveis:

- Os valores em kg para o teste de força de 1RM estimado;
- Os valores para o consumo de oxigênio pico ( $VO_2$  pico.);
- Os valores para os testes funcionais de sentar e levantar em 30 segundos e subir um lance de escadas;
- A espessura muscular do quadríceps femoral e eco-intensidade;
- A espessura do tecido adiposo visceral (VAT) e subcutâneo (SAT);
- HSP70 intracelular, em leucócitos, e extracelular, no plasma;
- Relação da HSP70 extracelular e intracelular;
- Peroxidação lipídica, em soro, pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);

- Níveis de nitratos/nitritos, no plasma;
- Atividade antioxidante por meio da análise da superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT), em soro.

### 3.2 METODOLOGIA

#### **Local de estudo e participantes**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), no Laboratório de Pesquisa e Exercício (LAPEX) e na academia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A amostra se caracteriza por conveniência, na qual foram recrutados 16 sujeitos entre homens e mulheres com idade entre 40 e 59 anos, (idade  $49,25 \pm 5,02$  anos; massa corporal  $68,77 \pm 9,79$  kg; altura  $1,64 \pm 0,07$  m; média e desvio padrão respectivamente), fisicamente ativos avaliados pelo IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) versão longa validado para a população brasileira (Matsudo et. al. 2001) e pelo PARQ (Physical Activity Readiness Questionnaire), que não fossem fumantes, com índice de massa corporal (IMC) menor que 29 ( $\text{kg/m}^2$ ) e que não estivessem praticando exercício físico nos últimos seis meses. Foram excluídos do estudo sujeitos que fossem diabéticos, com hipertensão não controlada ou que possuíssem alguma limitação osteomuscular que impedisse a prática de exercícios. Para o cálculo amostral utilizou-se o programa G\*Power 3.1. Inicialmente, o cálculo foi realizado levando em consideração análise dos grupos Treinado e Controle Meia Idade (Estudo 2) e Treinado e Controle Idosos (Estudo 3) de maneira conjunta. Dessa forma, utilizando o teste estatístico ANOVA de medidas repetidas, com nível de confiança de 95% e erro padrão de 5%, chegou-se ao número de dez sujeitos para cada um dos quatro grupos. Todos os sujeitos incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme a Resolução CNS nº 196/1996 do Ministério da Saúde. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS sob o número de parecer 1.614.907.

#### **Desenho experimental**

Os voluntários foram divididos em dois grupos (Treinado ou Controle) utilizando a página virtual randomization.com. A randomização foi realizada logo após a finalização das avaliações pré-treinamento. Após isso, os voluntários alocados no grupo Treinado realizaram três meses de treinamento de força com frequência semanal de três vezes. Os sujeitos do grupo controle não realizaram nenhum tipo de treinamento ao longo de três meses.

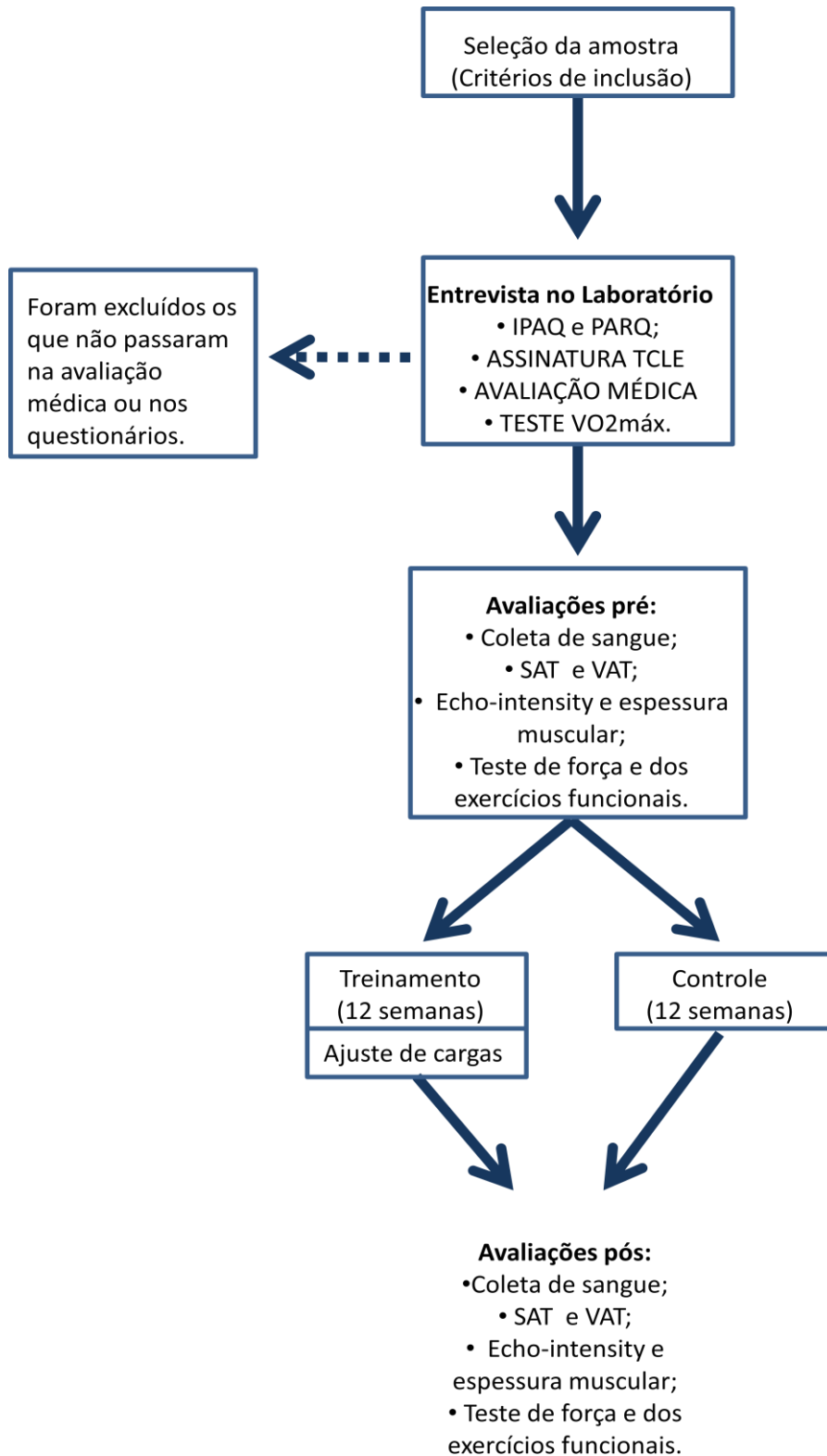
Tabela 3. Caracterização da amostra (n=16). Média  $\pm$  dp.

Variável	Controle (9)	Treinado (7)
Idade (anos)	49,22 $\pm$ 5,09	49,29 $\pm$ 5,35
Estatura (m)	1,64 $\pm$ 0,08	1,65 $\pm$ 0,08
Massa Corporal (kg)	68,6 $\pm$ 9,02	69 $\pm$ 11,45
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,47 $\pm$ 2,56	25,54 $\pm$ 3,23

Tabela 4. Valores para perfil lipídico e glicose. Média  $\pm$  dp.

Variável	Controle	Treinado
Colesterol Total (mg/dL)	174,26 $\pm$ 48,34	179,30 $\pm$ 46,12
Triglicerídeos (mg/dL)	94,28 $\pm$ 39,62	105,12 $\pm$ 22,58
HDL (mg/dL)	45,28 $\pm$ 11,92	48,71 $\pm$ 9,79
LDL (mg/dL)	110,12 $\pm$ 43,56	109,57 $\pm$ 41,90
Glicose (mg/dL)	101,03 $\pm$ 12,36	99,74 $\pm$ 10,32

Primeiramente os voluntários foram ao Laboratório de Pesquisa e Exercício (LAPEX) para esclarecimentos sobre o protocolo de estudo, para responderem o IPAQ, PARQ, além de assinarem o TCLE. No mesmo dia, foi realizado um eletrocardiograma de esforço pelo médico do laboratório, para que os participantes fossem incluídos no estudo, além do teste de consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2\text{pico}}$ ). No segundo dia de avaliações, foi realizada a coleta de sangue e as avaliações, por ultrassom, de espessura muscular, eco-intensidade, do tecido adiposo subcutâneo (SAT) e visceral (VAT). Nesse dia todas as avaliações foram realizadas em jejum. Nas duas visitas seguintes dos voluntários, os mesmos foram encaminhados para academia da UFRGS para familiarização com os exercícios. No último dia de avaliação, os sujeitos retornaram a academia para realização do teste de força e dos exercícios funcionais. Posteriormente as avaliações, iniciaram os três meses da intervenção. Após esse período todas as avaliações pré-treinamento foram refeitas. Abaixo segue o desenho experimental do estudo.



**Figura 3.** Desenho experimental do estudo com sujeitos de Meia Idade.

### **Programa de treinamento de força**

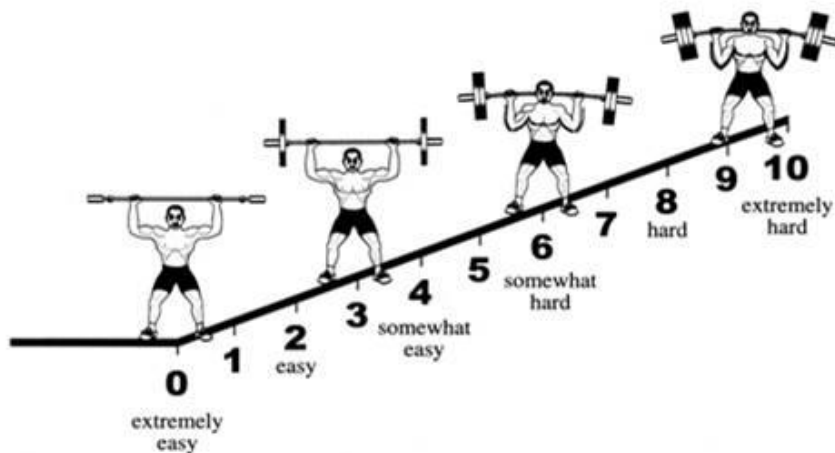
O programa de treinamento teve duração de doze semanas com frequência de três vezes por semana. As doze semanas foram divididas em quatro microciclos de três semanas (Tabela 5). Foram realizados exercícios em máquinas e peso livre. Além disso, foram executados exercícios funcionais: subir e descer de uma caixa, subir e descer um lance de escada e levantar de uma cadeira. Por outro lado, o grupo controle não participou de nenhuma intervenção durante as doze semanas. O modelo de periodização do treinamento foi linear com aumento progressivo de cargas e séries, mas com redução no número de repetições. As cargas foram controladas por faixas de repetições máximas (RMs), de modo que sejam utilizadas cargas de treino suficientes para realização do número desejado de repetições. Por exemplo, em uma faixa de 5-7 RMs os participantes precisavam realizar um mínimo de cinco repetições e máximo de sete. Quando as cargas se tornaram leves para a respectiva faixa de repetições ocorreu um incremento de carga. Os exercícios executados foram: abdominal reto, extensão de joelhos, flexão de joelhos, flexão plantar, leg press, remada, rosca bíceps, rosca tríceps e supino reto na barra guiada.

Tabela 5. Periodização do treinamento de força.

Mesociclos	Faixa de repetições	Número de séries	Intervalo entre séries
1	17-20	2	1 min
2	12-15	2	1 min
3	9-12	3	1 min e 30 s
4	7-10	4	2 min

Nos exercícios funcionais (levantar e sentar da cadeira, subir e descer da caixa e subir um lance de escada) os voluntários realizaram duas séries de dez repetições. A escala de OMNI para exercícios de força (Robertson et. al. 2003) era apresentada a eles com o intuito de controlar a intensidade do exercício. Quando os participantes chegassem a um nível de esforço abaixo de seis, foram utilizadas cargas adicionais, como caneleiras e halteres para incrementar a carga de treino. Durante a execução desses exercícios os participantes foram incentivados a realizarem o movimento o mais rápido possível, de maneira que a execução seja segura e correta.

**Figura 4.** Escala de percepção de esforço de OMNI



### **Teste de consumo máximo de oxigênio $VO_{2\text{pico}}$**

O protocolo utilizado foi o Bruce Modificado (Lerman et. al., 1976). Esse protocolo, com exceção dos dois primeiros estágios, é similar ao Bruce original. Os dois primeiros estágios, com duração de três minutos cada, possuem velocidade de 2,7 km/h e diferem apenas na inclinação da esteira (0% para o 1º estágio e 5% para o 2º estágio). No nono minuto, quando se inicia o 3º estágio a velocidade se mantém e a inclinação aumenta para 10%. A partir desse estágio ocorre aumento da velocidade e da inclinação em 2% a cada três minutos. O teste era finalizado quando o voluntário chegava à exaustão. Esse protocolo foi escolhido por ser mais adequado para idosos, visto que os resultados preliminares dos mesmos se encontram no experimento três. O equipamento utilizado para o teste foi o Vo2000 (Medgraphics, 2004).

### **Avaliações com o ultrassom**

Espessura muscular e Eco-intensidade.

Os sujeitos permaneceram deitados com os membros inferiores e superiores estendidos e relaxados. Foram feitas aquisições de imagens dos músculos vasto lateral (VL), vasto medial (VM), reto femoral (RF) e vasto intermédio (VI) com um ultrassom (Toshiba, Japão) em modo-B, sendo o ponto de medição do VL, VI e RF referente a 50% da distância entre o epicôndilo lateral do fêmur ao trocanter maior do fêmur, enquanto que o VM será mensurado a 30% da distância entre o epicôndilo lateral do fêmur ao trocanter maior do fêmur (Korhonen et al., 2009). Após a determinação dos pontos, foi utilizado um gel à base de água, que promove um contato acústico sem a necessidade de causar pressão sobre a pele. Em seguida o transdutor com frequência de amostragem de 7,5 MHz foi posicionado de forma



perpendicular ao músculo sobre o ponto a ser avaliado. Após coletadas, as imagens foram exportadas para um computador para serem analisadas no software de análise de imagens ImageJ (National Institutes of Health, EUA). A espessura muscular foi definida como distância entre o tecido adiposo subcutâneo e a aponeurose óssea superior, identificados na imagem.

A eco-intensidade (EI) foi determinada em uma região de interesse, por meio da escala de cinza obtida calculada pelo próprio software (Arts et. al. 2010). Foi realizada a eco-intensidade do VL, RF, VI e VM. Depois que foram feitas as eco-intensidades das quatro porções do quadríceps, foi determinada a EI do quadríceps femoral como a média das eco-intensidades das quatro porções do quadríceps. O mesmo avaliador executará as análises de espessura muscular e de eco-intensidade em todo o período do estudo e a média dos valores de três imagens será utilizada como valores de espessura e eco-intensidade muscular. Após as medidas de espessura muscular será feito um mapa dos pontos utilizados para maior fidedignidade da comparação com as medidas do período pós-treinamento.

#### Tecido adiposo subcutâneo (SAT) e visceral (VAT)

A espessura do tecido adiposo da região abdominal foi realizada com um aparelho de ultrassonografia Nemio XG (Tohiba, Japão). Para a medida da espessura do tecido adiposo subcutâneo foi utilizado um transdutor linear de 7,5 MHz, o qual foi posicionado cinco centímetros acima da cicatriz umbilical. Esse é o ponto onde se encontra a máxima espessura do SAT. Para espessura do SAT foi considerada a distância entre a gordura da pele e a interface da linha alba (Semiz et al. 2007).

A medida de espessura do VAT será realizada com um transdutor convexo de 3,75 MHz. O transdutor será posicionado imediatamente acima da cicatriz umbilical, tendo o cuidado para exercer a pressão mínima para aquisição da imagem. A espessura de VAT foi considerada a distância entre porção posterior do reto do abdômen a parede posterior da artéria aorta abdominal (Sankar et al. 2011).

#### **Teste de força máxima estimado**

O teste de força máximo estimado foi realizado para todos os exercícios de força. Esse teste consiste em que o voluntário realize o número máximo de repetições até a exaustão, de modo que ao realizar dez ou menos repetições, a escala de Lombardi (Lombardi, 1989) (tabela 6) era utilizada para estimar a força máxima. Dessa forma, a carga utilizada na série era multiplicada pelo fator de correção referente ao número de repetições realizadas. Caso o

voluntário fizesse mais de dez repetições na primeira tentativa, o mesmo descansava durante três minutos para uma nova tentativa, no qual a carga utilizada era aumentada. O número máximo de cinco tentativas eram realizadas para que se chegasse na faixa de repetições ideal, e assim, o teste poderia ser validado. Esse tipo de teste, em comparação ao teste de uma repetição máxima (1RM), mostra-se mais rápido e seguro, em virtude da utilização de cargas mais baixas.

Tabela 6. Escala de Lombardi. Relação porcentagem de 1RM e repetições.

REPETIÇÕES REALIZADAS	COEFICIENTE DE REPETIÇÃO
1	1.00
2	1.07
3	1.10
4	1.13
5	1.16
6	1.20
7	1.23
8	1.27
9	1.32
10	1.36

### Testes funcionais

#### Teste de sentar e levantar em 30 segundos

O teste de levantar e sentar em trinta segundos reflete a força dos membros inferiores. Nesse teste, o voluntário precisou levantar e sentar o maior número de vezes durante trinta segundos sem ajuda das mãos. Em resumo, o voluntário iniciou o teste sentado no meio da cadeira (altura padrão 42 cm) com os braços cruzados e no momento do sinal do avaliador o voluntário precisa levantar e posteriormente voltar à posição sentada. Ao final dos trinta segundos, o número de vezes que o voluntário levantou e sentou indica o resultado final. Caso os trinta segundos terminem após o sujeito levantar, o mesmo conta como movimento executado. (Rikki; Jonnes; 1999).

### Subir um lance de escada

Esse teste tem como objetivo medir a velocidade que o indivíduo consegue subir um lance de escada. Em resumo, o voluntário deve partir da posição em pé, no início da escada e, ao sinal do avaliador, o voluntário precisa subir o lance de escada o mais rápido possível (de maneira segura), podendo ou não utilizar o corrimão. O cronômetro deve ser disparado quando o avaliado colocar um dos pés no primeiro degrau e parado quando um dos pés alcançar o último degrau (Andreotti; Okuma, 1999).

### Registro alimentar

Foi realizado no momento da colheita de sangue antes do início da intervenção experimental um recordatório alimentar das 24 horas anteriores à coleta. Quando foram feitas as colheitas de sangue após o período de intervenção, os voluntários receberam o registro alimentar e repetiram nas 24 horas anteriores à colheita de sangue. Isso foi feito para tentar evitar uma alteração nos parâmetros do estresse oxidativo.

Tabela 7. Registro alimentar no período da coleta de sangue. Média  $\pm$  dp.

Variável	Controle	Treinado
Calorias (kcal)	1582,68 $\pm$ 462,92	1357,65 $\pm$ 268,31
Proteínas (g)	66,34 $\pm$ 20,43	67,49 $\pm$ 20,12
Carboidratos (g)	214,36 $\pm$ 99,95	164,19 $\pm$ 36,60
Lipídeos (g)	51,21 $\pm$ 20,70	50,12 $\pm$ 15,55
Vitamina A (mcg)	538,175 $\pm$ 219,88	737,81 $\pm$ 708,98
Vitamina C (mg)	85,76 $\pm$ 48,96	92,17 $\pm$ 75,95
Vitamina E (mg)	5,16 $\pm$ 3,09	5,91 $\pm$ 3,03

Os macronutrientes foram representados em grama (g) enquanto a vitamina A em microgramas (mcg) e as vitaminas C e E em miligramas (mg).

### Obtenção das amostras biológicas e preparação dos leucócitos

O procedimento de coleta de sangue foi realizado no LAPEX-UFRGS, na Escola Superior de Educação Física, Fisioterapia e Dança, por um profissional devidamente qualificado e habilitado, sempre na presença do responsável pelo projeto. O sangue foi coletado na região antecubital, com o local previamente preparado, higienizado e refrigerado para a realização do

procedimento. Em todas as coletas, foram retirados 16 mL de sangue através de punção venosa por meio de seringas e agulhas descartáveis. A agulha foi descartada imediatamente em recipientes apropriados para materiais perfurocortantes, adotando todos os cuidados de biossegurança de acordo com a resolução 358/05 CONAMA. O sangue foi coletado em tubos para soro e com EDTA (para separação das células mononucleares). Antes da separação das células mononucleares, o sangue total foi aliquoteado e incubado a duas temperaturas distintas em banho-maria (37 e 42 °C) por duas horas. O objetivo desta estratégia é verificar a habilidade das células em responder ao estresse (42 °C) expressando HSP70. Após a incubação (2 horas), as células mononucleares serão separadas por camadas de sangue em Histopaque 1077 (Sigma), como previamente descrito<sup>23</sup>.

### **Análises bioquímicas**

A mensuração HSPA1A intracelular foi feita através da técnica de Western Blot e as membranas foram reveladas no aparelho ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) e os dados foram expressos em unidades arbitrárias. A HSPA1A extracelular foi feita através de um kit ELISA de alta sensibilidade para HSP70 (Amp'd HSP70 High Sensitivity ELISA kit; Enzo Life Sciences, Nova Iorque, Estados Unidos). Os resultados foram expressos por ng/ml. A atividade da enzima antioxidante SOD foi determinada, em soro, de acordo com a técnica descrita por Mirsa e Fridovich (1972) na qual se mensura a capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação da adrenalina. Os valores de SOD foram expressos em USOD/ mg de proteína. A CAT, em soro, foi realizada com base na técnica de Aebi (1984) na qual se avalia a capacidade da catalase em consumir o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os resultados foram expressos em constante por mililitros (k/ml). As análises de SOD e CAT foram feitas no espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) Para determinar o índice de peroxidação lipídica, em soro, foi utilizado o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com o método descrito por Draper et. al. (1993) com os resultados expressos por nmol/ml. A determinação dos níveis de nitratos/nitritos totais, em plasma, foi realizada de acordo com o método de García-Robledo et. al. (2014) na qual é utilizado cloreto de vanádio (VCl<sub>3</sub>) para que reaja com nitrato e haja formação de nitrito. Os resultados foram expressos µM. Para avaliação do perfil lipídico e da glicose, em plasma, foi utilizado o aparelho Cobas C111 (Roche, São Paulo, Brasil) com kits específicos para cada análise. Os resultados foram expressos em mg/dL.

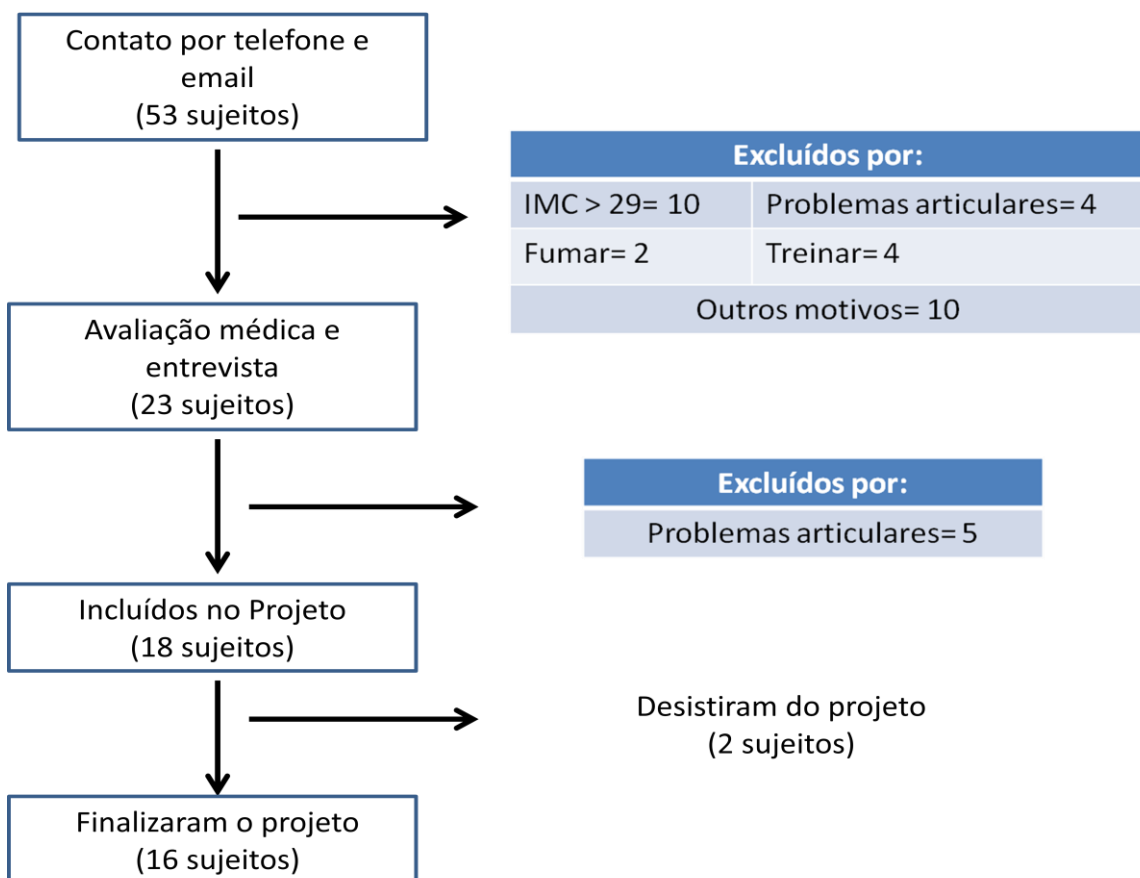
### Análise estatística

Foi utilizado o teste de Shapiro Wilk para verificação da normalidade das variáveis, assumindo uma distribuição normal homogênea. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-Teste de Bonferroni. Além disso, foi utilizado o teste t não pareado para análise do delta em algumas variáveis. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ . A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism 7.

### 3.3 RESULTADOS

#### Seleção dos voluntários

O total de 53 sujeitos entraram em contato, via telefone ou email, interessados em participar do estudo. Desses, somente 23 seguiram para o primeiro dia de visita, que incluía o preenchimento dos questionários e avaliação médica. A partir disso, 18 sujeitos foram incluídos e apenas dois voluntários desistiram da pesquisa, um por motivo de lesão e o outro por falta de tempo. Abaixo segue o quadro com a seleção dos voluntários.



**Figura 5.** Fases da seleção de voluntários para que fossem incluídos no estudo.

### Lista de medicamentos

Entre os voluntários que participaram do estudo, seis deles faziam uso de algum medicamento, o que corresponde a menos da metade da amostra. Dentre os utilizados, estão incluídos medicamentos para hipertensão, depressão e/ou ansiedade, para varizes e de reposição hormonal. A tabela oito mostra com mais detalhes a relação de medicamentos e sua função.

Tabela 8. Lista de medicamentos utilizados pelos voluntários.

Nº de Sujeitos	MEDICAMENTO	FUNÇÃO	DOENÇA
1	Aradois 25 mg	Inibidor da ECA	Hipertensão
1	Fluoxetina 20 mg	ISRS	Depressão, TOC e ansiedade
1	Puran T4 100 mg	Hormônio sintético	Reposição hormonal
1	Velija 30 mg (Cloridrato de Duloxetina)	ISRSN	Depressão, TOC e ansiedade
1	Amitriptilina	ISRSN	Depressão
1	Diosmin (Diosmina/Hesperidina)	Vasculoprotetor	Varizes, petéquias

TOC: transtorno obsessivo compulsivo;

ECA: enzima conversora da angiotensina;

ISRS(N): Inibidor Seletivo do Receptor de Serotonina (e Noradrenalina).

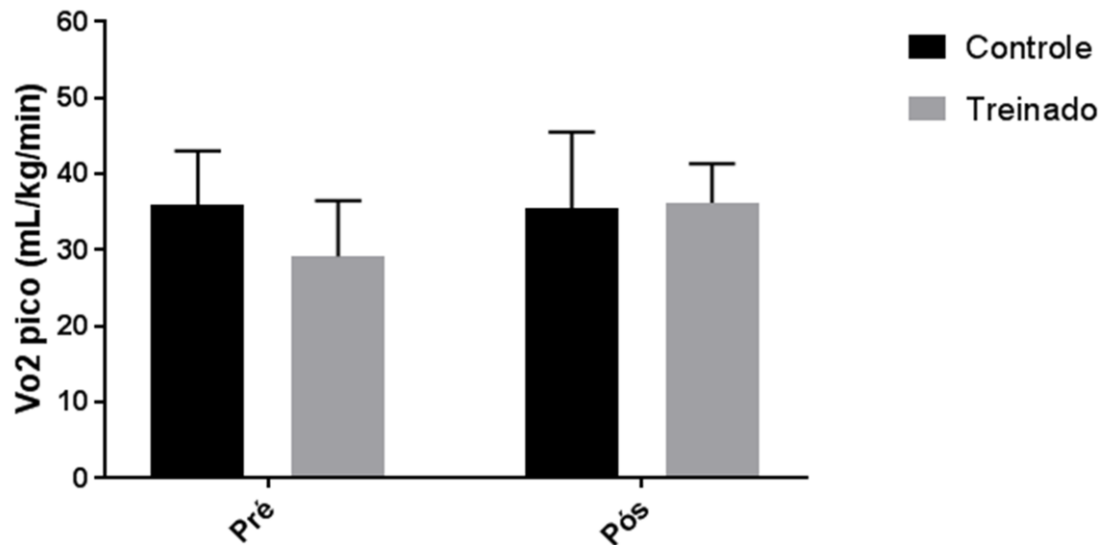
### Aderência ao treinamento

Os sete sujeitos que participaram do grupo que realizou o treinamento de força compareceram a todas as sessões de treino, correspondendo a 100% de aderência. Para que o voluntário não fosse excluído pelo número de faltas, o mesmo deveria ter ido a, pelo menos, 75% das sessões, ou seja, 27 sessões.

### Pico do consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub> pico)

Não houve diferença significativa entre os grupos tanto no momento pré quanto no pós-treinamento. Quando comparado os momentos pré e pós dentro dos grupos também não houve diferença significativa ( $p > 0,005$ ). Os valores para o VO<sub>2</sub> pico no grupo Treinado no momento pré foram de  $29,17 \pm 7,3$  (ml/kg/min) e no momento pós de  $36,17 \pm 5,15$  (ml/kg/min). Para o grupo Controle os valores foram de  $35,86 \pm 7,1$  e  $35,49 \pm 10$ , respectivamente.

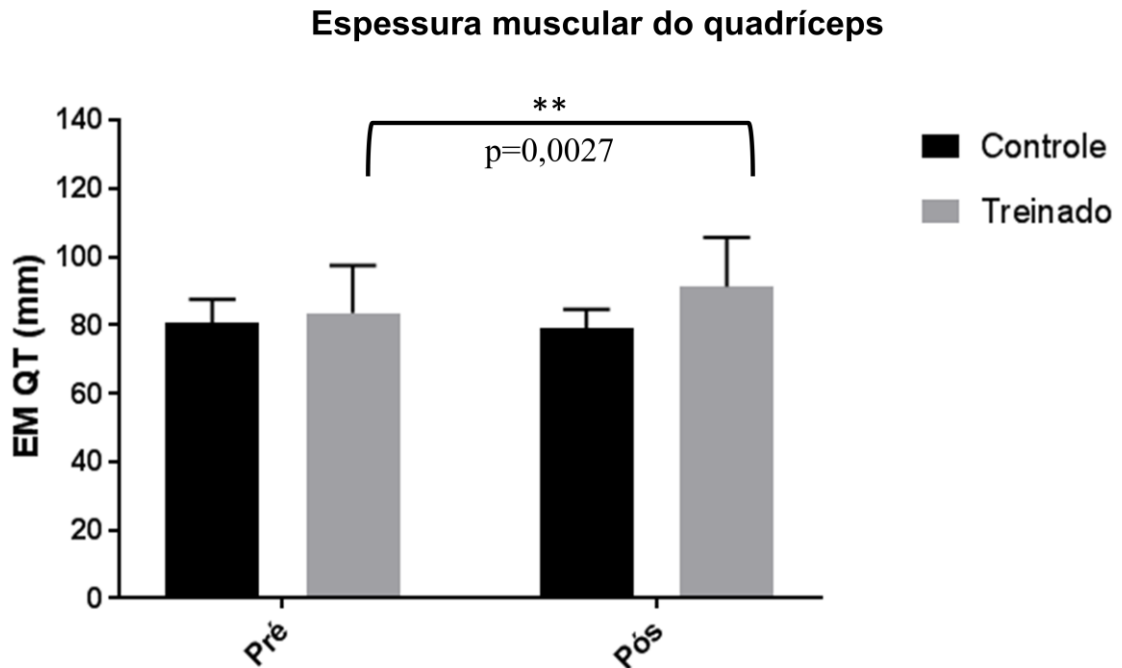
### Pico do consumo máximo de oxigênio



**Figura 6.** Valores do VO<sub>2</sub> (consumo de oxigênio) de pico pré e pós treinamento em sujeitos de Meia Idade alocados em grupo controle ou treinado ( $p > 0,05$ ). Valores expressos de VO<sub>2</sub> pico em (ml/kg/min).

### Espessura muscular

Não houve diferença significativa entre os momentos pré e pós-treinamento e entre os grupos no músculo vasto lateral ( $p > 0,005$ ). Os valores para o grupo Treinado foram:  $21,3 \pm 3,13$  mm e  $22,66 \pm 4,07$  mm, respectivamente. E para o grupo Controle:  $19,66 \pm 1,46$  mm e  $19,36 \pm 2,23$  mm. Da mesma forma, não houve diferença significativa ao analisar o músculo vasto medial. Para o grupo Treinado os valores pré e pós foram:  $24,08 \pm 7,73$  mm e  $28,5 \pm 6,71$  mm, respectivamente. No grupo Controle os valores pré e pós foram:  $24,18 \pm 3,23$  mm e  $24,4 \pm 2,15$  mm, respectivamente. Quando analisado o músculo reto femoral houve interação significativa ( $p = 0,0224$ ), com os seguintes valores pré e pós para o grupo Treinado ( $19,46 \pm 4,8$  mm e  $20,14 \pm 4,77$  mm) e para o Controle ( $19,62 \pm 2,3$  mm e  $18,94 \pm 1,45$ ). No músculo vasto intermédio houve diferença entre grupos no momento pós ( $p = 0,0400$ ). Os valores pré e pós do grupo Treinado foram:  $18,53 \pm 3$  mm e  $19,95 \pm 2,97$  mm. Para o grupo Controle os valores foram os seguintes:  $17,39 \pm 2,98$  mm e  $16,19 \pm 2,36$  mm. Por último, verificando os valores para todo o quadríceps houve diferença significativa entre os momentos pré e pós no grupo Treinado ( $p = 0,0028$ ). Os valores para esse grupo foram os seguintes:  $83,51 \pm 13,88$  mm e  $91,27 \pm 14,36$  mm. E para o Controle:  $80,87 \pm 6,66$  mm e  $79,04 \pm 5,53$  mm. O gráfico abaixo ilustra os valores pré e pós dos dois grupos para o quadríceps.



**Figura 7.** Espessura muscular do quadríceps (EM QT) avaliada por ultrassom em sujeitos de Meia Idade alocados em grupo controle ou treinado. As mensurações foram realizadas antes e depois do período de treinamento. Valores expressos em milímetros (mm).

### Eco-intensidade

Nas quatro porções do quadríceps (vasto lateral, intermédio e medial e o reto femoral) não houve diferença significativa entre os momentos pré e pós e entre grupos ( $p > 0,05$ ). Os valores para o grupo Treinado e Controle são mostrados na tabela.

Tabela 9. Valores para Echo-intensity nos momentos pré e pós. Média  $\pm$  dp.

Porção do quadríceps	Controle		Treinado	
	Pré	Pós	Pré	Pós
Vasto Lateral EI (U.a.)	57,83 $\pm$ 12,18	57,9 $\pm$ 11,6	52,04 $\pm$ 12,32	46,16 $\pm$ 6,04
Reto Femoral EI (U.a.)	61,66 $\pm$ 14,21	61,66 $\pm$ 10,83	59,36 $\pm$ 15,89	58,06 $\pm$ 11,75
Vasto Intermédio EI (U.a.)	29,92 $\pm$ 8,61	33,5 $\pm$ 7,12	25 $\pm$ 6,80	23,53 $\pm$ 3,23
Vasto Medial EI (U.a.)	64,29 $\pm$ 11,92	66,98 $\pm$ 10,48	66,55 $\pm$ 20,23	64,60 $\pm$ 12,6

EI: Echo intensity. Valores expressos em unidades arbitrárias (U.a.)



### Tecido adiposo subcutâneo (SAT) e visceral (VAT)

Não houve diferença significativa entre os grupos e nos momentos pré e pós dentro dos grupos tanto para o SAT quanto para o VAT ( $p>0,05$ ). Os valores para as duas variáveis nos dois grupos são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 10. Valores para tecido adiposo subcutâneo (SAT) e visceral (VAT) nos momentos pré e pós. Média  $\pm$  dp.

Variável	Controle		Treinado	
	Pré	Pós	Pré	Pós
SAT (mm)	25,31 $\pm$ 8,88	25,6 $\pm$ 11,54	23,77 $\pm$ 5,92	23,34 $\pm$ 4,23
VAT (mm)	43,19 $\pm$ 15,61	44,58 $\pm$ 14,6	39,15 $\pm$ 13,59	39,55 $\pm$ 9,02

Valores para SAT e VAT expressos em milímetros (mm).

### Parâmetros de força muscular

Os valores de força foram analisados levando em consideração os valores pré e pós, além do delta ( $\Delta$ ), conforme é mostrado na tabela abaixo. No exercício leg press houve diferença significativa entre os momentos pré e pós no grupo Treinado ( $p=0,0048$ ) e ao considerar os valores do delta, houve diferença significativa entre grupos ( $p=0,0066$ ). Da mesma forma, houve diferença no exercício de bíceps entre pré e pós no Treinado ( $p=0,0058$ ) e no delta ( $p=0,0141$ ) entre grupos. Para o exercício supino (barra guiada) também houve diferença no grupo Treinado entre os momentos pré e pós ( $p=0,0028$ ) e entre grupos considerando o delta ( $p=0,0073$ ). O mesmo aconteceu no exercício remada onde houve diferença entre os momentos no grupo Treinado ( $p=0,0060$ ) e entre grupos analisando o delta ( $p=0,0321$ ). No exercício flexor também houve diferença entre os momentos no grupo Treinado ( $p=0,0016$ ) e entre grupos pelo delta ( $p=0,0151$ ). Para o exercício de tríceps houve diferença significativa entre grupos no momento pré ( $p=0,0343$ ), além da diferença no grupo Treinado entre os momentos ( $p=0,0031$ ) e entre grupos pelo delta ( $p=0,0285$ ). Nos exercícios extensor e flexão plantar houve diferença significativa apenas entre momentos no grupo Treinado ( $p=0,0014$ ) e ( $p=0,0280$ ), respectivamente.

Tabela 11. Valores de força para o teste de 1RM estimado nos momentos pré e pós. Média  $\pm$  dp.

Exercício	Controle			Treinado		
	Pré	Pós	$\Delta$	Pré	Pós	$\Delta$
Leg Press (kg)	172,94 $\pm$ 46,38	171,67 $\pm$ 32,39	(-)1,27 $\pm$ 24,83†	143,28 $\pm$ 96,92*	244,143 $\pm$ 163,97*	100,86 $\pm$ 92,74†
Supino (kg)	27 $\pm$ 8,2	26,44 $\pm$ 7,83	(-)0,77 $\pm$ 2,63†	14,57 $\pm$ 9,16*	24,71 $\pm$ 18,15*	10,14 $\pm$ 9,87†
Extensor (kg)	51,5 $\pm$ 13,38	58,5 $\pm$ 16,06	7 $\pm$ 7,2	41,71 $\pm$ 16,95*	61,43 $\pm$ 32,19*	19,71 $\pm$ 16,45
Remada (kg)	45,39 $\pm$ 10,69	46,66 $\pm$ 10,28	1,28 $\pm$ 3,41†	36,57 $\pm$ 9,52*	47,78 $\pm$ 21,37*	11,21 $\pm$ 12,03†
Flexor (kg)	82,83 $\pm$ 21,99	86,16 $\pm$ 21,6	3,33 $\pm$ 14,19†	62,43 $\pm$ 16,37*	87,93 $\pm$ 33,47*	25,5 $\pm$ 17,9†
Bíceps (kg)	8,06 $\pm$ 1,69	8 $\pm$ 1,54	(-)0,06 $\pm$ 0,68†	7,36 $\pm$ 1,54*	8,78 $\pm$ 2,61*	1,43 $\pm$ 1,40†
Flexão Plantar (kg)	65,55 $\pm$ 23,92	74,5 $\pm$ 22,9	8,94 $\pm$ 16,58	48,78 $\pm$ 20,65*	72,28 $\pm$ 44,84*	23,5 $\pm$ 27,89
Tríceps (kg)	42,05 $\pm$ 10,4‡	43,67 $\pm$ 7,58	1,61 $\pm$ 5,5†	29,71 $\pm$ 6,47‡*	39,28 $\pm$ 13,56*	9,57 $\pm$ 7,56†

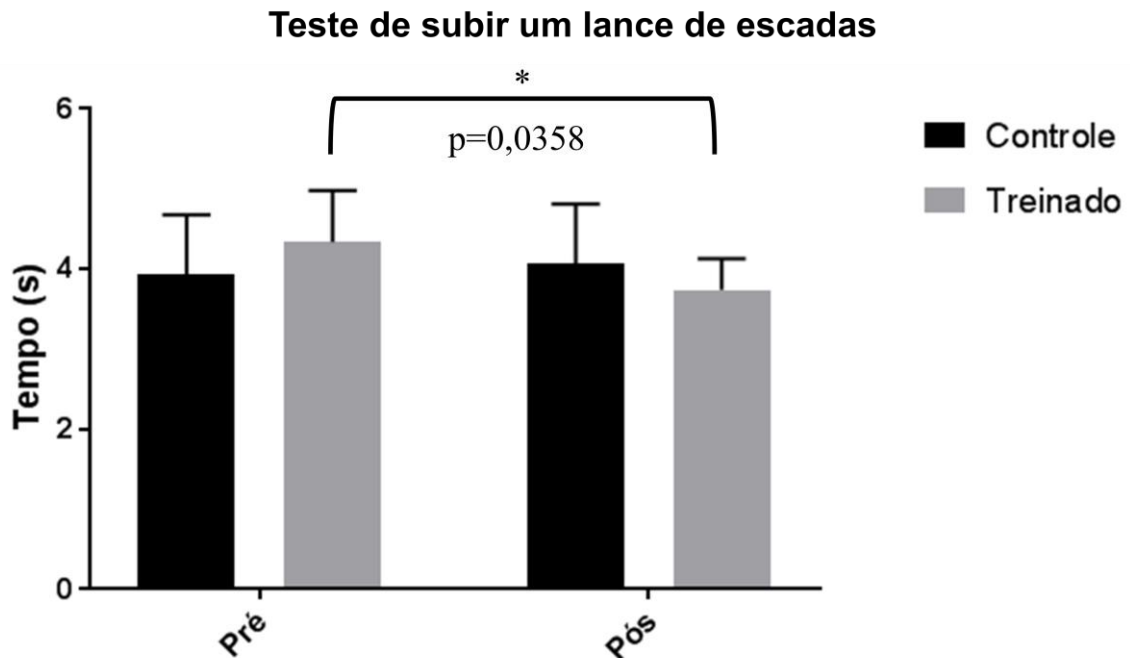
Diferença entre os grupos no momento pré (‡). Diferença entre pré-pós treinado (\*). Diferença entre os  $\Delta$  (†).

1RM: Uma repetição máxima. Valores expressos em quilograma (kg).

O exercício supino foi realizado com barra guiada.

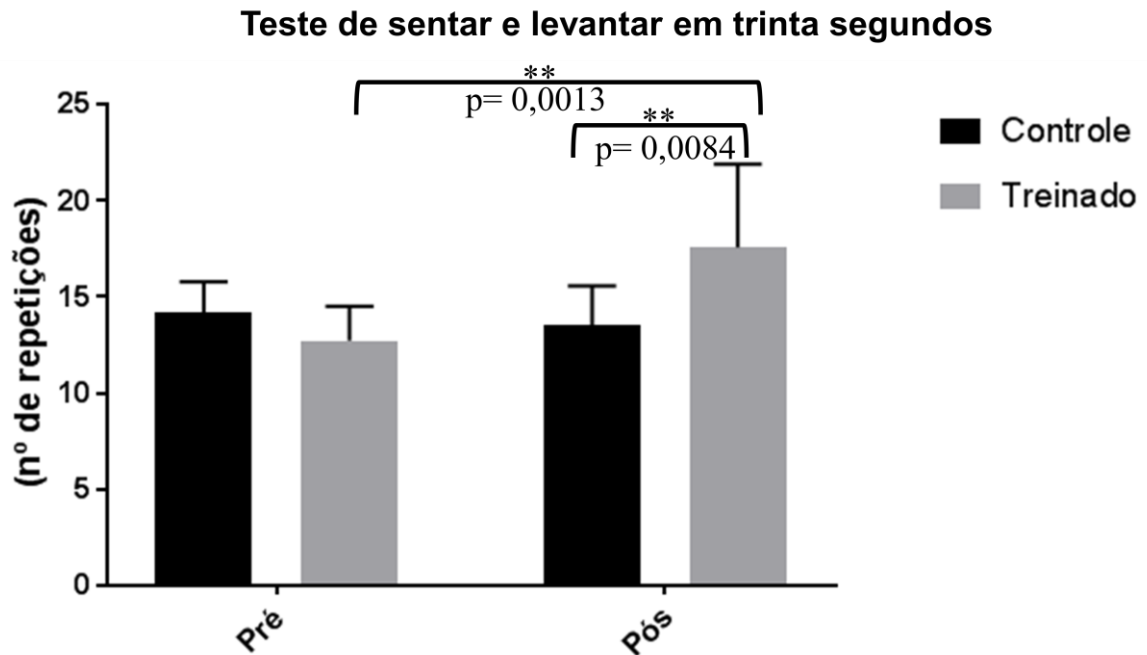
### Testes Funcionais

Para o exercício de subir um lance de escadas houve diferença significativa no grupo Treinado entre os momentos ( $p=0,0358$ ). Nesse grupo os valores pré e pós foram: 4,33 $\pm$ 0,65 seg. e 3,73 $\pm$ 0,39 seg. Para o grupo Controle: 3,92 $\pm$ 0,74 seg. e 4,05 $\pm$ 0,75 seg.



**Figura 8.** Teste de subir um lance de escadas pré e pós treinamento em sujeitos de Meia Idade alocados em grupo controle ou treinado. Valores expressos em segundos (s).

No exercício de sentar e levantar em trinta segundos houve diferença entre grupos pós-treinamento ( $p=0,0084$ ) e no grupo Treinado entre momentos ( $p=0,0013$ ). Os valores pré e pós para o grupo Treinado foram:  $12,71\pm 1,79$  (nº de repetições) e  $17,57\pm 4,13$  (nº de repetições). Para o grupo Controle:  $14,22\pm 1,56$  (nº de repetições) e  $13,55\pm 2$  (nº de repetições).



**Figura 9.** Teste de sentar e levantar em trinta segundos pré e pós treinamento em sujeitos de Meia Idade alocados em grupo controle ou treinado. Valores expressos em número de repetições.

### Parâmetros de estresse oxidativo e nitritos

Nessas quatro variáveis bioquímicas, não houve diferença significativa entre os grupos e entre os momentos ( $p>0,005$ ). Os valores por grupo e momento estão na tabela abaixo.

Tabela 12. Valores para estresse oxidativo e nitritos nos momentos pré e pós. Média  $\pm$  dp.

Variável	Controle		Treinado	
	Pré	Pós	Pré	Pós
SOD (USOD/mg PTN)	1,006 $\pm$ 0,695	1,135 $\pm$ 0,762	1,370 $\pm$ 0,992	1,393 $\pm$ 0,798
CAT (k/mL)	4,082 $\pm$ 2,284	3,19 $\pm$ 1,74	2,381 $\pm$ 0,9	3,036 $\pm$ 1,32
Nitritos ( $\mu$ M)	139,443 $\pm$ 76,16	116,95 $\pm$ 53,06	158,82 $\pm$ 56,66	137,16 $\pm$ 66,74
TBARS (nmol/mL)	3,159 $\pm$ 0,705	3,342 $\pm$ 0,981	3,195 $\pm$ 1,4	2,505 $\pm$ 0,466

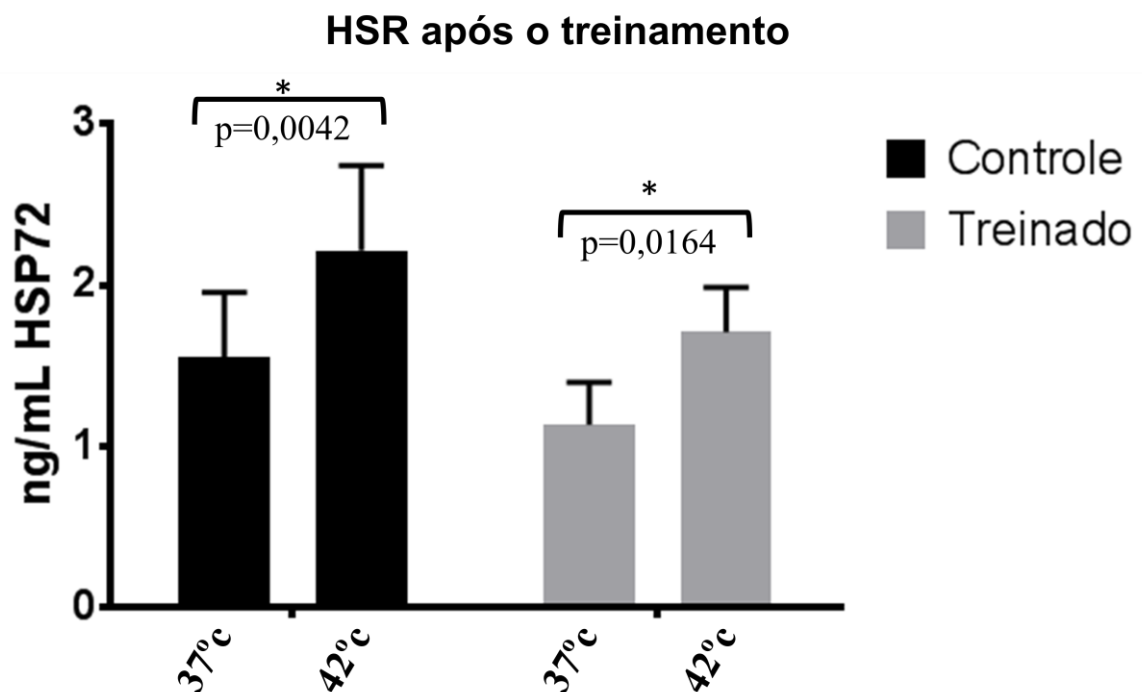
SOD: superóxido dismutase. Valores expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína(mg/PTN)

CAT: catalase. Valores expressos em constante (k) por mililitros (ml).

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

### Resposta ao choque térmico– HSP70 extracelular

Quando comparada todas as variáveis ao mesmo tempo (37 °C e 42 °C, momentos e grupos) não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ). Entretanto, ao analisar apenas o pós-treinamento houve diferença significativa entre 37 °C e 42 °C no grupo Controle ( $p=0,042$ ) e no Treinado ( $p=0,0164$ ). Ou seja, ambos os grupos, treinado e controle, apresentam respostas similares quando suas células são submetidas ao estresse térmico. No entanto, o treinamento de força não modifica essa resposta. O gráfico abaixo ilustra esse resultado.

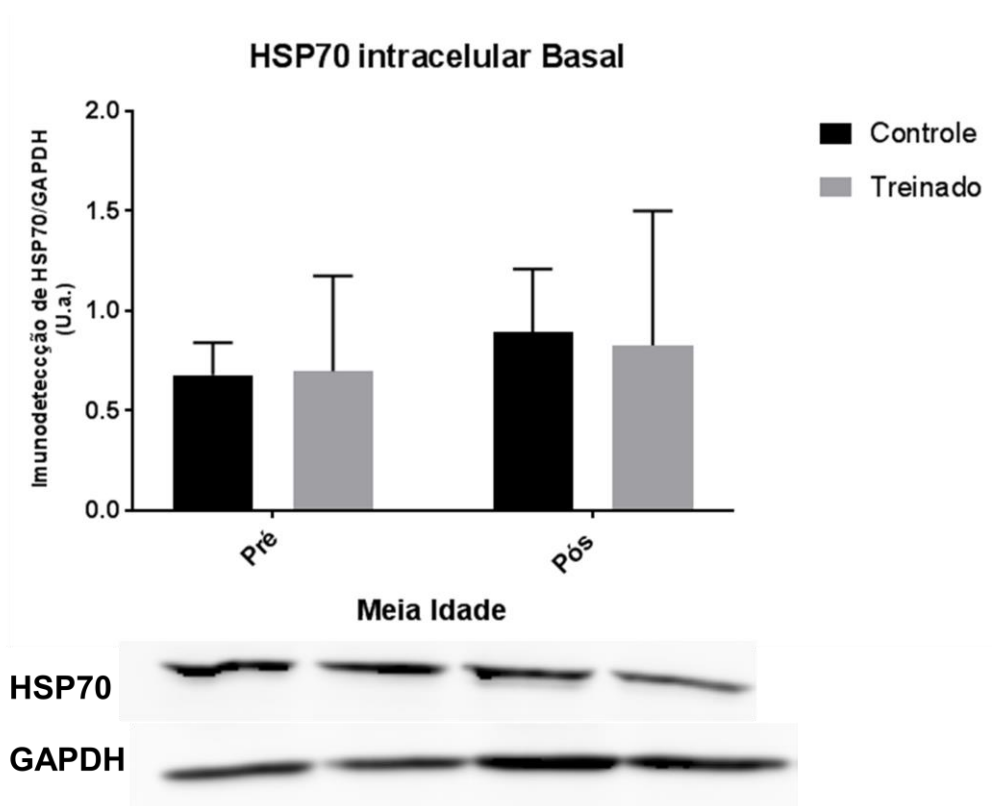


**Figura 10.** Resposta ao choque térmico (HSR) no momento pós-treinamento em sujeitos de Meia Idade alocados em grupo controle ou treinado. Amostras foram colocadas durante duas horas em temperaturas distintas (37°C e 42°C) e depois a HSP70 extracelular foi avaliada com kit ELISA de alta sensibilidade para HSP70.

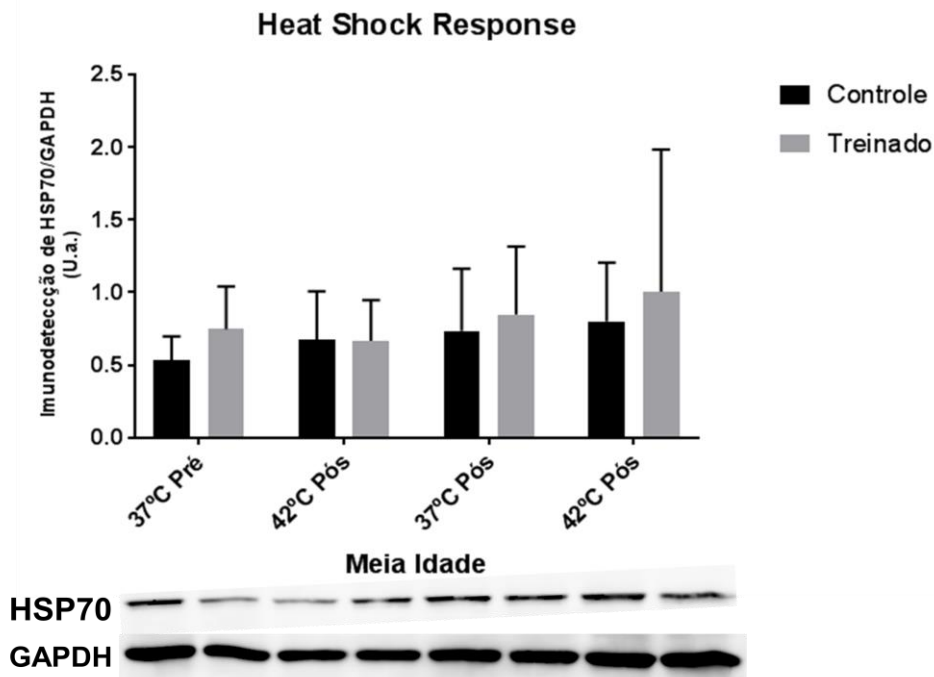
### HSP70 Intracelular- Basal e resposta ao choque térmico

Ao comparar os valores basais (sem choque térmico) entre os grupos e momentos não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ). Da mesma forma, quando avaliado a resposta ao choque térmico em leucócitos não houve diferença significativa considerando todas as variáveis (37 °C e 42 °C, momentos e grupos) não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ). A ausência de diferenças na expressão de iHSP70 entre as temperaturas 37 °C e 42 °C (que eram esperadas), pode ser devida a diversos fatores: I) tempo insuficiente (2h) para expressar a

proteína de forma significativa e consistente ou II) transporte imediato da HSP70 sintetizada para o meio extracelular. Os gráficos abaixo ilustram os resultados.



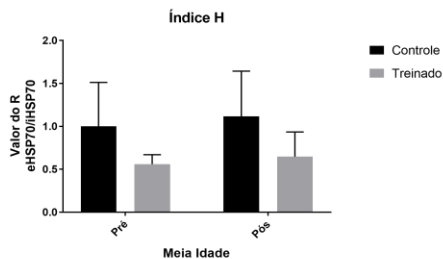
**Figura 11.** Análise quantitativa de HSP70 intracelular normalizada pelo GAPDH em sujeitos de Meia Idade alocados em grupo controle ou treinado. Avaliações foram feitas antes e depois do treinamento. Valores expressos em unidades arbitrárias.



**Figura 12.** Análise quantitativa da HSP70 normalizada pelo GAPDH após resposta ao choque térmico em sujeitos de Meia Idade alocados em grupo controle ou treinado. As amostras foram colocadas em duas temperaturas (37°C e 42°C) durante duas horas para posterior avaliação da HSP70 por Western Blot. Avaliações foram feitas pré e pós treinamento. Valores expressos em unidades arbitrárias.

### Índice H

Avaliando a relação entre a HSP70 extra/intracelular não foi encontrado diferença significativa entre grupos e momentos ( $p > 0,05$ ). O gráfico abaixo mostra os resultados.



**Figura 13.** Relação entre HSP70 extra e intracelular avaliada em sujeitos de Meia Idade alocados em grupo controle ou treinado. Relação foi feita nos momentos pré e pós treinamento.

### 3.4 DISCUSSÃO

Os principais resultados desse estudo mostram que sujeitos saudáveis, de Meia Idade, submetidos a um protocolo de treinamento de força por doze semanas obtiveram ganhos de força, aumento da espessura muscular e melhora em exercícios funcionais. Ademais, esses voluntários, independente do treinamento, mantêm em parâmetros, aparentemente normais, a HSR.

Como já está amplamente descrito na literatura, o treinamento de força é uma estratégia importante para aprimoramentos na força muscular (Häkkinen et. al., 1998; Aagaard et. al., 2002; Karavirta et. al., 2009). Esses ganhos são importantes para manutenção do desempenho físico e prevenção da sarcopenia e da dinapenia (perda de força muscular) (Clark; Manini, 2008). Isso também se torna relevante para sujeitos de Meia Idade que estão na fase inicial do processo de envelhecimento. A respeito disso, estudos longitudinais têm verificado perdas de força, potência e qualidade muscular tanto em sujeitos de Meia Idade quanto em idosos (Kennis et. al., 2014; Delmonico et. al., 2009; Reid et. al., 2014).

O estudo de Kennis e colaboradores (2014) analisou 105 homens (média de idade: 46 anos) em duas avaliações com um intervalo de dez anos para verificar alterações de força e composição corporal resultantes do processo de envelhecimento. Após os dez anos, os pesquisadores encontraram redução de força e potência muscular e diminuição da capacidade aeróbia. Apesar dos resultados demonstrarem modestos ganhos de massa muscular e corporal, ocorreram significativas reduções na eficiência muscular. Essa mensuração foi feita pela relação entre força ou potência com a massa muscular da perna. Segundo os autores, isso demonstra que aumentos da massa muscular não seriam tão preponderantes para manutenção da força muscular e que fatores neurais se deteriorariam antes e, por isso, seriam importantes para redução da eficiência muscular (Kennis et. al., 2014). Uma possível explicação é que sujeitos de Meia Idade já estão perdendo unidades motoras nas fibras de contração rápida, e quando as mesmas são reinervadas, o são por neurônios motores que inervam as fibras de contração lenta (Aagaard et. al., 2010). Portanto, existiria uma redução de força anterior à perda de massa muscular em sujeitos de Meia Idade.

Como contraponto a isso, e mencionado anteriormente, sujeitos de Meia Idade que participam de programas de treinamento de força demonstram aprimoramento de força muscular (Häkkinen et. al., 1998; Kemmler et. al., 2004) No estudo de Häkkinen e colaboradores (1998) seis meses de treinamento possibilitaram ganhos de força isométrica e dinâmica (avaliado por uma repetição máxima-1RM) nos membros inferiores. Outro estudo demonstrou ganhos de força isométrica nos membros superiores e inferiores e de força

dinâmica (1RM) nos membros inferiores após 21 semanas de treinamento (Karavirta et. al., 2009). Esses estudos corroboram com os nossos resultados, demonstrando que sujeitos de Meia Idade aumentam a força e, mais especificamente, a força dinâmica após o treinamento.

Ademais dos ganhos de força proporcionados pelo treinamento, a melhora da capacidade funcional tem sido verificada na literatura (Bautmas et. al., 2005; Njemini et. al., 2017). A consequência disso é maior independência para realização de tarefas, como as atividades da vida diária (AVDs) (Lynch et. al. 2011) No presente experimento ocorrem melhoras na execução dos dois testes funcionais realizados (subir um lance de escadas e sentar e levantar em trinta segundos). Corroborando com nossos achados, Batumans e colaboradores (2005) encontraram melhora da capacidade funcional após seis semanas de treinamento de força. Os testes realizados foram caminhada de seis minutos e sentar e levantar da cadeira em trinta segundos. Da mesma forma, outro estudo do mesmo grupo verificou, após doze semanas de treinamento de força, aumento no número de repetições para o teste de sentar e levantar em trinta segundos, aumento na distância para o teste de caminhada de seis minutos e redução do tempo para o teste de sentar e levantar cinco vezes (Njemini et. al., 2017).

Os nossos achados corroboram com os estudos citados anteriormente, principalmente porque um dos testes realizados foi o mesmo que o do presente estudo (teste de sentar e levantar em trinta segundos). Entretanto, não realizaram o teste de subir um lance de escadas. Para efeito de comparação com o presente experimento que encontrou melhoras no teste de subir um lance de escadas, um estudo com duração de 24 semanas de treinamento de força demonstrou redução no tempo para execução desse teste ao final do treinamento (Henwood et. al., 2008).

Na literatura, vem sendo encontrado relação entre capacidade funcional e qualidade muscular do quadríceps femoral (Rech, et. al., 2014; Wilhelm et. al., 2014). Nesses casos, a qualidade muscular é avaliada pela Eco-intensidade (Echo-intensity-EI), onde um aumento da mesma indicaria aumento de tecido não contrátil no músculo (Wilhelm et. al., 2014). Portanto, o aumento da EI estaria relacionada com diminuição da capacidade funcional. Ao contrário dos nossos resultados, muitos estudos demonstraram redução da EI após o treinamento de força tanto em jovens quanto em idosos (Ikezoe et. al., 2017; Radaelli, 2013a,b). Um treinamento de força, utilizando o exercício extensor de joelhos, durante oito semanas em jovens foi eficaz para, além de melhorar força e massa muscular, reduzir a EI (Ikezoe, 2017). Em idosos, treze semanas de treinamento de força foram eficazes para reduzir a EI (Radaelli, 2013b) Uma possível explicação para o presente estudo não ter encontrado



alteração na EI após o treinamento, pode estar relacionado com a faixa etária muito grande do grupo (40-59 anos), acarretando em resultados mais heterogêneos.

Um estudo tentou verificar relação entre EI e capacidade aeróbia (Cadore et. al., 2012). Visto que a capacidade aeróbia está relacionada com a capacidade funcional, seria possível uma relação entre EI e desempenho aeróbio (Cadore et. al., 2012). Nesse estudo, os voluntários realizaram um teste incremental em ciclo ergômetro para verificar o pico do consumo de oxigênio ( $VO_2$  pico), além da EI ter sido avaliada. Os autores encontraram associação entre EI e as cargas de trabalho nos limiares ventilatórios (LV1 e LV2), indicando que o aumento de tecido não contrátil no músculo influenciaria de modo negativo o desempenho aeróbio (Cadore, 2012). Como no presente experimento não houve alteração na EI, isso não influenciou de maneira positiva incrementos no  $VO_2$  pico. Ademais, é possível que o treinamento de força não seja tão eficiente para aprimorar o  $VO_2$  pico, ainda mais em sujeitos de Meia Idade que não possuem uma redução tão drástica no desempenho aeróbio quanto idosos.

Ainda que as reduções de força e da qualidade muscular não estejam diretamente relacionadas com a perda de massa muscular, aprimoramentos da mesma são importantes para prevenção da sarcopenia e resistência à insulina (Cleasby et. al., 2016) e manutenção das suas funções como órgão endócrino (Pedersen, 2009). Os aumentos de massa muscular encontrados no presente experimento corroboram com outros estudos (Häkkinen et. al., 1998; Radaelli et. al. 2013b, Ikezoe et. al., 2017) Esses aumentos encontrados nos estudos foram verificados tanto avaliando pela espessura muscular (Radaelli et. al. 2013b, Ikezoe et; al., 2017) quanto pela área de secção transversa do músculo (Häkkinen et. al., 1998). Ademais do que foi mencionado anteriormente, os ganhos de massa muscular são importantes, visto que a perda da mesma, causada pela inatividade física, pode preceder a redução de massa óssea (Lloyd et. al., 2014). O que resultaria em um sujeito frágil e dependente (Clark; Manini, 2008) Considerando que a perda de massa muscular é inerente ao envelhecimento, uma atenuação da mesma pode ser importante para manutenção da massa muscular e óssea. Dessa forma, pode-se considerar que o treinamento realizado nesse experimento seria uma estratégia efetiva para tal.

Sabe-se que com o avançar da idade, mais especificamente pelos 40 anos, além do aumento de lipídeos intramuscular, ocorre aumento do VAT. Esse aumento tem relação com a redistribuição de gordura do SAT para o VAT (Palmer; Kirkland, 2016; Tchkonja et. al., 2010). Portanto, aumentos no VAT estariam mais relacionados com doenças relacionadas ao envelhecimento (Tchkonja et. al., 2010). Como estratégia para redução do VAT, o exercício

parece ser efetivo (Ismail, 2011; Vissers et. al., 2013). Ao realizar uma revisão sistemática e meta-análise, Ismail e colaboradores (2011) verificaram que em sujeitos com sobrepeso ou obesos apenas o exercício aeróbio seria eficaz para redução do VAT. Não foi encontrado efeito significativo para o treinamento de força. Um dos critérios utilizados no estudo foi que as intervenções deveriam ter pelo menos quatro semanas de duração. Outra meta-análise também demonstrou que o treinamento aeróbio (duração de no mínimo oito semanas) seria mais efetivo para redução do VAT que o treinamento de força em sujeitos com sobrepeso e obesos (Vissers et. al., 2013). Esses achados corroboram com os nossos, visto que não encontramos ao final do treinamento redução do VAT. Além do treinamento de força parecer ser menos eficaz para reduzi-lo, os voluntários do presente estudo não eram obesos, o que possivelmente dificulta perceber alguma modificação no VAT.

O presente estudo também não encontrou modificações do SAT ao final do treinamento. Esse resultado vai ao encontro do estudo de Keating e colaboradores (2017). Ainda que o estudo tivesse apenas voluntários com sobrepeso e obesos, os autores não verificaram alterações no SAT após as oito semanas de treinamento de força. Aparentemente o treinamento não parece efetivo para reduzir o SAT. Além disso, redução isolada do mesmo parece não melhorar a sensibilidade à insulina no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, ademais de não alterar marcadores inflamatórios na circulação (Klein et. al., 2004).

A inatividade física relacionada com o processo do envelhecimento está diretamente relacionada com o aumento do dano oxidativo e, por consequência, da inflamação (Bouaziz et. al., 2015; De Maio; De la Fuente, 2015) Sobre isso, as adaptações ocorridas com a prática do exercício parecem aumentar atividade antioxidante (Gomez-Cabrera, 2007). No músculo esquelético isso ocorreria mediado pelo NF- $\kappa$ B, pois a mesma possui sítios de ligação na região promotora dos genes das enzimas antioxidantes, principalmente MnSOD (manganês superóxido dismutase) e GPx (glutathione peroxidase) (Gomez-Cabrera et. al., 2007). Em relação aos nossos resultados, não encontramos aumento da atividade antioxidante circulante avaliando a SOD e a CAT (catalase) e peroxidação lipídica avaliado pelo TBARS. Três estudos do mesmo autor (Azizbeigi et.al., 2013; 2014; 2015) verificaram que oito semanas de treinamento de força melhoram atividade da SOD e da GPx e reduzem os níveis de peroxidação lipídica. Algumas diferenças importantes entre o nosso e os três estudos são que os participantes dos três estudos eram jovens enquanto do nosso eram maiores de 40 anos e em dois estudos (Azizbeigi et. al, 2013; 2014) as enzimas antioxidantes foram avaliadas em eritrócitos. Essa seria uma possível explicação para não ter ocorrido diferença da SOD e CAT após o treinamento no presente estudo. Outro ponto importante é que os níveis de peroxidação

lipídica avaliados nos estudos foram por um método direto, mensurando os níveis de MDA (malondialdeído), e no presente estudo foi utilizado um método indireto. Apesar disso, pode-se dizer que há uma tendência para diminuição do TBARS (interação  $p=0,0506$ ) e que pode estar sendo influenciada pelo número de sujeitos reduzido no estudo.

Além das enzimas antioxidantes, as proteínas de choque térmico (HSPs) são consideradas um mecanismo de defesa celular. No caso do presente estudo, onde foi avaliado a HSP70 intracelular no momento basal e em resposta ao choque térmico, não foi encontrada diferença significativa após o treinamento. Ao comparar, inicialmente, o resultado da HSP70 basal do presente estudo com outros, nossos achados vão de encontro ao visto na literatura. Na realidade, três estudos demonstram redução da HSP70 basal após o treinamento (Bautmans et. al., 2005; Tiss et. al., 2014; Valls et. al., 2013) e um encontrou aumento da mesma (Rodriguez-Miguel et. al., 2014). Apesar dessas divergências, alguns aspectos devem ser considerados. Um estudo de Fehrenbach e colaboradores (2001) verificou que atletas de maratona possuem, após realizarem meia-maratona, maior expressão de HSP70 em leucócitos. Além disso, verificou que em condições de repouso (basal) os atletas teriam menor expressão de iHSP70 do que sujeitos não treinados. Segundo os autores, a menor expressão de HSP70 em leucócitos dos atletas estaria relacionada com redução de intermediários reativos ao oxigênio nessas células. Dessa forma, seria possível cogitar que o treinamento possibilitaria menor expressão em condições basais de HSP70, mas aumentaria sua expressão em condições de estresse agindo como um mecanismo protetor. Da mesma forma, o estudo de Tiss e colaboradores (2014) verificaram que sujeitos obesos possuem maiores níveis basais de iHSP70 no tecido adiposo que sujeitos com peso normal e que três meses de exercício restaurou os valores da iHSP70 em obesos para valores próximos aos normais. Nos obesos, os níveis aumentados em condições basais seriam uma forma de contrapor o estresse metabólico no tecido adiposo (Tiss et. al., 2014). Considerando esses aspectos é possível que o exercício, mais precisamente o treinamento de força, reduza em condições basais a expressão de iHSP70, visto que a célula não estaria em estresse. A partir disso, é possível que não tenhamos encontrado diferença após o treinamento, em virtude do menor número de sujeitos no grupo treinado em relação a esses estudos.

Apesar de uma possível redução da HSP70 intracelular ocorrer em células mononucleares (PBMC) e no tecido adiposo como adaptação ao treinamento, o inverso parece ocorrer no músculo esquelético. Na literatura tem se descrito redução da expressão de HSP70 no músculo esquelético relacionado com menor sensibilidade à insulina e atividade enzimática mitocondrial (Archer et. al., 2018; Henstridge et. al., 2014) Entretanto, o exercício parece

reverter o quadro aumentando a expressão de HSP70 (Archer et. al., 2018). A partir disso, seria possível cogitar que o exercício modula de forma diferente órgãos e células imunes.

Analisando o efeito do treinamento na resposta ao choque térmico considerando tanto a HSP70 intracelular quanto a extracelular, nossos resultados não demonstram diferença entre os momentos. Como o presente estudo, Bautmans e colaboradores (2005) avaliaram o efeito do treinamento na HSR. Após seis semanas encontraram diferença da produção de HSP70 em linfócitos e monócitos após o choque térmico avaliado por citometria de fluxo. A possível explicação para diferença de resultados entre os estudos seria o protocolo de indução do choque térmico. Basicamente, no presente experimento o choque térmico durou duas horas e logo após os leucócitos foram separados. No estudo de Bautmans e colegas (2005) o choque térmico teve duração de uma hora e após as células foram colocadas em repouso (37 °C) por quatro horas.

Da mesma forma que na HSP70 intracelular, não houve efeito do treinamento na resposta ao choque térmico para eHSP70 (avaliado no plasma). Entretanto, houve maior liberação de eHSP70 para o plasma em resposta ao choque térmico tanto no grupo controle quanto no grupo treinado. Uma plausível explicação para essa diferença entre HSP70 intra e extracelular é que a duração do choque térmico foi suficiente para as células exportarem HSP70, mas não suficiente para aumentarem a produção. Parece que uma máxima produção de HSP70 ocorre após quatro horas do choque térmico (Njemini et. al., 2002). Apesar do tempo de choque térmico, aparentemente, não ter sido suficiente para notar modificação na expressão de iHSP70 é possível dizer que sujeitos de Meia Idade, fisicamente ativos, possuem uma resposta ao choque normal como visto pela maior liberação de eHSP70, indicando uma ação citoprotetora frente ao estresse agudo.

Considerando que, em condições basais, a iHSP70 possuem função citoprotetora, anti-inflamatória e anti-apoptótica e a eHSP70 possui ação pró-inflamatória e pró-apoptótica, a relação entre eHSP70 e iHSP70 (índice H) seria um indicador de estado inflamatório (Krause et. al., 2015b). Quando realizado essa relação com os dados do presente experimento, não foi encontrada diferença entre grupos e entre momentos, de modo que, o treinamento não se mostrou eficaz para melhorar o estado inflamatório, pelo menos quando verificado pelo índice H. Uma possível explicação para esse resultado é o número relativamente baixo de sujeitos no experimento que dificulta uma análise mais precisa.

## 4 ESTUDO 3- DADOS PRELIMINARES DA RESPOSTA AO TREINO EM IDOSOS

### 4.1 METODOLOGIA

#### Local de estudo e participantes

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), no Laboratório de Pesquisa e Exercício (LAPEX) e na academia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A amostra se caracteriza por conveniência, na qual foram recrutados nove sujeitos entre homens e mulheres com idade entre 60 e 75 anos, (idade  $63,78 \pm 2,86$  anos; altura  $1,60 \pm 0,08$  m; massa corporal  $66,64 \pm 8,87$  kg, média e desvio padrão respectivamente), fisicamente ativos avaliados pelo IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) versão longa, validado para a população brasileira (Matsudo et. al. 2001) e pelo PARQ (Physical Activity Readiness Questionnaire), que não fossem fumantes, com índice de massa corporal (IMC) menor que 29 ( $\text{kg/m}^2$ ) e que não estivessem praticando exercício físico nos últimos seis meses. Foram excluídos do estudo sujeitos que fossem diabéticos, com hipertensão não controlada ou que possuísem alguma limitação osteomuscular que impedisse a prática de exercícios. Como mencionado no experimento anterior, o cálculo amostral foi de dez sujeitos por grupo. Todos os sujeitos incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme a Resolução CNS nº 196/1996 do Ministério da Saúde. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS sob o número de parecer 1.614.907.

#### Desenho experimental

Os voluntários foram divididos em dois grupos (Treinado ou Controle) utilizando a página virtual randomization.com. A randomização foi realizada logo após a finalização das avaliações pré-treinamento. Após isso, os voluntários realizaram três meses de treinamento de força com frequência semanal de três vezes ou três meses de período controle. Em virtude dos dados serem preliminares em quase todas as variáveis é mostrado apenas os resultados do grupo treinado, exceto para a resposta ao choque térmico.

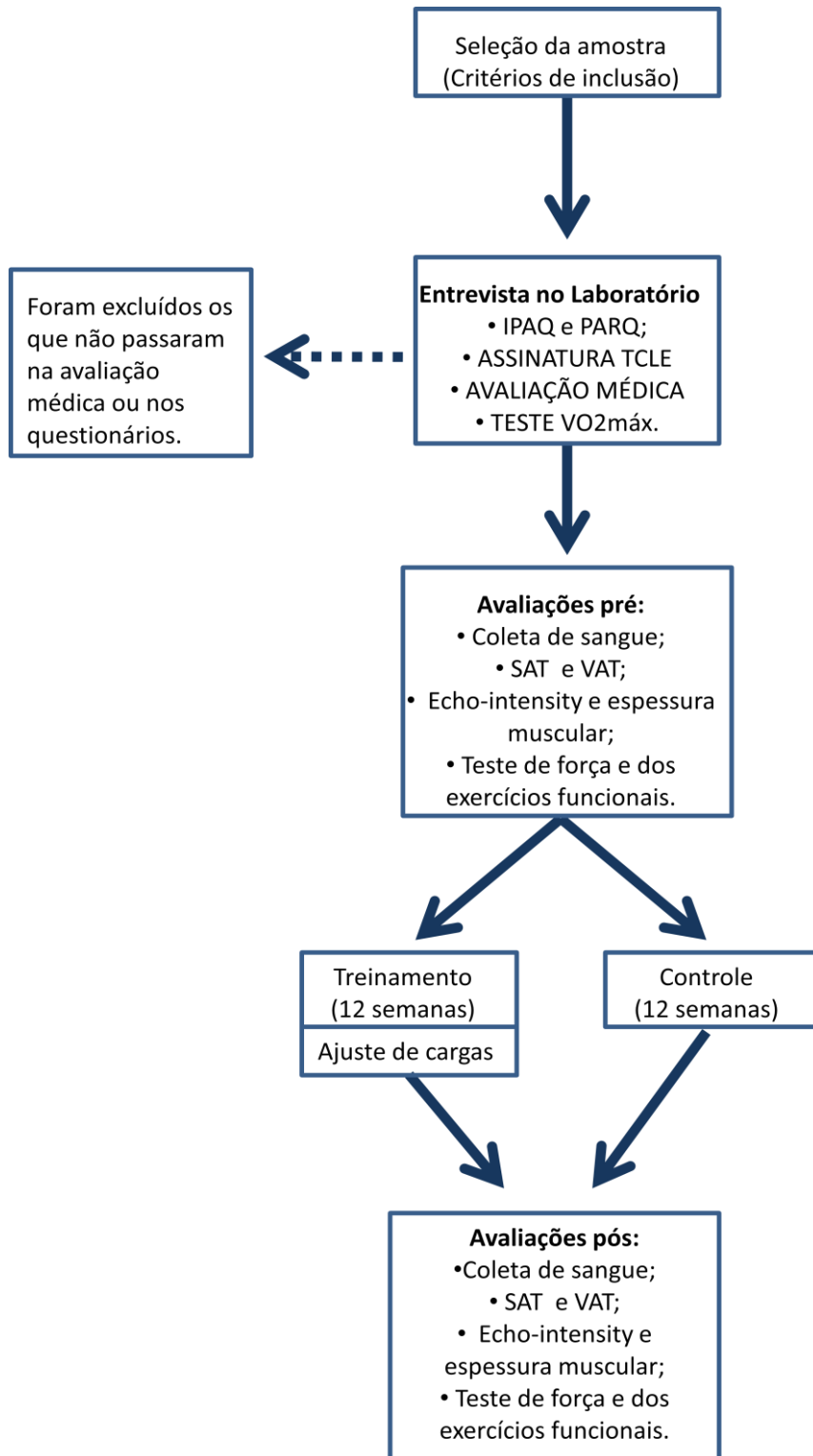
Tabela 13. Caracterização da amostra (n=6).

Média $\pm$ dp.	
Variável	Idosos
Idade (anos)	$63,5 \pm 1,51$
Estatura (m)	$1,56 \pm 0,05$
Massa Corporal (kg)	$64,3 \pm 9,14$
IMC ( $\text{kg/m}^2$ )	$26,1 \pm 2,38$

Tabela 14. Valores para perfil lipídico e glicose. Média  $\pm$  dp.

Variável	Idosos
Colesterol Total (mg/dL)	205,53 $\pm$ 41,69
Triglicerídeos (mg/dL)	141,01 $\pm$ 34,93
HDL (mg/dL)	49,42 $\pm$ 6,5
LDL (mg/dL)	127,9 $\pm$ 39,21
Glicose (mg/dL)	103,47 $\pm$ 13,04

O desenho do presente experimento segue o mesmo modelo do experimento dois, portanto não serão descritos aqui todas as técnicas e avaliações já mencionadas. Abaixo segue o desenho experimental.



**Figura 14.** Desenho experimental do estudo com idosos.

### **Registro alimentar**

Foi realizado no momento da colheita de sangue antes do início da intervenção experimental um recordatório alimentar das últimas 24 horas. Quando foram feitas as colheitas de sangue após o período de intervenção, os voluntários receberam o registro

alimentar e o repetiram nas 24 horas antes da colheita de sangue. Isso foi feito para tentar evitar uma alteração nos parâmetros do estresse oxidativo.

Tabela 15. Registro alimentar no período da coleta de sangue. Média  $\pm$  dp.

Variável	Idosos
Calorias (kcal)	1306,6 $\pm$ 310,30
Proteínas (g)	53,76 $\pm$ 8,3
Carboidratos (g)	174,2 $\pm$ 76,94
Lipídeos (g)	44,44 $\pm$ 15,84
Vitamina A (mcg)	271,69 $\pm$ 225,46
Vitamina C (mg)	37,25 $\pm$ 22,10
Vitamina E (mg)	2,72 $\pm$ 1,92

Os macronutrientes foram representados em grama (g) enquanto a vitamina A em microgramas (mcg) e as vitaminas C e E em miligramas (mg).

### **Análise estatística**

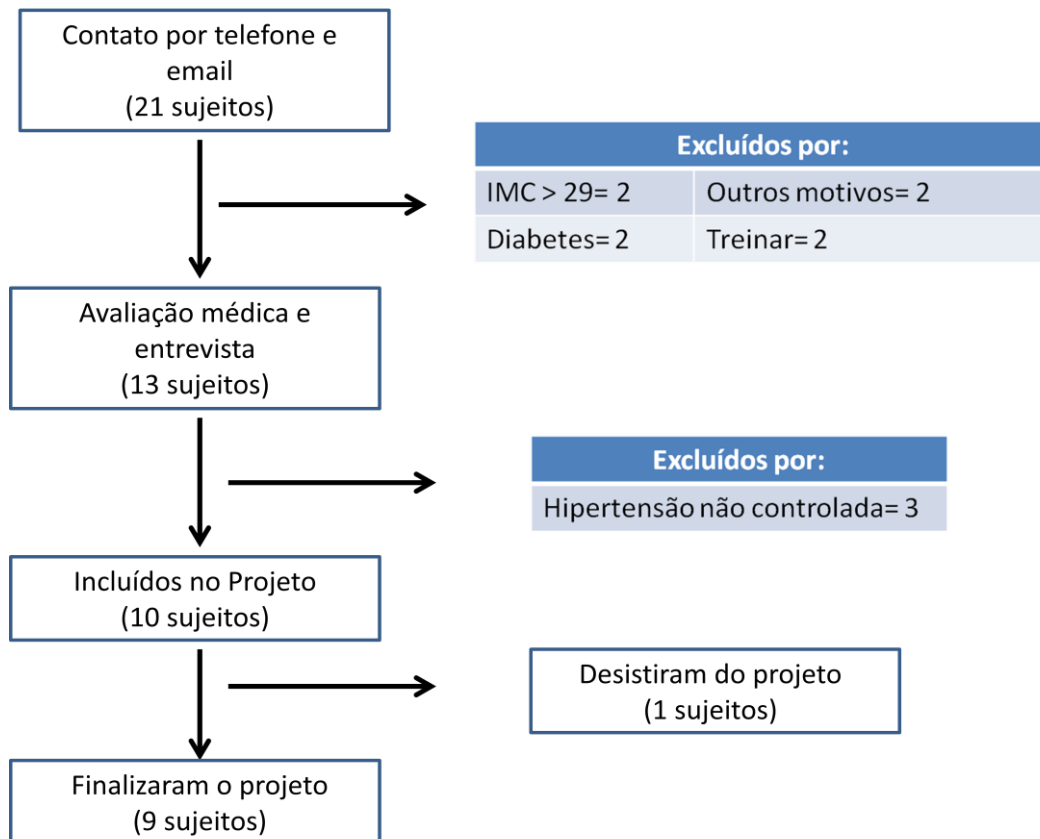
O teste t pareado foi utilizado para análise entre os momentos pré e pós no grupo Treinado. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ . A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism 7.

## **4.2 RESULTADOS PRELIMINARES**

### **Seleção dos voluntários**

O total de 21 sujeitos entraram em contato, via telefone ou email, interessados em participar do estudo. Para o primeiro dia de visita, que consistia na avaliação médica e preenchimento de questionários, apenas trezes sujeitos foram selecionados. Nesse dia, três sujeitos foram excluídos, de modo que dez sujeitos iniciaram o estudo. Desses, apenas um voluntário desistiu, em virtude de outros compromissos. O total de nove voluntários refere-se ao grupo controle e treinado, entretanto como mencionado anteriormente são mostrados aqui os resultados prévios do grupo treinado, que finalizou com seis voluntários. Abaixo segue o quadro com a seleção dos voluntários.





**Figura 15.** Seleção de voluntários idosos para inclusão no estudo.

### Lista de medicamentos

Levando em consideração o total de sujeitos com mais de 60 anos incluídos no estudo (nove), três deles faziam uso de algum medicamento. Um voluntário utilizava dois medicamentos para hipertensão, outro fazia o uso de cinco medicamentos, dos quais dois eram para hipertensão, um para dislipidemia, um analgésico e outro fitoterápico. O outro sujeito utilizava quatro fármacos, sendo dois para hipertensão, um para ansiedade e um para depressão. Desses três voluntários apenas o primeiro estava no grupo que realizou o treinamento. A tabela 17 mostra com mais detalhes a relação de medicamentos e sua função.

Tabela 16. Lista de medicamentos utilizados pelos voluntários.

Nº de Sujeitos	MEDICAMENTO	FUNÇÃO	DOENÇA
1	Enalapril 20mg	Inibidor da ECA	Hipertensão
	Hidroclorotiazida	Diurético	Hipertensão
1	Enalapril	Inibidor da ECA	Hipertensão
	Sinvastatina	Inibidor da HMG-CoA redutase	Dislipidemia
	AAS	AINE	Antipirético e Analgésico
	Diurix (Hidroclorotiazida)	Diurético	Hipertensão
	Ginkgo biloba	Fitoterápico	"Potencializar memória"
1	Hidroclorotiazida	Diurético	Hipertensão
	Losartana Potássica	ARAs	Hipertensão
	Amplictil (cloridrato de clorpromazina)	Estabilizador do SNC	Ansiedade e "agitação"
	Amitriptilina	ISRSN	Depressão

SNC: Sistema Nervoso Central;

ISRS(N): Inibidor Seletivo do Receptor de Serotonina (e Noradrenalina);

AINE: Antiinflamatório Não-Esteroidal;

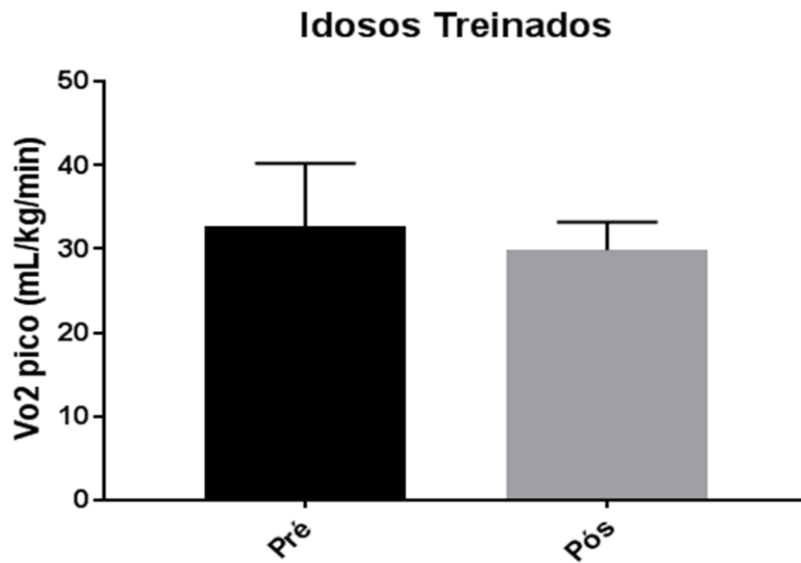
ARAs: Antagonista do Receptor de Angiotensina II.

### Aderência ao treinamento

Dos seis voluntários que estavam no grupo que realizou o treinamento de força, apenas um esteve presente em todas as 36 sessões. Por outro lado, o sujeito que frequentou 28 treinos (correspondendo a 77,77% do total) foi o que menos compareceu. Em média, os seis indivíduos estiveram presentes a  $33 \pm 3,22$  sessões, o que corresponde a  $91,65 \pm 8,95\%$  do total.

### Pico do consumo de oxigênio (VO2 pico)

Comparando os valores pré e pós- treinamento no grupo Treinado não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ). No momento pré-treinamento o VO2 pico foi de  $32,67 \pm 7,55$  (ml/kg/min) enquanto que no pós-treinamento os valores foram de  $29,85 \pm 3,36$  (ml/kg/min).



**Figura 16.** Valores do VO<sub>2</sub> (consumo de oxigênio) de pico pré e pós treinamento em idosos ( $p>0,05$ ). Valores expressos de VO<sub>2</sub> pico em (ml/kg/min.),

### Espessura muscular

Ao analisar os valores pré e pós-treinamento não se encontrou diferença significativa para nenhuma das porções do quadríceps (vasto lateral, reto femoral, vasto intermédio e medial) e quando considerado todo o quadríceps ( $p>0,05$ ). Os valores são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 17. Valores para espessura muscular nos momentos pré e pós.

Porção do quadríceps	Média $\pm$ dp.	
	Idosos	
	Pré	Pós
Vasto Lateral EM(mm)	19,3 $\pm$ 3,34	20,33 $\pm$ 5,16
Reto Femoral EM (mm)	16,73 $\pm$ 3,81	17,79 $\pm$ 2,76
Vasto Intermédio EM (mm)	18,14 $\pm$ 7	20,56 $\pm$ 5,03
Vasto Medial EM (mm)	22,47 $\pm$ 8,39	23,33 $\pm$ 5

EM: Espessura muscular. Valores expressos em milímetros (mm).

### Eco-intensidade

Os valores para as porções do quadríceps não diferiram de maneira significativa entre os momentos pré e pós. Da mesma forma, não houve diferença considerando todo o quadríceps ( $p>0,05$ ). Os valores são mostrados na tabela abaixo.

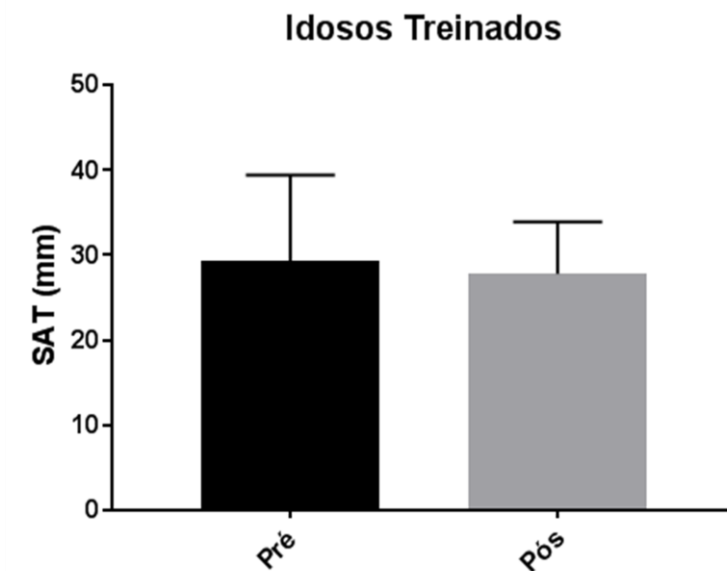
Tabela 18. Valores para Echo-intensity nos momentos pré e pós.  
Média  $\pm$  dp.

Porção do quadríceps	Idosos	
	Pré	Pós
Vasto Lateral EI(U.a.)	58,7 $\pm$ 13,17	52,77 $\pm$ 16,15
Reto Femoral EI (U.a.)	66,73 $\pm$ 15,19	64,42 $\pm$ 10,19
Vasto Intermédio EI (U.a.)	30,24 $\pm$ 10,18	26,18 $\pm$ 8,01
Vasto Medial EI (U.a.)	61,91 $\pm$ 13,53	60,86 $\pm$ 15

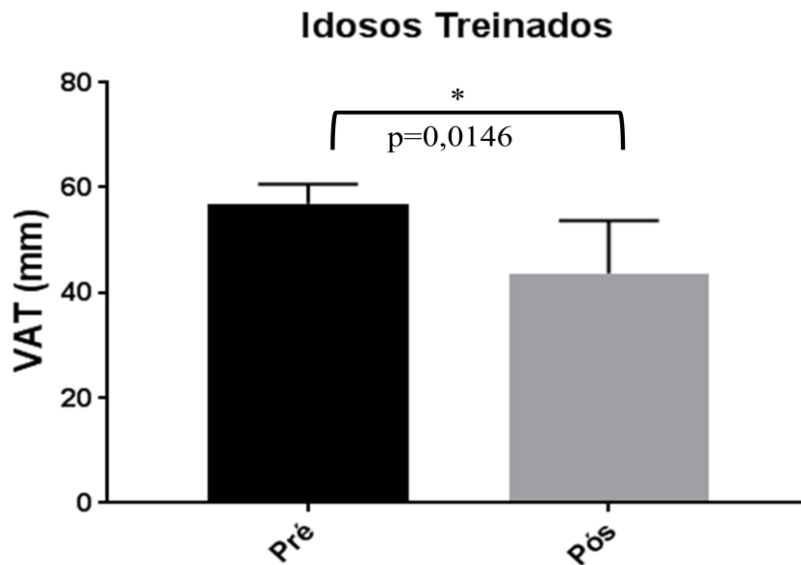
EI: Echo intensity. Valores expressos em unidades arbitrárias (U.a.)

### Tecido adiposo subcutâneo (SAT) e visceral (VAT)

Não houve diferença significativa para o SAT entre os momentos pré e pós ( $p>0,05$ ). Os valores pré e pós-treinamento foram os seguintes: 29,27 $\pm$ 10,13mm e 27,8 $\pm$ 6,09mm. Entretanto, no VAT houve diferença significativa entre os momentos ( $p=0,0146$ ). No momento pré os valores foram de 56,91 $\pm$ 15,37mm e no pós de 43,68 $\pm$ 9,17mm. Os gráficos subsequentes ilustram o comportamento nos momentos pré e pós para essas duas variáveis.



**Figura 17.** Tecido adiposo subcutâneo (SAT) em idosos nos momentos pré e pós treinamento. Valores expressos em milímetros (mm) ( $p>0,05$ ).



**Figura 18.** Tecido adiposo visceral (VAT) em idosos antes e depois do treinamento. Valores expressos em milímetros (mm).

### Parâmetros de força

Comparando os momentos pré e pós houve diferença significativa em todos os exercícios (leg press  $p=0,0051$ ), (bíceps  $p=0,0240$ ), (extensor  $p=0,0009$ ), (supino  $p=0,0419$ ), (remada  $p=0,0023$ ), (tríceps  $p=0,0259$ ), (flexão plantar  $p=0,0037$ ), com exceção do flexor ( $p=0,0514$ ). Os valores de força para todos os exercícios são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 19. Valores de força para o teste de 1RM estimado nos momentos pré e pós. Média  $\pm$  dp.

Exercício	Idosos	
	Pré	Pós
Leg Press (kg)	121,7 $\pm$ 37,9*	211,2 $\pm$ 52,87*
Supino (kg)	16,72 $\pm$ 4,7*	22 $\pm$ 2*
Extensor (kg)	31,9 $\pm$ 10,64*	49,4 $\pm$ 10,89*
Remada (kg)	32,6 $\pm$ 5,16*	47,7 $\pm$ 4,7*
Flexor (kg)	63 $\pm$ 12,94	73 $\pm$ 16,01
Bíceps (kg)	7,2 $\pm$ 1,03*	8,4 $\pm$ 0,89*
Flexão Plantar (kg)	43,8 $\pm$ 7,5*	69 $\pm$ 9,24*
Tríceps (kg)	31,7 $\pm$ 5,69*	39,4 $\pm$ 3,45*

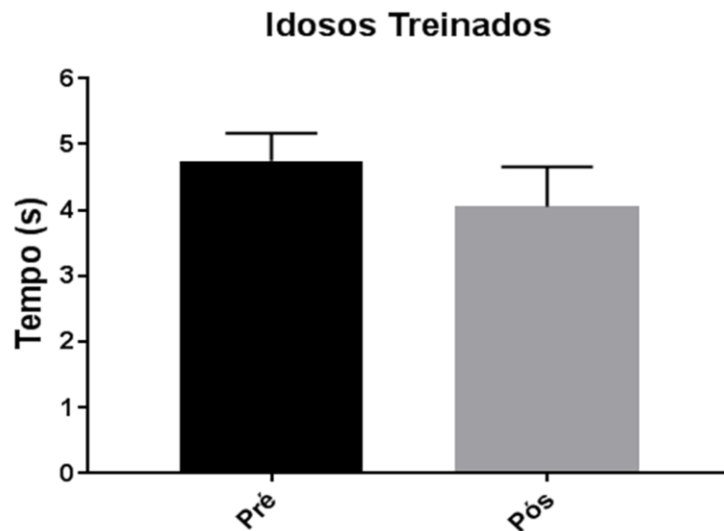
Diferença pré-pós Treino (\*).  $p<0,005$ .

1RM: Uma repetição máxima. Valores expressos em kilograma (kg).

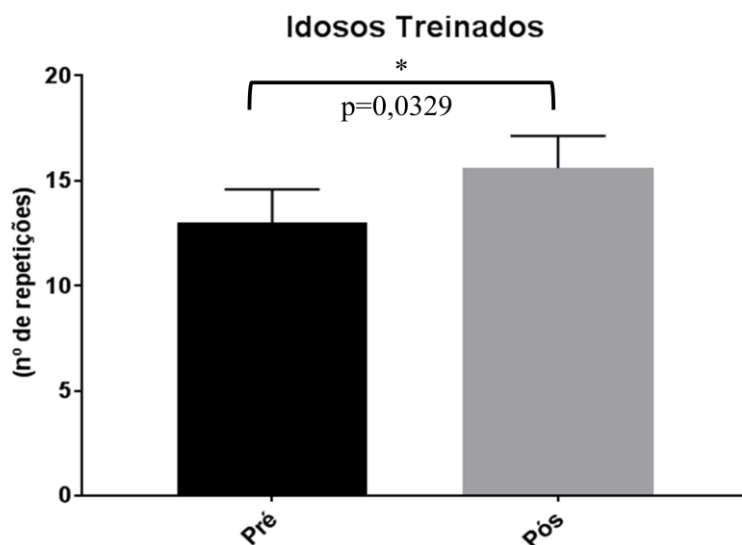
O exercício supino foi realizado com barra guiada.

### Exercícios funcionais

Para o exercício de subir um lance de escadas não houve diferença significativa entre os momentos pré e pós ( $p=0,0667$ ). Os valores pré foram de  $4,74\pm 0,42$  seg. e pós de  $4,04\pm 0,6$  seg. Por outro lado, para o exercício de sentar e levantar em trinta segundos houve diferença significativa entre os momentos ( $p=0,0329$ ). Os valores pré foram de  $13\pm 1,58$  (nº de repetições) e pós de  $15,6\pm 1,51$  (nº de repetições).



**Figura 19.** Teste de subir um lance de escadas em idosos antes e após o treinamento. Valores expressos em segundos ( $p>0,05$ ).



**Figura 20.** Teste de sentar e levantar em trinta segundos em idosos antes e após o treinamento. Valores expressos em número de repetições.

### Parâmetros de estresse oxidativo e nitrato/nitritos totais

Nessas quatro variáveis bioquímicas não houve diferença significativa entre os grupos e entre os momentos ( $p>0,005$ ). Os valores por grupo e momento estão na tabela abaixo.

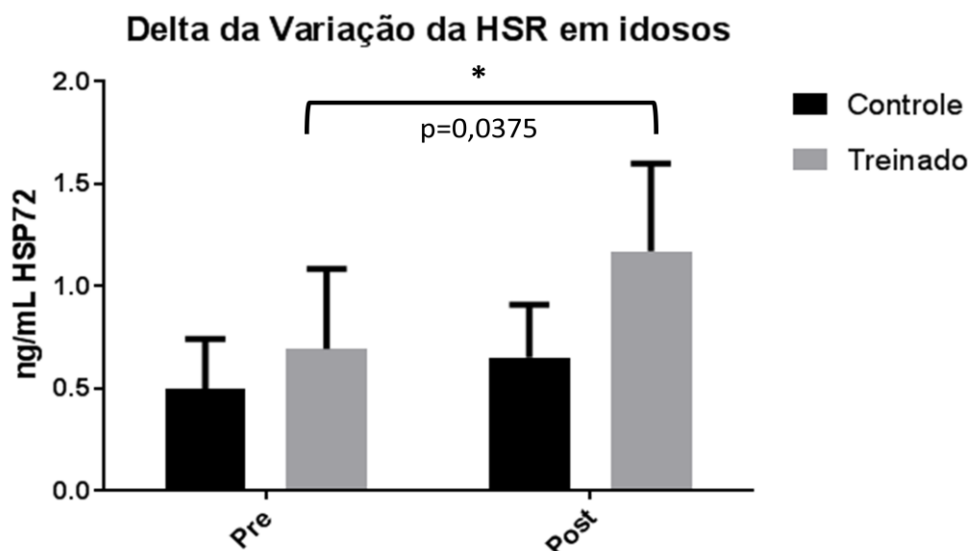
Tabela 20. Valores para estresse oxidativo e nitritos nos momentos pré e pós. Média  $\pm$  dp.

Variável	Idosos	
	Pré	Pós
SOD (USOD/mg PTN)	1,421 $\pm$ 0,562	1,365 $\pm$ 0,723
CAT (k/mL)	2,597 $\pm$ 0,921	1,998 $\pm$ 0,626
Nitritos ( $\mu$ M)	136,133 $\pm$ 76,397	103,206 $\pm$ 48,271
TBARS (nmol/mL)	2,829 $\pm$ 0,955	2,880 $\pm$ 0,935

SOD: superóxido dismutase. Valores expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína (mg/PTN);  
 CAT: catalase. Valores expressos em constante (k) por mililitros (ml);  
 TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

### Resposta ao choque térmico

Ao avaliar o delta da variação (37 °C vs. 42 °C) entre momentos e grupos houve diferença significativa ( $p=0,0375$ ) no grupo idoso treinado. Os dados estão ilustrados nos gráficos abaixo.



**Figura 21.** Valores do delta da variação (37°C vs. 42°C) da Heat shock response (HSR) em idosos antes e após o treinamento. As amostras foram colocadas em duas temperaturas diferentes (37°C e 42°C) por duas horas e , posteriormente, avaliadas com um kit ELISA de alta sensibilidade para HSP70.

## 5. DISCUSSÃO FINAL

Considerando os resultados dos dois primeiros experimentos e os resultados preliminares do último, Idosos com DM2 apresentam resposta ao choque térmico prejudicada em relação aos voluntários saudáveis de Meia Idade e Idosos, possivelmente em função da resistência à insulina estabelecida. Ademais, o treinamento de força, em sujeitos de Meia Idade, possibilita ganhos de força, massa muscular e melhora da capacidade funcional. Quanto ao efeito do treinamento de força nos idosos, ainda que de modo preliminar, parece que existem ganhos de força muscular, da capacidade funcional, redução do VAT e aprimoramento da HSR.

Como discutido no experimento um, o principal fator para redução na resposta ao choque térmico, concomitante com o envelhecimento, parece ser a resistência à insulina (Kavanagh et. al., 2012). Além disso, menores níveis de HSP70 no músculo na juventude poderiam estar associados com desenvolvimento de RI com o passar dos anos (Chinchester et. al., 2014). Considerando a reduzida expressão de HSP70 no músculo aliado ao processo inflamatório desencadeado principalmente no tecido adiposo como fundamentais para RI e Diabetes (Krause et. al., 2015) alternativas têm sido propostas para contrapor esse processo. Além do exercício, que, entre outras coisas, possibilitaria aumento de HSP70 no músculo (Archer et. al., 2018) a terapia térmica (Heat therapy-HT) vem sendo sugerida como um meio para o tratamento do Diabetes (Krause et. al., 2015a). Estudos em modelos animais (Karpe; Tikoo, 2014; Chung et. al., 2008) demonstram redução da RI associada a HT e em humanos, após sessões durante três semanas, houve redução da hemoglobina glicada (HbA1c) e da glicose plasmática (Hooper, 1999) Como resultado disso, ocorreria redução do processo inflamatório, resultando em inativação da GSK-3 $\beta$ , da JNK e da Ikk $\beta$ . Os dois primeiros, quando ativados, fosforilam o HSF-1, inativando-o, e os dois últimos, diminuem a sinalização de insulina bloqueando o IRS-1 (Geiger; Gupte, 2011). Considerando, a partir disso, que há uma redução sistêmica da inflamação é possível que os leucócitos consigam responder adequadamente ao estresse transitório, ou seja, adequada HSR.

Como verificado no experimento dois e nos resultados preliminares do experimento três, tanto sujeitos de Meia Idade quanto Idosos obtiveram aprimoramentos na força muscular e melhora na execução de exercícios funcionais. Em relação aos resultados é importante ressaltar que nos idosos houve melhora significativa apenas no teste de sentar e levantar em trinta segundos. Entretanto, considerando o baixo número de sujeitos é plausível que haja uma melhora significativa no teste de subir um lance de escadas com um maior número de pessoas no grupo. Vários estudos têm demonstrado melhora na capacidade funcional após o treinamento de força em idosos e isso parece estar associado aos ganhos de força (Bautmans,



et. al., 2005; Njemini et. al., 2017, Pinto et. al., 2014). Isso se torna importante para manutenção da independência do idoso (Clark, Manini, 2008).

Estudos longitudinais têm demonstrado perda de força e qualidade muscular em idosos (Delmonico et. al., 2009; Reid et. al., 2014) e em sujeitos de meia idade (Kennis et. al., 2014). Essas alterações não são acompanhadas por redução da massa muscular, mas em idosos a perda de força parece ser concomitante com aumento de lipídeos intramusculares (Delmonico et. al., 2009; Reid et. al., 2014). Apesar dessa relação não houve no presente estudo modificação da EI com o treinamento, ainda que tenha ocorrido ganhos de força. Provavelmente isso esteja relacionado com o baixo número de sujeitos tanto no experimento dois quanto no experimento três.

Um importante achado, ainda que preliminar, desse estudo foi a redução do VAT nos idosos que realizaram o treinamento. Esse resultado pode ser relevante, visto que o VAT aumenta com o envelhecimento e está diretamente ligado com inflamação crônica de baixo grau (Palmer et. al., 2016; Tchnokia et. al., 2010). A mesma ocorre pelo aumento do tamanho dos adipócitos que podem vir a ser apoptóticos e cercados pelos macrófagos que se infiltram no tecido adiposo (Deng et. al., 2016; Stout et. al., 2016). Entre outras coisas, a expansão do tecido adiposo, nesse caso do VAT, possui efeitos negativos em tecidos periféricos levando à RI, hiperglicemia, hiperlipdemia e dano vascular (Deng et. al., 2016) A respeito disso, um estudo tinha o objetivo de verificar relação entre o VAT e RI hepática e periférica. O estudo foi realizado com voluntários com idade entre 30-75 anos, sedentários, que tivessem sobrepeso ou eram obesos. A sensibilidade à insulina foi avaliada através de um clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico e o VAT foi avaliado por tomografia computadorizada. Os resultados demonstraram correlação inversa entre o VAT e sensibilidade à insulina, além de mostrar que sujeitos com maior VAT e menor quantidade de SAT no quadríceps seriam mais propensos a RI. (Amati et. al., 2012). Esse resultado basicamente ilustra o papel central do VAT para desencadear o processo inflamatório. Dessa forma, o exercício nos idosos pode ser considerado efetivo para mantê-los independentes, reduzindo as chances de quedas e de tornarem se frágeis, além de diminuir as chances de doenças relacionadas a inflamação de baixo grau, visto a redução do VAT

Um dos fatores que, ao lado do aumento do processo inflamatório, estão relacionados com as doenças ligadas ao envelhecimento é o estresse oxidativo. Entretanto, no presente estudo não foi verificado aumento da SOD e CAT e redução da peroxidação lipídica. Como discutido no experimento dois, em relação ao grupo de Meia Idade, é possível que haja uma redução na peroxidação lipídica com um aumento no número de pessoas no grupo. Ao analisar os idosos,

ainda que deva ser levado em conta o número de pessoas reduzido no grupo, é possível que o treinamento de força não seja tão efetivo para aumentar atividade antioxidante, ao passo que reduziria marcadores de dano oxidativo (Bouزيد et. al., 2015). Ao contrário do treinamento aeróbico que possibilita aumento dos antioxidantes e redução de marcadores de dano oxidativo, menos estudos são encontrados na literatura a respeito do treinamento de força (Bouزيد et. al., 2015). A respeito disso, foram encontrados na literatura três estudos que demonstram alteração das enzimas antioxidantes e/ou do dano oxidativo (Blommer et. al., 2008; Parise et. al., 2005; Vincent et. al., 2006). O estudo de Parise e colaboradores (2005) encontrou, após o treinamento, aumento das enzimas antioxidantes SOD e CAT no músculo, sem alteração da oxidação de proteínas. Os estudos de Blommer e colaboradores (2008) e de Vincent e colegas (2006) verificaram redução do dano oxidativo mensurado no plasma. O primeiro encontrou diminuição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) e de peroxidação lipídica (avaliado pelo MDA) após oito semanas de treinamento em idosos com Parkinson. Já o segundo, demonstrou redução da peroxidação lipídica (avaliada pelo TBARS) após doze semanas de treinamento. Considerando que no presente estudo no grupo de Idosos os dados são preliminares, além do que existem diferenças entre os protocolos de treinamento e de duração dos mesmos, fica difícil fazer uma comparação entre os estudos.

Ao passo que, não houve alteração da atividade antioxidante pelo treinamento, nos idosos o mesmo parece ter sido efetivo para aprimorar a resposta ao choque térmico. Considerando que a HSP70 é um importante mecanismo de defesa intracelular contra EROS (Fehrenbach et. al., 2000), a aprimorada resposta ao choque demonstraria que as células (nesse caso os leucócitos) estão saudáveis e conseguem responder adequadamente ao estresse agudo. Ainda que não avaliado a resposta ao choque térmico, alguns estudos tem verificado a eHSP após o treinamento de força em idosos (Njemini et. al., 2017; Perreault et. al., 2016; Ogawa et. al., 2010) O estudo de Njemini e colaboradores (2017) verificou redução da eHSP70 após doze semanas de treinamento de força apenas em mulheres concomitante com aumento de força e da capacidade funcional. Da mesma forma, outro estudo com mulheres idosas também encontrou aprimoramentos de força e na massa muscular ao passo que houve redução da eHSP70 após doze semanas de treinamento. Ademais, foi encontrada redução na Proteína C-Reativa (PCR) e correlação negativa entre a mesma e a espessura muscular (Ogawa et. al., 2010). Esses estudos indicam que há uma relação entre o processo inflamatório e massa muscular. Ademais parece que há uma resposta diferente da eHSP70 relacionada ao sexo, como verificado no estudo de Njemini e colaboradores (2017) que parece estar relacionada com atividade do estrogênio. A deficiência ao estrogênio em mulheres pós-menopausa parece

estar envolvida na redução da expressão da HSP70 que aumentaria o risco para doenças cardiovasculares e inflamatórias crônicas, como diabetes tipo dois (Miragem; Bittencourt Jr., 2017). Entretanto, é possível que o treinamento regule os níveis dos hormônios sexuais (Njemini et. al., 2017). Em virtude do nosso número baixo de sujeitos por grupo não é possível estratificar os dados por sexo para percebermos uma possível diferença na resposta da HSP70 entre homens e mulheres.

Avaliando apenas a redução da eHSP70 nesses estudos após o treinamento, pode-se entender que houve uma diminuição do processo inflamatório o que culmina com a menor liberação da mesma para a circulação. O que é sustentado por achados que demonstram maiores níveis basais de eHSP70 em pacientes com inflamação (Njemini 2007). Por conta disso, maiores níveis basais dessa proteína no meio extracelular reduziria a HSR por exacerbar o processo inflamatório (Krause et. al., 2015c). Portanto, além dos idosos saudáveis possuírem uma resposta ao choque adequada (como demonstrado no experimento 1), o treinamento parece aprimorar essa resposta ao choque podendo estar relacionada com a redução do VAT, e dos ganhos de força. Isso se torna apenas especulação, visto que não encontramos correlação entre eHSP70 e as outras variáveis.

Esse estudo possui algumas limitações. Primeiramente o baixo número de sujeitos impossibilita maiores conclusões em relação aos resultados, de modo que a amostra reduzida pode impedir a visualização de alguma diferença importante nas variáveis. Apesar de ter sido feita avaliação da resposta ao choque térmico com a eHSP70 a ausência de sua mensuração basal impede comparação com outros estudos que utilizam ela como marcador inflamatório. Por último, a ausência de avaliação de marcadores inflamatórios (IL-6, PCR e TNF- $\alpha$ ) que parecem estar associados com a massa muscular e com a expressão da HSP70 intracelular e seus níveis extracelulares.

## **6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

A resposta de choque térmico é essencial para prevenção de doenças relacionadas à resistência à insulina, como diabetes e doenças cardiovasculares (devido à disfunção endotelial). O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que sujeitos de Meia Idade e Idosos, desde que saudáveis, possuem uma resposta adequada ao choque térmico (em leucócitos), e que Idosos Diabéticos apresentam a resposta ao choque térmico debilitada, aumentando o risco do desenvolvimento de outras doenças crônicas e de complicações associadas ao diabetes. Dessa forma, estratégias como o exercício e a terapia térmica parecem

efetivos como tratamento ao Diabetes, o que acarretaria também, em uma resposta ao choque normal nessas pessoas.

Em relação ao efeito do treinamento de força, o mesmo possibilitou ganhos de força e melhora da capacidade funcional tanto em sujeitos de Meia Idade quanto em Idosos, entretanto aumentos na massa muscular foram vistos apenas no grupo de Meia Idade. Por outro lado, o treinamento possibilitou redução do VAT nos idosos e aprimoramento na resposta ao choque. Esses resultados indicam que, nos sujeitos de Meia Idade, o treinamento de força pode ser importante para prevenir processos relacionados ao envelhecimento como sarcopenia e dinapenia, e assim reduzir a possibilidade de, no futuro, perderem sua independência funcional. Nos idosos, ainda que sejam dados preliminares, além do treinamento reduzir as chances de dinapenia e de se tornarem dependentes funcionais, a redução no VAT pode indicar menores chances de RI e Diabetes e a melhora na HSR também estaria relacionada a isso.

Como perspectivas seria interessante avaliar as enzimas antioxidantes SOD e CAT nos eritrócitos, visto que não foi encontrada diferença ao avaliar os níveis circulantes e, por outro lado, vários estudos encontram modificação da atividade antioxidante quando avaliado nos eritrócitos. Ao passo que não foi encontrado aumento da HSP70 intracelular após as duas horas de choque térmico, uma possibilidade seria avaliar o mRNA após esse mesmo período de choque térmico. Alternativamente, uma modificação do protocolo de indução de choque térmico poderia ser utilizada, adicionando um tempo de descanso a 37°C, por algumas horas, permitindo assim, tempo suficiente para a expressão das proteínas. Se for o caso, o melhor tempo de descanso após o choque será testado em nosso laboratório. (Njemini et. al., 2002; Bautmans et. al., 2005).

## 7. REFERÊNCIAS

AAGAARD, Per et al. Increased rate of force development and neural drive of human skeletal muscle following resistance training. **Journal of applied physiology**, v. 93, n. 4, p. 1318-1326, 2002.

AAGAARD, Per et al. Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 20, n. 1, p. 49-64, 2010.

AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1984. p. 121-126.

AMATI, Francesca et al. Lower thigh subcutaneous and higher visceral abdominal adipose tissue content both contribute to insulin resistance. **Obesity**, v. 20, n. 5, p. 1115-1117, 2012.

ANDREOTTI, Rosana Aparecida; OKUMA, Silene Sumire. Validação de uma bateria de testes de atividades da vida diária para idosos fisicamente independentes. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 13, n. 1, p. 46-66, 2017.

ARCHER, Ashley E.; VON SCHULZE, Alex T.; GEIGER, Paige C. Exercise, heat shock proteins and insulin resistance. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 373, n. 1738, p. 20160529, 2018.

- ARTS, Ilse MP et al. Normal values for quantitative muscle ultrasonography in adults. **Muscle & nerve**, v. 41, n. 1, p. 32-41, 2010.
- ASEA, Alexzander et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70 role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 15028-15034, 2002.
- AZIZBEIGI, Kamal et al. Antioxidant enzymes and oxidative stress adaptation to exercise training: comparison of endurance, resistance, and concurrent training in untrained males. **Journal of exercise science & fitness**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2014.
- AZIZBEIGI, Kamal et al. Effect of moderate and high resistance training intensity on indices of inflammatory and oxidative stress. **Research in sports medicine**, v. 23, n. 1, p. 73-87, 2015.
- AZIZBEIGI, Kamal et al. The effect of progressive resistance training on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in erythrocytes in untrained men. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, v. 23, n. 3, p. 230-238, 2013.
- BAUTMANS, Ivan et al. Biochemical changes in response to intensive resistance exercise training in the elderly. **Gerontology**, v. 51, n. 4, p. 253-265, 2005.
- BLOOMER, Richard J. et al. Effect of resistance training on blood oxidative stress in Parkinson disease. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 40, n. 8, p. 1385-1389, 2008.
- BOUZID, Mohamed Amine et al. Radical oxygen species, exercise and aging: an update. **Sports Medicine**, v. 45, n. 9, p. 1245-1261, 2015.
- BREEN, Leigh; PHILLIPS, Stuart M. Skeletal muscle protein metabolism in the elderly: Interventions to counteract the 'anabolic resistance' of ageing. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, p. 68, 2011.
- BRUCE, Clinton R. et al. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. **Diabetes**, v. 52, n. 9, p. 2338-2345, 2003.
- CADORE, Eduardo Lusa et al. Echo intensity is associated with skeletal muscle power and cardiovascular performance in elderly men. **Experimental Gerontology**, v. 47, n. 6, p. 473-478, 2012.
- CALDERWOOD, Stuart K.; MURSHID, Ayesha; PRINCE, Thomas. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging—a mini-review. **Gerontology**, v. 55, n. 5, p. 550-558, 2009.
- CHICHESTER, Lee et al. Muscle heat shock protein 70 predicts insulin resistance with aging. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 70, n. 2, p. 155-162, 2014.
- CHUNG, Jason et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 5, p. 1739-1744, 2008.
- CLAYTON, Aled et al. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. **J Cell Sci**, v. 118, n. 16, p. 3631-3638, 2005.
- CLEASBY, Mark E.; JAMIESON, Pauline M.; ATHERTON, Philip J. Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities. **Journal of Endocrinology**, v. 229, n. 2, p. R67-R81, 2016.
- CLARK, Brian C.; MANINI, Todd M. Sarcopenia ≠ dynapenia. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 63, n. 8, p. 829-834, 2008.
- DE MAIO, Antonio; VAZQUEZ, Daniel. Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 40, n. 4, p. 239, 2013.
- DE MUTSERT, Renée et al. Associations of Abdominal Subcutaneous and Visceral Fat with Insulin Resistance and Secretion Differ Between Men and Women: The Netherlands Epidemiology of Obesity Study. **Metabolic syndrome and related disorders**, 2018.
- DE TODA, I. Martínez; DE LA FUENTE, M. The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan. **Biogerontology**, v. 16, n. 6, p. 709-721, 2015.
- DENG, Tuo et al. Obesity, inflammation, and cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 421-449, 2016.
- DRAPER, H. H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 15, n. 4, p. 353-363, 1993.
- FEBBRAIO, M. A.; KOUKOULAS, I. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 3, p. 1055-1060, 2000.
- FEHRENBACH, Elvira et al. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 3, p. 592-600, 2000.

- FITTIPALDI, S. et al. Role of exercise-induced reactive oxygen species in the modulation of heat shock protein response. **Free radical research**, v. 48, n. 1, p. 52-70, 2014.
- GARCÍA-ROBLEDO, Emilio; CORZO, Alfonso; PAPASPYROU, Sokratis. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. **Marine Chemistry**, v. 162, p. 30-36, 2014.
- GEIGER, Paige C.; GUPTE, Anisha A. Heat shock proteins are important mediators of skeletal muscle insulin sensitivity. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 39, n. 1, p. 34, 2011.
- GIRALDO, Esther; HINCHADO, María D.; ORTEGA, Eduardo. Combined activity of post-exercise concentrations of NA and eHsp72 on human neutrophil function: Role of cAMP. **Journal of cellular physiology**, v. 228, n. 9, p. 1902-1906, 2013.
- GOMEZ-CABRERA, Mari-Carmen; DOMENECH, Elena; VIÑA, Jose. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 2, p. 126-131, 2008.
- HAKKINEN, K. et al. Changes in agonist-antagonist EMG, muscle CSA, and force during strength training in middle-aged and older people. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 4, p. 1341-1349, 1998.
- HAN, Seung Jin et al. Effects of combination of change in visceral fat and thigh muscle mass on the development of type 2 diabetes. **diabetes research and clinical practice**, v. 134, p. 131-138, 2017.
- HEALTH AGINGBODY COMPOSITION STUDY DELMONICO MATTHEW J DELMONICO@ URI. EDU HARRIS TAMARA B VISSER MARJOLEIN PARK SEOK WON CONROY MOLLY B VELASQUEZ-MIEYER PEDRO BOUDREAU ROBERT MANINI TODD M NEVITT MICHAEL NEWMAN ANNE B GOODPASTER BRET H. Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration-. **The American journal of clinical nutrition**, v. 90, n. 6, p. 1579-1585, 2009.
- HECK, Thiago Gomes et al. Acute exercise boosts cell proliferation and the heat shock response in lymphocytes: correlation with cytokine production and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio. **Cell Stress and Chaperones**, v. 22, n. 2, p. 271-291, 2017.
- HENSTRIDGE, Darren C.; WHITHAM, Martin; FEBBRAIO, Mark A. Chaperoning to the metabolic party: the emerging therapeutic role of heat-shock proteins in obesity and type 2 diabetes. **Molecular metabolism**, v. 3, n. 8, p. 781-793, 2014.
- HENWOOD, Tim R.; RIEK, Stephan; TAAFFE, Dennis R. Strength versus muscle power-specific resistance training in community-dwelling older adults. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 83-91, 2008.
- HOOPER, Philip L. Insulin signaling, GSK-3, heat shock proteins and the natural history of type 2 diabetes mellitus: a hypothesis. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 5, n. 3, p. 220-230, 2007.
- HOOPER, Philip L. Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 12, p. 924-925, 1999.
- HINCHADO, María D.; GIRALDO, Esther; ORTEGA, Eduardo. Adrenoreceptors are involved in the stimulation of neutrophils by exercise-induced circulating concentrations of Hsp72: cAMP as a potential "intracellular danger signal". **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 2, p. 604-608, 2012.
- HUNTER-LAVIN, Claire et al. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 324, n. 2, p. 511-517, 2004.
- IKEZOE, T. et al. Effects of low-load, higher-repetition versus high-load, lower-repetition resistance training not performed to failure on muscle strength, mass, and echo intensity in healthy young men: a time-course study. **Journal of strength and conditioning research**, 2017.
- ISMAIL, Irfan et al. A systematic review and meta-analysis of the effect of aerobic vs. resistance exercise training on visceral fat. **Obesity reviews**, v. 13, n. 1, p. 68-91, 2012.
- JENEI, Zsigmond M. et al. Elevated extracellular HSP70 (HSPA1A) level as an independent prognostic marker of mortality in patients with heart failure. **Cell Stress and Chaperones**, v. 18, n. 6, p. 809-813, 2013.
- KAMPINGA, Harm H. et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. **Cell Stress and Chaperones**, v. 14, n. 1, p. 105-111, 2009.
- KARAVIRTA, L. et al. Effects of combined endurance and strength training on muscle strength, power and hypertrophy in 40–67-year-old men. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 21, n. 3, p. 402-411, 2011.

KARPE, Pinakin Arun; TIKOO, Kulbhushan. Heat shock prevents insulin resistance–induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling. **Diabetes**, v. 63, n. 3, p. 1124-1139, 2014.

KAVANAGH, Kylie et al. Aging does not reduce heat shock protein 70 in the absence of chronic insulin resistance. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 67, n. 10, p. 1014-1021, 2012.

KEATING, Shelley E. et al. Effect of resistance training on liver fat and visceral adiposity in adults with obesity: A randomized controlled trial. **Hepatology Research**, v. 47, n. 7, p. 622-631, 2017.

KEMMLER, Wolfgang K. et al. Effects of single-vs. multiple-set resistance training on maximum strength and body composition in trained postmenopausal women. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 18, n. 4, p. 689-694, 2004.

KENNIS, Eva et al. Longitudinal impact of aging on muscle quality in middle-aged men. **Age**, v. 36, n. 4, p. 9689, 2014.

KIM, Tae Nyun et al. Prevalence and determinant factors of sarcopenia in patients with type 2 diabetes: the Korean Sarcopenic Obesity Study (KSOS). **Diabetes care**, v. 33, n. 7, p. 1497-1499, 2010.

KLEIN, Samuel et al. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 25, p. 2549-2557, 2004.

KORHONEN, Marko T. et al. Biomechanical and skeletal muscle determinants of maximum running speed with aging. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 41, n. 4, p. 844-856, 2009.

KRAUSE, Mauricio; DA COSTA RODRIGUES-KRAUSE, Josianne. Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment. **Medical hypotheses**, v. 76, n. 2, p. 286-290, 2011.

KRAUSE, Mauricio et al. Elevated levels of extracellular heat-shock protein 72 (eHSP72) are positively correlated with insulin resistance in vivo and cause pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and death in vitro. **Clinical Science**, v. 126, n. 10, p. 739-752, 2014.

KRAUSE, Mauricio et al. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 18, n. 4, p. 374-380, 2015a.

KRAUSE, Mauricio et al. The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015b.

KRAUSE, Mauricio et al. The regulatory roles of NADPH oxidase, intra-and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. **Clinical Science**, v. 128, n. 11, p. 789-803, 2015c.

KURUCZ, Istvan et al. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1102-1109, 2002.

LANCASTER, Graeme I.; FEBBRAIO, Mark A. Exosome-dependent trafficking of HSP70 A novel secretory pathway for cellular stress proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 23349-23355, 2005.

LEITE, Jaqueline Santos Moreira et al. Physiological regulation of the heat shock response by glutamine: implications for chronic low-grade inflammatory diseases in age-related conditions. **Nutrire**, v. 41, n. 1, p. 17, 2016.

LERMAN, J. et al. Low-level dynamic exercises for earlier cardiac rehabilitation: aerobic and hemodynamic responses. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 57, n. 8, p. 355-360, 1976.

LYNCH, Gordon S. (Ed.). **Sarcopenia–age-related muscle wasting and weakness: mechanisms and treatments**. Springer Science & Business Media, 2010.

LLOYD, Shane A. et al. Interdependence of muscle atrophy and bone loss induced by mechanical unloading. **Journal of bone and mineral research**, v. 29, n. 5, p. 1118-1130, 2014.

MATSUDO, Sandra et al. Questionário internacional De atividade física (ipaq): estupo De validade e reprodutibilidade No Brasil. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v. 6, n. 2, p. 5-18, 2012.

MIRAGEM, Antônio Azambuja; HOMEM DE BITTENCOURT, Paulo Ivo. Nitric oxide-heat shock protein axis in menopausal hot flushes: neglected metabolic issues of chronic inflammatory diseases associated with deranged heat shock response. **Human reproduction update**, v. 23, n. 5, p. 600-628, 2017.

MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Irwin. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

- NAKHJAVANI, Manouchehr et al. Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. **Cell Stress and Chaperones**, v. 15, n. 6, p. 959-964, 2010.
- NEWSHOLME, Philip; KRAUSE, Mauricio. Diet, obesity, and reactive oxygen species—implications for diabetes and aging. In: **Systems biology of free radicals and antioxidants**. Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 3361-3374.
- NJEMINI, Rose et al. Basal and infection-induced levels of heat shock proteins in human aging. **Biogerontology**, v. 8, n. 3, p. 353-364, 2007.
- NJEMINI, Rose et al. Sex difference in the heat shock response to high external load resistance training in older humans. **Experimental gerontology**, v. 93, p. 46-53, 2017.
- NJEMINI, R. et al. Age-related decrease in the inducibility of heat-shock protein 70 in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of clinical immunology**, v. 22, n. 4, p. 195-205, 2002.
- NOBLE, Earl G.; MILNE, Kevin J.; MELLING, CW James. Heat shock proteins and exercise: a primer. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, v. 33, n. 5, p. 1050-1075, 2008.
- PALMER, Allyson K.; KIRKLAND, James L. Aging and adipose tissue: potential interventions for diabetes and regenerative medicine. **Experimental gerontology**, v. 86, p. 97-105, 2016.
- PARISE, Gianni et al. Antioxidant enzyme activity is up-regulated after unilateral resistance exercise training in older adults. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 2, p. 289-295, 2005.
- PEDERSEN, Bente K. Edward F. Adolph distinguished lecture: muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. **Journal of applied physiology**, v. 107, n. 4, p. 1006-1014, 2009.
- PERREAULT, K. et al. Sixteen weeks of resistance training decrease plasma heat shock protein 72 (eHSP72) and increase muscle mass without affecting high sensitivity inflammatory markers' levels in sarcopenic men. **Aging clinical and experimental research**, v. 28, n. 2, p. 207-214, 2016.
- PINTO, Ronei Silveira et al. Short-term strength training improves muscle quality and functional capacity of elderly women. **Age**, v. 36, n. 1, p. 365-372, 2014.
- OGAWA, Kishiko et al. Plasma heat shock protein 72 as a biomarker of sarcopenia in elderly people. **Cell Stress and Chaperones**, v. 17, n. 3, p. 349-359, 2012.
- OGAWA, Kishiko et al. Resistance exercise training-induced muscle hypertrophy was associated with reduction of inflammatory markers in elderly women. **Mediators of inflammation**, v. 2010, 2010.
- ORTEGA, E. et al. Role of Hsp72 and norepinephrine in the moderate exercise-induced stimulation of neutrophils' microbicide capacity. **European journal of applied physiology**, v. 98, n. 3, p. 250-255, 2006.
- ORTEGA, Eduardo et al. Hsp72, inflammation, and aging: causes, consequences, and perspectives. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1261, n. 1, p. 64-71, 2012.
- RADAELLI, R. et al. Effect of two different strength training volumes on muscle hypertrophy and quality in elderly women. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 53, n. 3, p. 6-11, 2013.
- RADAELLI, Regis et al. Low-and high-volume strength training induces similar neuromuscular improvements in muscle quality in elderly women. **Experimental gerontology**, v. 48, n. 8, p. 710-716, 2013.
- RAO, D. Visala; WATSON, Kenneth; JONES, Graham L. Age-related attenuation in the expression of the major heat shock proteins in human peripheral lymphocytes. **Mechanisms of ageing and development**, v. 107, n. 1, p. 105-118, 1999.
- RASMUSSEN, Blake B. et al. Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. **The FASEB journal**, v. 20, n. 6, p. 768-769, 2006.
- RECH, Anderson et al. Echo intensity is negatively associated with functional capacity in older women. **Age**, v. 36, n. 5, p. 9708, 2014.
- REID, Kieran F. et al. Longitudinal decline of lower extremity muscle power in healthy and mobility-limited older adults: influence of muscle mass, strength, composition, neuromuscular activation and single fiber contractile properties. **European journal of applied physiology**, v. 114, n. 1, p. 29-39, 2014.
- RIKLI, Roberta E.; JONES, C. Jessie. Development and validation of a functional fitness test for community-residing older adults. **Journal of aging and physical activity**, v. 7, n. 2, p. 129-161, 1999.
- ROBERTSON, Robert J. et al. Concurrent validation of the OMNI perceived exertion scale for resistance exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 35, n. 2, p. 333-341, 2003.
- RODRIGUES-KRAUSE, Josianne et al. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter?. **Cell Stress and Chaperones**, v. 17, n. 3, p. 293-302, 2012.



- RODRIGUEZ-MIGUELEZ, Paula et al. Role of Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathways on the inflammatory response to resistance training in elderly subjects. **Age**, v. 36, n. 6, p. 9734, 2014.
- SANKAR, Jayaram et al. Visceral fat assessment in over nourished children by ultrasonography and its relation to anthropometry. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 79, n. 10, p. 1338-1341, 2012.
- SENF, Sarah M. Skeletal muscle heat shock protein 70: diverse functions and therapeutic potential for wasting disorders. **Frontiers in physiology**, v. 4, p. 330, 2013.
- SEMIZ, S. et al. Comparison of ultrasonographic and anthropometric methods to assess body fat in childhood obesity. **International journal of obesity**, v. 31, n. 1, p. 53, 2007.
- SIMAR, David et al. Effect of age on Hsp72 expression in leukocytes of healthy active people. **Experimental gerontology**, v. 39, n. 10, p. 1467-1474, 2004.
- SIMAR, David et al. Physical activity modulates heat shock protein-72 expression and limits oxidative damage accumulation in a healthy elderly population aged 60–90 years. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 62, n. 12, p. 1413-1419, 2007.
- SON, Sang Joon et al. Increased plasma levels of heat shock protein 70 associated with subsequent clinical conversion to mild cognitive impairment in cognitively healthy elderly. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119180, 2015.
- STARR, Marlene E. et al. Age-Associated Increase in Cytokine Production During Systemic Inflammation—II: The Role of IL-1 $\beta$  in Age-Dependent IL-6 Upregulation in Adipose Tissue. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 70, n. 12, p. 1508-1515, 2014.
- STOUT, Michael B. et al. Physiological aging: links among adipose tissue dysfunction, diabetes, and frailty. **Physiology**, v. 32, n. 1, p. 9-19, 2016.
- TERRY, Dellara F. et al. Serum heat shock protein 70 level as a biomarker of exceptional longevity. **Mechanisms of ageing and development**, v. 127, n. 11, p. 862-868, 2006.
- TCHKONIA, Tamara et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. **Ageing cell**, v. 9, n. 5, p. 667-684, 2010.
- TISS, Ali et al. Immunohistochemical profiling of the heat shock response in obese non-diabetic subjects revealed impaired expression of heat shock proteins in the adipose tissue. **Lipids in health and disease**, v. 13, n. 1, p. 106, 2014.
- VALLS, Maria Reyes Beltran et al. Explosive type of moderate-resistance training induces functional, cardiovascular, and molecular adaptations in the elderly. **Age**, v. 36, n. 2, p. 759-772, 2014.
- VINCENT, Heather K.; BOURGUIGNON, Cheryl; VINCENT, Kevin R. Resistance training lowers exercise-induced oxidative stress and homocysteine levels in overweight and obese older adults. **Obesity**, v. 14, n. 11, p. 1921-1930, 2006.
- VISSERS, Dirk et al. The effect of exercise on visceral adipose tissue in overweight adults: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56415, 2013.
- WALSH, R. C. et al. Exercise increases serum Hsp72 in humans. **Cell stress & chaperones**, v. 6, n. 4, p. 386-393, 2001.
- WILHELM, Eurico Nestor et al. Relationship between quadriceps femoris echo intensity, muscle power, and functional capacity of older men. **Age**, v. 36, n. 3, p. 9625, 2014.