

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Avaliação da função mitocondrial e antioxidante ao nível hepático
em resposta ao exercício físico crónico e idade**

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Mónica Isabel Garcia da Silva

Orientador: *Professora Doutora Maria Manuel Silva Oliveira*

Coorientador: *Professor Doutor Francisco Manuel Pereira Peixoto*



Vila Real, 2019

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Avaliação da função mitocondrial e antioxidante ao nível hepático
em resposta ao exercício físico crónico e idade**

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Mónica Isabel Garcia da Silva

Orientador: *Professora Doutora Maria Manuel Silva Oliveira*

Coorientador: *Professor Doutor Francisco Manuel Pereira Peixoto*

Composição do júri:

Vila Real, 2019

Declaração

Eu, Mónica Isabel Garcia da Silva, declaro, sob compromisso de honra, que o trabalho aqui apresentado é original e foi elaborado para o efeito de obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com indicação da fonte.

Mónica Isabel Garcia da Silva

Vila Real, abril de 2019

Agradecimentos

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, ao Centro de Química de Vila Real (CQ-VR) e ao Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-ambientais e Biológicas (CITAB), por tornarem a realização desta dissertação possível.

A todos os professores que tive a oportunidade de me cruzar durante o 1º e 2º ciclo, por todos os conhecimentos transmitidos que serão essenciais para o futuro.

À direção do Mestrado de Bioquímica por toda a dedicação aos estudantes. Pelo constante esforço realizado de forma a nos instruir da melhor forma possível.

À Professora Doutora Maria Manuel Oliveira e ao Professor Doutor Francisco Peixoto pela excelente orientação. Por todos os conhecimentos transmitidos, por todo o trabalho, preocupação e dedicação ao longo deste ano. Por todos os conselhos, apoio e compreensão nas alturas mais difíceis. Agradeço ainda por toda a boa disposição, compreensão, paciência e disponibilidade, que foram essenciais para conseguir realizar este trabalho. Toda a experiência e conhecimento transmitido será sem dúvida uma mais valia no meu percurso académico.

Aos meus pais e irmão, por toda a paciência e compreensão. Por acreditarem sempre em mim, acima de tudo e acima de todos.

Aos meus amigos Paulo Nunes, Fátima Machado e Tiago Coutinho que me acompanharam todos os dias neste último ano. Obrigada por todas as gargalhadas nos bons e maus momentos. Ao Paulo, em especial, por me ter acompanhado na realização deste trabalho. Sem vocês este ano não teria sido o mesmo. Desejo-vos o maior dos sucessos.

A todos os meus amigos, que mesmo não estando presentes, não falharam com o apoio e motivação em todos os momentos. Um enorme obrigada pela amizade. Às minhas meninas, um obrigada em especial. Desejo-vos tudo aquilo que para mim desejo.

A todos estes e aqueles que aqui não mencionei, mas que de alguma forma deram o seu contributo, **um enorme obrigada!**

Este trabalho foi financiado por: Fundos Europeus de Investimento pelo FEDER / COMPETE / POCI – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização, sob o Projeto POCI-01-0145-FEDER-016728 e Fundos Nacionais pela FCT – Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia no âmbito do projeto PTDC / DTP-DES / 6077/2014 e UID / QUI / 00616/2013

Os resultados desta Dissertação de Mestrado foram apresentados nos seguintes encontros:

- **Comunicações orais e em painel:**

Mónica G. Silva, Francisco Peixoto, Paula Oliveira, P. Nunes, M. Manuel Oliveira (2018). **Avaliação dos parâmetros de stresse oxidativo em amostras de fígado recolhidas de ratos *Wistar* com cancro da próstata sujeitos a um plano de exercício físico diário.** *In, XI Encontro Nacional de Estudantes, 23-26 março 2018, Porto, Portugal.* Apresentação em painel.

Mónica G. Silva, P.Nunes, Paula Oliveira, Francisco Peixoto, M. Manuel Oliveira. **Evaluation of antioxidante function in liver samples collected in young and middle age animals subject to a plan of daily physical exercise.** *In Livro de Resumos do Encontro Luso-Galego de Química, 21-23 novembro, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal.* Comunicação Oral.

Mónica G. Silva, P. Nunes, Paula Oliveira, Francisco Peixoto, M. Manuel Oliveira. **Avaliação da função mitocondrial hepática de ratos *Wistar* em resposta ao aumento da idade e a um plano de treino ao longo da vida,** *In Livro de Resumos da Semana da Ciência e Cidadania, 25 fevereiro - 1 março 2019, Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.* Comunicação Oral.

Resumo

A prática regular de exercício físico tem um impacto positivo na saúde humana. A prescrição correta de exercício permite um alargamento da limitação funcional do organismo, havendo assim uma modulação da homeostase de forma a proporcionar uma adaptação a esta atividade. O envelhecimento parece provocar o efeito contrário. Desta forma, o treino pode funcionar como uma prática que atua de forma preventiva sobre os danos associados a este processo, e assim provocar uma diminuição do aparecimento de doenças relacionadas com o envelhecimento.

Até à data nenhum estudo avaliou as alterações adaptativas hepáticas provocadas pelo treino ao longo da vida e se este poderá prevenir algumas das consequências do envelhecimento. Além disso, a grande maioria dos estudos neste campo são realizados no músculo esquelético, no entanto, tendo em conta o papel importante do fígado na demanda energética requerida por esta atividade, é imperativo perceber como é que este órgão se comporta.

Este estudo pretende avaliar a função mitocondrial e antioxidante, ao nível hepático, em resposta a um plano de exercício físico até à meia idade. Para tal, foram utilizadas amostras de fígado de 28 ratos Wistar Unilever, do sexo masculino distribuídos aleatoriamente em dois grupos: não exercitados ou exercitados, submetidos a um plano de exercício, de corrida em *treadmill* (5 dias/semana, 60 min/dia a uma intensidade correspondente a 70% da velocidade máxima definida no início de cada mês através da realização de um teste de esforço), durante 24 ou 54 semanas. Avaliou-se a função hepática através da análise de alguns marcadores bioquímicos. A análise de alguns marcadores do stresse oxidativo e das principais enzimas antioxidantes permitiu a avaliação da função antioxidante. Por fim, foi ainda avaliada a função mitocondrial hepática.

Os biomarcadores séricos avaliados não mostraram qualquer dano hepático. Os marcadores do stresse oxidativo mostraram que os animais que praticaram exercício até uma idade jovem sofreram dano oxidativo, o que se refletiu num aumento da peroxidação lipídica e numa ligeira diminuição da razão GSH/GSSG, comparativamente aos animais praticaram exercício até à meia idade.

Algumas das enzimas antioxidantes (CAT, GR, GPx) apresentaram uma diminuição de atividade com a idade, enquanto a SOD e a GST não se mostraram alteradas. O plano de exercício levou a um aumento da expressão da SOD e CAT, enquanto que a GPx, GST e GR mostraram uma diminuição.

O processo de envelhecimento provocou uma diminuição da atividade da citrato sintase, porém o treino conseguiu reverter esta tendência. A atividade dos complexos pertencentes à cadeia transportadora de elétrons (complexo I, II, IV) mostrou que o complexo I responde de forma distinta do complexo II e IV, face ao processo de envelhecimento e ao treino. A velocidade de respiração, em estado 4, mostrou um aumento com o envelhecimento, sendo esta tendência revertida com o treino.

Estes resultados confirmam que a prática de exercício físico ao longo da vida poderá melhorar a função mitocondrial e antioxidante ao nível hepático, sendo o tempo de treino essencial para esta melhoria.

O treino ao longo da vida poderá prevenir algumas das consequências do envelhecimento associadas à função mitocondrial e ao dano oxidativo, podendo ser um importante contributo para a prevenção de algumas patologias associadas ao aumento da idade.

Palavras-chave: Bioquímica, exercício físico, mitocôndria, stresse oxidativo, bioenergética

Abstract

The active and regular practice of physical exercise has a positive impact on human healthy. A correct prescription of exercise allows an extension of the functional limitation of the organism, producing a modulation of the homeostasis because of the adaptation to this practice. The aging process seem to have the opposite effect. In this way, physical exercise can work preventively on the damages associated with this process and thus cause a decrease in the appearance of age-related diseases.

To our knowledge, no studies have fully evaluated the hepatic adaptive alterations cause by physical exercise practiced throughout life and if it can prevent age related damage. Moreover, the vast majority of the studies in this field are performed on the skeletal muscle. However, because of the important role of the liver in the energetic demand required by this activity, it's imperative to understand the behaviour of this organ.

This study aims to determine if the exercise plan performed during the lifetime and the aging process are capable to promote hepatic physiological changes both in antioxidant and mitochondrial system. Liver samples from 28 male Wistar rats were randomly distributed into two groups: non-exercised or exercised, submitted to a *treadmill* exercise program (5 days / week, 60 minutes / day at an intensity of 70% of the maximum speed defined at the beginning of each month by performing a stress test) for 24 or 54 weeks. Hepatic function was evaluated by the variation of biochemical markers. Evaluation of oxidative stress markers and activity of antioxidant enzymes allowed the evaluation of the antioxidant function. Mitochondrial function was also evaluated.

Clinical biomarkers of liver damage showed no liver injury. Oxidative stress biomarkers showed that animals that practice exercise until a young age suffer oxidative stress which was reflected in an increase in lipid peroxidation and a decrease in the ratio GSH/GSSG, contrarily to animals that practice exercise until the middle age.

Some of the antioxidant enzymes (CAT, GR, GPx) showed a decrease of activity with age, whereas SOD and GST showed no alterations. The training performed caused an increase in the first line defence antioxidants (SOD and CAT), while GPx, GST and GR shows a slight but significant decrease.

The aging process resulted in a decrease activity of citrate synthase, however, the training reverted this situation. The activity of complexes of mitochondrial electron transport chain (complex I, II, IV) showed that complex I responds differently from complex II and IV,

to the aging process and physical exercise. Respiratory rate in state 4, has suffered an increase with the aging process, however, the exercise was able of reverted this situation.

These results confirm that physical exercise practiced throughout life seems capable of improve the mitochondrial and antioxidant function. In fact, the duration of training proves to be essential for the improvement observed.

The life time practice of exercise is capable of the prevent some of the consequences caused by the aging process. This confirms that this practice can be helpful to prevent some of the age-related diseases.

Keywords: Biochemistry, physical exercise, mitochondria, oxidative stress, bioenergetics

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	V
Abstract	VII
Índice Geral	IX
Índice de figuras	XIII
Índice de tabelas	XVII
Lista de abreviaturas	XIX

I. INTRODUÇÃO	1
----------------------	----------

1.1. Mitocôndria	3
-------------------------	----------

1.1.1. Stresse oxidativo	5
--------------------------	---

1.1.2. Espécies reativas de oxigênio: formação e eliminação	6
---	---

1.1.3. Envelhecimento e patologias: a contribuição do stresse oxidativo	9
---	---

1.2. Exercício físico	10
------------------------------	-----------

1.2.1 Parâmetros do exercício: qual o protocolo de exercício mais benéfico?	12
---	----

1.2.2 Exercício físico e stresse oxidativo: qual a relação?	14
---	----

1.2.2.1. Produção de ROS a nível celular durante a prática de exercício	15
---	----

1.2.2.2. Mecanismos adaptativos estimulados pelo exercício físico	16
---	----

1.2.2.2.1. Fatores de dependência do processo adaptativo	18
--	----

1.3. Fígado	19
--------------------	-----------

1.3.1. Fígado e exercício físico	20
----------------------------------	----

1.3.1.1. Mecanismos adaptativos hepáticos ao exercício físico	21
---	----

1.3.2. Doenças hepáticas e envelhecimento	22
---	----

1.3.2.1 Exercício físico e prevenção de doença hepática	24
---	----

II. OBJETIVO	27
---------------------	-----------

III. MATERIAIS E MÉTODOS	31
---------------------------------	-----------

3.1 Amostragem	33
-----------------------	-----------

3.2	Avaliação de biomarcadores da função hepática	34
3.3	Avaliação da função antioxidante hepática	35
3.3.1	Homogeneização do material biológico	35
3.3.2	Quantificação Proteína	35
3.3.3	Atividades enzimáticas	36
3.3.3.1.	Superóxido Dismutase	36
3.3.3.2.	Catalase	36
3.3.3.3.	Glutaciona Peroxidase	37
3.3.3.4.	Glutaciona Redutase	37
3.3.3.5.	Glutaciona – S – Transferase	38
3.3.4	Determinação da peroxidação lipídica – Método de TBARS	38
3.3.5	Determinação do conteúdo em GSH e GSSG	38
3.4	Avaliação da função mitocondrial hepática	39
3.4.1	Atividades dos complexos mitocondriais e conteúdo mitocondrial	39
3.4.1.1	Obtenção da fração mitocondrial	39
3.4.1.2	Citrato Sintase	40
3.4.1.3	Complexo I	41
3.4.1.4	Complexo II	41
3.4.1.5	Complexo IV	42
3.4.1.5.1	Preparação do citocromo <i>c</i> 100% reduzido	42
3.4.1.5.2	Ensaio cinético	42
3.4.2	Avaliação da capacidade respiratória mitocondrial	43
3.4.2.1	Preparação do material biológico	43
3.4.2.2	Avaliação da velocidade respiratória mitocondrial hepática	43
3.5	Análise estatística	44
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
<hr/>		
4.1.	Avaliação de marcadores séricos da função hepática	47
4.2.	Avaliação da função antioxidante hepática	50
4.2.1	Atividades enzimáticas	50
4.2.1.1	Superóxido Dismutase	50
4.2.1.2	Catalase	53

4.2.1.3	Glutaciona Peroxidase	56
4.2.1.4	Glutaciona Redutase	58
4.2.1.5	Glutaciona – S – Transferase	60
4.2.2	Avaliação da peroxidação lipídica	63
4.2.3	Avaliação do teor em GSH e GSSG	67
4.3.	Avaliação da função mitocondrial hepática	70
4.3.1	Avaliação dos complexos mitocondriais e massa mitocondrial	70
4.3.1.1	Citrato Sintase	70
4.3.1.2	Complexo I	73
4.3.1.3	Complexo II	76
4.3.1.4	Complexo IV	79
4.3.2	Avaliação da atividade respiratória mitocondrial	83
4.4.	Efeito da prática de exercício a longo prazo no processo de envelhecimento	88
V. CONCLUSÕES FINAIS		93
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		97
VII. ANEXOS		111

Índice de figuras

- Figura 1 - Cadeia transportadora de elétrons.** Representação esquemática da transferência de elétrons, e consequente bombeamento de prótons, ocorrente ao nível dos diferentes complexos mitocondriais. (IMM – Membrana mitocondrial interna; OMM – Membrana mitocondrial externa; UBQ – ubiquinona; Cyt c – citocromo c) (adaptado de Dorn (2015)). 4
- Figura 2 - Formação das principais ROS via redução do oxigênio molecular** (adaptado de Lushchak (2014))...... 6
- Figura 3 - Fontes endógenas de produção de ROS e principais defesas antioxidantes enzimáticas** (adaptado de Bresciani et al., (2015))...... 7
- Figura 4 - Efeito do exercício físico na homeostase do organismo.** A zona denominada limitação biológica representa a capacidade máxima de cada indivíduo e não é um valor que pode sofrer alterações. Pelo contrário, a zona denominada limitação funcional pode variar, aumentando ou diminuindo, conforme os fatores representados (adaptado de Radak et al., (2013)). 11
- Figura 5 - Intensidade do exercício e curva de hormesis.** A quantidade de ROS produzida durante a prática de exercício é diretamente dependente da intensidade da atividade. Exercício de intensidade moderada, é associado a um nível de ROS moderado que provocará uma estimulação da função fisiológica no geral (adaptado de Radak et al., (2008))...... 16
- Figura 6 - Stresse oxidativo em indivíduos treinados e não treinados.** Indivíduos treinados, ou seja, adaptados ao exercício físico parecem beneficiar de protocolos de exercício de maior intensidade, contrariamente aos indivíduos não treinados (adaptado de Steinbacher and Eckl, (2015)). 18
- Figura 7 - Ciclo de Cori.** O lactato produzido a nível muscular é convertido em glicose pelo fígado (gliconeogênese), de forma a garantir a reposição das reservas de glicogênio hepáticas mobilizadas durante a prática de exercício (adaptado de Berg *et al.*, (2012))...... 20
- Figura 8 - Stresse oxidativo e doença hepática.** Mecanismos gerais pelos quais os estados de stresse oxidativo persistentes, provocados por fatores endógenos ou exógenos, estão envolvidos no desenvolvimento de algumas das patologias do fígado (adaptado de Li et al., (2015))...... 23
- Figura 9 - Atividade da SOD em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida.** Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições. 50
- Figura 10 - Atividade da CAT em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida.** Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício),

EX 54 (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições..... 53

Figura 11 - Atividade da **GPx** em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições..... 56

Figura 12 - Atividade da **GR** em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições..... 59

Figura 13 - Atividade da **GST** em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições..... 61

Figura 14 - Avaliação da **peroxidação lipídica** pelo método de TBARS, em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. **(A)** Teor de MDA no pellet 1, **fração total**, resultante da 1^o centrifugação (1500 g); **(B)** Teor de MDA no pellet 2, **fração mitocondrial**, resultante da junção dos pellets da 2^o e 3^o centrifugação (8000 g e 14 000 g, respetivamente); Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições..... 64

Figura 15 - Razão em **GSH/GSSG**, e valores médios do conteúdo de GSH e GSSG em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade –

sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições..... 68

Figura 16 - Atividade da **Citrato Sintase** em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=4), com duas repetições cada..... 71

Figura 17 - Atividade do **Complexo I, NADH desidrogenase**, em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições 74

Figura 18 - Atividade do **Complexo II, succinato desidrogenase**, em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições..... 77

Figura 19 - Atividade do **Complexo IV, citocromo c oxidase**, em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras diferentes apresentam diferenças significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições 80

Figura 20 - Efeito da idade e do exercício praticado ao longo da vida na **respiração mitocondrial, em estado 4**, em mitocôndrias hepáticas energizadas com piruvato/malato (**A**) e succinato (**B**), depois de adicionado rotenona. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições..... 84

Índice de tabelas

Tabela I - Quantidade de exercício realizado por semana e os diferentes benefícios para a saúde que se podem obter. Os efeitos benéficos podem variar para distintos indivíduos (adaptado de Powell <i>et al.</i> , (2011)).....	12
Tabela II - Diferentes intensidades do exercício aeróbio e a sua classificação com base na capacidade de consumo máximo de oxigénio (%VO ₂ max.) (adaptado de Mallo Ferrer, (2018)).....	13
Tabela II – Avaliação da função hepática através da quantificação do teor sérico em albumina, triacilgliceróis e colesterol total, assim como da atividade da alanina aminotransferase (ALT), dos animais pertencentes a cada grupo experimental. Todos os valores representam os valores médios ± SD (n=7). *p<0,05; #p<0,001; ^a comparativamente com NEX24; ^b comparativamente com EX24; ^c comparativamente com EX54;.....	47
Tabela IV – Tabela resumo dos resultados obtidos na avaliação da função antioxidante e mitocondrial, em amostras de fígado pertencentes aos animais dos diferentes grupos experimentais, face ao envelhecimento e ao exercício praticado ao longo da vida. A última coluna da tabela, “ exercício na idade ”, representa o efeito que a prática de exercício teve nos efeitos provocados pela idade, tanto na função mitocondrial como na capacidade antioxidante. O signal (+) indica que o exercício provocou uma melhoria nos parâmetros avaliados, comparativamente com os efeitos da idade. O signal (-) indica que o exercício piorou os parâmetros avaliados, comparando com os efeitos da idade.....	89

Lista de abreviaturas

ADP	Adenosina-5'-difosfato
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina de soro bovino
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CTE	Cadeia transportadora de elétrões
Cyt <i>c</i>	Citocromo <i>c</i>
DCPIP	2-clorofenol-indofenol
DTNB	1,2-dicloro-4-nitrobenzeno
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido egtálico
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina – forma oxidada
FADH₂	Dinucleótido de flavina e adenina – forma reduzida
FELASA	<i>Federation for Laboratory Animal Science Associations</i>
GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa – forma reduzida
GSSG	Glutationa – forma oxidada
GST	Glutationa – S – Transferase
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
HO·	Radical Hidroxilo

HOO·	Radical hidroperoxilo
IMM	Membrana mitocondrial interna
MDA	Malondialdeído
mtDNA	Ácido desoxirribonucleíco mitocondrial
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotido – forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotido – forma reduzida
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotido de fosfato – forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido de fosfato – forma reduzida
NAFLD	Esteatose hepática não alcoólica (do inglês – <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>)
NBT	Cloreto de azul de nitrotetrazólio
nDNA	Ácido desoxirribonucleíco nuclear
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
NF – κB	Fator nuclear kappa B
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
O₂^{·-}	Ião superóxido
OMM	Membrana mitocondrial externa
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPT	<i>O</i> – ftaldeído
Pi	Fosfato inorgânico
ROS	Espécies reativas de oxigénio (do inglês – <i>Reactive oxygen species</i>)
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido tiobarbiturico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA	Ácido tricarboxílico
TCA#	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos ácido (do inglês - <i>Tricarboxylic acid cycle</i>)
U	Unidade internacional de atividade enzimática
UBQ	Ubiquinona
VO₂ max	Velocidade máxima de consumo de oxigénio

Capítulo I

Introdução

I. Introdução

1.1. Mitocôndria

A mitocôndria desempenha um papel central na bioenergética celular, sendo por isso indispensável para a sobrevivência da maioria das células eucariotas. É altamente dinâmica e mutável face a estímulos externos, de forma a garantir as exigências necessárias para a função celular em situações distintas. É composta por cinco “compartimentos” distintos que possuem funções especializadas: a membrana mitocondrial externa, o espaço intermembranar, a membrana mitocondrial interna, formando cristas (invaginações da membrana interna), e a matriz mitocondrial (Handy e Loscalzo, 2012; Bishop *et al.*, 2014; Sanz, 2016).

Este organelo é responsável pela formação de cerca de 90% da energia necessária para a manutenção das funções celulares, ou seja, o ATP. A produção de ATP ocorre ao nível da membrana mitocondrial interna (ATP sintase), fazendo parte do processo de respiração aeróbia. Este é dependente do acoplamento de dois sistemas “independentes”: o transporte de eletrões pela cadeia transportadora de eletrões (CTE) e a fosforilação do ADP (Bresciani *et al.*, 2015; Berry *et al.*, 2018).

A CTE compreende 4 complexos respiratórios (complexos I a IV: I – NADH desidrogenase; II – succinato desidrogenase; III – citocromo *c* redutase; IV – citocromo *c* oxidase), responsáveis pelo transporte de eletrões até ao oxigénio molecular, o aceitador final de eletrões desta cadeia. Estes complexos catalisam a oxidação do NADH (complexo I) e FADH₂ (complexo II), provenientes principalmente do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA#), ocorrendo neste processo uma transferência de eletrões para um transportador móvel, a ubiquinona. Este transportador será responsável pela transferência dos eletrões até ao complexo III. Posteriormente, os eletrões serão transportados para um outro transportador móvel, o citocromo *c*. Esta cadeia de transferência termina com a aceitação destes eletrões pelo oxigénio molecular, reação catalisada pelo complexo IV (figura 1) (Bishop *et al.*, 2014; Berry *et al.*, 2018).

Durante a transferência de eletrões pela CTE ocorre, paralelamente, um bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, levando à formação de um gradiente eletroquímico. Consequentemente, ocorre uma alteração do potencial de membrana, devido à acumulação dessas cargas positivas. Estas servirão como força motriz necessária para que ocorra a fosforilação do ADP, ao nível da ATP sintase. O retorno dos prótons à matriz mitocondrial é mediado pelo complexo F₀F₁ – ATP sintase, muitas vezes referido como complexo V (Labbé *et al.*, 2014; Berry *et al.*, 2018).

Desta forma, a criação do gradiente eletroquímico, conhecido como força protomotriz é o responsável pela existência do acoplamento entre as reações que fazem parte da fosforilação oxidativa, ou seja, a CTE e a fosforilação do ADP (Berry *et al.*, 2018).

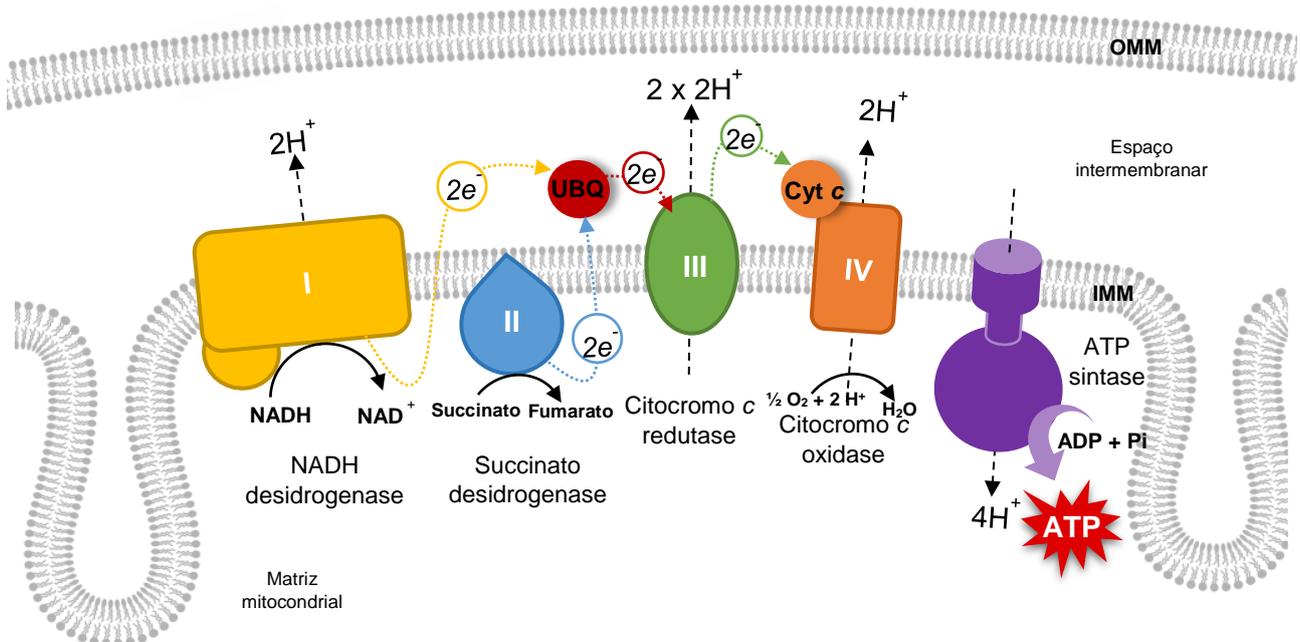


Figura 1 - Cadeia transportadora de elétrons. Representação esquemática da transferência de elétrões, e consequente bombeamento de prótons, ocorrente ao nível dos diferentes complexos mitocondriais. (IMM – Membrana mitocondrial interna; OMM – Membrana mitocondrial externa; UBQ – ubiquinona; Cyt c – citocromo c) (adaptado de Dorn (2015)).

A mitocôndria, para além da produção de energia, possui uma série de funções igualmente importantes e indispensáveis ao normal funcionamento celular. A regulação da homeostase intracelular de Ca^{2+} , sinalização redox, β -oxidação e síntese de macromoléculas essenciais, como é o caso dos nucleótidos de pirimidinas, agregados Fe-S e grupo hemo, são algumas dessas funções. Para além disto, as mitocôndrias desempenham ainda um papel fundamental na iniciação do processo de apoptose. Assim, possuem um papel essencial tanto na sobrevivência como na morte celular, sendo por isso consideradas os “*gatekeepers of life and death*” (Bresciani *et al.*, 2015; Sanz, 2016).

1.1.1. Stresse oxidativo

O oxigénio é essencial para a sobrevivência dos diferentes seres eucariotas. Apesar de ser essencial, paradoxalmente, pode acarretar alguns danos nos organismos, danos estes provocados pelas espécies reativas de oxigénio (ROS), subprodutos resultantes do metabolismo aeróbio. Apesar de serem considerados subprodutos, e por norma serem associadas apenas ao dano oxidativo, uma falha na produção destas espécies oxidantes está associada a uma diminuição de determinados processos de sinalização envolvidos em fenómenos de divisão, proliferação celular e apoptose (Ye *et al.*, 2015).

Desta forma, é plausível dizer que as ROS têm quer efeitos positivos quer efeitos negativos. Estes efeitos irão depender da quantidade de ROS, do seu local de produção e do estado em que a célula se encontra. O tipo de ROS produzidas também pode influenciar, tendo em conta a diferente reatividade apresentada por estas espécies (Sanz, 2016).

A definição exata do conceito de stresse oxidativo é um desafio e tem sofrido várias alterações ao longo dos anos. Foi primeiramente definido por Sies (1985) como “*a disturbance in the pro-oxidant-antioxidant balance in favor of the former*”, definição que foi aceite durante alguns anos. No entanto, com a evolução da “biologia redox”, esta definição foi sendo modificada. Em 2007, Sies e Jones redefiniram o stresse oxidativo como “*an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, leading to a disruption of redox signaling and control and/or molecular damage*”, sendo esta a definição aceite até à data (Sies *et al.*, 2017).

Assim, os estados de stresse oxidativo são consequência da existência dum desequilíbrio entre espécies pro-oxidantes e antioxidantes, provocado por um aumento da produção de ROS acompanhado por uma diminuição das defesas antioxidantes (Pisoschi e Pop, 2015).

No entanto, nem sempre estes estados resultam em dano oxidativo. Quando em estados de stresse oxidativo moderados, a célula tem a capacidade de bloquear alguns processos do seu metabolismo e desenvolve respostas de forma a prevenir ou neutralizar os efeitos negativos das ROS. Uma das respostas é a ativação de genes de enzimas antioxidantes estimulando a expressão desta defesa antioxidante, combatendo assim o excesso de espécies reativas. O NF- κ B é um dos fatores que é mais sensível ao estado redox celular, e como tal está diretamente envolvido nessa resposta. Esta é uma resposta positiva do organismo, podendo estar na base de um processo adaptativo a este estado oxidante (Gil del Valle, 2011; Birben *et al.*, 2012).

No caso de existir um aumento persistente do desequilíbrio redox, as ROS em excesso acabarão por oxidar biomoléculas como DNA, lípidos e proteínas. Para além disso, podem

afetar o funcionamento de alguns organelos, como é o caso da mitocôndria. Os danos que ocorrem a este nível podem ir desde a disrupção da CTE até a mutações ao nível do DNA mitocondrial, levando consequentemente à disfunção mitocondrial (Gil del Valle, 2011; Che *et al.*, 2016).

1.1.2. Espécies reativas de oxigénio: formação e eliminação

As espécies reativas de oxigénio são produzidas partindo do oxigénio molecular e resultam do metabolismo aeróbio celular, tal como é mostrado na figura 2. Estas podem ser divididas em 2 grupos: radicais e não- radicais (Birben *et al.*, 2012).

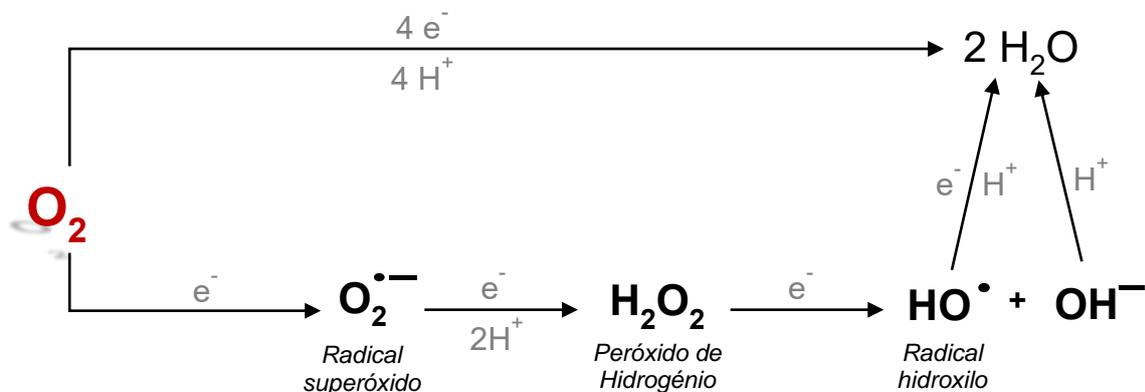
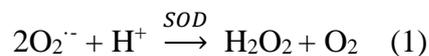


Figura 2 - Formação das principais ROS via redução do oxigénio molecular (adaptado de Lushchak (2014)).

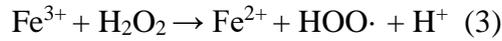
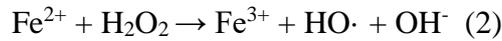
O principal e mais abundante radical produzido a nível celular é o radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), resultante da redução univalente do oxigénio molecular (Ye *et al.*, 2015). Este radical é rapidamente convertido em peróxido de hidrogénio (H_2O_2), reação que pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisada enzimaticamente pela superóxido dismutase (SOD) (Equação 1) (Lushchak, 2014).



O H_2O_2 não é um radical livre, no entanto, é fisiologicamente mais ativo que o ião superóxido, tendo em conta que a sua estabilidade permite-lhe atingir uma série de alvos a nível celular. Esta característica torna-o um bom sinalizador celular (Handy e Loscalzo, 2012).

Esta espécie pode levar à formação de radicais extremamente reativos, como o radical hidroxilo, através da reação com iões metálicos, como o ferro e o cobre, através das reações de Fenton (Equação 2 e 3). O radical hidroxilo é tido como a ROS com um maior poder oxidante,

não existindo qualquer mecanismo celular específico para o eliminar (Pisoschi e Pop, 2015; Ye *et al.*, 2015).



A mitocôndria é apontada como um dos principais locais de produção de ROS, principalmente do ião superóxido, devido à fuga de elétrons que ocorre ao nível da CTE. Atualmente, estima-se que cerca de 0,15% do oxigénio utilizado a nível mitocondrial poderá originar espécies reativas, contrariamente à ideia clássica de que estes valores percentuais rondariam os 2% a 5% (Brand, 2010).

Em teoria, a produção de ROS pode ocorrer ao longo de toda a CTE, no entanto apenas o complexo I e III são apontados como os principais locais de produção, sendo o complexo I, segundo alguns autores, aquele que desempenha um papel mais relevante na produção destas espécies (Brand, 2010; Zorov *et al.*, 2014).

Para além da mitocôndria existem outros locais, a nível celular, onde ocorre a produção de ROS. No geral, a produção destas moléculas ocorre maioritariamente a 4 níveis (figura 3): atividade de enzimas como as NADPH oxidases (NOX), xantina oxidase, óxido nítrico sintase (NOS), citocromo P450, são alguns dos processos que têm como consequência a produção de espécies reativas (figura 3). Os peroxissomas também foram identificados como uma das fontes de produção de ROS, principalmente de H_2O_2 (Pisoschi e Pop, 2015; Ye *et al.*, 2015; Che *et al.*, 2016).

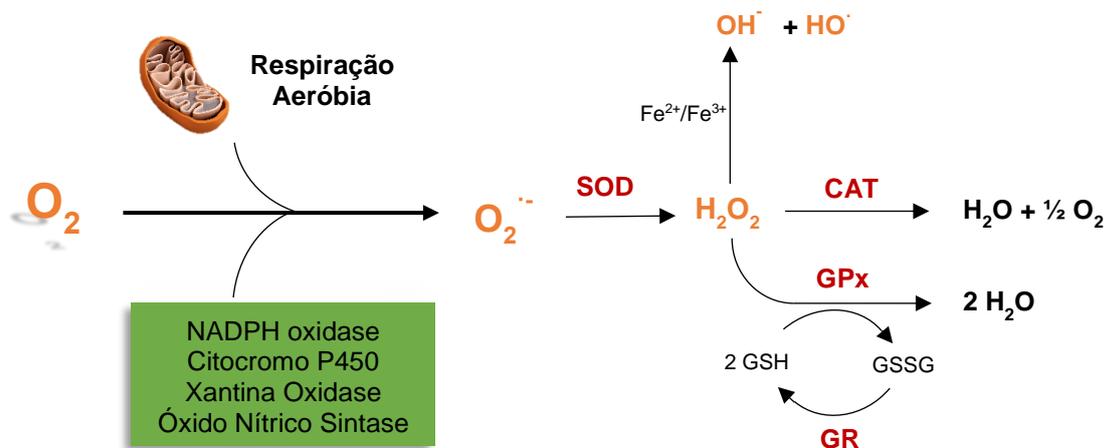
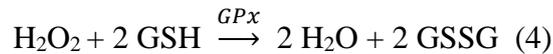


Figura 3 - Fontes endógenas de produção de ROS e principais defesas antioxidantes enzimáticas (adaptado de Bresciani *et al.*, (2015)).

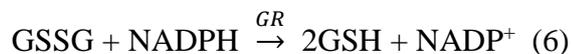
Para a manutenção do equilíbrio redox celular a quantidade de espécies reativas deve ser devidamente controlada, não só a nível da sua produção como também da sua eliminação, de forma a evitar danos oxidativos, sendo os diferentes sistemas antioxidantes, presentes nos organismos, os responsáveis por esse papel (Lushchak, 2014; Ye *et al.*, 2015; Che *et al.*, 2016).

Os sistemas antioxidantes podem ser classificados com base em diferentes critérios. Na maioria das vezes são divididos em duas categorias: antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos. Em ambos os casos têm a capacidade de prevenir ou eliminar as ROS, mas por mecanismos distintos (Pisoschi e Pop, 2015). Os sistemas enzimáticos compreendem enzimas que têm a capacidade de neutralizar a ação de espécies reativas. Entre estas encontram-se, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx). Nos mamíferos, a SOD é considerada a primeira e principal linha de defesa antioxidante (Ye *et al.*, 2015; Galadari *et al.*, 2017).

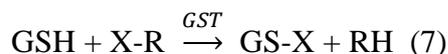
O H₂O₂ é um produto resultante da atividade da SOD. O mecanismo primário para eliminação desta espécie é catalisado pela glutathiona peroxidase (Equação 4) e pela catalase (Equação 5), esta última presente maioritariamente a nível dos peroxissomas (Lushchak, 2014).



A glutathiona é um tripéptido de baixo peso molecular que possui atividade antioxidante. Ao nível celular, cerca de 90% desta molécula encontra-se, ao nível celular, na sua forma reduzida. Esta desempenha um papel de elevada importância no controlo redox da célula, uma vez que é o principal antioxidante endógeno não enzimático existente a nível celular. Tendo em conta a necessidade desta molécula, o GSSG tem que voltar a ser reduzido a GSH pela ação da glutathiona redutase (GR) (Equação 6) (Lu, 2013; Lushchak, 2014).



É de notar que, para além de antioxidante, a GSH também tem um papel na eliminação de compostos tóxicos das células. Esta é conjugada com xenobióticos de forma a que estes sejam mais facilmente excretados. A glutathiona-S-transferase é a enzima responsável pela catálise de algumas dessas reações (Equação 7) (Ye *et al.*, 2015).



A GSH, ainda que seja o mais importante antioxidante não enzimático, não é o único. Os sistemas de defesa antioxidante podem ser endógenos, dos quais fazem parte proteínas como a ferritina, transferrina e albumina e ainda algumas moléculas de baixo peso molecular, como

é o caso do ácido úrico e da coenzima Q10, mas podem também ser exógenos, sendo estes provenientes da dieta, como é o caso de algumas vitaminas, como a vitamina C e E (Pisoschi e Pop, 2015).

1.1.3. Envelhecimento e patologias: a contribuição do stresse oxidativo

O envelhecimento é caracterizado pelo normal e progressivo declínio de variadas funções que, conseqüentemente, levam a uma diminuição da capacidade de resposta de todo o organismo a estímulos endógenos ou exógenos (Schmucker, 2005).

Os sistemas antioxidantes e mecanismos de reparação celulares nem sempre são eficientes a neutralizar as conseqüências provocadas pelas ROS produzidas durante o normal metabolismo. Os danos oxidativos ao nível de biomoléculas são observáveis em indivíduos saudáveis, sob condições fisiológicas normais, o que corrobora esta ideia. A acumulação destes danos ao longo da vida pode levar a uma falha da maquinaria celular responsável pela manutenção da homeostase, o que irá originar ainda mais danos a vários níveis. Esta cascata de eventos é associada ao processo de envelhecimento (Gil del Valle, 2011; Cui *et al.*, 2012). É neste princípio que assenta uma das mais bem aceites teorias do envelhecimento, a teoria dos radicais livres. Esta foi proposta por Harman (1956), tendo sido, anos mais tarde, reformulada como a teoria do stresse oxidativo para o envelhecimento. Nesta última teoria, é proposto que o dano oxidativo ocorre a nível mitocondrial, principalmente ao nível do DNA mitocondrial (mtDNA) e tem um papel central no envelhecimento (Harman, 1972; Cui *et al.*, 2012).

Esta teoria oferece o melhor mecanismo de elucidação do processo de envelhecimento assim como de outros fenómenos relacionados com a idade, como é o caso das doenças dependentes deste processo. No entanto, nenhuma das teorias existentes consegue elucidar todos os mecanismos moleculares do envelhecimento, uma vez que se trata dum processo multifatorial, não dependendo apenas de uma única disfunção molecular, mas sim de um conjunto de disfunções a vários níveis (Gil del Valle, 2011; Cui *et al.*, 2012; Liguori *et al.*, 2018).

Evidências, quer epidemiológicas quer etiológicas, recolhidas ao longo dos últimos anos mostram que o stresse oxidativo tem um papel crucial no desenvolvimento de uma série de patologias como, por exemplo, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, cujo desenvolvimento está associado ao envelhecimento. Assim, o aparecimento destas patologias, associadas ao aumento da idade, pode estar relacionado com os estados de stresse oxidativo existentes (Liguori *et al.*, 2018).

A redução da quantidade de moléculas oxidadas que se acumulam durante o processo de envelhecimento tem sido uma das estratégias usadas para o atenuar e, desta forma, prevenir determinadas patologias. As terapias baseadas na administração de antioxidantes e a restrição calórica têm sido as principais abordagens para cumprir tal objetivo (Radak *et al.*, 2008; Liguori *et al.*, 2018).

A prática de exercício tem despertado cada vez mais interesse, uma vez que este tem mostrado efeitos bastante positivos na atenuação de algumas das consequências do processo de envelhecimento e, conseqüentemente, poderá ser uma solução para prevenir algumas doenças relacionadas com este processo. Tal levou a que existisse um aumento exponencial de estudos nesta área de forma a elucidar quais os mecanismos bioquímicos que estão subjacentes a tais efeitos (Radak *et al.*, 2013; Liguori *et al.*, 2018).

1.2. Exercício físico

A atividade física e exercício físico estão associados a um estilo de vida saudável e a uma melhoria da saúde no geral. Apesar destes dois termos serem muitas das vezes utilizados como sinónimos, são conceitos distintos. A atividade física é definida como qualquer movimento da musculatura esquelética que envolve o gasto de energia, sendo incluídas, por exemplo, as tarefas realizadas no dia-a-dia. Por sua vez, o exercício físico é definido como uma atividade estruturada, planeada e repetitiva, sendo uma subcategoria da atividade física e tendo como objetivo o melhoramento e/ou manutenção da condição física (Caspersen *et al.*, 1985; Mallo Ferrer, 2018).

A prática de exercício permite um alargamento da limitação funcional do organismo, havendo assim uma modulação da homeostase de forma a existir uma adaptação a esta atividade. Fatores como a idade e o sedentarismo parecem provocar o efeito contrário. Desta forma, o exercício físico pode funcionar como uma prática que atua de forma preventiva sobre os danos associados a estes fatores e assim provocar uma diminuição do aparecimento de doenças relacionadas com os mesmos (figura 4) (Radak *et al.*, 2013; Okudan e Belviranlı, 2016).

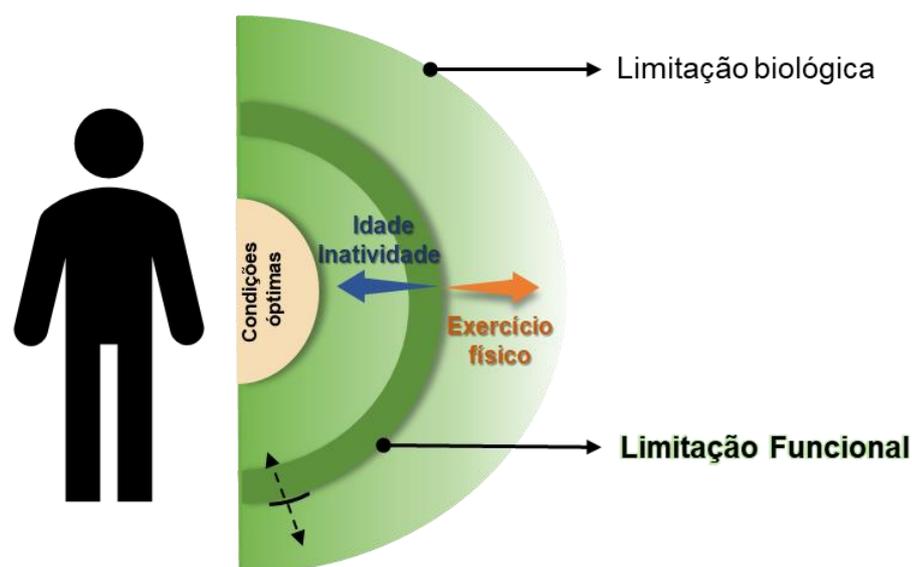


Figura 4 - Efeito do exercício físico na homeostase do organismo. A zona denominada limitação biológica representa a capacidade máxima de cada indivíduo e não é um valor que pode sofrer alterações. Pelo contrário, a zona denominada limitação funcional pode variar, aumentando ou diminuindo, conforme os fatores representados (adaptado de Radak *et al.*, (2013)).

Patologias como a obesidade, diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, depressão, ansiedade e alguns tipos de cancro, são algumas das patologias onde o exercício físico tem vindo a mostrar um efeito positivo. Entre todas as doenças em que a prática de exercício parece ser vantajosa é de destacar o efeito que esta atividade possui nas patologias que resultam dos estados de stress oxidativo associados ao envelhecimento (Radak *et al.*, 2013).

Atualmente, segundo a OMS, para idades entre os 18-64 anos, é recomendada a prática de pelo menos 150 minutos/semana de exercício físico aeróbio de intensidade moderada ou 75 minutos/semana de exercício físico aeróbio de intensidade elevada ou ainda uma combinação de ambas as hipóteses apresentadas. É de notar, que tais quantidades constituem apenas uma recomendação (WHO, 2010).

Apesar destas recomendações, a obtenção dos efeitos benéficos do exercício irá depender diretamente da condição física e fisiologia, da dieta e da idade do indivíduo em questão, logo a escolha do protocolo de exercício a aplicar deve depender destes fatores. O exercício físico que ultrapassa as capacidades de determinado indivíduo pode ser prejudicial à saúde, tal como é demonstrado por alguns estudos (Williams e Thompson, 2014; Armstrong *et al.*, 2015; Steinbacher e Eckl, 2015).

Tabela I - Quantidade de exercício realizado por semana e os diferentes benefícios para a saúde que se podem obter. Os efeitos benéficos podem variar para distintos indivíduos (adaptado de Powell *et al.*, (2011)).

<i>Quantidade de atividade (volume e intensidade)</i>	<i>Benefícios para a saúde</i>
<i>Baseline</i>	<i>Nenhum</i>
<150 minutos/semana de exercício intensidade moderada	<i>Algum</i>
150-300 minutos/semana de exercício intensidade moderada	<i>Substancial</i>
>300 minutos/semana de exercício intensidade moderada	<i>Adicional</i>

Assim, é um desafio estabelecer os parâmetros exatos do exercício, ou seja, a intensidade, frequência e duração, associados à obtenção dos benefícios desta prática. Para além disto, a complexidade dos diferentes tipos de exercícios, as diferentes vias estimuladas e resultados obtidos nos diferentes estudos da área, como consequência dos diferentes e variados protocolos, dificultam ainda mais esta tarefa. A resolução destes problemas, através da descoberta da influência de cada parâmetro do exercício e os mecanismos bioquímicos envolvidos na adaptação a esta prática, permitiria a prescrição de uma dose exata de exercício adequada a cada indivíduo (Powell *et al.*, 2011; Mallo Ferrer, 2018).

1.2.1 Parâmetros do exercício: qual o protocolo de exercício mais benéfico?

Os parâmetros referidos anteriormente são utilizados para definir os diferentes protocolos de exercício físico. Algumas publicações parecem apoiar a intensidade como o parâmetro do exercício físico cuja obtenção dos efeitos benéficos é maioritariamente dependente. Aparentemente, o aumento gradual da intensidade do exercício está associado ao desencadeamento dos mecanismos adaptativos no organismo. No entanto, o máximo de intensidade dum determinado exercício não significa a obtenção maximizada dos efeitos benéficos, uma vez que não existe uma relação totalmente linear entre o aumento da intensidade e efeitos benéficos. A falta de estudos onde os parâmetros do exercício são contantes mas associados a um aumento gradual da intensidade são escassos, o que faz com que não haja uma certeza acerca do benefício exato da intensidade (Radak *et al.*, 2013; Parker *et al.*, 2014; Liguori *et al.*, 2018).

A intensidade do exercício físico incide sobre a energia necessária para a performance da atividade, descrevendo assim a facilidade ou dificuldade com que a atividade é executada. A energia química necessária (ATP) pode ser obtida por dois mecanismos distintos: aeróbio,

onde a energia é obtida pela fosforilação oxidativa, e anaeróbio onde a obtenção de energia é realizada através da fermentação láctica (Powell *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012).

Os diversos estudos publicados até à data mostram que o exercício aeróbio é aquele que parece estar associado à potenciação dos efeitos benéficos do exercício. A intensidade deste tipo de exercício, por norma, é quantificada segundo a capacidade máxima de consumo de oxigénio ($VO_2 \text{ max.}$). Este valor permite classificar a atividade como sendo de baixa, moderada ou elevada intensidade, tal como é mostrado na tabela II (Colcombe *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2010; Mallo Ferrer, 2018).

Tabela II - Diferentes intensidades do exercício aeróbio e a sua classificação com base na capacidade de consumo máximo de oxigénio (% $VO_2 \text{ max.}$) (adaptado de Mallo Ferrer, (2018)).

<i>%$VO_2 \text{ max.}$</i>	<i>Intensidade</i>
≤ 25	<u>Baixa</u>
25 - 65	<u>Moderada</u>
≥ 85	<u>Elevada</u>

Apesar da intensidade ser considerada o parâmetro que mais influencia o desenvolvimento de mecanismos de adaptação e, conseqüentemente, a obtenção de efeitos benéficos, a frequência e o volume de prática também parecem possuir um papel significativo na adaptação (Powell *et al.*, 2011).

A frequência refere-se ao número de vezes que determinado exercício é praticado durante um período específico de tempo, podendo esta ser considerada aguda ou crónica. A prática de exercício crónica parece ser aquela que está associada à obtenção dos efeitos benéficos, uma vez que permite a existência de um treino que leva à indução de uma resposta adaptativa, que será visível a longo prazo. A frequência está de certa forma relacionada com o volume de exercício, em que o volume diz respeito ao total de atividade que é realizada num determinado período de tempo, normalmente numa semana (Powell *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012).

Atualmente, a prática de exercício aeróbio, de intensidade moderada e de forma crónica com uma frequência superior a 3 vezes por semana é associada à obtenção dos efeitos benéficos de exercício, levando ao desencadeamento dos processos adaptativos, o que vai de encontro às recomendações indicadas pela OMS (Powell *et al.*, 2011; Radak *et al.*, 2013).

1.2.2 Exercício físico e stresse oxidativo: qual a relação?

Passaram-se mais de 3 décadas desde que se demonstrou que a prática de qualquer tipo de exercício físico está diretamente relacionada com a existência de estados de stresse oxidativo ao nível do organismo (Dillard *et al.*, 1978). Os diversos estudos realizados desde então, quer em humanos, quer em modelos animais, vêm corroborar esta descoberta (Thirumalai *et al.*, 2011; Parker *et al.*, 2014).

De facto, existem uma série de situações que ocorrem durante a prática de atividade física que podem estar associadas à produção de ROS. O movimento contrátil do músculo esquelético é considerado a principal fonte de produção destas espécies reativas. As restantes perturbações homeostáticas que ocorrem durante a prática de exercício também podem contribuir para a presença destes estados de stresse oxidativo, assim como outros sistemas e vias metabólicas (Peake *et al.*, 2015; Jackson, *et al.*, 2016).

Desta forma, a prática de exercício parece ser um paradoxo: se por um lado esta atividade está associada a estados de stresse oxidativo que, por generalização, são associados a danos celulares, por outro lado, tal como já referido, é benéfica para a saúde (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2011).

Durante alguns anos tentou-se perceber qual o papel das ROS resultantes do exercício, de forma a compreender se estas espécies estavam, ou não, envolvidas no efeito benéfico desta prática. Só quando se descobriu que as ROS poderiam atuar como moléculas sinalizadoras é que se compreendeu que estas poderiam participar em processos de sinalização que, possivelmente, iriam estimular a adaptação do organismo ao exercício. Davies e colaboradores (1982) publicaram o primeiro estudo onde se demonstrou que, de facto, os estados de stresse oxidativo gerados durante a prática de exercício físico faziam parte de um processo adaptativo a este tipo de prática (Powers *et al.*, 2016).

Atualmente, existe evidência científica suficiente que relaciona a produção de ROS durante a prática de exercício físico, com o processo natural e fundamental da adaptação do organismo a esta atividade (Steinbacher e Eckl, 2015; Mason *et al.*, 2016).

Apesar de todos estes avanços feitos nas últimas décadas, os mecanismos moleculares exatos pelos quais ocorre adaptação aos estados de stresse oxidativo gerados pela prática de exercício permanecem por elucidar. A natureza reativa das ROS, os variados locais de produção destas e o envolvimento de uma rede de órgãos na prática desta atividade tornam esta tarefa um desafio (Boström *et al.*, 2013; He *et al.*, 2016).

1.2.2.1. Produção de ROS a nível celular durante a prática de exercício

Na última década, tem existido um grande debate acerca de quais as principais fontes de produção de ROS, ao nível do organismo, associadas à prática de exercício físico (Powers *et al.*, 2011; Powers *et al.*, 2016).

A mitocôndria é uma das principais fontes de ROS a nível celular, pelo que não estará dissociada da produção de espécies reativas a nível celular durante a prática de exercício físico. A prática desta atividade leva ao aumento do consumo de oxigénio, resultando num aumento da taxa de respiração, o que provoca um aumento da produção de ROS. De facto, durante a prática de exercício aeróbio há um aumento do metabolismo mitocondrial de forma a cumprir as necessidades energéticas exigidas. No entanto, a mitocôndria não é considerada a principal fonte de ROS durante esta atividade, pelo menos ao nível do músculo esquelético (Powers e Jackson, 2008; Gomes *et al.*, 2012; Merry e Ristow, 2015). Sakellariou e colaboradores (2013) foram os primeiros a demonstrá-lo num estudo em que foram utilizados inibidores dos diferentes complexos da CTE, ao nível do músculo esquelético de rato, e não foram observadas alterações no conteúdo do ião superóxido. Por sua vez, utilizando inibidores das NADPH oxidases, ocorreram diminuições ao nível do teor deste radical no citoplasma. Este foi o primeiro estudo que aponta as NADPH oxidases como uma das principais produtoras de ROS a nível muscular durante o exercício físico.

Algumas publicações desde então parecem confirmar aquilo que Sakellariou e colaboradores demonstraram, sendo por isso, atualmente, as NADPH oxidases consideradas uma das principais fontes de ROS durante a prática de exercício, a nível muscular (Whitehead *et al.*, 2010; Pearson *et al.*, 2014).

Para além das NADPH oxidases e da mitocôndria, existe uma série de mecanismos ao nível da fibra muscular que também contribuem para o stresse oxidativo, como por exemplo, a atividade de enzimas como as xantinas oxidases e fosfolipases (Powers *et al.*, 2011).

No entanto, apesar de no músculo esquelético a atividade da NADPH oxidase ser apontada como a principal produtora de ROS, não significa que o mesmo se verifique em outros órgãos que estejam envolvidos na prática de exercício físico (Pillon Barcelos *et al.*, 2017).

1.2.2.2. Mecanismos adaptativos estimulados pelo exercício físico

Os estados de stresse oxidativo gerados durante a prática do exercício são fundamentais para que ocorra um processo adaptativo por parte do organismo (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008; Radak *et al.*, 2013).

Atualmente, reconhece-se que as ROS produzidas durante o exercício físico podem atuar como sinalizadores, estimulando uma série de vias de sinalização sensíveis ao estado redox, podendo levar à alteração da expressão de genes através da ativação de determinados fatores de transcrição, que podem levar às alterações associadas ao processo adaptativo (Radak *et al.*, 2008, 2013; Mason *et al.*, 2016).

A base do mecanismo de adaptação assenta no conceito de *hormesis* (figura 5). Este conceito refere-se a um processo onde a administração de uma substância química em doses baixas, que em doses elevadas é prejudicial ao organismo, provoca uma resposta adaptativa, resultando em efeitos benéficos para o organismo em questão. Apesar de ser um termo maioritariamente aplicado em toxicologia, também pode ser utilizado para descrever alguns processos fisiológicos, que estão por base na resposta a determinado estímulo, como é o caso da resposta provocada pelo exercício físico.

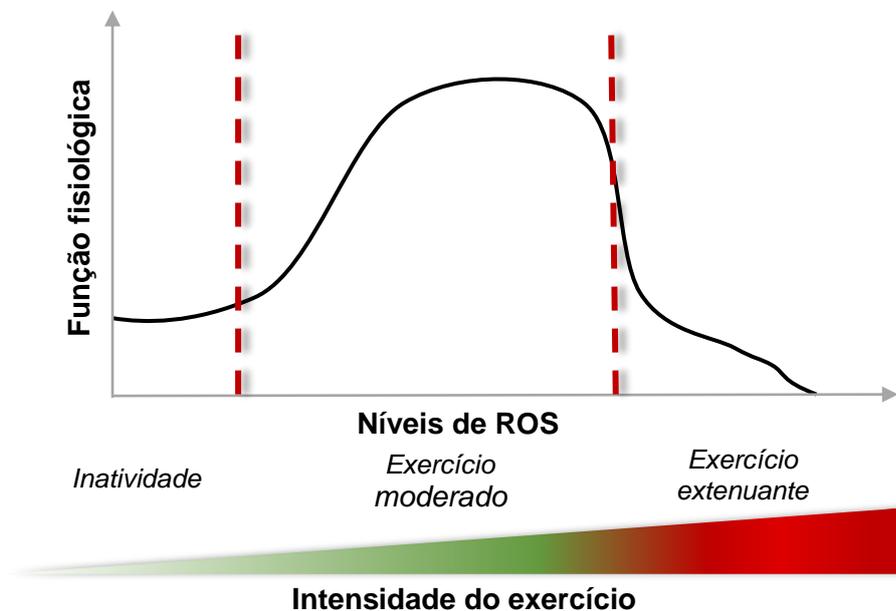


Figura 5 - Intensidade do exercício e curva de hormesis. A quantidade de ROS produzida durante a prática de exercício é diretamente dependente da intensidade da atividade. Exercício de intensidade de moderada, é associado a um nível de ROS moderado que provocará uma estimulação da função fisiológica no geral (adaptado de Radak *et al.*, (2008)).

Assim, doses baixas/moderadas e constantes de ROS irão provocar uma resposta adaptativa por parte do organismo. Esta resposta segue uma curva de *hormesis*, representada na figura 5. A curva mostra claramente que níveis baixos/moderados de ROS têm um efeito benéfico mas que níveis de ROS elevados acabam por ser prejudiciais (Radak *et al.*, 2008; Peake *et al.*, 2015).

Assim, os níveis de ROS produzidos durante o exercício são um dos principais fatores a ter em conta quando se fala num processo adaptativo a esta atividade. É a quantidade destas espécies que irá definir o seu papel no organismo, sendo esta resultante, maioritariamente, da intensidade do exercício. No entanto, a frequência do exercício também tem um papel relevante, pois para se desenvolver uma resposta adaptativa, os níveis de ROS devem ser moderados, mas devem existir de forma crónica no organismo. Tal apenas é conseguido através do treino a longo prazo, no entanto, não se sabe ao certo qual é a duração do treino para se obter os efeitos benéficos maximizados (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008; Nikolaidis *et al.*, 2012; Radak *et al.*, 2013).

A estimulação da biogénese mitocondrial e das defesas antioxidantes são as principais alterações adaptativas que ocorrem no músculo esquelético submetido a algum tipo de exercício físico. Nas células musculares, a captação de glicose e a sensibilidade à insulina assim como a força da contração são também outras das vias intracelulares alteradas face ao exercício físico. (Steinbacher e Eckl, 2015; Mason *et al.*, 2016).

A evidência recolhida nas últimas décadas é consistente no que concerne à observação de alterações no sistema de defesa antioxidante muscular, como resposta à prática de exercício físico. Porém, dependendo do exercício físico prescrito, estas alterações podem induzir uma estimulação ou uma depleção destas defesas. Por norma, a prática de exercício de intensidade moderada e de forma crónica, ou seja, o treino, é associada à estimulação (Liu *et al.*, 2000; Berzosa *et al.*, 2011; Radak *et al.*, 2013).

Os estudos realizados de forma a avaliar a biogénese mitocondrial ao nível do músculo esquelético são, na sua maioria, concordantes quanto ao aumento do teor mitocondrial. Tal como ocorre na estimulação das defesas antioxidantes, este aumento está associado à prática de exercício de forma crónica e moderada. Estas alterações são acompanhadas por uma melhoria da função mitocondrial associada à expressão de determinadas proteínas e enzimas mitocondriais (Baar, 2004; Seo *et al.*, 2016).

Atualmente, tem-se considerado mais interessante avaliar a capacidade respiratória mitocondrial do que a biogénese mitocondrial. No entanto, os estudos realizados nesta área

são relativamente poucos e, aqueles que existem, não permitem chegar a uma conclusão, pois, mais uma vez, os protocolos de exercício aplicados são muito variados e não permitem efetuar comparações (Bishop *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2016).

1.2.2.2.1. Fatores de dependência do processo adaptativo

Apesar do processo de adaptação descrito parecer simples, existem uma série de parâmetros dos quais este processo é diretamente dependente. A capacidade física, a idade e o estilo de vida dos indivíduos, são fatores adicionais que têm que ser tidos sempre em conta quando se fala num processo de adaptação mediado por estas espécies reativas produzidas durante o exercício (Nikolaidis *et al.*, 2012; Steinbacher e Eckl, 2015).

Para um indivíduo treinado, as quantidades de ROS necessárias para desencadear uma resposta positiva por parte do organismo terão que ser superiores às quantidades de ROS necessárias para provocar uma resposta igual num indivíduo não treinado, como é mostrado na figura 6. Logo, um indivíduo treinado beneficiará mais de um exercício de maior intensidade. Pelo contrário, este mesmo tipo de exercício num indivíduo não treinado poderá causar diversos danos oxidativos (Steinbacher e Eckl, 2015; He *et al.*, 2016).

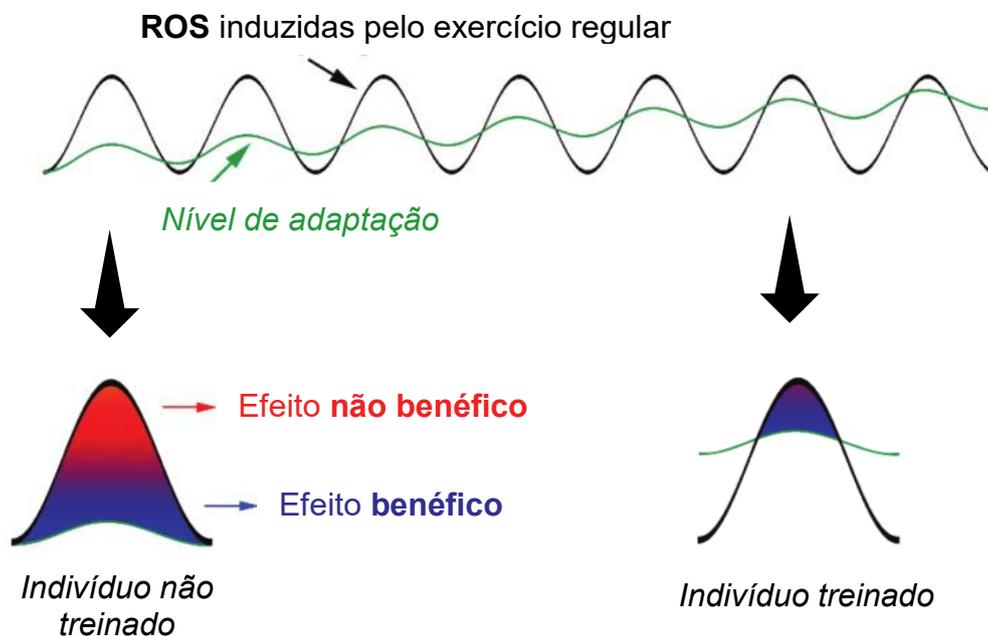


Figura 6 - Stresse oxidativo em indivíduos treinados e não treinados. Indivíduos treinados, ou seja, adaptados ao exercício físico parecem beneficiar de protocolos de exercício de maior intensidade, contrariamente aos indivíduos não treinados (adaptado de Steinbacher and Eckl, (2015)).

A idade do indivíduo também influencia os mecanismos de adaptação e a resposta que é obtida. O processo de envelhecimento está associado à existência de estados de stresse oxidativo, assim como a prática de exercício. Desta forma, é de esperar que o mesmo plano de exercício praticado por um indivíduo jovem ou por um indivíduo de idade avançada não resulte nos mesmos benefícios, uma vez que o indivíduo de maior idade estará sujeito a maior stresse oxidativo. Como a intensidade máxima do exercício que cada indivíduo é capaz de executar vai diminuindo com a idade, é de esperar que aumente a dificuldade em realizar o exercício com o aumento desta. Assim, podem existir diferenças no desencadeamento nos mecanismos de adaptação que serão dependentes da idade (Ji, 2006; Goto *et al.*, 2007).

A grande maioria, se não quase a totalidade, dos trabalhos desenvolvidos neste campo foram realizados ao nível do músculo esquelético, pelo que a literatura incide essencialmente sobre este tecido. Estudos da mesma natureza, mas ao nível de outros órgãos, são escassos. No entanto, o exercício é uma atividade de natureza multifacetada e, de forma a serem garantidos os elevados níveis de energia requeridos pelo músculo esquelético, é necessário o envolvimento de uma série de sistemas de órgãos, de maneira a cumprir as necessidades exigidas durante esta prática. Desta forma, o ambiente de stresse criado durante a atividade física parece afetar uma série de órgãos e alterar a sua homeostase destes. Assim é levantada a questão se as alterações provocadas nestes órgãos poderão induzir alterações no estado redox da célula e desencadear processos adaptativos semelhantes aos que ocorrem no músculo (Powers *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 2016).

1.3. Fígado

O fígado é um órgão vital sendo considerado o maior órgão metabólico nos mamíferos. Um das suas principais funções metabólicas são a regulação do metabolismo da glicose e dos lípidos e, para além disto, possui ainda um papel importante no metabolismo dos aminoácidos, sendo o responsável pela síntese de algumas proteínas essenciais, como é o caso da albumina. O metabolismo e destoxificação de xenobióticos é também uma das principais funções do fígado (Sheedfar *et al.*, 2013; Chiang, 2014; Rui, 2014).

Desta forma, tendo em conta todas as funções vitais deste órgão, o seu metabolismo tem que ser extremamente controlado pelo que qualquer falha neste controlo pode ser o primeiro passo para o desenvolvimento de algumas doenças hepáticas (Rui, 2014).

1.3.1. Fígado e exercício físico

Uma resposta por parte do fígado é necessária para que se possam cumprir as necessidades metabólicas requeridas pelo exercício. A mobilização de reservas de energia, presentes ao nível do fígado sob a forma de glicogénio é de extrema importância para que o músculo obtenha a energia exigida pela prática de exercício. Esta adequada mobilização de reservas energéticas garante que a prática de exercício não seja acompanhada por uma hipoglicemia, resultante do consumo elevado de glicose a nível muscular (Trefts *et al.*, 2015; Pillon Barcelos *et al.*, 2017).

É no fígado que existem as maiores reservas de glicogénio. Quando há um esgotamento destas reservas a nível muscular, ocorre a mobilização hepática de glicogénio como resposta aos níveis baixos de glicose no sangue (figura 7). Esta mobilização funciona como força motriz para que ocorra a reposição do glicogénio hepático (Trefts *et al.*, 2015).

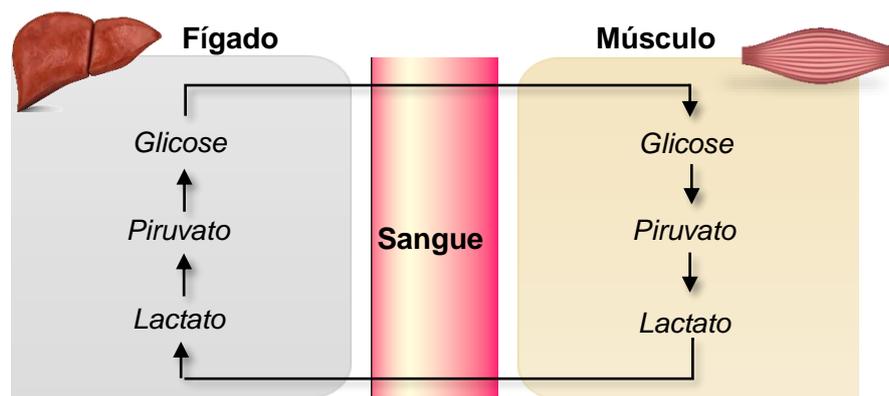


Figura 7 - Ciclo de Cori. O lactato produzido a nível muscular é convertido em glicose pelo fígado (gliconeogénese), de forma a garantir a reposição das reservas de glicogénio hepáticas mobilizadas durante a prática de exercício (adaptado de Berg *et al.*, (2012)).

A intensidade do exercício é o parâmetro do qual depende a mobilização das reservas de glicogénio. Intensidades moderadas a altas parecem estimular o processo de mobilização do glicogénio hepático fazendo com que a energia requerida para a prática de exercício provenha maioritariamente desta molécula (Mallo Ferrer, 2018).

Desta forma, tendo em conta o papel central que o fígado desempenha no fornecimento de energia ao músculo esquelético, será de esperar que este seja um dos órgãos mais suscetíveis à adaptação (Ascensão *et al.*, 2013; Pillon Barcelos *et al.*, 2017).

1.3.1.1. Mecanismos adaptativos hepáticos ao exercício físico

O'Neill e colaboradores (1996) realizaram o primeiro estudo onde mostraram que a contração do músculo esquelético parecia influenciar o estado de oxidação de outros órgãos assim como de alguns componentes sanguíneos. A influência destes estados ao nível dos diferentes órgãos dependerá de fatores como o consumo de oxigénio e a capacidade de ativação do sistema antioxidante de cada órgão (Okudan e Belviranlı, 2016).

Em teoria, seria expectável que o fígado sofresse uma adaptação ao nível da defesa antioxidante, assim como ao nível da função mitocondrial, semelhante àquela que ocorre no músculo esquelético, e que respondesse de forma semelhante aos diferentes parâmetros do exercício (Ascensão *et al.*, 2013).

Uma das principais alterações adaptativas que ocorre ao nível do músculo esquelético é a estimulação da defesa antioxidante, sendo esta alteração mediada pelos estados de stresse oxidativo resultantes da atividade física. Estudos que têm como objetivo a avaliação do comportamento deste tipo de defesa face a situações de exercício físico ao nível hepático são escassos e, aqueles que existem, não permitem chegar a uma conclusão de qual a resposta que as ROS aí provocam (Hoene e Weigert, 2010; Mason *et al.*, 2016; Pillon Barcelos *et al.*, 2017).

Para além da suposta estimulação das defesas antioxidantes hepáticas, este tipo de exercício também parece provocar alterações adaptativas a nível mitocondrial, tal como ocorre a nível do músculo esquelético. Alterações em parâmetros moleculares e funcionais na dinâmica mitocondrial, na biogénese mitocondrial, nas vias de sinalização apoptóticas, na capacidade de oxidação de lípidos e no sistema antioxidante mitocondrial são algumas das alterações mitocondriais hepáticas relevantes que parecem ocorrer aquando da atividade física. No entanto, contrariamente ao que ocorre ao nível do músculo esquelético, estas alterações não parecem ser dependentes de um aumento da biogénese mitocondrial. Assim, as adaptações que ocorrem no fígado parecem incidir maioritariamente a nível da funcionalidade mitocondrial e não no teor de mitocôndrias (Ascensão *et al.*, 2013; Fletcher *et al.*, 2014; Santos-Alves *et al.*, 2015).

Apesar de estar comprovado que o exercício leva a uma alteração do fenótipo mitocondrial hepático, há pouca informação acerca da forma como são alterados os diferentes mecanismos bioquímicos mitocondriais (Santos-Alves *et al.*, 2014, 2015).

Tendo em conta que as alterações hepáticas provocadas pelo exercício resultam num fenótipo em parte semelhante ao que se observa no músculo, é de prever que serão as mesmas vias sensíveis ao estado redox celular que serão estimuladas pelas ROS resultantes do exercício

físico, de forma a desenvolver as respostas adaptativas. Assim, apesar de todas as inconsistências encontradas nos diferentes estudos realizados, o processo de adaptação baseado no princípio de *hormesis* parece ser adequado para explicar a adaptação hepática observada face ao treino (Pillon Barcelos *et al.*, 2017).

Para além de todas as considerações apresentadas deve ser tido em conta, que o fígado é apontado como um dos principais órgãos onde a formação de ROS mais ocorre durante a prática de exercício, como consequência das alterações metabólicas induzidas por esta atividade. As mitocôndrias hepáticas, segundo alguns estudos, são as principais responsáveis por este aumento de produção de ROS, no fígado. No entanto, apesar desta informação, na literatura parece não existir praticamente nenhuma indicação de qual será a função dessas espécies reativas, desta forma não se sabe se apenas levarão à ocorrência de dano oxidativo ou estarão envolvidas na estimulação dos mecanismos redox que estão na base da adaptação ao exercício (Radak *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2016; Okudan e Belviranlı, 2016).

Apesar diferentes dos estudos já realizados apresentarem resultados muito diferentes, podemos afirmar que o exercício físico parece tornar a mitocôndria mais resistente a estímulos negativos, como desordens associadas à obesidade e à destoxificação de xenobióticos, sendo por isto, aparentemente, uma prática necessária para um melhor funcionamento da mitocôndria (Santos-Alves *et al.*, 2015).

1.3.2. Doenças hepáticas e envelhecimento

Devido ao papel essencial que o fígado tem no organismo é razoável assumir que este órgão seja particularmente suscetível ao processo de envelhecimento. Apesar deste processo não ser totalmente conhecido, ao nível hepático, os diferentes estudos realizados na área mostram que as principais alterações são a perda de volume do órgão, podendo esta ir de 20% a 40% do volume total e a diminuição do fluxo sanguíneo. Para além destas alterações, é ainda observado uma diminuição da função e do teor mitocondrial, assim como uma possível perda da capacidade antioxidante. Isto leva à existência de estados de stresse oxidativo, que podem estar na base da existência de danos oxidativos (Sheedfar *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015; Okudan e Belviranlı, 2016).

Estas alterações a nível molecular levam a que haja uma perda geral da função hepática. A capacidade de destoxificação e de regeneração são algumas das funções que parecem ficar diretamente afetadas. Para além disto, algumas alterações não hepáticas que ocorrem com o

aumento da idade podem influenciar a patogênese do fígado (Schmucker, 2005; Kim *et al.*, 2015).

O stresse oxidativo é associado à iniciação e ao desenvolvimento de algumas das patologias hepáticas (figura 8). Apesar do fígado possuir um forte sistema antioxidante, o facto de ser um órgão com uma atividade metabólica muito elevada faz com que este seja um alvo das ROS resultantes do próprio metabolismo aeróbio. Para além disto, a diminuição da eficiência do sistema antioxidante que ocorre com o envelhecimento, faz com que o fígado fique mais suscetível a este dano (Sheedfar *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015).

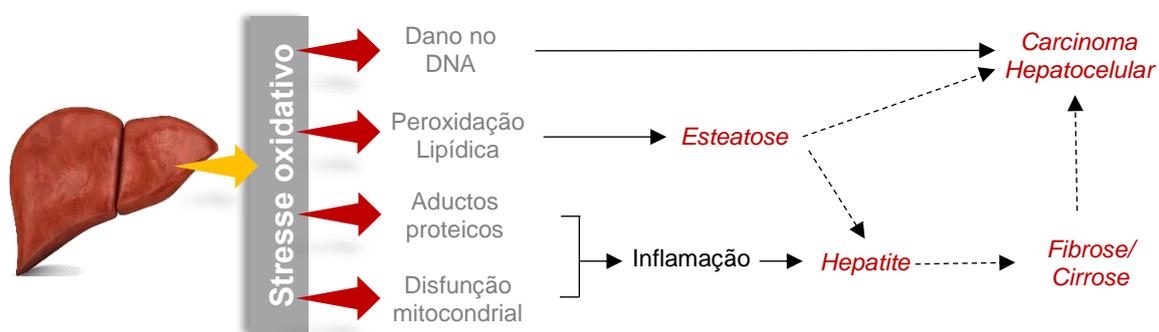


Figura 8 - Stresse oxidativo e doença hepática. Mecanismos gerais pelos quais os estados de stresse oxidativo persistentes, provocados por fatores endógenos ou exógenos, estão envolvidos no desenvolvimento de algumas das patologias do fígado (adaptado de Li *et al.*, (2015)).

As doenças crónicas do fígado representam um sério e negligenciado problema de saúde pública, uma vez que são consideradas doenças silenciosas e o aparecimento de sintomas é tardio. Estima-se que cerca de 844 milhões de pessoas a nível mundial sofra deste tipo de patologia. Contrariamente a outros tipos de doenças crónicas a prevenção é possível e, quando detetadas atempadamente, podem até mesmo ser tratadas e curadas (Marcellin e Kutala, 2018).

Estes tipos de patologias são precedidos de doenças metabólicas que podem ser tratadas, evitando o desenvolvimento de uma doença crónica, em que a esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) faz parte desse conjunto de patologias. Esta é a principal doença hepática que parece ocorrer maioritariamente em indivíduos mais velhos devido a alterações metabólicas resultantes do processo de envelhecimento. É uma das patologias mais recorrentes a nível mundial, atingindo cerca de 25% da população mundial (Kim *et al.*, 2015; Marcellin e Kutala, 2018).

A NAFLD é caracterizada por uma acumulação de lípidos no fígado. A mitocôndria hepática é estrutural e molecularmente modificada devido ao aumento do teor lipídico hepático. Os ácidos gordos acumulados parecem levar a alterações a nível da oxidação destas moléculas,

da indução do TCA e ao nível da fosforilação oxidativa (Sheedfar *et al.*, 2013; Simões *et al.*, 2018).

As alterações mitocondriais referidas acabam por levar a estados de stresse oxidativo que estão na base dos processos inflamatórios, que podem levar ao desenvolvimento de doenças crónicas do fígado (Sheedfar *et al.*, 2013; Marcellin e Kutala, 2018; Simões *et al.*, 2018).

Tendo em conta a percentagem de incidência a nível mundial desta e de outras doenças semelhantes, a prevenção e tratamento será o principal passo para resolver este grave problema de saúde mundial. No entanto, atualmente, para a NAFLD, não existe qualquer tipo de tratamento farmacológico. Alterações no estilo de vida parecem ter efeitos benéficos ao nível desta patologia. O exercício físico é uma das alterações que parece levar a uma melhoria da função hepática o que fez despertar o interesse nesta prática como um tratamento possível para esta patologia (Hashida *et al.*, 2017).

1.3.2.1 Exercício físico e prevenção de doença hepática

Devido ao papel crucial que o stresse oxidativo parece ter nas hepatopatias, é razoável assumir que os antioxidantes sejam uma estratégia racional para o tratamento e prevenção das patologias deste órgão. No entanto, os resultados obtidos até à data são controversos e inconclusivos (Cichoż-Lach e Halina, 2014; Li *et al.*, 2015).

O exercício físico tem mostrado efeitos terapêuticos interessantes em algumas patologias hepáticas (ex. NAFLD) sendo, em alguns casos, a primeira linha de terapia. Para além da modulação da atividade mitocondrial e da defesa antioxidante que esta prática aparenta induzir, a diminuição do teor lipídico hepático, sendo este efeito uma das alterações mais notáveis da prática de exercício físico (Boström *et al.*, 2013; Hashida *et al.*, 2017).

Atualmente, apesar de não estarem definidos os parâmetros do exercício que levam a uma inibição da perda da função hepática decorrente da idade, o exercício aeróbio praticado de forma crónica e com intensidade moderada é aquele que parece provocar a melhor adaptação hepática a esta atividade, tal como já foi referido. Esta adaptação leva à melhoria da função mitocondrial. Alterações ao nível deste organelo parecem ser o ponto de partida para o aparecimento de algumas doenças. Assim, é razoável assumir que será o tipo de treino referido que poderá estar associado à prevenção de algumas doenças hepáticas (Ascensão *et al.*, 2013; Medrano *et al.*, 2018).

No caso da NAFLD, a intensidade parece ser o parâmetro que tem maior efeito terapêutico. O treino de intensidade moderada parece provocar efeitos positivos na prevenção

desta patologia, o que vai de encontro às recomendações da OMS. No entanto, parece não existir concordância quanto ao exercício, aeróbio ou anaeróbio, que terá mais benéficos para esta patologia (Hashida *et al.*, 2017; Medrano *et al.*, 2018). É de notar que os resultados obtidos irão depender do indivíduo em questão, pois existe uma série de fatores, já referidos, que levam a que os benefícios obtidos sejam diferentes de pessoa para pessoa, o que justifica, em parte, as diferenças observadas nos diferentes estudos (Steinbacher e Eckl, 2015).

Capítulo II

Objetivos

II. Objetivo

Este trabalho tem como principal objetivo a avaliação do efeito de um plano de exercício na função antioxidante e mitocondrial hepática de animais que praticaram exercício até uma idade jovem (32 semanas) e até à meia idade (62 semanas), de forma a avaliar se este é eficiente no retardamento e prevenção das consequências associadas ao processo de envelhecimento, e assim funcionar como uma forma preventiva de possíveis doenças hepáticas.

O plano de exercício foi elaborado de forma a permitir avaliar qual o efeito da prática desta atividade durante a vida e qual o impacto que o tempo de treino poderá ter no desenvolvimento de mecanismos adaptativos, a nível hepático. O facto de se variar apenas um parametro do exercício físico, ou seja, o tempo de treino, permite avaliar a influência direta deste no comportamento hepático face ao treino.

De forma a responder a estas questões, este trabalho dividir-se-á em 3 pontos principais:

1. **Avaliação da função hepática geral em resposta ao fator idade e ao fator exercício físico**, analisando alguns marcadores bioquímicos, indicadores da função hepática, a nível sérico (colesterol total, albumina, triacilgliceróis e alanina-aminotransferase (ALT));
2. **Avaliação da função antioxidante hepática em resposta ao fator idade e ao fator exercício físico**, através da análise de alguns marcadores do stresse oxidativo, como a determinação da atividade das principais enzimas pertencentes ao sistema de defesa antioxidante: SOD, CAT, GR, GPx e GST, assim como a razão entre glutathiona reduzida e oxidada. Para além disto será ainda analisada a peroxidação lipídica.
3. **Avaliação da função mitocondrial hepática em resposta ao fator idade e ao fator exercício**. Para tal serão avaliadas as atividades enzimáticas do complexo I, II e IV pertencentes à CTE. Será ainda avaliada a atividade enzimática da citrato sintase, um marcador da massa mitocondrial. Por final, proceder-se-á à análise da velocidade da respiração mitocondrial, em estado 4, com recurso a substratos e inibidores de dois complexos mitocondriais (Complexo I e II).

Capítulo III

Materiais e Métodos

III. Materiais e Métodos

3.1 Amostragem

Foram utilizados 28 ratos do sexo masculino pertencentes à espécie *Rattus norvegicus* da estirpe Wistar Unilever. Os animais chegaram ao Biotério da UTAD com 4 semanas de idade, e foram aí mantidos durante todo o ensaio experimental, com condições controladas de temperatura e humidade relativa, com ciclo de 12h de dia/noite. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas legislativas Portuguesas e Europeias em vigor (Diretiva 2010/63/EU). O alojamento foi realizado em gaiolas (5 animais por gaiola), com cama e enriquecimento ambiental. A comida e a água foram disponibilizadas *ad libitum*. À chegada dos animais ao biotério, estes foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: não exercitados e exercitados durante 24 ou 54 semanas.

O plano de exercício iniciou-se às 8 semanas de idade (os animais começaram a correr no dia 11 de outubro de 2016). O plano consistia em corrida num *treadmill* (*Treadmill Control LE 8710*, Harvard Apparatus, USA) durante 60 minutos/dia, 5 dias/semana, a 70% da velocidade máxima de corrida. Durante o programa de exercício, a velocidade de corrida foi ajustada com base num teste de determinação de velocidade máxima realizado a cada 6 semanas. Nas primeiras duas semanas de treino, a intensidade e a duração do exercício foram aumentadas progressivamente até atingir a duração e intensidade definida. Para incentivar os animais a manterem a velocidade de corrida foi colocada uma plataforma de choque no início de cada uma das pistas de *treadmill*.

De forma a que os animais não exercitados estivessem sujeitos ao mesmo stresse associado ao “handling” dos animais exercitados, estes foram regularmente colocados num *treadmill* durante uns minutos.

Os animais foram sacrificados por sedação através de uma administração, via intraperitoneal, de uma *overdose* de ketamina (*Imalgene® 1000*, Merial S.A.S., Lyon, França) e xilazina (*Rompum® 2%*, Bayer Healthcare S.A., Kiel, Alemanha), procedendo-se de seguida à exsanguinação dos animais por punção cardíaca, sendo este um método indicado pela FELASA (*Federation for Laboratory Animal Science Associations*). O sacrifício dos animais ocorreu em 2 momentos temporais distintos: 24 semanas depois do início do protocolo de exercício (19 de abril de 2017); 54 semanas depois do início do protocolo de exercício (19 de outubro de 2017). Os momentos temporais dos sacrifícios correspondem a duas fases distintas do desenvolvimento dos animais de forma a observar os efeitos do exercício em ambas as fases da vida deste. No primeiro sacrifício os animais tinham 32 semanas de idade, sendo

considerados animais jovens. Por sua vez, no segundo sacrifício os animais tinham 62 semanas de idade, sendo considerados animais de meia idade. Os animais exercitados não praticaram qualquer exercício nos 2 dias anteriores ao sacrifício.

Neste estudo foram utilizadas amostras de fígado recolhidas dos 28 animais (n=7) pertencentes aos 4 grupos experimentais diferentes: **Grupo NEX 24** (não exercitados jovens, sacrifício às 24 semanas de exercício); **Grupo EX 24** (exercitados até à idade jovem, sacrifício às 24 semanas de exercício); **Grupo NEX 54** (não exercitados meia-idade, sacrifício às 54 semanas de exercício); **Grupo EX 54** (exercitados até à meia-idade, sacrifício às 54 semanas de exercício). As amostras, depois de recolhidas, foram divididas em 2 partes e mantidas a -80°C.

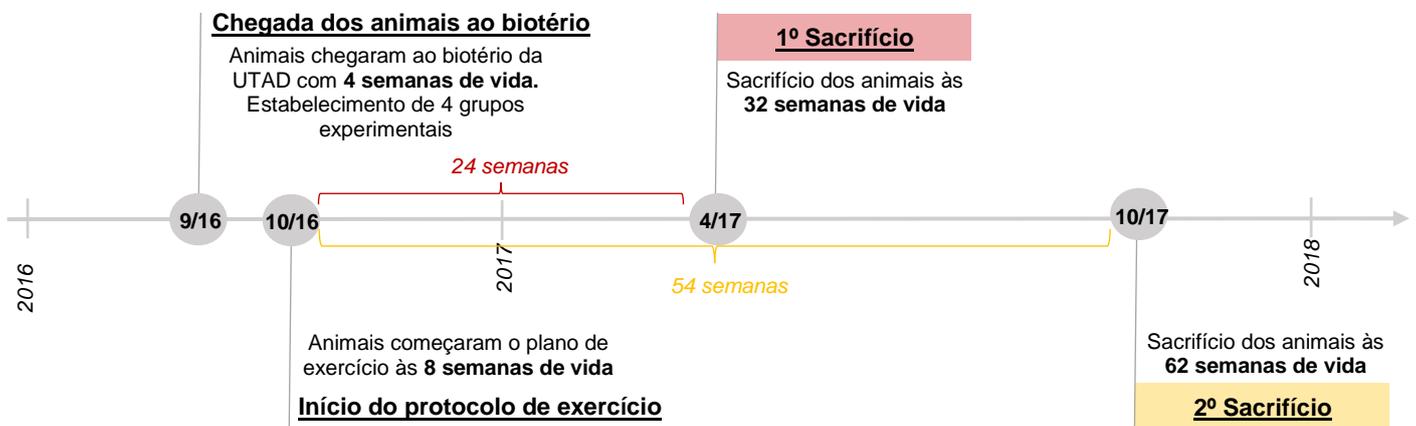


Figura 9 – Delineamento experimental - Cronograma da aplicação do protocolo experimental aos animais a avaliar. Aos grupos experimentais **NEX 24** e **EX 24** pertencem os animais sacrificados em abril de 2017, no 1º sacrifício, **24 semanas** depois do início do protocolo de exercício físico. Aos grupos experimentais **NEX 54** e **EX 54** pertencem os animais sacrificados em outubro de 2017, no 2º sacrifício, **54 semanas** depois do início do protocolo de exercício físico.

3.2 Avaliação de biomarcadores da função hepática

Para a avaliação da função geral hepática foram realizados testes ao soro dos animais onde foi determinada a atividade da alanina aminotransferase (ALT), assim com a concentração sérica de triacilgliceróis, colesterol total e albumina. Esta avaliação foi realizada por procedimentos de padrão automatizados e foram realizados na Universidade de Fernando Pessoa, Porto, Portugal.

3.3 Avaliação da função antioxidante hepática

3.3.1 Homogeneização do material biológico

Para preparação dos homogeneizados de fígado, as amostras foram descongeladas sendo de seguida pesadas e lavadas. Foram depois transferidas para copos, onde foi adicionado 20% (m/v) de tampão de homogeneização (50 mM KH_2PO_4 , pH=7,0).

As amostras foram cortadas com a ajuda de uma tesoura de forma a facilitar a homogeneização e, de seguida, transferidas para um *Potter-Elvehjem* onde foram homogeneizadas num homogeneizador mecânico Eurostar Power-B a 500 rotações/minuto com o objetivo de lisar e libertar todo o conteúdo celular.

O homogeneizado foi sujeito a uma sonda ultrassons (SONICS VibraCell™) durante 2 minutos (pulsos de 20 segundos ultrassons/10 segundos pausa). O conteúdo foi depois transferido para tubos de centrífuga e procedeu-se a uma centrifugação a 1500g, a 4°C, durante 10 minutos numa centrífuga Sigma 2-16K. O sobrenadante resultante foi transferido para novos tubos e estes foram centrifugados a 8000g, a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante obtido foi novamente centrifugado, a 14 000g durante 15 minutos.

O sobrenadante obtido nestas últimas centrifugações foi transferido para *ependorfs*, tendo-se realizado a avaliação da atividade de algumas enzimas como a SOD, CAT, GST, GR e GPx e também do teor em tióis não proteicos.

Os precipitados resultantes tanto da 2ª como da 3ª centrifugação, correspondentes à fração mitocondrial, foram juntos e ressuspensos em tampão de homogeneização sendo guardados em *ependorfs* a -20°C. O precipitado resultante da 1ª centrifugação sofreu o mesmo tratamento, sendo este correspondente à fração total. Ambos os precipitados foram utilizados para avaliação da peroxidação lipídica.

3.3.2 Quantificação Proteína

A quantidade de proteína, quer do sobrenadante quer dos precipitados, foi estimada utilizando o método colorimétrico do Biureto, descrito por Gornall (1949). Para tal foram preparados padrões de BSA, em tubos de vidro, de maneira a construir uma curva de calibração. Os padrões compreendiam concentrações de 0; 0,4; 0,8; 1,6; 2,4 mg de BSA (0,4%). A cada padrão foram ainda adicionados 100 µL de SDS (10%), reagente de Biureto (2000 µL) e água ultrapura de maneira a perfazer um volume total de 4 mL. As amostras sofreram um tratamento

semelhante, tendo para o efeito sido utilizados 20 μL de sobrenadante e de precipitado, em substituição da BSA.

Posteriormente, os tubos foram colocados num banho de água morna durante 15 minutos, e as absorvâncias dos padrões e das amostras foram lidas num espectrofotómetro UV-Vis (Varian Cary 50), a 540 nm.

3.3.3 Atividades enzimáticas

3.3.3.1. Superóxido Dismutase

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi avaliada segundo o método descrito por Payá (1992). Para tal foi necessário a oxidação da hipoxantina a xantina e posteriormente a ácido úrico, através da ação da xantina oxidase, havendo assim a produção do ião superóxido (O_2^-). Este foi detetado através da utilização de um cromóforo, o cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT).

O meio de reação é constituído por tampão fosfato (50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA pH =7,4), 10 μL de hipoxantina (10 mM) e 10 μL de NBT (10 mM). Esta mistura foi incubada durante 2 minutos a 30°C, e faltando 20 segundos para o término deste tempo foram adicionados 10 μL de xantina oxidase (10% (v/v), agitando-se a cuvete de seguida. A cinética enzimática foi acompanhada espectrofotometricamente (Varian Cary 50) a 560 nm, durante 1 minuto, de forma a obter-se o valor do branco. De seguida foi adicionada à mistura um volume de amostra correspondente a 0,375 mg de proteína e a reação foi acompanhada durante mais 2 minutos. O volume final da reação foi de 1 mL.

Os resultados foram expressos em $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína, onde uma unidade de atividade da SOD (1U) é definida como a quantidade da SOD que inibe 50% da redução do NBT a *formazan*.

3.3.3.2. Catalase

A atividade enzimática da Catalase (EC 1.11.1.6) foi avaliada num elétrodo de oxigénio do tipo Clark que permitiu a observação da produção de O_2 , resultante da degradação do peróxido de hidrogénio (H_2O_2), seguindo o método descrito por Ríó (1977).

O meio de reação é constituído por tampão fosfato (50 mM KH_2PO_4 , pH=7,0) e 17 μL de H_2O_2 10 vezes diluído (30% (m/v), 8,82 M). A mistura foi incubada na câmara a 30°C, durante cerca de 1 minuto. Decorrido este tempo, foi adicionado um volume de amostra

correspondente a 0,375 mg de proteína (amostra diluída 200 vezes), de forma ao volume final ser de 1 mL. A evolução da reação foi acompanhada durante cerca de 2 minutos.

Os resultados foram expressos em $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.3.3.3. Glutathione Peroxidase

A atividade da GPx (EC 1.11.1.9) foi determinada segundo o método descrito por Mannervik (1985). Este método baseia-se na avaliação da quantidade de NADPH que é consumido.

O meio da reação é constituído por tampão fosfato (100 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, $\text{pH}=7$), um volume de amostra correspondente a 0,375 mg de proteína, 10 μL GSH (100 mM) e 5 μL de GR (glutathione reductase). Esta mistura foi incubada durante 2 minutos a 30°C , e 30 segundos antes do término da incubação foram adicionados 10 μL NADPH (10 mM). A cinética foi acompanhada espectralmente (Variana Cary 50) a 340 nm, durante 3 minutos depois de terem sido adicionados 20 μL de *tert*-butil-hidroperóxido (10% (v/v); 7,7 M). O volume final da mistura reacional é de 1 mL.

A atividade enzimática foi expressa em μM de NADPH oxidado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, utilizando-se para tal o coeficiente de extinção molar do NADPH de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.3.4. Glutathione Reductase

A atividade da GR (EC 1.6.4.2) foi avaliada espectralmente (Varian Cary 50), a 340 nm, pelo método descrito por Carlberg e Mannervik (1985).

O meio reacional é constituído por tampão fosfato (100 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM EDTA, $\text{pH}=7,4$) e um volume de amostra correspondente a 1,5 mg de proteína. Esta mistura foi incubada durante 2 minutos a 30°C , e 30 segundos antes do término da incubação foram adicionados 20 μL NADPH (10 mM). Depois do término do tempo de incubação, foram adicionados 20 μL de GSSG (100 mM), e a cinética da reação foi acompanhada durante 3 minutos. O volume final da reação é de 2 mL.

Os resultados foram expressos em μM de NADPH oxidado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, utilizando-se para tal o coeficiente de extinção molar do NADPH de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.3.5. Glutathione S-Transferase

A atividade da GST (EC 2.5.1.18) foi determinada espectrofotometricamente pelo método descrito por Hatton (1996). O meio de reação é constituído por tampão fosfato (100 mM KH_2PO_4 , pH=7), 20 μL de CDNB (100 mM) e um volume de amostra correspondente a 0,375 mg de proteína. O volume final reacional é de 2 mL.

A mistura reacional é incubada durante 2 minutos a 30°C, e 30 segundos depois do término deste tempo a reação é iniciada com a adição de 30 μL de GSH (100 mM) à mistura. A cinética da reação foi acompanhada durante 2 minutos num espectrofotómetro UV/Vis (Varian Cary 50) a 340 nm.

Os resultados foram expressos em mM de CDNB conjugado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína, recorrendo-se para tal ao coeficiente de extinção molar do CDNB de $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.4 Determinação da peroxidação lipídica – Método de TBARS

A peroxidação lipídica foi avaliada com base no método descrito por Ottolenghi (1958). Este método baseia-se na deteção de produtos da peroxidação lipídica que são reativos ao ácido tiobarbitúrico. O malondialdeído (MDA) é um dos produtos maioritários resultantes da peroxidação lipídica e, tipicamente, estes resultados são expressos em função deste marcador.

O meio de reação é constituído por um volume de amostra correspondente a 0,5 mg de proteína, 1 mL de reagente TBARS (0,38% TBA (m/v), 37,5% TCA (v/v) e 0,015% BHT (m/v)) e tampão Tris-HCl (10 mM) em KCl (175 mM), de maneira a perfazer um volume final de 1,5 mL. Após agitação, os tubos contendo a mistura reacional, tapados com esferas de vidro, foram colocados num banho de água a 100°C durante 15 minutos. Ao fim deste tempo foram arrefecidos por imersão em gelo. O conteúdo dos tubos foi centrifugado a 3000 rpm numa centrífuga Hettich EBA 8S, durante 10 minutos. De cada tubo foram retirados 1000 μL para uma cuvete e foi medida a absorvância num espectrofotómetro Varian Cary 50 a 530 nm.

Os resultados foram expressos em $\mu\text{M MDA}.\text{mg}^{-1}$ proteína, tendo-se recorrido para tal ao coeficiente de extinção molar do MDA de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.5 Determinação do conteúdo em GSH e GSSG

A determinação do teor em GSH e GSSG foi realizada pelo método descrito por Hissin e Hilf (1976), por fluorimetria. Este método baseia-se na reação de grupos tiol (-SH) com o o-ftaldeído (OPT).

Para quantificação do GSH o meio reacional é constituído por 25 μL de amostra e um volume de tampão fosfato (100 mM KH_2PO_4 , 5 mM EDTA, pH=8) de maneira a perfazer o volume de 2300 μL . Foram adicionados 200 μL de OPT (1mg/mL) a cada mistura, tendo sido esta agitada e incubada no escuro durante 15 minutos. Decorrido este tempo, procedeu-se à leitura da intensidade num fluorímetro (Varian Cary Eclipse) usando a emissão a 426 nm, com excitação a 339 nm.

A quantidade de GSH foi calculada utilizando uma curva de calibração que sofreu o mesmo tratamento que a amostra (anexo A). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M GSH.mg}^{-1}$ de proteína.

Para quantificação do GSSG o meio da reação continha 25 μL de amostra e um volume de NaOH (100 mM) de forma a completar o volume de 100 μL . De seguida, foram adicionados 40 μL de uma solução de *N*-etilmaleimida (NEM, 40 mM), sendo esta incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos. Decorrido este tempo, completou-se o volume de 2300 μL , utilizando-se para tal NaOH (100 mM). Foram seguidamente adicionados 200 μL de OPT (1 mg/mL), homogeneizou-se e incubou-se a mistura no escuro, durante 15 minutos. Decorrido este tempo, procedeu-se à leitura da intensidade num fluorímetro (Varian Cary Eclipse) usando a emissão a 426 nm, com excitação a 339 nm, tal como foi realizado na quantificação do GSH.

O teor de GSSG foi determinado utilizando uma curva de calibração (anexo B). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M GSSG.mg}^{-1}$ de proteína.

3.4 Avaliação da função mitocondrial hepática

3.4.1 Atividades dos complexos mitocondriais e conteúdo mitocondrial

3.4.1.1 Obtenção da fração mitocondrial

Para obtenção das frações mitocondriais do material biológico, os fígados foram previamente descongelados e pesados, sendo de seguida transferidos para copos de vidro onde foi adicionado 10% (m/v) de tampão de homogeneização (Sacarose 200 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH=7,6).

As amostras foram cortadas com o auxílio de uma tesoura de forma a facilitar o processo de homogeneização, sendo transferidas para um *Potter-Elvehjem* e homogeneizadas num homogeneizador mecânico Eurostar Power-B a 300 rotações/minuto. Este processo permite assim a lise e libertação de todo o conteúdo celular.

Os homogeneizados foram de seguida centrifugados a 800g durante 10 minutos a 4°C (Sigma 2-16K), sendo no final descartado o precipitado e o sobrenadante sujeito novamente a uma centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante resultante foi sujeito a uma centrifugação a 14000g, 10 minutos a 4°C, sendo descartado o sobrenadante obtido. O precipitado foi ressuspenso em 5 mL de tampão de homogeneização, com o auxílio de um pincel. Após este processo, centrifugou-se a mistura nas condições referidas anteriormente. O precipitado obtido nesta centrifugação final corresponde à fração mitocondrial e foi ressuspenso em 500 µL de tampão de homogeneização. Foi realizada a quantificação de proteína desta fração pelo método de Biureto, descrito previamente.

Antes da realização dos ensaios de avaliação da atividade dos complexos mitocondriais, as frações mitocondriais foram sujeitas a 3 ciclos de congelamento/descongelamento de maneira a facilitar o acesso dos diferentes substratos ao local ativo dos diferentes complexos enzimáticos a avaliar.

3.4.1.2 Citrato Sintase

A atividade da citrato sintase (EC 4.1.3.7), a 1ª enzima do ciclo de Krebs, foi avaliada espectralmente, a 412 nm, segundo o método descrito por Monteiro-Cardoso (2014). A cinética reacional foi acompanhada num leitor de microplacas (BioTek – PowerWave-XS2), recorrendo ao software Gen5, através da observação do aumento de absorvância correspondente à formação do TNB. Foram utilizadas microplacas de 96 poços, sendo o volume final em cada poço 200 µL.

O meio reacional é constituído por tampão Tris-HCl (200 mM pH=8,0), 2 µL de DTNB (1,01 mM), 2 µL de Triton X-100 (10% v/v), 20 µL de oxaloacetato (10 mM) e 6 µL de acetil-CoA (12,2 mM). A mistura foi incubada, durante 2 minutos, a 30°C.

A cinética reacional inicia-se com a adição de um volume de amostra correspondente a 0,0125 mg de proteína, sendo feita de seguida a leitura de absorvâncias durante 3 minutos.

Os resultados foram expressos em mM TNB.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína, sendo para tal utilizado o coeficiente de extinção molar do TNB de 1,36 x 10³ M⁻¹.cm⁻¹.

3.4.1.3 Complexo I

A atividade do complexo I, NADH desidrogenase (EC 1.6.99.3), foi determinada espectrofotometricamente, acompanhando a oxidação do NADH através da diminuição de absorvância, pelo método descrito por Kiebish (2008).

O meio reacional é constituído por tampão fosfato (KH_2PO_4 , 50 Mm, pH=7,5), 75 μL de BSA (50 mg/mL) e 1,5 μL de decilubiquinona (50 mM). De seguida é adicionado um volume correspondente a 0,2 mg de proteína da fração mitocondrial. O volume final da reação é de 1 mL.

A mistura foi de seguida incubada a 30°C durante 2 minutos, e 20 segundos antes do término do tempo de incubação foram adicionados 10 μL de NADH (10mM), sendo iniciada a leitura da absorvância. A cinética enzimática foi acompanhada espectrofotometricamente (Varian Cary 50) a 340 nm, durante 2 minutos.

Foi realizado ainda um ensaio com a mesma composição, apenas acrescentando 5 μL de rotenona (1mg/mL) antes da adição da fração mitocondrial, por forma a avaliar a atividade específica do complexo I.

Os resultados foram expressos em $\mu\text{M NADH oxidado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, utilizando-se para tal o coeficiente de extinção molar do NADH de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4.1.4 Complexo II

A atividade enzimática do complexo II, succinato desidrogenase (EC 1.3.5.1), foi avaliada espectrofotometricamente, através da diminuição da absorvância correspondente ao consumo do 2-clorofenol-indofenol (DCPIP) a 600 nm, segundo o método descrito por King (1967).

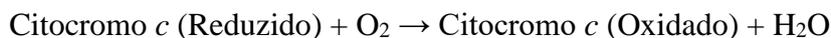
O meio reacional é constituído por tampão fosfato (KH_2PO_4 , 100 Mm, pH=7,5), 40 μL de BSA (50mg/mL), 2 μL de rotenona (1mg/mL), 10 μL de KCN (100 mM), 10 μL de ATP (10 mM), 20 μL de DCPIP (5 mM) e 20 μL de succinato (1M). É ainda adicionado um volume de fração mitocondrial correspondente a 0,2 mg proteína, sendo o volume final da reação de 1 mL.

A mistura foi incubada durante 2 minutos a 30°C, e aproximadamente 20 segundos antes do término deste período de tempo foram adicionados 2 μL de decilubiquinona (50 mM). A variação da absorvância foi acompanhada espectrofotometricamente durante 2 minutos.

Os resultados da cinética enzimática foram expressos em $\mu\text{M DCPIP oxidado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, sendo utilizado para tal o coeficiente de extinção molar do DCPIP de $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4.1.5 Complexo IV

A atividade enzimática do complexo IV, citocromo *c* oxidase (EC 1.9.3.1) foi determinada no espectrofotómetro Varian Cary 50, acompanhando a oxidação do citocromo *c*, representada na equação abaixo (não acertada), e que se traduz por uma diminuição de absorvância, a 550 nm, segundo o método descrito por Ellis (2005).



3.4.1.5.1 Preparação do citocromo *c* 100% reduzido

Para realização do ensaio foi necessária a redução total do citocromo *c*. Para tal foi preparada uma solução de citocromo *c* 100 μM em tampão fosfato (KH_2PO_4 50 mM pH=7,5). Foi retirado um 1 mL desta solução e medida a absorvância, num espectrofotómetro UV-Vis (Varian Cary 50) (o valor deve aproximar-se de 0,7). De maneira a obter o citocromo *c* 100% reduzido é adicionada uma quantidade q.b. de ditionito de sódio, à solução de citocromo *c* preparada, e procede-se novamente à medição da absorvância. O valor da absorvância para o citocromo *c* reduzido deve ser aproximadamente de 1,30, valor correspondente ao máximo de absorvância deste composto (anexo C).

3.4.1.5.2 Ensaio cinético

O ensaio cinético iniciou-se com a incubação do citocromo *c* 100% reduzido numa cuvete tapada com parafilme, durante 2 minutos a 30°C. Uns segundos antes do término deste tempo, adicionou-se um volume de fração mitocondrial correspondente a 0,05 mg de proteína. A mistura foi homogeneizada suavemente e de seguida procedeu-se à leitura da absorvância durante 2 minutos, a 550 nm. A mistura reacional tem um volume final de 1 mL

Os resultados foram expressos em $\mu\text{M citocromo } c \text{ oxidado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, utilizando-se para tal o coeficiente de extinção molar do citocromo *c* de $19 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4.2 Avaliação da capacidade respiratória mitocondrial

3.4.2.1 Preparação do material biológico

Para avaliação da capacidade respiratória mitocondrial, os fígados a utilizar foram retirados do congelador a -20°C e imediatamente cortados e pesados. O peso da amostra deve ser aproximadamente 50 mg.

De seguida, o material foi transferido para copos de vidro, aos quais foram adicionados 500 μL de meio respiratório (Manitol 220 mM, Sacarose 75 mM, EGTA 0,5 mM, MgCl_2 3mM, KH_2PO_4 10 mM, HEPES 10 mM, BSA 0,1% (p/v), pH 7,4), a 4°C . O tecido foi cortado de forma a facilitar a homogeneização. Seguidamente, foi adicionado um volume de meio respiratório correspondente a 0,2% (m/v), e a mistura foi transferida para um *Potter-Elvehjem*, onde foi homogeneizada num homogeneizador mecânico Eurostar Power-B a 300 rotações/minuto, por um curto período de tempo (10 cursos no máximo).

Depois de homogeneizadas, as amostras foram transferidas para tubos de Falcon e colocados em gelo. Previamente à realização de cada ensaio, os tubos contendo as amostras foram manualmente homogeneizados por inversões do tubo de forma a ressuspender todo o conteúdo celular.

3.4.2.2 Avaliação da velocidade respiratória mitocondrial hepática

A capacidade de respiração mitocondrial foi avaliada recorrendo a um respirómetro de alta resolução OROBOROS® Oxygraph –2 k. As velocidades de consumo de oxigénio, foram calculadas utilizando o software *DatLab 4 analysis* (versão 4.2.1.50, *Oroboros Instruments*).

O protocolo experimental iniciou-se com a adição de 2 mL de amostra às câmaras de incubação do aparelho. As amostras foram incubadas durante aproximadamente 15 minutos, a 30°C , de forma a ser medida a velocidade de respiração sem a adição de qualquer substrato ou inibidor.

Para avaliação da respiração mitocondrial foram adicionados, sequencialmente, os substratos e inibidores para os diferentes complexos mitocondriais em estudo: 5 μL piruvato/malato (0,8M/0,8M) para avaliação do complexo I e 5 μL succinato (1M) para avaliação do complexo II. A respiração foi inibida pela adição de 5 μL rotenona (0,2M), inibidor do complexo I, e adição de 2 μL KCN (1M), inibidor do complexo IV, e consequente inibidor do transporte de eletrões pela CTE. Cada ensaio durou, aproximadamente, 45 minutos (anexo D). Entre ensaios, as câmaras de incubação são lavadas com etanol a 96% (v/v) e de seguida

com água destilada. Os resultados da capacidade respiratória mitocondrial foram expressos em $\text{pmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de fígado.

3.5 Análise estatística

O programa GraphPad Prism 6® foi utilizado para a realização do tratamento estatístico de todos os resultados. A análise estatística foi realizada através da aplicação do teste ANOVA (*one-way*) e de seguida foi aplicado o *Tukey's Multiple Comparison Test*.

Valores com *p-value* <0.05 foram considerados significativamente diferentes. Todos os dados obtidos representam os valores médios \pm SD (n=7), realizados em duplicado.

Capítulo IV

Resultados e Discussão

IV. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação de marcadores séricos da função hepática

O fígado tem como principais funções metabólicas a regulação do metabolismo da glicose e dos lípidos. É também responsável pela síntese de uma série de proteínas vitais, como é o caso da albumina. Possui ainda a importante função de destoxificação de produtos tóxicos endógenos e exógenos (Chiang, 2014). Alterações ao nível destes processos resultarão, possivelmente, em variações nos teores de determinadas moléculas que participam nestas vias metabólicas reguladas pelo fígado. A deteção destas alterações pode ser feita no soro, e assim a sua avaliação pode ser indicativa da função geral do fígado (Singh *et al.*, 2011).

Devido à função de destoxificação que o fígado possui, as células deste órgão podem sofrer danos que podem levar à libertação do conteúdo citoplasmático para a corrente sanguínea (ex. aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT)). Desta forma, a atividade de algumas enzimas pode ser utilizada como indicador de danos a nível hepático, o qual pode estar relacionado com algumas das doenças hepáticas (Chiang, 2014).

Tabela III – Avaliação da função hepática através da quantificação do teor sérico em albumina, triacilgliceróis e colesterol total, assim como da atividade da alanina aminotransferase (ALT), dos animais pertencentes a cada grupo experimental. Todos os valores representam os valores médios \pm SD (n=7). *p<0,05; #p<0,001; ^a comparativamente com NEX24; ^b comparativamente com EX24; ^c comparativamente com EX54;

	NEX24	EX24	NEX54	EX54
Albumina (g/L)	39,31 \pm 2,21	41,88 \pm 2,40	41,13 \pm 4,16	40,46 \pm 0,79
ALT (U/L)	39,78 \pm 3,56	41,72 \pm 10,24	32,23 \pm 4,69	31,24 \pm 6,64 ^{b*}
Triacilgliceróis (mg/dL)	44,08 \pm 12,95	47,39 \pm 11,20	46,14 \pm 3,59	49,95 \pm 13,79
Colesterol Total (mg/dL)	84,20 \pm 8,77	84,79 \pm 4,44	118,15 \pm 9,07 ^{abc#}	90,82 \pm 3,46

Os resultados obtidos para a avaliação sérica de marcadores da função hepática mostraram que apenas o teor em colesterol total e a atividade da ALT apresentaram alterações significativas relativamente ao aumento da idade ou em função do plano de exercício por nós proposto, respetivamente. Já o teor em albumina e triacilgliceróis mantiveram-se relativamente constantes face a ambos os fatores avaliados. Os animais de maior idade apresentaram uma maior quantidade de colesterol total comparativamente com os restantes grupos experimentais, tendo esta alteração sido estatisticamente significativa. Já os animais que praticaram exercício

durante 54 semanas apresentaram menor atividade da ALT, comparativamente com os restantes grupos experimentais, sendo esta estatisticamente significativa comparativamente com os animais que foram exercitados durante 24 semanas.

Com o aumento da idade, os lípidos são redistribuídos fora do tecido adiposo o que resulta numa acumulação destas moléculas em tecidos não adiposos, como é o caso do coração, músculo esquelético e fígado. A acumulação de lípidos, como os triacilgliceróis e o colesterol, ao nível hepático provocam o envelhecimento deste órgão. Sendo o fígado o principal regulador do metabolismo lipídico, a ocorrência de danos neste órgão, associados ao processo de envelhecimento, irá certamente provocar alterações no metabolismo dos lípidos, o que poderá ainda provocar uma maior acumulação de danos (Sheedfar *et al.*, 2013; Giorgi *et al.*, 2018).

No estudo por nós proposto, o aumento da idade provocou um aumento estatisticamente significativo ao nível do teor de colesterol total. Apesar de os animais mais velhos por nós utilizados terem somente 62 semanas de vida, pelo que ainda não podem ser considerados animais senescentes, o aumento no teor desta molécula poderá ser entendido como uma das consequências do processo de envelhecimento. Estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Farkhondeh e colaboradores (2019), onde avaliaram os níveis séricos de colesterol total em ratos Wistar com 80 semanas comparativamente com animais com 8 semanas de vida. No entanto, o processo de envelhecimento não pareceu alterar os restantes parâmetros bioquímicos avaliados a nível sérico. O facto de os animais utilizados não serem considerados velhos poderá explicar esta ausência de alterações.

Apesar do aumento do teor em colesterol verificado com o aumento da idade, o plano de exercício por nós imposto ao longo da vida, com uma duração de 54 semanas, foi suficiente para reverter o incremento verificado. Um estudo realizado por Yoon e colaboradores (2014) mostrou a ausência de alterações estatisticamente significativas no soro de ratos Sprague-Dawley face a um protocolo de exercício semelhante ao por nós imposto, mas com uma duração de apenas 5 semanas. Kazemi e colaboradores (2018) corroboram esta ausência de alterações ao nível do soro ratos Wistar, sujeitos a um plano de exercício igualmente semelhante ao por nós imposto, mas durante 8 semanas. Tendo em conta esta informação, para um exercício a uma intensidade moderada, a duração do treino para ser essencial para a redução dos níveis de colesterol total na corrente sanguínea.

A ALT é dos marcadores séricos mais indicativo de dano hepático, uma vez que esta enzima se encontra presente maioritariamente ao nível do fígado, tendo um papel bastante importante no metabolismo dos aminoácidos e na gluconeogénese (Singh *et al.*, 2011). O

aumento da idade é associado a um aumento da ALT, possivelmente como uma consequência de possíveis danos ao nível do fígado provocados pelo processo de envelhecimento, tal como é mostrado por alguns investigadores (Mizoguchi *et al.*, 2010; Ramesh *et al.*, 2012). No entanto, no nosso estudo não se verificou este aumento. Mais uma vez, o facto de os animais mais velhos utilizados no nosso estudo possuírem apenas 62 semanas de vida e, por isso, ainda não serem considerados animais velhos poderá justificar estas diferenças.

Alguns estudos mostram que a prática de alguns tipos de exercício físico encontra-se associada a um aumento assintomático das transaminases do fígado, ou seja, a AST e ALT (Pavlet *et al.*, 2015). Um estudo realizado por Mizoguchi e colaboradores (2010), onde foram avaliados os efeitos do exercício agudo no soro de ratos Sprague-Dawley, mostrou um aumento dos níveis séricos da ALT (Mizoguchi *et al.*, 2010). No entanto, nada está descrito na literatura que o exercício físico, mesmo aquele que é praticado de forma aguda esteja associado à disfunção hepática (Ascensão *et al.*, 2013).

No nosso estudo, os animais que praticaram exercício durante 54 semanas, ou seja, até à meia idade, foram o grupo experimental que apresentou uma menor expressão da ALT a nível sérico. Esta diminuição foi estatisticamente significativa comparativamente com o exercício praticado durante 24 semanas. O facto de o exercício físico por nós avaliado não se tratar de um exercício agudo, mas sim de um treino que estará por detrás de uma adaptação crónica, poderá ser explicativo da ausência do aumento da ALT face ao exercício.

Apesar das alterações verificadas na atividade desta enzima, os valores obtidos encontram-se dentro dos valores considerados normais da ALT no soro dos animais da espécie e estirpe por nós utilizada (Valor médio ALT em *Ratus Norvegicus* – Wistar Unilever: 33 U/L) (Boehm *et al.*, 2007).

Desta forma, nenhum dos estímulos avaliados aparenta provocar qualquer disfunção significativa a nível hepático. O plano de exercício por nós imposto, através da observação destes marcadores, parece provocar uma ligeira melhoria da função hepática, no entanto esta não é significativa. O normal processo de envelhecimento parece provocar alterações ao nível do metabolismo lipídico, o que resulta num aumento do teor de colesterol circulante. Porém, a prática de exercício ao longo da vida parece contrariar esta tendência.

4.2. Avaliação da função antioxidante hepática

4.2.1 Atividades enzimáticas

4.2.1.1 Superóxido Dismutase

A SOD é considerada a primeira linha de defesa antioxidante enzimática. Nos mamíferos, são conhecidas 3 isoenzimas, sendo estas classificadas conforme o metal de transição presente no seu centro ativo e a sua localização a nível celular. A SOD 1 (Cu-Zn SOD) encontra-se maioritariamente no citoplasma, sendo o tipo mais abundante. A SOD 3, possui os mesmos metais do que a SOD1, mas está presente apenas no meio extracelular (Bresciani *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2015).

Ao nível da matriz mitocondrial, encontra-se a SOD 2 (MnSOD), que se distingue dos restantes tipos por apresentar como metal de transição o manganésio. Esta é considerada essencial para a sobrevivência aeróbia, daí o aumento da expressão desta isoenzima nos organismos pode funcionar como uma forma preventiva de algumas patologias que tenham como etiologia o stresse oxidativo (Bresciani *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos para a atividade da SOD nos diferentes grupos experimentais encontram-se representados na figura 9.

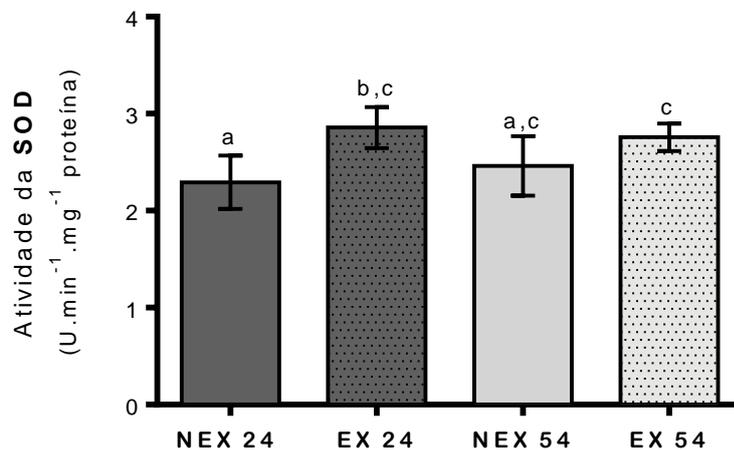


Figura 9 - Atividade da SOD em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições.

A atividade enzimática da SOD nos animais de meia idade mostrou um ligeiro aumento de atividade (7%) quando comparada com os animais jovens. No entanto, este aumento não se apresentou estatisticamente significativo ($p=0,573$ para NEX24 vs NEX54).

O plano de exercício nos animais que o praticaram até à idade jovem provocou um aumento de 20% na atividade da SOD comparativamente com os animais da mesma idade não exercitados, sendo este aumento estatisticamente significativo ($p<0,0001$ para NEX24 vs EX24). Nos animais exercitados até à meia idade, apesar de ter existido um aumento da expressão da SOD de 10%, este não foi estatisticamente significativo ($p=0,0655$ para NEX54 vs EX54).

O processo de envelhecimento é caracterizado pela perda gradual da capacidade de manutenção da homeostase do organismo. Uma das consequências desta falha é a existência de estados de stresse oxidativo (Gil del Valle, 2011). Apesar de não se saber exatamente ao certo qual a resposta exata das enzimas antioxidantes hepáticas face ao envelhecimento, uma grande parte dos estudos realizados mostram uma depleção, fazendo a SOD parte deste grupo. Mahesh e colaboradores (2009) mostraram a existência de um decréscimo da expressão desta enzima, a nível hepático, em ratos Wistar do sexo masculino com 88 semanas de vida, comparativamente a animais com 16 semanas de vida. Estes resultados são corroborados por trabalhos onde são utilizados modelos animais com idades semelhantes pertencentes à mesma estirpe (Mauriz *et al.*, 2007). No entanto, existem alguns estudos que mostram um efeito contrário em modelos semelhantes. Palomero e colaboradores (2001) observaram um aumento da atividade da SOD em ratos Wistar machos com 96 semanas, comparativamente com animais de 4,8 e 16 semanas. Esta variação de resultados torna difícil estabelecer uma correlação entre a atividade da SOD e o processo de envelhecimento.

No presente estudo, os animais de maior idade tinham 62 semanas, visto que não era o objetivo principal avaliar apenas o efeito da idade, mas sim avaliar o efeito do exercício ao longo da idade e qual o efeito desta prática na prevenção de algumas das consequências deste processo. Os animais às 62 semanas são considerados animais de meia idade, porém na maioria dos estudos em que se pretende avaliar as alterações da capacidade antioxidante em função da idade são utilizados ratos cujas idades variam entre as 80 e 100 semanas. Desta forma, os ratos utilizados no nosso estudo poderão ainda não apresentar as consequências tão acentuadas do envelhecimento, o que poderá justificar o facto de não se ter observado um decréscimo no grupo NEX54 quando comparado com o NEX24. Isto pode significar que os animais nesta idade ainda terão alguma capacidade de resposta. Já em animais com idades mais avançadas, como há uma

perda de capacidade de resposta a diferentes estímulos, a capacidade antioxidante total hepática poderá já não ser suficiente para neutralizar as ROS em excesso, o que explica a depleção enzimática observada por alguns investigadores, face ao processo de envelhecimento (Jayakumar *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007).

Para além do efeito da idade, os resultados apresentados mostram que o exercício físico consegue, pelo menos em parte, modular a atividade da SOD, quando praticado a longo prazo. O exercício físico aeróbio de intensidade moderada praticado a longo prazo é associado a uma adaptação crónica baseada no princípio de *hormesis*. Parte deste processo adaptativo passa por uma estimulação do sistema de defesa antioxidante (Radak *et al.*, 2008).

No presente estudo os animais praticaram exercício ao longo de toda a sua vida, durante 24 ou 54 semanas. De acordo com os resultados obtidos, 24 semanas de treino são suficientes para uma modulação significativa da atividade da SOD, a nível hepático. Às 54 semanas de treino, continua-se a verificar esta tendência, tendo-se mantido a atividade da SOD praticamente igual àquela que foi apresentada pelos animais treinados durante 24 semanas. Este aumento na atividade da SOD é corroborado por diversos estudos publicados, e pode ser considerado como uma resposta ao aumento da produção de ROS consequente da prática de exercício físico, fazendo parte dos mecanismos adaptativos induzidos por esta prática.

Mallikarjuna e colaboradores (2010) mostraram um aumento da expressão da SOD em ratos Wistar do sexo masculino, com 20 e 80 semanas de vida, que praticaram exercício físico em *treadmill* 30 min./dia, 5 dias/semana, durante um período de 8 semanas. Kakarla e colaboradores (2005) obtiveram resultados idênticos num modelo de exercício semelhante, mas com a duração de 12 semanas e em animais com idades de 24 e 60 semanas. Nestes trabalhos, a velocidade de corrida dos animais, ou seja, a intensidade do exercício, é pré-definida sendo essa a velocidade imposta a cada animal, independentemente da capacidade física individual. No nosso estudo, os animais correram conforme as suas capacidades físicas individuais, avaliadas num teste de esforço realizado a cada 6 semanas, o que pode explicar o elevado tempo de obtenção de uma alteração no sistema enzimático antioxidante.

Assim, o protocolo de exercício por nós imposto leva a uma modulação da expressão hepática da SOD. Tal poderá ser entendido como o início de uma resposta adaptativa a esta prática, que poderá vir a ser vantajosa no combate aos estados de stresse oxidativo consequentes da idade. Para além disto, o facto de o treino praticado durante 54 semanas permitir a manutenção da expressão da SOD que foi induzida pelo treino durante 24 semanas, parece indicar que esta prática poderá prevenir algumas das consequências do envelhecimento.

4.2.1.2 Catalase

A catalase é uma das principais enzimas responsáveis pela dismutação do H_2O_2 em água e oxigénio, sendo por isso de elevada relevância em alguns órgãos. É encontrada nos peroxissomas da maioria das células, tecidos e órgãos, estando expressa em elevadas quantidades ao nível do fígado e eritrócitos (Bresciani *et al.*, 2015; Pisoschi e Pop, 2015).

Nos mamíferos, a SOD trabalha em conjunto com a catalase de forma a manter os níveis de peróxido de hidrogénio produzidos pela SOD. Esta cooperação permite um controlo das ROS em excesso (Ye *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos para a atividade da catalase nos diferentes grupos experimentais encontram-se representados na figura 10.

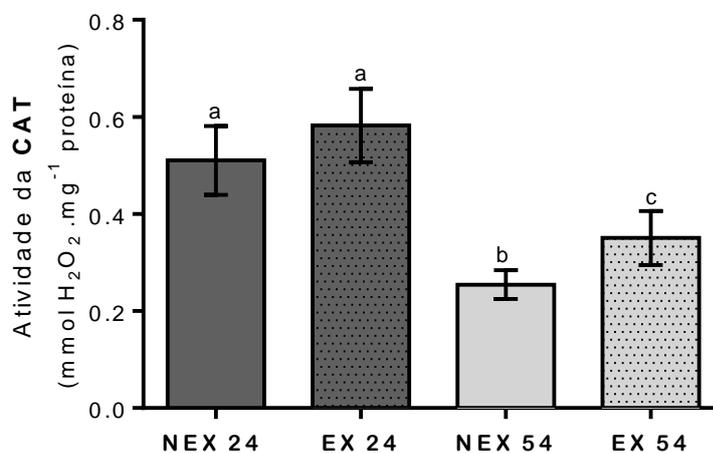


Figura 10 - Atividade da CAT em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições.

A atividade da catalase nos animais de meia idade apresentou-se cerca de 50% inferior comparativamente com a atividade desta enzima nos animais jovens, sendo esta diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,0001$ para NEX24 vs NEX54).

O exercício físico a longo prazo, tal como observado em relação à atividade da SOD, provocou um aumento na atividade da catalase. O treino durante 24 semanas provocou um aumento da atividade da CAT, comparativamente com os animais não exercitados da mesma idade. No entanto, contrariamente ao que ocorreu na SOD, este aumento de 12% na atividade não se apresentou estatisticamente significativo ($p = 0,0884$ para NEX24 vs EX24). O mesmo

tipo de exercício nos animais que o praticaram até à meia idade mostrou um aumento estatisticamente significativo de 27% na atividade da catalase ($p=0,0278$ para NEX54 vs EX54).

Estes resultados mostram que a CAT e a SOD apresentam uma resposta semelhante ao plano de treino. No entanto, face à idade este padrão não se mantém, uma vez que a CAT apresenta uma diminuição significativa com o aumento da idade e na SOD não se verificou qualquer diferença estatisticamente significativa.

Tal como descrito para a SOD, a literatura também não é concordante acerca do efeito da idade na expressão da CAT. Jayakumar e colaboradores (2007) mostraram uma diminuição da atividade enzimática da catalase, em animais de 96 semanas, comparativamente com animais com 12 semanas de vida. Pelo contrário, Mahesh e colaboradores (2009) mostraram um aumento da expressão da catalase num modelo animal com idades semelhantes, ou seja 88 semanas de vida, e pertencente à mesma estirpe.

No presente estudo, o aumento da idade levou a uma menor expressão da CAT, sendo esta diminuição estatisticamente significativa. No entanto, no caso da SOD, apesar de não se observarem diferenças estatisticamente significativas, esta sofreu um ligeiro aumento com o envelhecimento. Assim, estes resultados parecem indicar que a nível hepático a CAT é primeiramente afetada pelas consequências deletérias do envelhecimento (Mahesh *et al.*, 2009).

A resposta da catalase face ao treino tem sido alvo de controvérsia, ao nível do músculo esquelético. Ao nível do fígado, essa controvérsia é ainda maior, uma vez que, no geral, não existe concordância sobre como é que o exercício afeta as principais enzimas antioxidantes neste órgão (Cieslak *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016).

Face ao plano de exercício aplicado, a catalase parece responder de forma semelhante à SOD, resultando num aumento da atividade desta enzima, possivelmente como consequência dos estados de stresse oxidativo provocado por esta prática. No entanto, apenas são observadas diferenças estatisticamente significativas ao nível da atividade da CAT com 54 semanas de treino, enquanto que na SOD estes resultados já são estatisticamente significativos às 24 semanas de treino. Estes resultados parecem ser indicativos que a SOD poderá ser mais rapidamente modulada por este estímulo comparativamente com a catalase, podendo mesmo ser uma das primeiras enzimas a responder em situações de stresse uma vez que esta é a principal enzima antioxidante, responsável pela eliminação da ROS que é maioritariamente produzida, ou seja, o radical superóxido. Esta estimulação enzimática, em função do exercício,

está de acordo com alguns resultados obtidos por outros investigadores em estudos realizados com protocolos de exercício semelhantes ao que foi usado no nosso estudo.

Gul e colaboradores (2006) mostraram uma variação semelhante entre a SOD e a CAT, ao nível do miocárdio, em ratos Sprague-Dawley do sexo masculino, face a um plano de exercício físico de corrida durante 8 semanas. Este estudo é corroborado por Navarro e colaboradores (2003), a nível hepático, num modelo animal semelhante, que praticaram exercício durante 50 semanas.

Devido à relação existente entre a atividade catalítica da SOD e da CAT seria de esperar que ambas as enzimas apresentassem uma resposta semelhante face aos dois fatores avaliados, uma vez que um dos produtos da atividade da SOD, o peróxido de hidrogénio, é o substrato da catalase. Assim, seria de esperar que um funcionamento eficaz da SOD fosse acompanhado, em condições fisiológicas normais, por uma função eficaz da catalase de forma a eliminar o excesso de H_2O_2 produzido (Kakarla *et al.*, 2005). No entanto, existem alguns estudos que afirmam que o excesso do radical superóxido pode provocar uma inibição da atividade da CAT (Palomero *et al.*, 2001). O processo de envelhecimento está associado a estados de stresse oxidativo e, conseqüentemente, à existência de níveis elevados de radical superóxido o que poderá justificar a depleção observada na CAT com a idade. A ligeiríssima estimulação observada ao nível da atividade da SOD poderá não ter sido suficiente para eliminar o radical superóxido em excesso, pelo que poderá ocorrer oxidação de biomoléculas.

Apesar disto, o treino mostrou uma regulação semelhante de ambas as enzimas. O facto de o exercício estar associado a um aumento de produção de ROS pode explicar o aumento de atividade verificado na SOD. O radical superóxido ao ser eficazmente eliminado pela SOD, uma vez que esta enzima se encontra a funcionar corretamente, irá provocar um aumento de produção de H_2O_2 , o que resultará na estimulação da atividade da CAT. O tempo de treino parece ser essencial para que ocorra esta estimulação significativa da CAT, uma vez que a diferença estatisticamente significativa é somente observada às 54 semanas de treino.

O perfil de resposta semelhante para a SOD e CAT, face ao treino, pode mostrar que a regulação destas enzimas, possivelmente, poderá ter vias de sinalização interligadas. No entanto, até à data não existe tal confirmação pois desconhecem-se os mecanismos celulares exatos que regulam estas enzimas face a estados de stresse oxidativo gerados por determinado tipo de exercício (He *et al.*, 2016).

Assim, a prática de exercício durante 54 semanas parece ser essencial para que ocorra uma estimulação significativa da atividade da catalase. Mais uma vez, esta estimulação pode

ser entendida como uma resposta adaptativa face ao treino, mas que apenas ocorre quando o treino é mais prolongado. Para além disto, o protocolo de exercício por nós proposto pareceu ser eficaz em contrariar, em certa medida, a depleção da atividade da CAT com o aumento da idade.

4.2.1.3 Glutathione Peroxidase

A GPx tem a capacidade de catalisar a redução de vários hidroperóxidos, como é o caso do H_2O_2 , utilizando a GSH como dador de eletrões. Desta forma, para o correto funcionamento da GPx os níveis de GSH têm que ser mantidos dentro dos valores adequados. Existem 8 tipos de glutathione peroxidase nos mamíferos, sendo classificadas com base na ausência ou presença de selénio no seu centro catalítico (Powers e Jackson, 2008; Pisoschi e Pop, 2015; Ye *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos na avaliação da atividade da GPx encontram-se representados na figura 11.

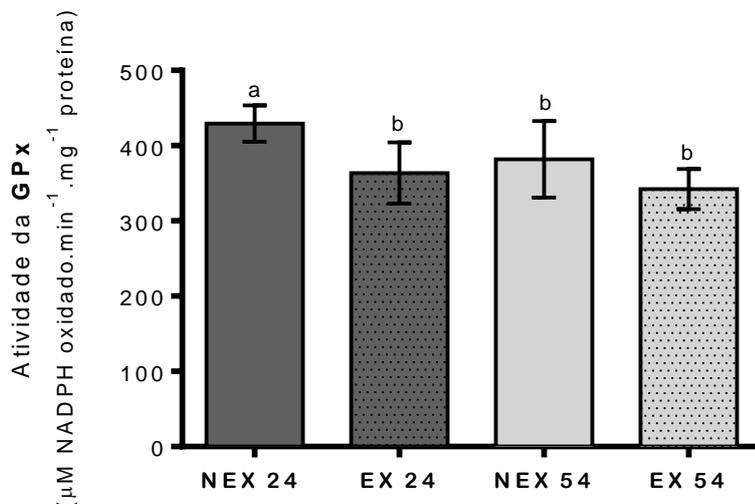


Figura 11 - Atividade da GPx em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições.

A avaliação da atividade da GPx nos diferentes grupos de animais mostrou que os ratos de meia idade apresentaram uma diminuição de atividade, estatisticamente significativa, de cerca de 11%, comparativamente aos animais jovens ($p < 0,0001$ para NEX24 vs NEX54).

A prática de exercício durante 54 semanas, ou seja, até à meia idade não provocou qualquer alteração estatisticamente significativa, comparativamente com os animais da mesma idade não exercitados ($p = 0,1377$ para NEX54 vs EX54). No entanto, o treino durante 24 semanas, ou seja, até a uma idade jovem provocou uma diminuição de 15% na atividade da enzima em questão, comparativamente com os animais não exercitados da mesma idade, sendo esta diminuição estatisticamente significativa ($p = 0,0025$ para NEX24 vs EX24).

Estes resultados mostram que, relativamente à idade, a GPx apresenta um padrão semelhante ao da CAT. No entanto, face ao exercício físico praticado ao longo da vida, a GPx apresentou uma resposta contrária àquela apresentada pela SOD e CAT.

Apesar da literatura apresentar algumas discordâncias acerca da variação da atividade da GPx face ao aumento da idade, no geral parece existir uma depleção com o envelhecimento, a nível hepático. Li e colaboradores (2007) mostraram, a nível hepático, uma diminuição do teor da GPx em animais com 80 semanas comparativamente a animais de 12 semanas. Estes resultados são corroborados por Aydin e colaboradores (2010) num modelo animal semelhante. Assim, estes estudos parecem corroborar os resultados obtidos no nosso estudo. Apesar dos ratos mais velhos utilizados no nosso estudo terem apenas 62 semanas e, como tal, ainda não serem considerados ratos velhos, começam já, relativamente à atividade de algumas enzimas antioxidantes, a apresentar um padrão semelhante ao apresentado pelos ratos mais velhos. O facto de o fígado ser um órgão de elevada capacidade metabólica, faz com que este possa ser um dos primeiros órgãos a ser afetados pelo processo de envelhecimento o que faz com que as consequências deste processo possam ser detetáveis mais precocemente a este nível (Schmucker, 2005).

Segundo os nossos resultados, o plano de exercício praticado pelos animais durante as 24 e 54 semanas está associado a uma diminuição da atividade da GPx, sendo esta estatisticamente significativa às 24 semanas de treino, comparativamente com os animais da mesma idade não exercitados.

Não existe grande concordância na literatura acerca da variação da atividade da GPx face à prática de exercício físico. Pey e colaboradores (2003) mostraram uma diminuição da atividade enzimática em ratos Wistar, face a um protocolo de corrida em *treadmill*, 45 minutos/dia, 5 dias/semana, a uma velocidade de 25m/minutos durante 12 semanas.

Contrariamente, Mallikarjuna e colaboradores (2010) apresentaram um aumento de atividade num modelo animal semelhante onde foi aplicado um plano de exercício semelhante, com exceção que foi aplicado apenas durante 8 semanas.

A CAT e a GPx possuem a capacidade de eliminação de peróxido de hidrogénio, apesar da GPx também possuir a capacidade de eliminação de outros hidroperóxidos. Assim, tendo em conta esta relação, a diminuição da atividade apresentada pela GPx nos grupos dos animais exercitados, durante 24 e 54 semanas, poderá ser explicada pelo facto do aumento da atividade da CAT ter sido eficaz na eliminação do aumento de H_2O_2 produzido, o que indica que esta poderá ser a principal enzima responsável pela dismutação do H_2O_2 , numa situação de treino.

No entanto, seria expectável ter-se observado um aumento da atividade da GPx às 24 semanas de treino tendo em consideração o facto de se ter verificado, neste grupo, um grande aumento da peroxidação lipídica, com o conseqüente aumento da formação de hidroperóxidos lipídicos (figura 14). Já com as 54 semanas de treino verificou-se uma diminuição na peroxidação lipídica a nível hepático. Visto que esta diminuição não poderá ser justificada pelo aumento da atividade desta enzima, terá provavelmente resultado de possíveis mecanismos adaptativos que terão levado a um menor stresse oxidativo e, conseqüentemente, um nível de peroxidação lipídica menos elevado.

4.2.1.4 Glutationa Redutase

A GR, apesar de não se encontrar diretamente envolvida na eliminação das ROS, tem um papel de elevada importância, uma vez que é a principal enzima responsável pela conversão da GSSG em GSH, utilizando o NADPH como dador de eletrões (Ji e Leichtweis, 1997; Powers e Jackson, 2008).

Desta forma, esta enzima é essencial para a reposição dos níveis celulares de GSH necessários à correta atividade de outras enzimas antioxidantes, como é o caso da GPx e GST, bem como do estado redox da célula, visto que a GSH é o principal antioxidante endógeno não enzimático (Birben *et al.*, 2012; Lu, 2013).

Os resultados da atividade da GR ao nível dos diferentes grupos experimentais encontram-se representados na figura 12.

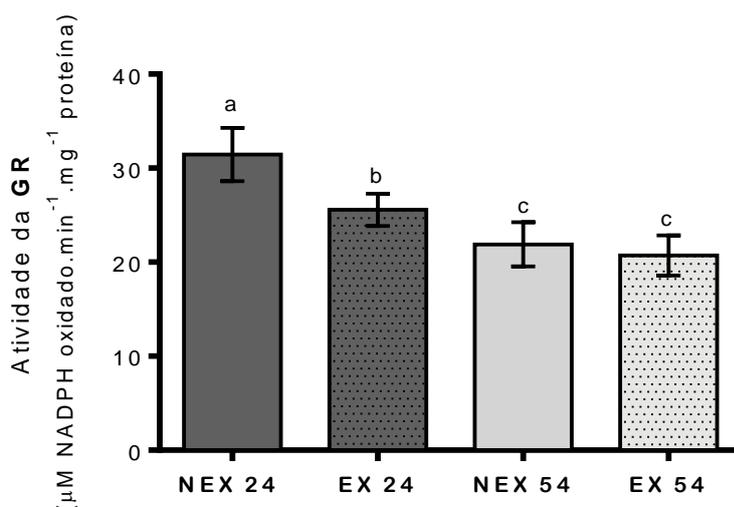


Figura 12 - Atividade da GR em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições.

Os resultados obtidos para a GR mostraram que tanto a idade como o exercício provocaram uma diminuição na atividade desta enzima. Relativamente à idade, os animais de meia idade apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa na atividade quando comparada com a atividade da GR nos animais mais jovens ($p < 0,0001$ para NEX24 vs NEX 54). Quanto ao exercício, verificámos que, tanto nos animais que praticaram exercício até à idade jovem como nos que o praticaram até à meia idade, a atividade sofreu um decréscimo, ainda que só nos animais mais jovens essa diferença tenha sido estatisticamente significativa ($p < 0,0001$ para NEX24 vs EX24).

Tendo em conta que a GR é essencial para a manutenção dos níveis intracelulares de GSH, e que esta molécula é um cofator necessário à atividade da GPx, será de esperar que uma alteração significativa ao nível da atividade da GPx seja acompanhada por uma alteração ao nível da GR, de forma a garantir as condições necessárias para o correto funcionamento da GPx (Kakarla *et al.*, 2008; Lu, 2013). Os resultados por nós apresentados acabam por corroborar esta afirmação, uma vez que a GR e a GPx respondem de forma semelhante ao processo de envelhecimento e ao plano de treino avaliado.

A depleção registada na atividade da GR em função da idade segue o padrão previamente observado noutras enzimas analisadas, nomeadamente a CAT e a GPx. Assim, é

corroborada a ideia de que apesar dos animais utilizados ainda não serem considerados velhos, mas sim de meia idade, algumas das enzimas antioxidantes começam a apresentar, ao nível hepático, alguns dos efeitos deletérios associados ao processo do envelhecimento, pertencendo a GR a este grupo de enzimas. Estes resultados são corroborados por um estudo realizado por Ramesh e colaboradores (2012), onde mostram uma diminuição estatisticamente significativa da atividade da GR, a nível hepático, em ratos Sprague-Dawley do sexo masculino, com 48 semanas de vida comparativamente com animais com apenas 8 semanas de idade.

O comportamento da atividade da GR face a um plano de exercício não apresenta grande concordância ao nível da literatura, tal como ocorre para o caso da GPx. No entanto, a ação da GR será de extrema importância na prática de exercício, uma vez que durante o exercício físico há oxidação de uma grande quantidade de GSH como consequência da elevada quantidade de ROS produzida, especialmente no músculo, mas também no fígado e em outros órgãos. Assim, durante a prática de exercício, será essencial uma atividade eficiente da GR de forma a ser mantido o equilíbrio redox a nível celular (Steinbacher e Eckl, 2015).

No entanto, o plano de treino avaliado, tanto praticado durante 24 como 54 semanas, provocou uma diminuição da atividade da GR, sendo esta estatisticamente significativa às 24 semanas de treino. Esta diminuição está de acordo com alguns estudos realizados por outros investigadores. Taysi e colaboradores (Taysi *et al.*, 2008) observaram uma diminuição da atividade da GR em ratos Sprague-Dawley, a nível hepático, face a um plano de exercício semelhante àquele por nós imposto, mas com uma duração de 8 semanas.

Assim, a diminuição na atividade da GR face ao treino ao longo prazo poderá ser uma resposta à diminuição da atividade da GPx, tendo em conta que a atividade destas enzimas apresenta uma interligação.

Desta forma, a prática de exercício durante 24 semanas aparentemente não é suficiente para provocar uma estimulação da GR, tal como aconteceu com a GPx. O treino durante 54 semanas também não provocou esse efeito, no entanto, a diminuição observada não pareceu afetar negativamente a função antioxidante hepática.

4.2.1.5 Glutathione S-Transferase

A GST é a enzima responsável pela formação de conjugados tióéster de uma série de produtos tóxicos produzidos no metabolismo, assim como de xenobióticos, de forma a que sejam mais facilmente excretados do organismo. Estas reações de conjugação utilizam GSH daí

ser requerida uma concentração adequada desta molécula para o correto funcionamento da enzima em questão (Ji e Leichtweis, 1997; Ye *et al.*, 2015).

Esta enzima é das enzimas responsáveis pela biotransformação (Fase II) de moléculas por forma a que possam ser mais facilmente excretadas. O facto de eliminar produtos tóxicos que possam contribuir para a possível existência de estados de stresse oxidativo permite também a sua classificação como uma enzima antioxidante (Sharma *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos para a atividade da GST ao nível dos diferentes grupos experimentais encontram-se representados na figura 13.

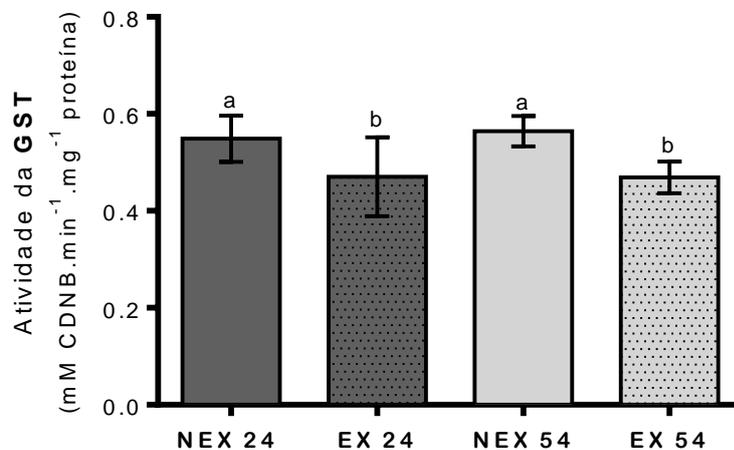


Figura 13 - Atividade da GST em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições.

A atividade da GST não apresentou qualquer alteração estatisticamente significativa quando comparando os animais de meia idade com os animais jovens ($p=0,9910$ para NEX24 vs NEX54).

O plano de exercício físico tanto praticado até a uma idade jovem, como praticado até à meia idade, provocou uma diminuição de 14% e 17%, respetivamente, comparativamente com os animais da mesma idade não exercitados. Em ambos os casos a diminuição foi estatisticamente significativa ($p=0,0142$ para NEX24 vs EX24, $p=0,0039$ para NEX54 vs EX54).

Estes resultados mostram que a GST apresenta uma resposta semelhante à GPx e GR, face ao exercício físico ao longo da vida, uma vez que os resultados apresentam um padrão semelhante. Já face ao fator idade, a GST não parece sofrer os efeitos deletérios aparentemente associados ao processo de envelhecimento. O facto dos animais mais velhos por nós utilizados terem 62 semanas de idade poderá justificar, mais uma vez, esta ausência de alteração na atividade da enzima em questão, pelo que ainda não se observará a depleção registada por alguns investigadores na atividade desta enzima em animais em senescência, apesar de algumas das enzimas antioxidantes já se mostrarem afetadas (Parildar-Karpuzo *et al.*, 2008).

Com o aumento da idade, principalmente a nível hepático, existe um aumento da formação e acumulação de produtos endógenos tóxicos, possivelmente devido a disfunções metabólicas associadas ao envelhecimento. Tendo em conta que a GST é responsável pela eliminação de alguns destes produtos, esta relação poderá justificar o aumento da GST face à idade que é apresentada em alguns estudos (Jang *et al.*, 2001). No entanto, se o modelo animal utilizado já se encontrar em senescência e os produtos tóxicos superarem a capacidade hepática da sua destoxificação, será de esperar uma depleção na atividade enzimática da GST, tal como é descrito num estudo realizado por Mahesh e colaboradores (2009). No nosso caso, a ausência de alterações nesta atividade poderá ser justificada pelo facto de os animais ainda possuírem alguma capacidade de resposta uma vez que ainda não se encontravam em senescência.

A literatura é escassa acerca do comportamento desta enzima face a qualquer tipo de exercício, e a existente não apresenta grande concordância entre si. O facto da GST estar envolvida maioritariamente no processo de destoxificação, faz com que não seja objeto principal de estudo face a um plano de treino. No entanto, tendo em conta a capacidade que esta enzima possui na eliminação de hidroperóxidos, que podem ser produzidos durante a prática de alguns tipos de exercício, também será importante entender como é que esta responde a este tipo de prática (Gul *et al.*, 2006).

O plano de exercício em questão, tanto praticado até a uma idade jovem como praticado até à meia idade provocou uma diminuição da atividade da GST, sendo esta diminuição estatisticamente significativa em ambos os casos. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos realizados por outros autores. Taysi e colaboradores (2008) observaram uma diminuição da atividade da GST face a um plano de exercício físico com a duração de 8 semanas, 5 dias/semana, 1,5h/dia.

Tendo em conta a capacidade de destoxificação da GST seria de esperar que às 24 semanas de treino existisse uma estimulação da sua atividade, uma vez que os níveis de peroxidação lipídica (figura 14), e consequentemente os níveis de hidroperóxidos lipídicos, se apresentaram elevados. No entanto, a diminuição da atividade enzimática observada às 24 semanas de treino poderá ser considerada uma consequência de possíveis estados de stresse oxidativo, a nível hepático, provocado pela prática de exercício físico, uma vez que aparentemente os animais não tinham capacidade endógena para combater este aumento da produção de ROS. Estes resultados são corroborados através da avaliação de outros marcadores de stresse oxidativo que mostraram que o treino durante as 24 semanas resultou num aumento do dano oxidativo a nível hepático. Isto poderá ser uma consequência de ainda não se terem desenvolvido os mecanismos adaptativos associados à prática de exercício.

Por sua vez, às 54 semanas de treino existiu uma diminuição do dano oxidativo, traduzido numa diminuição significativa da peroxidação lipídica. Tal como ocorreu no caso da GPx, a depleção observada na atividade da GST não poderá justificar a ausência de dano ao nível das membranas lipídicas, pelo que possivelmente ter-se-ão desenvolvido mecanismos adaptativos, a outros níveis, que justificarão esta ausência. O facto da GST e da GPx terem em comum a capacidade de eliminação de hidroperóxidos consequentes da peroxidação lipídica, pode explicar o facto de ambas as enzimas apresentarem uma resposta semelhante face aos estímulos avaliados (Sharma *et al.*, 2004). No entanto, a diminuição da atividade destas enzimas às 54 semanas de treino também poderá ser entendida como uma consequência do processo adaptativo que provocou uma diminuição dos hidroperóxidos e, como tal, não será necessária uma elevada atividade por parte destas enzimas.

Desta forma, a resposta adaptativa provocada pelo treino a longo prazo parece conseguir atenuar alguma das consequências do processo de envelhecimento, a nível hepático, apesar de não ter induzido uma estimulação da atividade da GST.

4.2.2 Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é uma das consequências do ataque aos lípidos pelas ROS em excesso, consequentes dos estados de stresse oxidativo. Estas biomoléculas são das mais suscetíveis a sofrer oxidação, sendo este processo considerado irreversível, uma vez que a célula não possui mecanismos que permitam a reversão do processo (Bresciani *et al.*, 2015; Pisoschi e Pop, 2015).

Os produtos da peroxidação lipídica são rapidamente convertidos em compostos secundários, como os isoprostanos, e principalmente, aldeídos. O malondialdeído (MDA) é o subproduto final maioritário. Estes e outros subprodutos são considerados bons marcadores de stress oxidativo (Birben *et al.*, 2012; Bresciani *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos para a avaliação da peroxidação lipídica em diferentes frações lipídicas encontram-se representados na figura 14, e foram expressos em $\mu\text{M MDA} \cdot \text{mg}^{-1} \text{proteína}$.

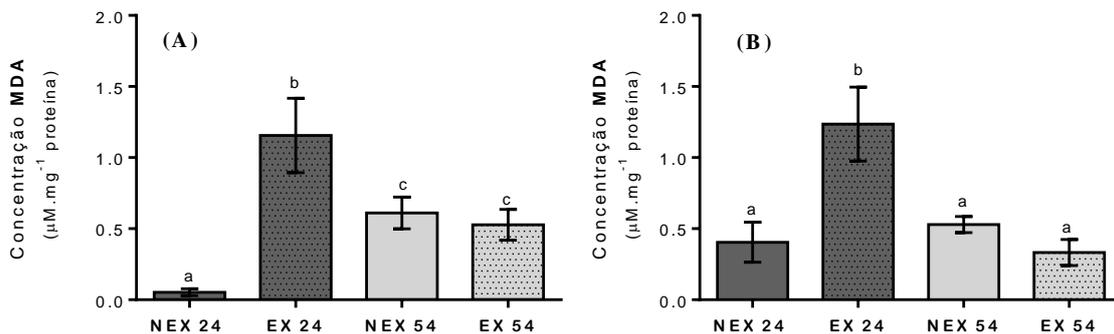


Figura 14 - Avaliação da **peroxidação lipídica** pelo método de TBARS, em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. **(A)** Teor de MDA no pellet 1, **fração total**, resultante da 1ª centrifugação (1500 g); **(B)** Teor de MDA no pellet 2, **fração mitocondrial**, resultante da junção dos pellets da 2ª e 3ª centrifugação (8000 g e 14 000 g, respetivamente); Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições.

Na fração total, a idade provocou um aumento do teor em MDA ao nível hepático, uma vez que a concentração desta molécula aumentou cerca de 90% nos animais de meia idade, comparativamente com os animais jovens, tendo este aumento sido estatisticamente significativo ($p=0,0007$ para NEX24 vs NEX54). Os animais exercitados até à idade jovem apresentaram um aumento significativo de cerca de 96% do conteúdo em MDA, comparativamente com os animais da mesma idade não exercitados ($p<0,0001$ para NEX24 vs EX24). Nos animais de meia idade, verifica-se o oposto, tendo-se verificado uma diminuição da peroxidação lipídica de cerca de 14%, no entanto esta diminuição não é estatisticamente significativa ($p=0,8644$ para NEX54 vs EX54).

Na fração mitocondrial, o teor em MDA nos diferentes grupos experimentais apresentou um padrão semelhante aos resultados obtidos para a fração total. No entanto, apenas os animais

exercitados até à idade jovem apresentaram um aumento estatisticamente significativo no conteúdo desta espécie quando comparado com os restantes grupos ($p < 0,0001$ para NEX24 vs EX24, EX24 vs NEX54, EX24 vs EX54).

Os nossos resultados obtidos para a peroxidação lipídica em ambas as frações apresentaram um comportamento semelhante. A principal diferença observada entre ambas as frações verifica-se ao nível dos animais jovens não exercitados (NEX24), onde a fração mitocondrial apresentou uma concentração de MDA cerca de 8 vezes superiores à fração total, sendo esta diferença estatisticamente significativa (resultados não apresentados).

Segundo a teoria do envelhecimento dos radicais livres, o aumento da idade está associado à existência de um estado pro-oxidante que, por falha de uma resposta por parte do organismo para combater este estado, acaba por causar dano oxidativo ao nível das biomoléculas, como é o caso dos lípidos (Gil del Valle, 2011). Assim, níveis elevados de peroxidação lipídica parecem estar associados ao normal processo de envelhecimento. Mauriz e colaboradores (2007) mostraram um aumento dos níveis de peroxidação lipídica, a nível hepático, em ratos Wistar com 80 semanas. Estes resultados são corroborados por Çorban e colaboradores (2014) num modelo animal com a mesma idade.

Os resultados mostram claramente que, às 62 semanas de vida os animais que não foram exercitados apresentam, na fração total, um aumento significativo na peroxidação lipídica. Estes resultados poderão ser justificados pelo início de perda de capacidade de função antioxidante hepática, traduzida pela diminuição da atividade catalítica de algumas das enzimas antioxidantes e, eventualmente, de antioxidantes endógenos não enzimáticos (Mauriz *et al.*, 2007; Manikonda e Jagota, 2012). No entanto, na fração mitocondrial, principal local onde ocorre a produção de ROS, não se verifica qualquer diferença significativa com a idade nos grupos não exercitados. Isto poderá significar que as defesas antioxidantes nesta fração serão mais eficientes na proteção contra a oxidação dos lípidos membranares, uma vez que os animais ainda não se encontram em senescência e, como tal, não apresentarão evidentes todas as típicas consequências do processo de envelhecimento.

Relativamente ao exercício, os resultados obtidos às 24 semanas de treino indicam que no início do treino haverá um aumento na produção de ROS o qual irá provocar stresse oxidativo antes que a resposta celular antioxidante possa contrabalançar este efeito. Curiosamente, nos animais que praticaram exercício durante 54 semanas, o conteúdo em MDA é inferior aos dos animais não exercitados e significativamente menor quando comparado com o grupo EX24.

Estudos anteriores e já descritos na literatura, indicam que o treino regular e de intensidade moderada parece levar a uma redução dos níveis de peroxidação lipídica. A justificação baseia-se no facto de que o exercício físico praticado a longo prazo encontra-se associado a uma estimulação das defesas antioxidantes, permitindo que o organismo esteja equipado com mecanismos de defesa eficazes de forma a eliminar as ROS mesmo quando produzidas de forma exacerbada, evitando assim o possível dano oxidativo (Radak *et al.*, 2013).

Assim, o aumento da peroxidação lipídica nos animais que treinaram durante 24 semanas, ou seja, até a uma idade jovem, é corroborado pela insuficiente atividade enzimática no grupo em questão, tal como foi observado até agora. Apesar da SOD e da CAT, as principais enzimas antioxidantes, terem sofrido uma estimulação face ao treino, esta não terá sido suficiente para eliminar totalmente as ROS provocadas pela prática de exercício, o que poderá justificar o aumento da peroxidação lipídica observada neste grupo. O facto das restantes enzimas avaliadas terem sofrido um decréscimo poderá também ter contribuído para este aumento. Assim, a resposta antioxidante aos níveis de ROS formadas pela prática de exercício físico durante 24 semanas não foi suficiente para evitar o dano oxidativo. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos publicados por outros autores. Mallikarjuna e colaboradores (2009) mostraram um aumento da peroxidação lipídica face a um plano de exercício semelhante ao utilizado no nosso estudo, mas com uma duração de 8 semanas. Yoon e colaboradores (2014) obtiveram também resultados concordantes com o nossos.

Já os animais que treinaram durante 54 semanas, apresentaram valores de MDA mais baixos do que os animais da mesma idade não exercitados, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa. Pey e colaboradores (2003) mostraram um padrão de resultados semelhantes, em ratos Wistar do sexo masculino sujeitos a um plano de exercício durante 12 semanas (Pey *et al.*, 2003). Esta tendência é corroborada por Chae e colaboradores (2008) ao nível do músculo esquelético de um modelo animal sujeito a um plano de exercício durante 8 semanas. Esta diminuição pode ser considerada um efeito da alteração ao nível do sistema antioxidante enzimático provocado pela prática de exercício continuada no tempo, que resultou no desenvolvimento de uma série de mecanismos adaptativos, a este nível. Previamente, foi observado que o treino a longo prazo levou a uma estimulação da atividade das principais enzimas antioxidantes, a SOD e a CAT. Este incremento poderá estar na base da eficiente remoção dos níveis de ROS em excesso resultantes de cada sessão de exercício, e como tal explica a diminuta peroxidação lipídica existente ao nível deste grupo experimental.

Os resultados obtidos para a peroxidação lipídica ao nível da fração celular e mitocondrial apresentaram uma tendência muito semelhante. Tal pode indicar, em parte, que a principal fonte de ROS durante a prática de exercício, a nível hepático, poderá não ser a mitocôndria, mas sim uma fonte externa a este organelo. Alguns estudos, têm apontado as NADPH oxidases como uma fonte de ROS ao nível do músculo esquelético, se não a principal, aquando da prática de exercício (Sakellariou *et al.*, 2014). A nível hepático, a informação é limitada. Existem autores que apontam a mitocôndria como a principal responsável pela produção de ROS durante o exercício. Mais recentemente, a xantina oxidase tem despertado a atenção como uma fonte de ROS significativa durante a prática de exercício a nível hepático, uma vez que está bastante presente no fígado, e a sua atividade apresenta-se aumentada durante o exercício, segundo alguns estudos (Ascensão *et al.*, 2013; Pillon Barcelos *et al.*, 2017).

Desta forma, os resultados da peroxidação lipídica corroboram as conclusões apresentadas até agora. De facto, aparentemente 54 semanas de treino moderado, ou seja, aproximadamente um ano, serão suficientes para, a nível hepático, se conseguir uma adaptação crónica ao exercício.

4.2.3 Avaliação do teor em GSH e GSSG

A GSH é uma das moléculas com maior importância na manutenção do estado redox celular, uma vez que tem a capacidade de neutralizar as ROS quando em excesso, prevenindo a ocorrência de danos oxidativos ao nível das biomoléculas. Desta forma, é de extrema importância a manutenção dos níveis desta molécula na sua forma reduzida (Hey e Loscalzo, 2012; Lu, 2013).

A razão entre a forma reduzida e oxidada da glutatona (GSH/GSSG) é um dos marcadores do stresse oxidativo celular mais utilizados. A exposição da GSH a níveis de ROS elevados, resultará na oxidação desta molécula, o que irá levar a uma diminuição da razão intracelular de GSH/GSSG (Birben *et al.*, 2012; Handy e Loscalzo, 2012).

Os resultados obtidos para a quantificação da GSH e GSSG, assim como a razão entre estas duas moléculas, encontram-se representados na figura 15.

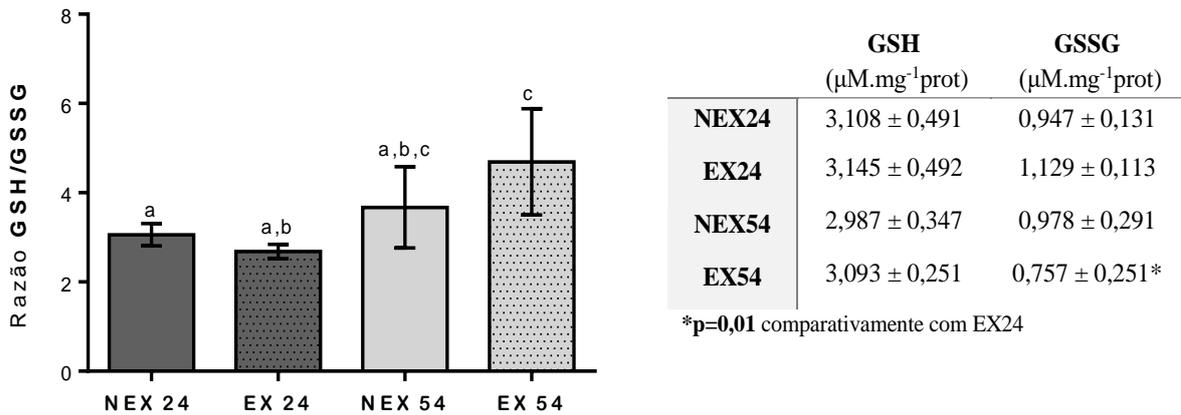


Figura 15 - Razão em GSH/GSSG, e valores médios do conteúdo de GSH e GSSG em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD ($n=7$), com duas repetições.

A avaliação do conteúdo em GSH e GSSG, mostrou que o aumento da idade provocou um ligeiro aumento da razão entre estas duas moléculas, no entanto este não foi estatisticamente significativo ($p=0,5884$ para NEX24 vs NEX54).

Por sua vez, o plano de exercício praticado pelos animais até a uma idade jovem induziu uma ligeira diminuição de 13% na razão GSH/GSSG comparativamente com os animais da mesma idade não exercitados. Contrariamente, o treino até uma idade mais avançada levou a um aumento de 22% da razão avaliada, comparativamente aos animais da mesma idade não exercitados. No entanto, em nenhuma das situações as alterações verificadas foram estatisticamente significativas ($p=0,8369$ para NEX24 vs EX24, $p=0,2233$ para NEX54 vs EX54).

Será expetável prever uma menor razão de GSH/GSSG com o aumento da idade, uma vez que uma das consequências do processo de envelhecimento é a presença de estados de stresse oxidativo, tipicamente associados a uma diminuição significativa do teor em GSH e um consequente aumento do GSSG (Giorgi *et al.*, 2018). Manikonda e colaboradores (2012) corroboram esta afirmação, mostrando uma diminuição da razão GSH/GSSG em ratos Wistar do sexo masculino com 96 semanas de idade. Estes resultados foram também corroborados por Malikarjuna e colaboradores (2007) num modelo animal com idade semelhante.

O aumento da idade, no estudo por nós proposto, levou a um ligeiro aumento da razão GSH/GSSG, não sendo este significativo. Isto poderá ser indicativo que o fígado dos animais às 62 semanas não estará ainda a sofrer os possíveis efeitos do stresse oxidativo existente, tendo ainda intactos alguns mecanismos de resposta, mesmo que algumas das enzimas antioxidantes tenham começado a apresentar alguns dos efeitos deletérios do processo de envelhecimento, traduzidos numa diminuição da atividade. O facto de não terem existido alterações no teor de GSH nos animais com esta idade, significa a capacidade antioxidante não está ainda comprometida, não existindo por isso um consumo excessivo de GSH.

Por sua vez, a prática de exercício físico parece estar relacionada com uma diminuição do conteúdo hepático de GSH, devido ao aumento da produção de ROS consequente desta prática (Goto *et al.*, 2007). No entanto, o treino induz uma adaptação crónica, em parte ao nível do sistema de defesa antioxidante, o que fará com que os níveis de GSH não decresçam de forma significativa, uma vez que as células já se encontram protegidas contra o stresse oxidativo, devido à adaptação referida (Radak *et al.*, 2013).

Apenas o treino durante 54 semanas provocou um aumento da razão GSH/GSSG, apesar de não ser significativo. O treino durante 24 semanas, provocou o efeito contrário, o que pode ser explicado pelo facto de não ter decorrido tempo suficiente de treino para que ocorram os mecanismos adaptativos ao nível do sistema antioxidante hepático, logo as ROS produzidas durante o exercício podem ser neutralizadas pelo GSH endógeno, levando a um ligeiro aumento dos níveis de GSSG. Estes resultados vêm corroborar a ausência de mecanismos adaptativos a nível hepático com 24 semanas de treino.

O aumento da razão apresentada com o treino a longo prazo, ou seja, durante 54 semanas, deve-se a uma diminuição significativa no teor de GSSG comparativamente com os restantes grupos de animais, uma vez que o teor em GSH não sofreu qualquer alteração entre os grupos em questão. O facto de, a nível celular, apenas 10% da glutathiona se encontrar na forma oxidada, faz com que alterações no teor desta molécula possa não provocar alterações significativas no teor da glutathiona reduzida, uma vez que a GSH se encontra em quantidades muito superiores. Desta forma, a razão GSH/GSSG parece ser mais dependente de alterações dos níveis de GSSG do que nos níveis de GSH (Gomez-Cabrera *et al.*, 2005).

Os estudos presentes na literatura não apresentam a mesma tendência na variação dos teores de GSH e GSSG, face à prática de exercício. Num trabalho realizado por Kakarla e colaboradores (2008) obtiveram um aumento do teor de GSH, a nível do miocárdio, face a um plano de exercício físico com duração de 12 semanas, a uma intensidade de 23 m/min, 5

dias/semana, durante 30 minutos. Já Chae e colaboradores (2008), face a um plano de exercício semelhante, mostraram que os níveis de GSH se mantiveram inalterados em diferentes partes do músculo esquelético. Estas diferenças observadas entre os vários estudos podem ser consequência das diferentes alterações das atividades enzimáticas da GPx e GR face ao treino. Neste estudo, a ausência de alterações no conteúdo de GSH poderá ser justificada pela atividade tanto da GR como da GPx que, apesar de terem sofrido alterações face à idade e ao treino, não terão sido suficientes para provocar alterações ao nível do *pool* de GSH.

Desta forma, os resultados aqui apresentados parecem indicar que os animais que praticaram exercício durante 54 semanas, ou seja, até uma idade mais avançada são aqueles que estarão supostamente num melhor estado de proteção antioxidante, representado pela razão de GSH/GSSG mais elevada. Assim, estes resultados vão ao encontro daqueles que foram apresentados previamente ao nível da atividade enzimática antioxidante e peroxidação lipídica, e parece indicar que o treino, de facto, provocou uma modulação redox hepática, levando a uma maior proteção contra possíveis estados de stresse oxidativo.

4.3. Avaliação da função mitocondrial hepática

4.3.1 Avaliação dos complexos mitocondriais e massa mitocondrial

4.3.1.1 Citrato Sintase

A citrato sintase é a enzima responsável pela catálise da primeira reação correspondente ao conjunto de reações que fazem parte do ciclo de Krebs. Catalisa a formação do citrato, através da combinação da acetil-CoA com o oxaloacetato. É ainda uma das responsáveis pela regulação das reações deste ciclo (Pinho *et al.*, 2006; Berg *et al.*, 2012).

Esta enzima está localizada exclusivamente ao nível da matriz mitocondrial e, como tal, a sua atividade está intimamente correlacionada com o teor de mitocôndrias presentes no tecido. Esta característica torna a avaliação da sua atividade um bom marcador da massa mitocondrial (Bishop *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos para a atividade da citrato sintase em amostras de fígado encontram-se representados na figura 16.

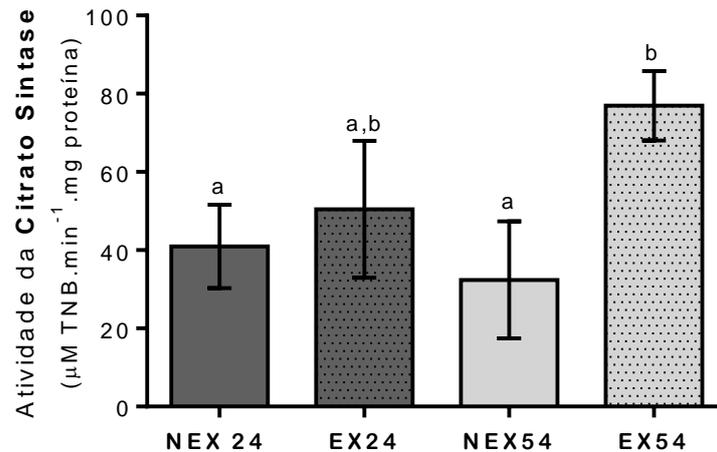


Figura 16 - Atividade da Citrato Sintase em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=4), com duas repetições cada.

A avaliação da atividade da citrato sintase mostrou que os animais exercitados, tanto durante 24 ou 54 semanas, apresentaram um aumento na atividade enzimática de 19% e 58%, respetivamente, comparativamente com os animais não exercitados, embora este aumento apenas tenha sido estatisticamente significativo entre os animais que praticaram exercício até à meia idade e os animais da mesma idade não exercitados ($p=0,0071$ para NEX54 vs EX54).

O aumento de idade provocou uma diminuição da atividade da citrato sintase de cerca 21% nos animais de meia idade comparativamente com os animais jovens, no entanto, esta alteração não foi estatisticamente significativa ($p=0,8646$ para NEX24 vs NEX54).

A mitocôndria apesar de ter um papel central no envelhecimento devido à produção de ROS ao nível da cadeia transportadora de eletrões (CTE), paradoxalmente, também aparenta ser um dos organelos mais afetados por este processo (Navarro e Boveris, 2007). Uma das alterações é a perda da massa mitocondrial ao nível dos diferentes órgãos, como o coração (Duicu *et al.*, 2013), o cérebro (Srividhya *et al.*, 2009) e o músculo esquelético (Siu *et al.*, 2003).

O comportamento das mitocôndrias hepáticas aparenta seguir a mesma tendência apresentada por outros órgãos face ao envelhecimento, apesar dos estudos desta natureza ao nível do fígado serem escassos (Kim *et al.*, 2015). Cahill e colaboradores (2005) observaram uma diminuição de atividade da citrato sintase, isto é indicativo de uma menor massa mitocondrial, face ao aumento da idade num modelo animal semelhante ao por nós utilizado.

Os resultados por nós obtidos estão de acordo com a tendência apresentada, uma vez que os animais mais velhos apresentaram também uma diminuição na massa mitocondrial hepática, ainda que ligeira. O facto desta alteração não ter sido estatisticamente significativa poderá ser justificado pela circunstância dos animais mais velhos ainda não se encontrarem em senescência, e como tal as consequências deletérias do envelhecimento ainda não serem totalmente notórias, tal como tem vindo a ser referido.

Contrariamente ao envelhecimento, o exercício físico parece provocar um aumento do teor mitocondrial, o que faz com que a prática de exercício físico possa representar uma das possíveis soluções à depleção tipicamente associada ao aumento da idade (Navarro *et al.*, 2003). Este incremento está bem descrito ao nível do músculo esquelético, onde a grande parte das publicações na literatura mostram um aumento da citrato sintase face ao treino (Siu *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2014). Ao nível do fígado não existe muita informação acerca do efeito do exercício na massa mitocondrial deste órgão, pelo que devem ser realizados mais estudos, com diferentes planos de exercício e a diferentes idades para se poder concluir sobre o real valor deste na função mitocondrial hepática.

No nosso estudo, a prática de exercício até à meia idade, ou seja, durante 54 semanas levou a um aumento estatisticamente significativo do teor de mitocôndrias hepático. Esta tendência foi verificada já com 24 semanas de treino, apesar de não corresponder a um aumento estatisticamente significativo. Desta forma, a nível hepático, o plano de exercício por nós proposto, quando praticado a longo prazo, consegue contrariar a depleção da massa mitocondrial que foi verificada com o aumento da idade.

Os diferentes parâmetros do exercício apresentam uma influência distinta na biogénese mitocondrial. Aparentemente, alterações no conteúdo mitocondrial, pelo menos ao nível do músculo esquelético, são maioritariamente dependentes do volume de exercício e, conseqüentemente, da frequência com que é praticado (Bishop *et al.*, 2014).

No presente estudo, o volume de exercício foi de 5h/semana, tendo sido necessárias 54 semanas para existir uma alteração estatisticamente significativa ao nível da massa mitocondrial hepática. Fletcher e colaboradores (2014) mostraram que um volume de exercício de 5h/semana, durante 4 semanas não foi suficiente para provocar qualquer alteração na atividade da citrato sintase, a nível hepático. Santos-Alves e colaboradores (2015) obtiveram resultados semelhantes para um volume de exercício de 5h/semana durante 12 semanas. No entanto, ao nível do músculo esquelético Siu e colaboradores (2003) mostraram um aumento estatisticamente significativo da massa mitocondrial com um volume de exercício de 5h

semanais em 6 semanas. Nos trabalhos até agora realizados, a nível hepático, o volume de exercício, assim como a frequência foram muito semelhantes. A principal diferença entre os planos de exercício é o tempo que durou o treino, o que pode ser indicativo que, de facto, este parâmetro poderá ser mais determinante na biogénese mitocondrial hepática do que o volume de exercício. No entanto, na literatura não existem muitos estudos com volumes de exercício superiores a 5h semanais o que não nos permite perceber o efeito que teria um aumento neste parâmetro.

Assim, os nossos resultados parecem indicar que o tempo de duração do treino tem uma elevada influência no teor mitocondrial hepático, e que 54 semanas de treino serão capazes de contrariar a diminuição do conteúdo mitocondrial, resultante do processo natural de envelhecimento. Apesar da intensidade ser considerada o parâmetro mais relevante para a obtenção dos efeitos benéficos do exercício, estes resultados parecem indicar que alguns dos restantes parâmetros também são igualmente relevantes para a obtenção destes mesmos benefícios.

4.3.1.2 Complexo I

O complexo I, ou NADH desidrogenase, é responsável pela catálise simultânea de dois processos: a oxidação do NADH e o bombeamento de quatro prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (Navarro e Boveris, 2007). Nos humanos, das subunidades que constituem este complexo, 7 são codificadas pelo DNA mitocondrial (mtDNA) e as restantes 39 codificadas pelo DNA nuclear (nDNA) (Preston *et al.*, 2008).

É considerado um dos principais locais, conjuntamente com o complexo III, onde ocorre a formação do radical superóxido a nível mitocondrial. No entanto, o mecanismo por detrás deste processo ainda permanece por esclarecer. Apesar de ser um dos principais produtores de superóxido, também é um dos principais alvos de ataque desta mesma espécie química (Handy e Loscalzo, 2012; Bresciani *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos para a atividade específica do complexo I ao nível da fração mitocondrial hepática encontram-se apresentados na figura 17.

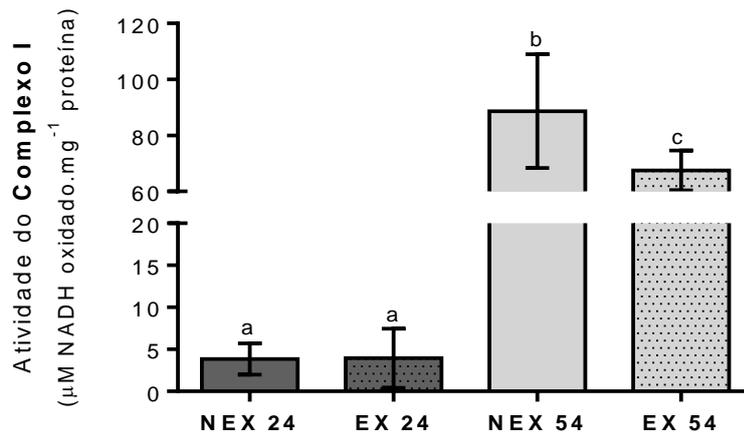


Figura 17 - Atividade do **Complexo I, NADH desidrogenase**, em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições

A avaliação da atividade do complexo I mostrou que os animais de meia idade apresentaram uma atividade deste complexo cerca de 95% superior à dos animais jovens, sendo esta alteração estatisticamente significativa ($p < 0,001$ para NEX24 vs NEX54).

O exercício praticado até à meia idade, ou seja, durante 54 semanas, foi aquele que teve um maior impacto na atividade do complexo I, uma vez que provocou uma diminuição de cerca de 24% na expressão deste complexo, comparativamente aos animais da mesma idade não exercitados ($p = 0,004$ para NEX54 vs EX54). Por sua vez, o mesmo tipo de treino até uma idade jovem não teve qualquer efeito estatisticamente significativo nesta atividade, comparativamente com os animais da mesma idade não exercitados ($p > 0,999$ para NEX24 vs EX24).

A disfunção dos complexos da CTE parece ser uma das muitas manifestações que ocorrem a nível mitocondrial como consequência do aumento da idade, ocorrendo uma diminuição da sua atividade (Seo *et al.*, 2016). O complexo I é um dos componentes da CTE mais afetado pelo envelhecimento, sendo por isso muitas das vezes utilizado como um marcador do envelhecimento, a nível mitocondrial. Mutações causadas pelos estados de stresse oxidativo associados ao envelhecimento, ao nível dos genes presentes no mtDNA responsáveis pela codificação de algumas das subunidades deste complexo são uma das possíveis causas da depleção verificada (Ventura *et al.*, 2002; Bratic e Larsson, 2013). Para além disto, a diminuição

observada poderá também ser consequência de uma diminuição dos níveis de transcrição e de translação deste complexo na mitocôndria, ou ainda a ocorrência de uma redução da disponibilidade de equivalentes redutores, como o NADH (Kumaran *et al.*, 2004; Ajith *et al.*, 2009).

O aumento de atividade do complexo I verificado ao longo da idade nas amostras por nós utilizadas não segue o padrão tipicamente apresentado pela maioria dos poucos estudos existentes onde são utilizados os animais de elevada idade. Ventura e colaboradores (2002) observaram uma diminuição da atividade deste complexo, nas frações mitocondriais hepáticas de ratos Wistar com 120 semanas de idade comparativamente com animais com 16 semanas de vida. No entanto, Laurent e colaboradores (2012), utilizando o mesmo modelo animal, observaram um aumento do complexo I entre animais com 4 e 76 semanas. Os resultados apresentados por Laurent vão de encontro aos por nós obtidos, o que pode ser explicado pela proximidade de idades entre os animais com a maior idade.

Estes estudos parecem mostrar que o aumento da idade não tem um efeito linear na atividade deste complexo ao nível das mitocôndrias hepáticas, o que pode justificar algumas das discordâncias existentes na literatura, uma vez que são utilizados animais com grandes diferenças de idade, mas na maioria das vezes os utilizados já se encontram em senescência.

O treino de intensidade moderada não só provoca uma modulação redox, como também leva a uma alteração a diferentes níveis do fenótipo mitocondrial. Segundo a teoria de *mitohormesis*, o treino atua como um estímulo ao nível da mitocôndria levando à emissão de sinais, na forma de ROS ou outros metabolitos mitocondriais, que irão atuar como sinalizadores provocando a ativação de determinadas vias metabólicas que, posteriormente, acabarão por levar a uma melhoria da função mitocondrial, e da célula em geral (Merry e Ristow, 2015). Uma destas melhorias verificadas face a este estímulo é o aumento da atividade dos complexos mitocondriais, promovendo assim um transporte de eletrões mais eficiente, reduzindo o teor de ROS consequente deste processo, o que poderá evitar a existência de estados de stresse oxidativo (Santos-Alves *et al.*, 2015).

O plano de exercício por nós proposto, quando praticado até a uma idade jovem não provocou qualquer alteração ao nível da atividade do complexo I, o que indica que o estímulo não foi suficiente para provocar a emissão de um sinal suficientemente forte que levasse a uma resposta a nível mitocondrial. Apenas quando praticado até à meia idade, ou seja, durante 54 semanas, provocou uma alteração estatisticamente significativa, levando a uma diminuição da atividade deste complexo.

Um estudo publicado por Navarro e colaboradores (2003) mostrou a ausência de qualquer alteração ao nível da atividade do complexo I ao nível do fígado de ratos Wistar, face a um plano de exercício de corrida em *treadmill* com a duração de 50 semanas, 7 dias/semana durante 15 minutos com um aumento gradual da intensidade (10-20 cm/s), onde no momento do sacrifício os animais tinham 78 semanas de idade. Contrariamente a estes resultados, um estudo realizado por Sun e colaboradores (2010) mostrou um aumento significativo na atividade deste complexo no mesmo tipo de amostras. No entanto, o plano de exercício consistia em 4 semanas de treino a intensidade moderada e 4 semanas de treino a alta intensidade. Assim, aparentemente, as flutuações no consumo de oxigénio, provocadas pela prática de diferentes tipos de exercício, têm mais efeito ao nível da cadeia respiratória, pelo menos no complexo I, do que propriamente o tempo de treino, como defendem alguns autores (Bishop *et al.*, 2014).

Desta forma, a depleção observada no complexo I face ao treino por nós proposto poderá ser entendida como consequência da ausência de alterações significativas ao nível da intensidade e duração em cada sessão do exercício o que levará a uma diminuição do estímulo provocado por estes parâmetros a nível mitocondrial, fazendo assim com que não existissem oscilações no consumo de oxigénio que poderão estar por detrás da estimulação da atividade deste complexo face à prática em questão e o tempo de treino não compensou a ausência destas oscilações.

Apesar das tendências observadas nas diferentes publicações sobre a avaliação da função mitocondrial face aos fatores envelhecimento e treino, o número de estudos a nível hepático ainda é reduzido e os resultados são variáveis. As diferenças entre resultados podem dever-se ao facto das avaliações das atividades dos diferentes componentes da CTE envolverem o isolamento da mitocôndria do seu meio nativo, à possível diferente atividade das diferentes subpopulações de mitocôndrias existentes ao nível dos diferentes órgãos e tecidos, e até aos diferentes dadores/recetores de eletrões utilizados para avaliar a atividade destas enzimas (Tatarková *et al.*, 2011; Duicu *et al.*, 2013).

4.3.1.3 Complexo II

O complexo II, ou succinato desidrogenase, para além de ser um dos complexos da cadeia transportadora de eletrões, é ainda uma das enzimas responsáveis pela catálise das reações finais do ciclo de Krebs (Navarro e Boveris, 2007). É responsável pela catálise da

oxidação do succinato a fumarato utilizando FAD como aceitador de hidrogénio, em vez de NAD^+ , ocorrendo a formação de poder redutor sob a forma de FADH_2 (Berg *et al.*, 2012).

Contrariamente ao que ocorre ao nível dos restantes complexos, a atividade deste complexo não resulta no bombeamento de prótons para o espaço intermembranar, não contribuindo assim para a formação do gradiente eletroquímico (Kadenbach, 2003).

Os resultados apresentados na figura 18, representam a atividade do complexo II obtida nas frações mitocondriais hepáticas.

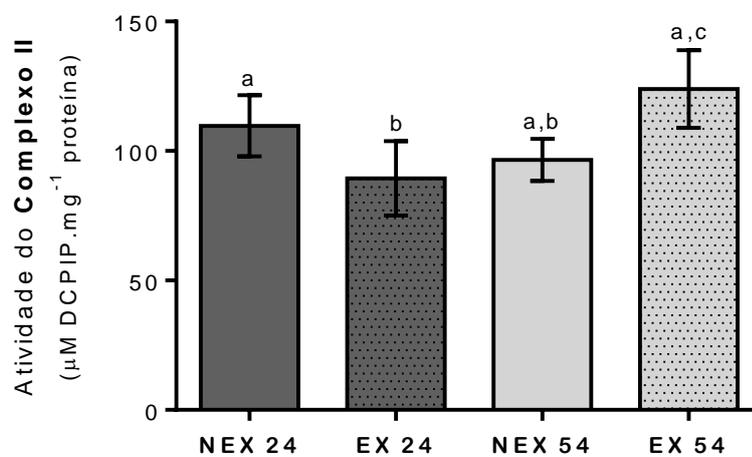


Figura 18 - Atividade do **Complexo II, succinato desidrogenase**, em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras iguais não apresentam diferenças significativas, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferenças significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições.

Os resultados obtidos para a atividade do complexo II mostraram que a idade parece influenciar a atividade deste complexo ainda que a ligeira diminuição entre o grupo dos animais de meia idade e jovens não exercitados não sejam estatisticamente significativas ($p=0,197$ para NEX24 vs NEX54).

Curiosamente, o exercício praticado durante 24 ou 54 semanas teve efeitos opostos na atividade do complexo II, ao nível hepático. Enquanto o treino durante 24 semanas, ou seja, praticado até a uma idade jovem levou a uma diminuição de 18% comparativamente com os animais não exercitados da mesma idade, o exercício praticado durante 54 semanas provocou um aumento de atividade de cerca de 22%, comparativamente com os animais de meia idade

não exercitados. Em ambos os casos, as alterações foram estatisticamente significativas ($p=0,0097$ para NEX24 vs EX24, $p=0,0005$ para NEX54 vs EX54).

Estudos realizados em diferentes tecidos indicam que o complexo II é o componente da CTE que aparenta ser menos afetado pelo processo de envelhecimento. Uma das possíveis justificações para este padrão de resultados, poderá assentar no facto de nenhuma das subunidades deste complexo ser codificada pelo mtDNA, pois o mtDNA é mais afetado pelo dano oxidativo do que o nDNA, e como tal poderá ser mais afetado pelos estados de stresse oxidativo associados ao processo de envelhecimento. Assim, o facto do complexo II ser apenas codificado pelo nDNA e este ser menos suscetível a danos, poderá explicar a menor alteração em relação às consequências do envelhecimento (Kumaran *et al.*, 2004).

Os resultados por nós obtidos para a influência do aumento de idade na atividade do complexo II estão de acordo com a tendência apresentada nos trabalhos referidos, uma vez que existiu uma ligeira diminuição da atividade, apesar de não ser estatisticamente significativa. Um estudo realizado por Kwong e colaboradores (2000) mostrou este mesmo padrão de resultados num modelo animal com 56 semanas de idade comparativamente a animais com 14 semanas de idade. Alguns trabalhos onde são utilizados animais já em senescência apresentam diminuições estatisticamente significativas neste complexo, a nível hepático. Arivazhagan e colaboradores (2001) mostraram uma diminuição da atividade desta enzima num modelo animal semelhante com 88 semanas, comparativamente com animais com 16 semanas de vida. Assim, o facto dos animais de maior idade utilizados no nosso estudo não se encontrarem em senescência também poderá justificar a ligeira diminuição observada.

O complexo II, tal como ocorria face ao envelhecimento, aparenta ser o complexo que menos alterações apresenta como resultado da prática de exercício físico. O protocolo de exercício por nós imposto, quando praticado durante 24 semanas provocou uma depleção da atividade desta enzima. No entanto, com as 54 semanas de treino, obtivemos um resultado inverso, sendo a diminuição da atividade deste complexo, resultante da idade, foi revertida pela prática do plano de exercício imposto.

Contrariamente aos resultados por nós apresentados, Gonçalves e colaboradores (2014) não observaram alterações na atividade do complexo II a nível hepático, face a um plano de exercício com duração de 8 semanas, 5 dias/semana, tendo sido a intensidade e a duração aumentados gradualmente até se atingirem valores de 15m/min e 60 minutos/dia, respetivamente. Estes resultados são corroborados pela maioria dos estudos desta natureza realizados em amostras de fígados (Sun *et al.*, 2010). No entanto, Silva e colaboradores (2009)

mostraram um aumento da atividade deste complexo, no músculo esquelético, num modelo animal com um plano de exercício semelhante e com a mesma duração de 8 semanas. Estes dois resultados, parecem indicar que para ocorrerem alterações na atividade do complexo II pelo treino ao nível do fígado é necessário um maior tempo de treino do que para ocorrer o mesmo efeito ao nível do músculo esquelético. Assim, parece ser o tempo de treino o parâmetro que mais influência terá na atividade do complexo II, pelo menos no fígado.

Os resultados por nós apresentados também indicam que, aparentemente, o efeito do exercício não é totalmente linear ao longo do tempo, uma vez que com 24 semanas de treino ocorreu uma depleção na atividade, enquanto que nas 54 semanas tivemos um aumento. Este resultado poderá dever-se ao facto de às 24 semanas ainda não se terem desenvolvido mecanismos adaptativos, e assim, o aumento da produção de ROS associado à prática de exercício poderá estar a provocar a inibição desta enzima, o que vai de encontro aos resultados por nós apresentados previamente na avaliação da função antioxidante. As 24 semanas poderão não ser suficientes para que ocorra um modelamento deste complexo, cujos genes estão localizados no núcleo.

Desta forma, com base nos nossos resultados, o complexo I e II apresentam respostas distintas tanto em relação ao envelhecimento como à prática de exercício ao longo da vida, pelo menos a nível hepático. Estas diferenças mostram que, aparentemente, a resposta a estes estímulos é regulada por vias metabólicas que não parecem encontrar-se interligadas. Enquanto que a prática de exercício com uma intensidade moderada, durante 54 semanas, parece ser suficiente para que ocorra um aumento na atividade do complexo II contrariando e, provavelmente, prevenindo a diminuição observada com a idade, no complexo I ocorre o inverso.

4.3.1.4 Complexo IV

O complexo IV é o catalisador final da cadeia respiratória, sendo responsável pela redução do oxigénio molecular a água, num processo que utiliza quatro prótons provenientes da matriz mitocondrial e quatro eletrões provenientes do citocromo *c* (Navarro e Boveris, 2007; Berry *et al.*, 2018). Tal como o complexo I, as diferentes subunidades deste complexo não são todas codificadas pelo nDNA. O mtDNA é responsável pela codificação de 3 subunidades das 13 que constituem o complexo IV nos mamíferos, enquanto as restantes são codificadas pelo nDNA (Srinivasan e Avadhani, 2012).

Em condições fisiológicas normais, a atividade deste complexo atua como reguladora da atividade da cadeia transportadora de elétrons e, para além disto, a sua atividade é ainda um dos indicadores da capacidade oxidativa celular (Srinivasan e Avadhani, 2012).

Os resultados obtidos para a atividade do complexo IV nas frações mitocondriais hepáticas encontram-se representados na figura 19.

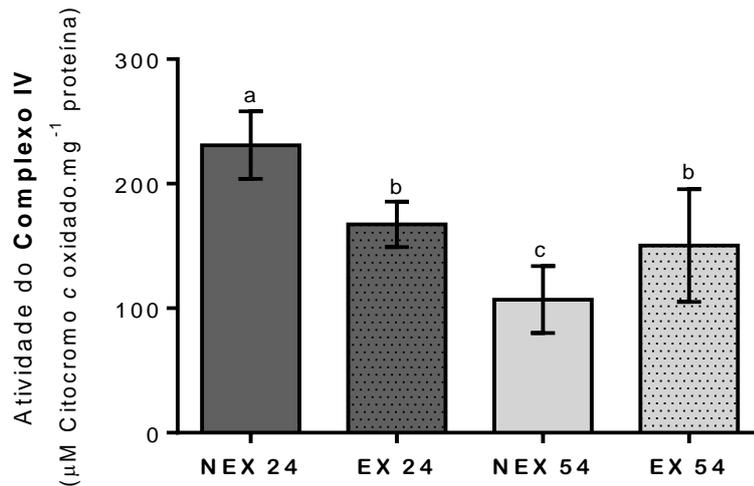


Figura 19 - Atividade do **Complexo IV, citocromo c oxidase**, em amostras de fígado obtidas de animais submetidos a um plano de exercício físico ao longo da vida. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras diferentes apresentam diferenças significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições

A avaliação da atividade do complexo IV mostrou que o aumento da idade provocou uma diminuição de 54% do teor do complexo IV nos animais de meia idade, comparativamente com os animais jovens, sendo esta diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,0001$ para NEX 24 vs NEX54).

O plano de exercício por nós implementado pareceu ter diferentes efeitos ao nível dos animais que o praticaram até uma idade jovem e dos animais que o praticaram até à meia idade. Nos animais exercitados até à idade jovem, ou seja, durante 24 semanas, houve uma diminuição significativa de 30% da atividade do complexo IV comparativamente aos animais jovens não exercitados ($p = 0,0082$ para NEX24 vs EX24). Contrariamente, nos animais que praticaram exercício até à meia idade, ou seja, durante 54 semanas, verificou-se um aumento de 29%, comparativamente com os animais da mesma idade não exercitados, sendo este aumento estatisticamente significativo ($p = 0,0493$ para NEX54 vs EX54).

O complexo IV, tal como o complexo I, é um dos componentes da CTE mais afetado pelas consequências do envelhecimento, o que faz com que alterações ao nível da sua atividade possam ser consideradas um marcador do envelhecimento mitocondrial, juntamente com a avaliação da atividade do complexo I (Navarro e Boveris, 2007). Um dos estudos realizados por Navarro e colaboradores (2004) apresentou uma diminuição da atividade do complexo IV a nível hepático de ratos Wistar do sexo masculino com 92 semanas de idade, comparativamente com animais com 28 semanas. Kumaram e colaboradores (2004) mostraram também este padrão de resultados ao nível da fração mitocondrial isolada de músculo esquelético e de músculo cardíaco, num modelo animal numa estirpe idêntica à referida anteriormente. Os resultados por nós apresentados estão de acordo com estas investigações, uma vez que o aumento da idade provocou uma diminuição da atividade do complexo IV.

Segundo os resultados por nós obtidos, o complexo IV aparenta ser afetado de forma distinta relativamente ao complexo I, uma vez que às 62 semanas de idade a atividade do complexo IV diminui, enquanto que a do complexo I aumenta. No entanto, na maioria dos estudos já publicados não se verifica esta diferença. Tipicamente, ambos os complexos apresentam uma depleção com a idade. No entanto, isto poderá ser devido ao facto dos estudos em que foi avaliada a atividade de ambos os complexos, em função da idade, utilizarem maioritariamente animais em senescência, onde ambas as atividades dos complexos já poderão refletir os efeitos deletérios associado ao envelhecimento.

O plano de exercício, quando praticado durante 24 semanas, por nós imposto provocou uma diminuição da atividade ao nível do complexo IV. No entanto, com o decorrer do tempo verificou-se que a atividade deste complexo ainda que tenha sofrido uma diminuição face ao treino durante 24 semanas, o treino durante 54 semanas provocou um aumento de atividade comparativamente com o grupo de animais da mesma idade não exercitado. Assim, o exercício continuado, no nosso caso durante 54 semanas, parece prevenir, pelo menos em parte, o decréscimo desta atividade associada à idade.

Ao nível do músculo esquelético, o tecido maioritariamente estudado na área, os estudos realizados parecem ser, no geral, concordantes relativamente à alteração da atividade do complexo IV face ao treino de intensidade moderada, mostrando um aumento desta atividade face a este estímulo (Parise *et al.*, 2005). No entanto, já os estudos realizados no fígado não apresentam a mesma tendência. Lezi e colaboradores (2013) não observaram qualquer alteração na atividade do complexo IV a nível hepático face a um protocolo de exercício com duração de 6 semanas, 5 dias/semana, 45 minutos/dia, com uma intensidade de 18m/min. Estes resultados

são corroborados por alguns estudos a nível hepático, face a um plano de exercício equiparável, com uma duração semelhante (Gonçalves *et al.*, 2014). No entanto, quando um plano de exercício semelhante é praticado durante 50 semanas já se verifica um aumento de atividade do complexo IV, tal como é mostrado num dos estudos realizado por Navarro e colaboradores (2003). Um estudo realizado por Sun e colaboradores (2010) onde é imposto um exercício misto, ou seja, é praticada corrida de intensidade moderada e de alta intensidade, verificou-se um aumento da atividade do complexo IV, em apenas 8 semanas de treino.

Desta forma, parece que flutuações no consumo de oxigénio provocadas pelas oscilações na intensidade do treino, terão um efeito positivo na atividade do complexo IV. No plano de exercício por nós imposto não ocorreram estas oscilações, no entanto o tempo de treino mais prolongado (54 semanas), parece compensar a ausência das oscilações referidas, pois o treino com esta duração provocou um aumento estatisticamente significativo na atividade deste complexo. Logo, a atividade aumentada do complexo IV face a este período de treino poderá ser entendida como uma consequência de um processo adaptativo ao treino a longo prazo.

Alguns autores defendem que o consumo de oxigénio a nível hepático, durante o exercício, é baixo, uma vez que o fluxo sanguíneo nesse órgão, aquando desta prática, é também menor (Ascensão *et al.*, 2013). Desta forma, a depleção observada com o treino durante 24 semanas pode ser explicada pelo facto de este tempo de treino não parecer ser o suficiente para desencadear mecanismos adaptativos face à prática de exercício, tal como observamos previamente, daí esta diminuição poder ser uma consequência das ROS provocadas pelo exercício, uma vez que com este período de treino poderão não estar ainda desenvolvidos os mecanismos de adaptação na sua totalidade.

Alterações ao nível da atividade do complexo IV dependem, muitas das vezes da atividade dos complexos que se encontram anteriormente posicionados na CTE. Sendo o complexo I o componente inicial da CTE, diminuições na sua atividade poderão influenciar a atividade dos restantes complexos. Por exemplo, uma diminuição ao nível da atividade do complexo I irá resultar numa diminuição do fluxo de eletrões do NADH para o O₂, através de toda a CTE (Ajith *et al.*, 2009). No entanto, tal como referido anteriormente, a atividade do complexo IV atua como reguladora da atividade de toda a CTE (Srinivasan e Avadhani, 2012). Tendo isto em conta, é de esperar que as atividades dos complexos mitocondriais, em situações fisiológicas normais, apresentem atividades relativamente semelhantes devido a este controlo realizado tanto pelo complexo I como pelo IV.

No entanto, a atividade dos complexos pertencentes à CTE parece ser controlada de forma distinta face a diferentes estímulos. Os resultados por nós obtidos neste estudo parecem corroborar esta informação, uma vez que para estímulos iguais obtivemos respostas diferentes no complexo I e IV. Por sua vez, o complexo II apresentou um padrão de resultados semelhante ao do complexo IV, o que pode indicar que as vias metabólicas que regulam a atividade destes complexos estão interligadas, podendo esta ligação justificar as semelhanças no comportamento destas enzimas face aos diferentes estímulos que estamos a avaliar.

4.3.2 Avaliação da atividade respiratória mitocondrial

A respiração mitocondrial é um processo dependente de um fluxo contínuo de substratos e produtos através das membranas mitocondriais que delimitam a matriz e o espaço intermembranar. Assim, diferentes substratos, inibidores e desacopladores são utilizados para a avaliação de todo o funcionamento deste processo (Berry *et al.*, 2018).

Experimentalmente, podem ser definidos 5 estados respiratórios mitocondriais. *In vivo*, apenas dois destes estados podem ocorrer, o estado 3 e o estado 4. O estado 4 é caracterizado por níveis de ADP muito baixos, o que leva a que a produção de ATP seja praticamente nula. Desta forma, este estado é caracterizado por uma atividade respiratória baixa, sendo a VO_2 maioritariamente dependente do *leak* de prótons existente. Por sua vez, o estado 3, obtido *in vitro*, é caracterizado por existirem concentrações saturantes de ADP, adicionado exogenamente, o que provoca uma taxa de produção de ATP elevada e, conseqüentemente, um aumento da atividade respiratória. Quando todo o ADP é esgotado, consequência do processo de fosforilação oxidativa, a mitocôndria transita para o estado respiratório 4 (Kadenbach, 2003; Korzeniewski, 2015). O estado 3, fisiologicamente, é aquele em que a mitocôndria se encontra em situações de uma maior demanda de ATP. No entanto, a maioria do tempo a mitocôndria encontra-se no estado 4 (Korzeniewski, 2015).

Os resultados obtidos para a respiração mitocondrial, em estado 4, em homogeneizado de fígado de ratos encontram-se representados na figura 20.

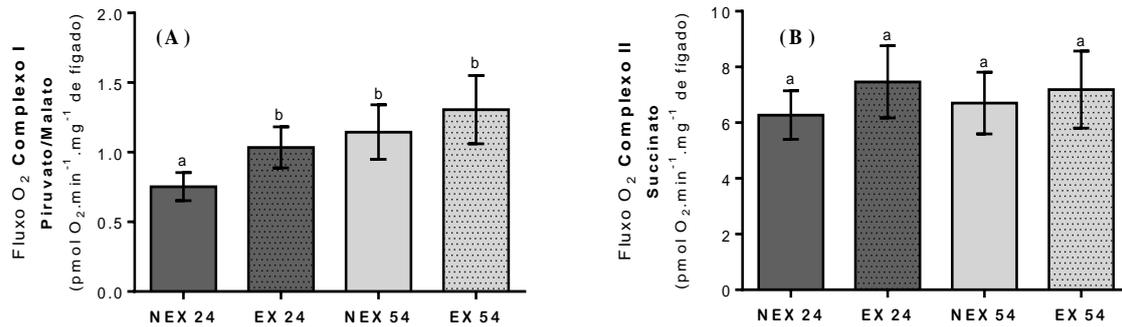


Figura 20 - Efeito da idade e do exercício praticado ao longo da vida na **respiração mitocondrial, em estado 4**, em mitocôndrias hepáticas energizadas com piruvato/malato (A) e succinato (B), depois de adicionado rotenona. Resultados obtidos nos diferentes 4 grupos: **NEX 24** (não exercitados jovens – sacrifício às 24 semanas de exercício), **EX 24** (exercitados até idade jovem – sacrifício às 24 semanas de exercício), **NEX 54** (não exercitados meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício), **EX 54** (exercitados até à meia idade – sacrifício às 54 semanas de exercício). Na figura, barras com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados apresentam valores médios \pm SD (n=7), com duas repetições.

A respiração mitocondrial, em estado 4, suportada pelo complexo I, mostrou que a idade provocou um aumento, de cerca de 27%, do consumo de oxigénio ao nível da mitocôndria hepática, sendo este aumento estatisticamente significativo ($p=0,0021$ para NEX24 vs NEX54). O protocolo de exercício por nós aplicado, no geral, levou a um aumento da respiração suportada pelo complexo I. O treino com a duração de 24 semanas, ou seja, até uma idade jovem, levou a um aumento de 34% da taxa respiratória, comparativamente com os animais da mesma idade não exercitados, sendo este aumento estatisticamente significativo ($p=0,0321$ para NEX 24 vs EX54). O treino durante 54 semanas teve este mesmo efeito, no entanto o aumento provocado não foi estatisticamente significativo ($p= 0,384$ para NEX54 vs EX54).

O aumento da idade não teve qualquer efeito estatisticamente significativo na atividade respiratória quando as mitocôndrias foram energizadas com succinato ($p=0,932$ para NEX24 vs NEX54). Por sua vez o exercício físico a longo prazo, tanto durante 24 semanas como durante 54 semanas, levou a um aumento da taxa respiratória em 23% e 15%, respetivamente. No entanto, este incremento não foi estatisticamente significativo para nenhum dos casos ($p=0,350$ para NEX24 vs EX24, $p=0,899$ para NEX54 vs EX54).

Existe alguma controvérsia na literatura da especialidade face à variação da capacidade respiratória mitocondrial com o aumento da idade, principalmente ao nível dos principais órgãos metabólicos. Num estudo realizado em mitocôndrias cardíacas isoladas de ratos Sprague-Dawley com 88 semanas de vida, comparativamente com animais de 22 semanas de idade, Duici e colaboradores (2013) observaram uma diminuição na velocidade da respiração,

em estado 4, tanto quando estas foram energizadas com glutamato/malato como com succinato (Duicu *et al.*, 2013). No entanto, um estudo realizado por Gilmer e colaboradores (2010) mostrou a ausência de alterações ao nível da atividade respiratória suportada pelo complexo I e também na respiração suportada pelo complexo II, a nível cerebral, em ratos Fischer 344 do sexo masculino com 92 semanas de vida comparativamente a animais com 12 semanas de vida.

Já no fígado, segundo um estudo realizado por Baratli e colaboradores (2014) a respiração suportada pelo complexo II não parece sofrer qualquer alteração em animais com 72 semanas de idade, comparativamente com ratos de 12 semanas de vida. Delaval e colaboradores (2004) também não observaram, a nível hepático, qualquer alteração estatisticamente significativa ao nível da respiração suportada pelo complexo I num modelo animal semelhante.

Apesar desta controvérsia, é do conhecimento geral que existe alguma disfunção mitocondrial associada ao processo de envelhecimento. Esta disfunção é caracterizada por um decréscimo da taxa respiratória em estado 3, uma alteração do potencial de membrana e um aumento da respiração, em estado 4. Estas alterações encontram-se associadas a um aumento da produção de ROS. Este aumento dos ROS associados à idade poderá provocar ainda mais danos, o que irá acentuar ainda mais a disfunção observada (Navarro e Boveris, 2007).

No estudo por nós realizado verificou-se um aumento da velocidade de respiração com o aumento da idade, quando a respiração é suportada pelo complexo I. No entanto, a avaliação da respiração suportada pelo complexo II não apresentou qualquer alteração com o envelhecimento. O aumento da velocidade de consumo de oxigénio em estado 4 poderá ser interpretada como um maior desacoplamento ao nível do processo respiratório (Schoepe *et al.*, 2012). O facto da atividade enzimática do complexo I se encontrar bastante aumentada nos animais mais velhos comparativamente com os animais jovens, tal como foi previamente mostrado por nós, leva a que ocorra um aumento na entrada de eletrões na CTE ao nível deste complexo, o que poderá justificar o aumento da taxa respiratória dependente do complexo I. O inverso é também observado por outros autores que utilizaram animais com idades superiores aos utilizados no nosso estudo, e que verificaram uma diminuição da respiração, acompanhada pela diminuição na atividade do complexo em questão, ainda que em algumas situações não tenha sido estatisticamente significativa a diferença observada (Schoepe *et al.*, 2012).

No entanto, é de notar que a velocidade de respiração é diretamente dependente da massa mitocondrial do órgão ou tecido em questão. Os resultados por nós obtidos na citrato sintase indicam claramente uma diminuição do conteúdo mitocondrial hepática com a idade. Apesar disto, a taxa respiratória por nós avaliada ao nível dos dois complexos não seguiu esta

tendência. Assim, o aumento da velocidade respiratória dependente do complexo I verificado com o aumento da idade, por nós observado, em estado 4, não acompanhou a depleção do número de mitocôndrias. Desta forma, o aumento da respiração em estado 4 poderá ser indicativo de um maior estado de desacoplamento, o que poderá estar associado a uma maior produção de ROS a nível mitocondrial. Já a avaliação da atividade respiratória suportada pelo complexo II, apesar de não ter sido encontrada qualquer diferença estatisticamente significativa com o aumento da idade, parece estar positivamente correlacionada com a atividade da citrato sintase.

Ao nível do músculo esquelético, o exercício físico está associado a uma maior demanda de ATP. Esta maior necessidade energética faz com que as mitocôndrias musculares deixem de estar no estado respiratório 4 e transitem para o estado 3 de forma a que seja possível cumprir estas necessidades. Esta transição leva a um maior acoplamento entre a respiração mitocondrial e o processo de fosforilação do ADP, tornando-se todo este processo mais eficiente. Este aumento da eficácia traduz-se numa diminuição da produção de ROS ao nível da CTE (Barja, 2007; He *et al.*, 2016). No fígado, desconhece-se se este tipo de exercício físico poderá provocar o mesmo tipo de alterações na respiração mitocondrial, uma vez que os estudos realizados ao nível deste órgão, face a um plano de exercício, são em número muito reduzido, não permitindo ainda chegar a uma conclusão. No nosso estudo, a atividade respiratória em estado 4, face ao treino durante 24 e 54 semanas, apresentou um ligeiro aumento, tanto quando a mitocôndria foi energizada com piruvato/malato como com succinato. No entanto, este aumento só se apresentou estatisticamente significativo para a respiração suportada pelo complexo I. Este ligeiro aumento poderá ser uma consequência da demanda energética, a nível hepático, que estará associado ao exercício físico.

Os resultados por nós obtidos na avaliação da respiração mitocondrial, pelo menos na respiração suportada pelo complexo II, vão de encontro a alguns estudos realizados a nível do fígado assim como de outros órgãos, publicados por outros investigadores, face a um plano de exercício semelhante, com exceção da duração. Fletcher e colaboradores (2014) não verificaram qualquer alteração na velocidade da respiração mitocondrial hepática, em estado 4, em ratos Sprague-Dawley, face a um plano de exercício de intensidade moderada com uma duração de 4 semanas. Um estudo realizado por Lumini-Oliveira (2011) também não registou alterações na respiração mitocondrial, a nível cardíaco, face a um protocolo de exercício que teve a duração de 14 semanas, 5 dias/semana, 60 min/dia a uma velocidade de 25 m/min.

Já na avaliação da respiração suportada pelo complexo I em função do treino, os nossos resultados mostram algumas diferenças comparativamente com os estudos referidos. No primeiro sacrifício, ou seja, às 24 semanas de treino verificamos um aumento estatisticamente significativo na respiração, em estado 4, suportada pelo complexo I, comparativamente com os animais da mesma idade não exercitados. O treino de 54 semanas provocou igualmente um ligeiro aumento da respiração, sendo mantida a tendência verificada com as 24 semanas de treino. O aumento da respiração no estado 4 pode de alguma forma estar relacionado com um maior desacoplamento o que levará a uma menor eficácia do processo de fosforilação oxidativa, tal como já foi referido (Schoepe *et al.*, 2012). No entanto, segundo os resultados por nós previamente apresentados, a prática de exercício físico tanto às 24 como às 54 semanas, provocou um aumento na atividade da citrato sintase, o que é indicativo de um aumento no teor mitocondrial, sendo este estatisticamente significativo às 54 semanas de treino. Assim, o aumento da taxa respiratória suportada pelo complexo I, não terá resultado dum aumento do grau de desacoplamento, mas sim do aumento da massa mitocondrial.

Desta forma, o estudo por nós proposto parece indicar que a duração do treino, além de ser essencial para a melhoria de alguns parâmetros da função mitocondrial, tal como mostramos previamente, também parece influenciar a respiração mitocondrial hepática. Segundo a literatura, as variações de intensidade parecem ser aquilo que provocará maiores alterações no processo de respiração (Radak *et al.*, 2013). No entanto, no plano de exercício por nós utilizado, mostra que apesar da intensidade ser mantida num nível moderado, o tempo de duração de treino parece compensar a ausência de grandes oscilações na intensidade, pelo menos no desenvolvimento de mecanismos adaptativos a nível da respiração mitocondrial.

Os resultados por nós obtidos ao nível da respiração mitocondrial mostram que o exercício físico parece prevenir o desacoplamento observado com o aumento da idade, o que possivelmente resultará numa maior eficácia no processo de fosforilação do ADP, como consequência de uma respiração mais eficaz, principalmente quando o treino é mantido durante 54 semanas. No entanto, não podemos avaliar com toda a certeza o estado de acoplamento entre o processo de respiração e fosforilação do ADP, uma vez que esta avaliação apenas seria possível se tivesse sido avaliado o estado de respiração 3.

4.4. Efeito da prática de exercício a longo prazo no processo de envelhecimento

O envelhecimento é associado a diversos processos degenerativos que, devido à acumulação de danos moleculares e celulares, acabam por levar a uma perda progressiva da capacidade de resposta a determinados estímulos (Giorgi *et al.*, 2018). Segundo alguns autores, a mitocôndria tem um papel central em todo este processo, uma vez que o dano provocado neste organelo ao longo da vida pelas ROS produzidas no normal metabolismo é apontada como uma das causas do envelhecimento (Harman, 1972; Cui *et al.*, 2012).

O exercício físico tem ganho cada vez mais relevância, como uma possível solução, para a prevenção de possíveis consequências do envelhecimento ao nível dos diferentes órgãos. Há cada vez mais estudos que associam esta prática a uma melhoria na função antioxidante e mitocondrial, duas das funções que são maioritariamente afetadas com o aumento da idade. Vários investigadores associam o treino de intensidade moderada a estas melhorias (Radak *et al.*, 2013; Liguori *et al.*, 2018). No entanto, não está descrito durante quanto tempo este tipo de exercício tem que ser mantido para se desenvolver uma adaptação crónica.

O presente estudo permitiu avaliar o efeito do treino ao longo de toda a vida e como é que este parece atuar na atenuação das consequências do processo de envelhecimento. O facto deste protocolo manter os parâmetros do exercício constantes variando apenas um, permitiu-nos avaliar o seu impacto no desenvolvimento de mecanismos adaptativos ao nível hepático, o que é inovador comparativamente à maioria dos trabalhos existentes na literatura. O tempo da duração do treino foi a variável por nós avaliada, enquanto que os restantes parâmetros do exercício foram mantidos constantes. Na tabela IV encontra-se uma representação geral dos resultados obtidos neste estudo.

No geral, o plano de treino ao longo da vida por nós imposto mostrou-se eficaz em contrariar os efeitos deletérios do envelhecimento ao nível da função mitocondrial e antioxidante, através de uma estimulação de ambas as funções. Segundo os resultados por nós obtidos, o aumento da idade provocou uma ligeira diminuição da massa mitocondrial assim como alguma disfunção ao nível dos complexos da CTE nas mitocôndrias hepáticas. Parte desta disfunção resultou numa menor eficácia da respiração mitocondrial

As alterações referidas estão tipicamente associadas a uma maior produção de ROS ao nível da CTE, o que é tipicamente associado ao aumento da idade. Assim, as mitocôndrias hepáticas parecem encontrar-se ligeiramente afetadas pelo processo inicial de envelhecimento,

apesar dos animais por nós utilizados no momento do último sacrifício, terem 62 semanas de vida e, como tal, não serem considerados velhos.

Tabela IV– Tabela resumo dos resultados obtidos na avaliação da função antioxidante e mitocondrial, em amostras de fígado pertencentes aos animais dos diferentes grupos experimentais, face ao envelhecimento e ao exercício praticado ao longo da vida. A última coluna da tabela, “**exercício na idade**”, representa o efeito que a prática de exercício teve nos efeitos provocados pela idade, tanto na função mitocondrial como na capacidade antioxidante. O **sinal (+)** indica que o exercício provocou uma melhoria nos parâmetros avaliados, comparativamente com os efeitos da idade. O **sinal (-)** indica que o exercício piorou os parâmetros avaliados, comparando com os efeitos da idade.

	Idade	Treino	Exercício na idade
	<i>Função Antioxidante</i>		
SOD	=	↑	+
CAT	↓	↑	+
GPx, GR	↓	↓	-
GST	=	↓	-
Peroxidação lipídica	↑	↓	+
Razão GSH/GSSG	↑	↓	+
	<i>Função Mitocondrial</i>		
Citrato Sintase	↓	↑	+
Complexo I	↑	↓	-
Complexo II	↓	↑	+
Complexo IV	↓	↑	+
Atividade Respiratória	↑	↑	+

É de esperar que esta ligeira disfunção mitocondrial se reflita, em parte, na função antioxidante resultando em alterações que são tipicamente associadas ao envelhecimento. De facto, algumas das enzimas antioxidantes, como a CAT, GPx e a GR, apresentaram uma diminuição de atividade, conseqüente deste processo. No entanto, a SOD e a GST não apresentaram alterações significativas. Para além da depleção enzimática referida, ainda foram observados alguns danos ao nível das membranas celulares. Possivelmente os animais mais velhos por nós utilizados ainda apresentariam alguma capacidade de resposta, o que justifica o facto das conseqüências do envelhecimento não se apresentarem muito notórias comparativamente com outros estudos da especialidade.

Às 24 semanas de treino verificou-se de uma diminuição significativa na atividade do complexo II e IV, o que poderá levar a uma menor eficácia no transporte de elétrons. Assim, esta diminuição de eficácia poderá contribuir, em certa parte, para o aumento observado na produção de ROS. Através da avaliação da função antioxidante, neste momento temporal (24 semanas), verificamos que existe uma produção de ROS significativamente aumentada como consequência do exercício. A atividade enzimática antioxidante de algumas das enzimas apresentou uma diminuição pelo que a capacidade antioxidante endógena não foi suficiente para eliminar as ROS produzidas em consequência do exercício, o que poderá justificar o dano provocado ao nível enzimático. Estas alterações parecem ser indicativas de que o treino não foi mantido durante o tempo suficiente de forma a desenvolver-se uma resposta adaptativa crónica, o que resultou na existência de estados de stresse oxidativo.

O treino durante 54 semanas pareceu estar associado à existência de um processo adaptativo ao nível da mitocôndria e da função antioxidante. Esta prática levou, no geral, a uma maior eficácia da CTE, traduzida por um aumento da atividade do complexo II e IV, apesar de se ter observado um decréscimo da atividade do complexo I. A avaliação da respiração mitocondrial mostrou que esta prática provocou uma maior eficácia no processo de respiração. O aumento da eficácia observado no processo de respiração, estará associado a uma menor produção de ROS a este nível. A função antioxidante, neste momento temporal (54 semanas), encontra-se estimulada e os marcadores de stresse oxidativo mostram que o fígado já não se encontrará num estado de stresse oxidativo consequente da prática de exercício físico, o que indica que já terá ocorrido um processo adaptativo a esta prática.

Assim, o exercício parece provocar primeiramente um efeito nas mitocôndrias hepáticas, fazendo com que estas emitam um sinal, possivelmente na forma de ROS, que servirá como estímulo para o desenvolvimento dos mecanismos de adaptação. No entanto, é necessário manter constantes a existência deste estímulo mais do que 24 semanas para provocar tal efeito. A estimulação referida resultará em alterações ao nível da função antioxidante. Posteriormente, serão também provocadas alterações no fenótipo mitocondrial provocando uma melhoria do funcionamento mitocondrial, alterações que foram observadas às 54 semanas de treino.

Tendo em conta esta informação, parece ser plausível assumir que a partir de certo momento de treino, é necessário um aumento da intensidade do treino, para provocar uma melhoria nos mecanismos adaptativos já desenvolvidos no fígado por esta prática, uma vez que o tempo de treino não compensará totalmente a ausência deste incremento, ou até oscilações, na intensidade do treino. No entanto, o tempo de treino é crucial para que ocorra uma adaptação

a nível mitocondrial, mais especificamente ao nível da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial hepática. Já para uma adaptação do sistema antioxidante parece não ser necessário tanto tempo de treino.

Eventuais alterações nas atividades dos complexos não são observadas em estudos da especialidade onde é avaliado o comportamento do fígado face a um protocolo de exercício de intensidade moderada, possivelmente porque os planos de exercício na maioria dos casos são mantidos entre as 8 e as 16 semanas de treino, o que parece não ser suficiente para ocorrer alterações na mitocôndria (Fletcher *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2014).

Avaliando o efeito do plano de exercício nas consequências provocadas pelo normal processo de envelhecimento a nível hepático, vemos que, no geral, houve um efeito positivo. O treino mantido durante 54 semanas conseguiu atenuar os efeitos do aumento da idade, provocando uma melhoria da função mitocondrial e antioxidante, contrariando as consequências deletérias da idade a este nível.

Capítulo V

Conclusões Finais

V. Conclusões finais

No objetivo deste trabalho foi proposta a avaliação da função hepática geral, assim como da função antioxidante e mitocondrial hepática em função de duas variáveis: o processo de envelhecimento, ou seja, a idade, e um plano de exercício físico aeróbio de intensidade moderada ao longo da vida. Os animais praticaram exercício durante 24 semanas, sendo sacrificados quando tinham 32 semanas de vida (jovens), e os restantes animais praticaram exercício durante 54 semanas, sendo sacrificados quando tinha 62 semanas de vida (meia idade).

Vários investigadores associam a prática de exercício de intensidade moderada ao desenvolvimento de mecanismos adaptativos. No entanto, não está descrito durante quanto tempo o treino tem que ser mantido para se desenvolver uma adaptação crónica maximizada. Estas conclusões têm por base estudos realizados no músculo esquelético, porém a prática de exercício envolve um conjunto de órgãos de forma a que possam ser cumpridas as necessidades energéticas exigidas por esta atividade. No entanto, os estudos da especialidade em que utilizam o fígado são em número reduzido, o que torna difícil tirar alguma conclusão.

O facto deste trabalho permitir uma avaliação do efeito do exercício ao longo da vida, tendo assim em conta o aumento inevitável da idade, torna este trabalho diferenciador dos estudos existentes que avaliam o comportamento hepático face a este estímulo, permitindo-nos observar se, de facto, o exercício poderá atenuar ou até prevenir algumas das consequências do processo de envelhecimento a este nível. Desta forma, o plano de treino por nós proposto permite analisar o efeito do tempo do treino a nível da função mitocondrial e antioxidante, uma vez que esta foi a única variável no plano em questão, tendo sido mantidos constantes os restantes parâmetros do exercício.

A avaliação de diversos biomarcadores da função hepática mostraram que o fígado não sofreu qualquer dano face ao envelhecimento e face ao plano de exercício físico aplicado.

A função antioxidante mostrou uma melhoria face ao treino praticado durante 54 semanas, que foi traduzida por um aumento de atividade das principais enzimas antioxidantes (SOD, CAT) e uma ligeira diminuição do dano lipídico assim como um aumento da razão GSH/GSSG, comparativamente com os efeitos do aumento da idade. Apesar de se terem verificado diminuições estatisticamente significativas ao nível de algumas das enzimas antioxidantes (GPx, GST), a função antioxidante não parece ser diretamente afetada.

A função mitocondrial também apresentou uma melhoria com o treino, relativamente aos efeitos provocados pelo aumento da idade. Esta melhoria traduz-se por um incremento na

massa mitocondrial, assim como uma maior capacidade respiratória mitocondrial. A atividade do complexo I mostrou ser afetada diretamente pela idade, contrariamente ao que ocorreu nas atividades do complexo II e IV. Estes dois complexos foram mais afetados pelo exercício do que pelo processo de envelhecimento, desta forma o exercício conseguiu contrariar, pelo menos em parte, a depleção verificada com a idade.

Os resultados apresentados confirmam que a prática de exercício ao longo da vida provoca uma melhoria da função antioxidante e da função mitocondrial. Apesar de a intensidade ser considerada o principal parâmetro para o desenvolvimento de mecanismos adaptativos, este trabalho mostra que o tempo de treino é essencial para o desenvolvimento de alguns destes processos, principalmente a nível mitocondrial. Desta forma, será plausível assumir que o treino ao longo da vida poderá prevenir algumas das consequências do envelhecimento, podendo funcionar, isoladamente ou como adjuvante de alguma terapia farmacológica, na prevenção de algumas patologias hepáticas associadas com a idade, principalmente as que possam resultar de uma disfunção a nível mitocondrial ou associadas ao stresse oxidativo.

Para além disto, será plausível assumir que a continuidade deste plano de exercício até uma idade mais avançada possa ter efeitos, ainda mais significativos, na prevenção de algumas das consequências do envelhecimento.

Capítulo VI

Referências Bibliográficas

VI. Bibliografia

- Ajith, T. A., Sudheesh, N. P., Roshny, D., Abishek, G. *et al.* (2009) 'Effect of *Ganoderma lucidum* on the activities of mitochondrial dehydrogenases and complex I and II of electron transport chain in the brain of aged rats', *Experimental Gerontology*, 44(3), pp. 219–223.
- Arivazhagan, P., Ramanathan, K. and Panneerselvam, C. (2001) 'Effect of DL- α -lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats', *Chemico-Biological Interactions*, 138, pp. 189–198.
- Armstrong, M. E. G., Green, J., Reeves, G. K., Beral, V. *et al.* (2015) 'Frequent Physical Activity May Not Reduce Vascular Disease Risk as Much as Moderate Activity - Large Prospective Study of Women in the United Kingdom', *Circulation*, 131(8), pp. 721–729.
- Ascensão, A., Martins, M. J., Santos-Alves, E., Gonçalves, I. O. *et al.* (2013) 'Modulation of hepatic redox status and mitochondrial metabolism by exercise: Therapeutic strategy for liver diseases', *Mitochondrion*, 13(6), pp.
- Aydin, A. F., Kuçukgergin, C., Ozdemirler-Erata, G., Koçak-Toker, N. *et al.* (2010) 'The effect of carnosine treatment on prooxidant – antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats', *Biogerontology*, 11, pp. 103–109.
- Baar, K. (2004) 'Involvement of PPAR γ co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR α in the adaptive response to endurance exercise', *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(2), pp. 269–273.
- Baker, L. D., Frank, L. L., Foster-Schubert, K., Green, P. S. *et al.* (2010) 'Aerobic Exercise Improves Cognition for Older Adults with Glucose Intolerance, A Risk Factor for Alzheimer's Disease', *Journal of Alzheimer's Disease*, 22(2), pp. 569–579.
- Baratli, Y., Charles, A., Wolff, V., Tahar, L. B. *et al.* (2014) 'Age Modulates Fe₃O₄ Nanoparticles Liver Toxicity : Dose-Dependent Decrease in Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities and Coupling in Middle-Aged as Compared to Young Rats', *Biomed Research International*, 2014, pp. 1–10.
- Barja, G. (2007) 'Mitochondrial Oxygen Consumption and Reactive Oxygen Species Production are Independently Modulated: Implications for Aging Studies', *Rejuvenation Research*, 10(2), pp. 215–223.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2012) *Biochemistry*. 7th edn. New York: W. H. Freeman and Company.
- Berry, B. J., Trewin, A. J., Amitrano, A. M., Kim, M. *et al.* (2018) 'Use the Protonmotive Force: Mitochondrial Uncoupling and Reactive Oxygen Species', *Journal of Molecular Biology*, 430(21), pp. 3873–3891.
- Berzosa, C., Cebrián, U., Fuentes-Broto, L., Gómez-Trullén, E. *et al.* (2011) 'Acute Exercise Increases Plasma Total Antioxidant Status and Antioxidant Enzyme Activities in Untrained Men', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, pp. 1–7.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. *et al.* (2012) 'Oxidative Stress and Antioxidant Defense', *World Allergy Organization Journal*, 5, pp. 9–19.
- Bishop, D. J., Granata, C. and Eynon, N. (2014) 'Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content?', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(4), pp. 1266–1275.

- Boehm, O., Zur, B., Koch, A., Tran, N. *et al.* (2007) ‘Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice’, 388, pp. 547–554.
- Boström, P. A., Graham, E. L., Georgiadi, A., Ma, X. *et al.* (2013) ‘Impact of exercise on muscle and nonmuscle organs’, *IUBMB Life*, 65(10), pp. 845–850.
- Brand, M. D. (2010) ‘The sites and topology of mitochondrial superoxide production’, *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc., 45, pp. 466–472.
- Bratc, A. and Larsson, N. (2013) ‘The role of mitochondria in aging’, *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), pp. 951–57.
- Bresciani, G., da Cruz, I. B. M. and González-Gallego, J. (2015) ‘Manganese Superoxide Dismutase and Oxidative Stress Modulation’, *Advances in Clinical Chemistry*, 68, pp. 87–130.
- Cahill, A., Hershman, S., Davies, A. and Sykora, P. (2005) ‘Ethanol feeding enhances age-related deterioration of the rat hepatic mitochondrion’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289, pp. 1115–1123.
- Carlberg, I. and Mannervik, B. (1985) ‘Glutathione reductase’, in *Methods in Enzymology*, pp. 484–490.
- Caspersen, C. J., Powell, K. e Christenson, G. M. (1985) ‘Physical Activity, Exercise, and Physical Fitness : Definitions and Distinctions for Health-Related Research’, *Public Health Reports*, 100(2), pp. 126–130.
- Chae, C. H., Shin, C. H. e Kim, H. T. (2008) ‘The combination of α -lipoic acid supplementation and aerobic exercise inhibits lipid peroxidation in rat skeletal muscles’, *Nutrition Research*, 28(6), pp. 399–405.
- Che, M., Wang, R., Li, X., Wang, H. *et al.* (2016) ‘Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer’, *Drug Discovery Today*, 21(1), pp. 143–149.
- Chiang, J. (2014) ‘Liver Physiology: Metabolism and Detoxification’, in *Pathobiology of Human Disease*, pp. 1770–1782.
- Cichoż-Lach, H. e Halina, A. M. (2014) ‘Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases’, *World Journal of Gastroenterology*, 20(25), pp. 8082–8091.
- Cieslak, K. P., Baur, O., Verheiji, J., Bennink, R. J. *et al.* (2016) ‘Liver function declines with increased age’, *Hepato-Pancreato-Biliary (HPB)*, 18(8), pp. 691–696.
- Çoban, J., Öztezcan, S. e Dog, S. (2014) ‘Olive leaf extract decreases age-induced oxidative stress in major organs of aged rats’, *Geriatrics Gerontology Internacional*, 14 (4) pp. 1–7.
- Colcombe, S. J., Erickson, K. I., Scalf, P. E., Kim, J. S. *et al.* (2006) ‘Aerobic Exercise Training Increases Brain Volume in Aging Humans’, *Journal of Gerontology*, 61(11), pp. 1166–1170.
- Cui, H., Kong, Y. e Zhang, H. (2012) ‘Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging’, *Journal of Signal Transduction*, 2012, pp. 1–13.
- Davies, K. J. A., Quintanilha, G. A. B. e Packer, L. (1982) ‘Free radicals and tissue damage produced by exercise’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107(4), pp. 1198–1205.
- Delaval, E., Perichon, M. e Friguet, B. (2004) ‘Age-related impairment of mitochondrial matrix

- aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart', *European Journal of Biochemistry*, 271, pp. 4559–4564.
- Dillard, C. J., Litov, R. E., Savin, W. M., Dumelin, E. E. *et al.* (1978) 'Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation', *Journal of Applied Physiology*, 45(6), pp. 927–932.
- Dorn, G. W. (2015) 'Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change' *EMBO Molecular Medicine* 7, pp 865-877.
- Duicu, O. M., Mirica, S. N., Gheorgheosu, D. E., Privistirescu, A. I. *et al.* (2013) 'Ageing-induced decrease in cardiac mitochondrial function in healthy rats', *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91, pp. 1–8.
- Ellis, C. E., Murphy, E. J., Mitchell, D. C., Golovko, M. Y. *et al.* (2005) 'Mitochondrial Lipid Abnormality and Electron Transport Chain Impairment in Mice Lacking α -Synuclein \dagger ', *Molecular and Cellular Biology*, 25(22), pp. 10190–10201.
- Farkhondeh, T., Abedi, F. e Samarghandian, S. (2019) 'Chrysin attenuates inflammatory and metabolic disorder indices in aged male rat', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, pp. 1120–1125.
- Fletcher, J. A., Meers, G. M., Linden, M. A., Kearney, M. L. *et al.* (2014) 'Impact of Various Exercise Modalities on Hepatic Mitochondrial Function', *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 46(6), pp. 1089–1097.
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S. e Thayyullathil, F. (2017) 'Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?', *Free Radical Biology and Medicine*, 104, pp. 144–164.
- Gil del Valle, L. (2011) 'Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans', *Biomedicine & Aging Pathology*, 1, pp. 1–7.
- Gilmer, L. K., Ansari, M. A., Roberts, K. N. e Scheff, S. N. (2010) 'Age-related changes in mitochondrial respiration and oxidative damage in the cerebral cortex of the Fischer 344 rat', *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(2), pp. 133–143.
- Giorgi, C., Marchi, S., Simões, I. C. M., Ren, Z. *et al.* (2018) 'Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases', *International Review of Cell and Molecular Biology*, 340, pp. 1–136.
- Gomes, E. C., Silva, A. N. e Oliveira, M. R. De (2012) 'Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, pp. 1–12.
- Gomez-Cabrera, M., Borrás, C., Pallardó, F. V., Sastre, J. *et al.* (2005) 'Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats', *The Journal of Physiology*, 567(1), pp. 113–120.
- Gomez-Cabrera, M., Domenech, E. e Viña, J. (2008) 'Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training', *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), pp. 126–131.
- Gonçalves, I. O., Passos, E., Rocha-Rodrigues, S., Diogo, C. V. *et al.* (2014) 'Physical exercise prevents and mitigates non-alcoholic steatohepatitis-induced liver mitochondrial structural and

- bioenergetics impairments’, *Mitochondrion*, 15, pp. 40–51.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. e David, M. M. (1949) ‘Determination of serum proteins by means of the biuret reaction’, *The Journal of Biologic Chemistry*, 177, pp. 751–766.
- Goto, S., Naito, H., Kaneko, T., Chung H. Y. *et al.* (2007) ‘Hormetic effects of regular exercise in aging: correlation with oxidative stress’, *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 32(5), pp. 948–953.
- Gul, M., Demircan, B., Taysi, S., Oztasan, N. *et al.* (2006) ‘Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart’, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 143, pp. 239–245.
- Handy, D. E. e Loscalzo, J. (2012) ‘Redox Regulation of Mitochondrial Function’, *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(11), pp. 1323–1367.
- Harman, D. (1956) ‘Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry’, *Journal of Gerontology*, pp. 298–300.
- Harman, D. (1972) ‘The Biologic Clock: The Mitochondria?’, *Journal of the American Geriatrics Society*, 20(4), pp. 145–147.
- Hashida, R., Kawaguchi, T., Bekki, M., Omoto, M. *et al.* (2017) ‘Aerobic versus Resistance Exercise in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review’, *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 66(1), pp. 142–152.
- Hatton, P. J., Dixon, D., Coleb, D. J. e Edwardsa, R. (1996) ‘Glutathione Transferase Activities and Herbicide Selectivity in Maize and Associated Weed Species’, *Journal of Pest Science*, 46, pp. 267–275.
- He, F., Li, J., Liu, Z., Chuang, C. *et al.* (2016) ‘Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise’, *Frontiers in Physiology*, 7, pp. 1–10.
- Hilf, R. (1976) ‘Fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues’, *Analytical Biochemistry*, 2697.
- Hoene, M. e Weigert, C. (2010) ‘The stress response of the liver to physical exercise’, *Exercise Immunology Review*, 16, pp. 163–183.
- Jackson, M. J., Vasilaki, A. e McArdle, A. (2016) ‘Cellular mechanisms underlying oxidative stress in human exercise’, *Free Radical Biology and Medicine*, 98, pp. 13–17.
- Jang, I., Chae, K. e Cho, J. (2001) ‘Effects of age and strain on small intestinal and hepatic antioxidant defense enzymes in Wistar and Fisher 344 rats’, *Mechanisms of Ageing and Development*, 122, pp. 561–570.
- Jayakumar, T., Aloysius, P. e Geraldine, P. (2007) ‘Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats’, *Experimental Gerontology*, 42, pp. 183–191.
- Ji, L. L. (2006) ‘Exercise at Old Age: Does It Increase or Alleviate Oxidative Stress?’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928(1), pp. 236–247.
- Ji, L. L. e Leichtweis, S. (1997) ‘Exercise and oxidative stress: Sources of free radicals and their impact on antioxidant systems’, *Age*, 20, pp. 91–106.

- Kadenbach, B. (2003) 'Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1604, pp. 77–94.
- Kakarla, P., Kesireddy, S. e Christiaan, L. (2008) 'Exercise training with ageing protects against ethanol induced myocardial glutathione homeostasis', *Free Radical Research*, 42(5), pp. 428–434.
- Kakarla, P., Vadluri, G. e Reddy Kesireddy, S. (2005) 'Response of hepatic antioxidant system to exercise training in aging female rat', *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 303(3), pp. 203–208.
- Kazemi, F. e Zahediasl, S. (2018) 'Effects of exercise training on adipose tissue apelin expression in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats', *Gene*, (2017).
- Kiebish, M. A., Han, X., Cheng, H., Lunceford, A. *et al.* (2008) 'Lipidomic analysis and electron transport chain activities in C57BL/6J mouse brain mitochondria', *Journal of Neurochemistry*, 106(1), pp. 299–312.
- Kim, I. H., Kisseleva, T. e Brenner, D. A. (2015) 'Aging and liver disease', *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(3), pp. 184–191.
- King, T. E. (1967) 'Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase', in *Oxidation and Phosphorylation*. Academic Press, pp. 322–331.
- Korzeniewski, B. (2015) "'Idealized" State 4 and State 3 in Mitochondria vs. Rest and Work in Skeletal Muscle', *PLoS ONE*, 10(2), pp. 1–18.
- Kumaran, S., Subathra, M., Balu, M. e Panneerselvam (2004) 'Age-associated decreased activities of mitochondrial electron transport chain complexes in heart and skeletal muscle: role of L-carnitine', *Chemico-Biological Interactions*, 148, pp. 11–18.
- Kwong, L. K. e Sohal, R. S. (2000) 'Age-Related Changes in Activities of Mitochondrial Electron Transport Complexes in Various Tissues', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), pp. 16–22.
- Labbé, K., Murley, A. e Nunnari, J. (2014) 'Determinants and Functions of Mitochondrial Behavior', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), pp. 357–391.
- Laurent, C., Chabi, B., Fouret, G., Py, G. *et al.* (2012) 'Polyphenols decreased liver NADPH oxidase activity, increased muscle mitochondrial biogenesis and decreased gastrocnemius age-dependent autophagy in aged rats', *Free Radical Research*, 46(9), pp. 1140–1149.
- Lezi, E., Lu, J., Burns, J. M. e Swerdlow, R. H. (2013) 'Effect of exercise on mouse liver and brain bioenergetic infrastructures', *Experimental Physiology*, 1, pp. 207–219.
- Li, S., Tan, H., Wang, N., Zhang, Z. *et al.* (2015) 'The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), pp. 26087–26124.
- Li, X. M., Ma, Y. L. e Liu, X. J. (2007) 'Effect of the Lycium barbarum polysaccharides on age-related oxidative stress in aged mice', *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), pp. 504–511.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G. *et al.* (2018) 'Oxidative stress, aging, and diseases', *Clinical Interventions in Aging*, 13, pp. 757–772.

- Liu, J., Yeo H. C., Övervik-Douki, E., Hagen, T. *et al.* (2000) ‘Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants’, *Journal of Applied Physiology*, 89(1), pp. 21–28.
- Lu, S. C. (2013) ‘Glutathione synthesis’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830, pp. 3143–3153.
- Lumini-Oliveira, J., Magalhães, J., Pereira, C. V., Moreira, A. C. *et al.* (2011) ‘Endurance training reverts heart mitochondrial dysfunction, permeability transition and apoptotic signaling in long-term severe hyperglycemia’, *Mitochondrion*, 11(1), pp. 54–63.
- Lushchak, V. I. (2014) ‘Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification’, *Chemico-Biological Interactions*, 224, pp. 164–175.
- Mahesh, R., Bhuvana, S. e Hazeena Begum, V. M. (2009) ‘Effect of *Terminalia chebula* aqueous extract on oxidative stress and antioxidant status in the liver and kidney of young and aged rats’, *Cell Biochemistry and Function*, 27(6), pp. 358–363.
- Mallikarjuna, K., Nishanth, K., Hou, C. W., Kuo, C. H. *et al.* (2009) ‘Effect of exercise training on ethanol-induced oxidative damage in aged rats’, *Alcohol*, 43(1), pp. 59–64.
- Mallikarjuna, K., Shanmugam, K. R., Nishanth, K., Wu, M. *et al.* (2010) ‘Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats’, *Alcohol*, 44(6), pp. 523–529.
- Mallikarjuna, K., Nishanth, K. e Reddy, K. S. (2007) ‘Hepatic glutathione mediated antioxidant system in ethanol treated rats: Decline with age’, *Pathophysiology*, 14(1), pp. 17–21.
- Mallo Ferrer, F. (2018) ‘Physical Activity and Exercise’, in *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, pp. 1–6.
- Manikonda, P. K. e Jagota, A. (2012) ‘Melatonin administration differentially affects age-induced alterations in daily rhythms of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male rat liver’, *Biogerontology*, 13(5), pp. 511–524.
- Mannervik, B. (1985) ‘Glutathione peroxidase’, in *Methods in Enzymology*, pp. 490–495.
- Marcellin, P. e Kutala, B. K. (2018) ‘Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening’, *Liver International*, 38(1), pp. 2–6.
- Mason, S. A., Morrison, D., McConell, G. e Wadley G. D. (2016) ‘Muscle redox signalling pathways in exercise. Role of antioxidants’, *Free Radical Biology and Medicine*, 98, pp. 29–45.
- Mauriz, J. L., Molpeceres, V., García-Mediavilla, M. V., González, P. *et al.* (2007) ‘Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats’, *Journal of Pineal Research*, 42(3), pp. 222–230.
- Medrano, M., Cadenas-Sanchez, C., Álvarez-Bueno, Cavero-Redondo, I. *et al.* (2018) ‘Evidence-Based Exercise Recommendations to Reduce Hepatic Fat Content in Youth- a Systematic Review and Meta-Analysis’, *Progress in Cardiovascular Diseases*. Elsevier Inc, 61(2), pp. 222–231.
- Merry, T. L. e Ristow, M. (2015) ‘Mitohormesis in exercise training’, *Free Radical Biology and Medicine*, 98, pp. 123-130.

- Mizoguchi, K., Tanaka, Y. e Tabira, T. (2010) ‘Anxiolytic effect of a herbal medicine, *yokukansan*, in aged rats : Involvement of serotonergic and dopaminergic transmissions in the prefrontal cortex’, *Journal of Ethnopharmacology*, 127, pp. 70–76.
- Monteiro-Cardoso, V. F., Oliveira, M. M., Melo, T., Domingues, M. R. M. *et al.* (2014) ‘Cardiolipin Profile Changes are Associated to the Early Synaptic Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer’s Disease’, *Journal of Alzheimer’s disease : JAD*, 43(4), pp. 1375–1392.
- Navarro, A., Gomez, C., López-Cepero, J. M. e Boveris, A. (2003) ‘Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer’, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(3), pp. R505–R511.
- Navarro, A. e Boveris, A. (2004) ‘Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging’, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(7), pp. 1244–1249.
- Navarro, A. e Boveris, A. (2007) ‘The mitochondrial energy transduction system and the aging process’, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(2), pp. C670–C686.
- Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., Spanou, C., Paschalis *et al.* (2012) ‘Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues’, *Journal of Experimental Biology*, 215(10), pp. 1615–1625.
- O’Neill, C. A., Stebbins, C. L., Bonigut, S., Halliwell *et al.* (1996) ‘Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats’, *Journal of Applied Physiology*. American Physiological Society, 81(3), pp. 1197–1206.
- Okudan, N. e Belviranli, M. (2016) ‘Effects of exercise training on hepatic oxidative stress and antioxidant status in aged rats’, *Archives of Physiology and Biochemistry*, 122(4), pp. 180–185.
- Ottolenghi, A. (1958) ‘Interaction of Ascorbic Acid and Mitochondrial Lipides’, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 79, pp. 355–363.
- Palomero, J., Galán, A. I., Muoz, M. E., Tuón, M. J. *et al.* (2001) ‘Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes’, *Free Radical Biology and Medicine*, 30(8), pp. 836–845.
- Parildar-Karpuzo, H., Mehmetçik, G., Özdemirler-Erara, G., Do, S. *et al.* (2008) ‘Effect of taurine treatment on pro-oxidant- antioxidant balance in livers and brains of old rats’, *Pharmacological Reports*, 60, pp. 673–678.
- Parise, G., Brose, A. N. e Tarnopolsky, M. A. (2005) ‘Resistance exercise training decreases oxidative damage to DNA and increases cytochrome oxidase activity in older adults’, *Experimental Gerontology*, 40, pp. 173–180.
- Parker, L., McGuckin, T. A. e Leicht, A. S. (2014) ‘Influence of exercise intensity on systemic oxidative stress and antioxidant capacity’, *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 34(5), pp. 377–383.
- Pavletic, A. J., Pao, M. e Wright, M. E. (2015) ‘Letters to the Editor Exercise-induced Elevation of Liver Enzymes in a Healthy Female Research Volunteer’, *Psychosomatics*. Elsevier, 56(5), pp. 604–606.
- Payá, M., Halliwell, B. e Hoult, R. S. (1992) ‘Interactions of a series of coumarins with reactive

oxygen species', *Biochemical Pharmacology*, 44(2), pp. 205–214.

Peake, J. M., Markworth, J. F., Nosaka, K., Raastad, T. *et al.* (2015) 'Modulating exercise-induced hormesis: Does less equal more?', *Journal of Applied Physiology*, 119(3), pp. 172–189.

Pearson, T., Kabayo, T., Ng, R., Chamberlain, J. *et al.* (2014) 'Skeletal Muscle Contractions Induce Acute Changes in Cytosolic Superoxide, but Slower Responses in Mitochondrial Superoxide and Cellular Hydrogen Peroxide', *PLoS ONE*, 9(5), pp. 1–10.

Pey, A., Saborido, A., Blázquez, I., Delgado, J. *et al.* (2003) 'Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 87(4–5), pp. 269–277.

Pillon Barcelos, R., Royes, L. F. F., Gonzalez-Gallego, J. e Bresciani, G. (2017) 'Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise', *Free Radical Research*, 51(2), pp. 222–236.

Pinho, R. A., Andrades, M. E., Oliveira, M. R., Pirola, A. C. *et al.* (2006) 'Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise', *Cell Biology International*, 30, pp. 848–853.

Pisoschi, A. M. e Pop, A. (2015) 'The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 97, pp. 55–74.

Powell, K. E., Paluch, A. E. e Blair, S. N. (2011) 'Physical Activity for Health: What Kind? How Much? How Intense? On Top of What?', *Annual Review of Public Health*, 32(1), pp. 349–365.

Powers, S. K. e Jackson, M. J. (2008) 'Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production', *Physiological Reviews*, 88(4), pp. 1243–1276.

Powers, S. K., Nelson, W. B. e Hudson, M. B. (2011) 'Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 51(5), pp. 942–950.

Powers, S. K., Radak, Z. e Ji, L. L. (2016) 'Exercise-induced oxidative stress: past, present and future', *The Journal of Physiology*, 594(18), pp. 5081–5092.

Preston, C. C., Oberlin, A. S., Holmuhamedov E. L., Gupta, A. *et al.* (2008) 'Aging-induced alterations in gene transcripts and functional activity of mitochondrial oxidative phosphorylation complexes in the heart', *Mechanisms of Ageing and Development*, 129, pp. 304–312.

Radak, Z., Sasvári, M., Nyakas, C., Taylor A. W. *et al.* (2000) 'Regular Training Modulates the Accumulation of Reactive Carbonyl Derivatives in Mitochondrial and Cytosolic Fractions of Rat Skeletal Muscle', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383(1), pp. 114–118.

Radak, Z., Chung, H. Y., Koltai, E., Taylor, A. W. *et al.* (2008) 'Exercise, oxidative stress and hormesis', *Ageing Research Reviews*, 7(1), pp. 34–42.

Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H. *et al.* (2013) 'Oxygen Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling', *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(10), pp. 1208–1246.

- Radak, Z., Chung, H. Y. e Goto, S. (2008) ‘Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise’, *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), pp. 153–159.
- Ramesh, T., Kim, S. W., Sung, J. H., Hwang, S. Y. *et al.* (2012) ‘Effect of fermented *Panax ginseng* extract (GINST) on oxidative stress and antioxidant activities in major organs of aged rats’, *Experimental Gerontology*, 47(1), pp. 77–84.
- Río, L. A., Ortega, M. G., López, A. L. e Gorgé, J. L. (1977) ‘A More Sensitive Modification of the Catalase Assay with the Clark Oxygen Electrode’, *Analytical Biochemistry*, 415, pp. 409–415.
- Rui, L. (2014) ‘Energy Metabolism in the Liver’, *Comprehensive Physiology*, 4(1), pp. 177–197.
- Sakellariou, G. K., Vasilaki, A., Palomero, J., Kayani, A. *et al.* (2013) ‘Studies of Mitochondrial e Nonmitochondrial Sources Implicate Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase(s) in the Increased Skeletal Muscle Superoxide Generation That Occurs During Contractile Activity’, *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(6), pp. 603–621.
- Sakellariou, G. K., Jackson, M. J. e Vasilaki, A. (2014) ‘Redefining the major contributors to superoxide production in contracting skeletal muscle. The role of NAD(P)H oxidases’, *Free Radical Research*, 48(1), pp. 12–29.
- Santos-Alves, E., Marques-Aleixo, I., Coxito, P. Balça M. M. *et al.* (2014) ‘Exercise mitigates diclofenac-induced liver mitochondrial dysfunction’, *European Journal of Clinical Investigation*, 44(7), pp. 668–677.
- Santos-Alves, E., Marques-Aleixo, I., Rizo-Roca, D., Torrella, J.R. *et al.* (2015) ‘Exercise modulates liver cellular and mitochondrial proteins related to quality control signaling’, *Life Sciences*, 135, pp. 124–130.
- Sanz, A. (2016) ‘Mitochondrial reactive oxygen species: Do they extend or shorten animal lifespan?’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(8), pp. 1116–1126.
- Schmucker, D. L. (2005) ‘Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease?’, *Experimental Gerontology*, 40(8–9), pp. 650–659.
- Schoepe, M., Schrepper, A., Schwarzer, M., Osterholt, M. *et al.* (2012) ‘Exercise can induce temporary mitochondrial and contractile dysfunction linked to impaired chain complex activity’, *Metabolism - Clinical and Experimental*, 61(1), pp. 117–126.
- Seo, D. Y., Lee, S. R., Kim, N., Ko, K. S. *et al.* (2016) ‘Age-related changes in skeletal muscle mitochondria: the role of exercise’, *Integrative Medicine Research*. Korea Institute of Oriental Medicine, 5, pp. 182–186.
- Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S. *et al.* (2004) ‘Antioxidant Role of Glutathione-S-Transferases: Protection Against Oxidant Toxicity and Regulation of Stress-Mediated Apoptosis’, *Antioxidants & Redox Signaling*, 6(2), pp. 289–300.
- Sheedfar, F., Biase S. D., Koonen, D e Vinciguerra, M. *et al.* (2013) ‘Liver diseases and aging: friends or foes?’, *Aging Cell*, 12(6), pp. 950–954.
- Sies, H. (1985) ‘Oxidative Stress: Introductory Remarks’, in *Oxidative Stress*. 1st edn, pp. 1–8.
- Sies, H., Berndt, C. e Jones, D. P. (2017) ‘Oxidative Stress’, *Annual Review of Biochemistry*.

2nd edn. Edited by G. B. T.-E. of S. (Second E. Fink. New York: Academic Press, 86(1), pp. 715–748.

Silva, L. A., Pinho, C. A., Scarabelot, K. S., Fraga, D. B. *et al.* (2009) ‘Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle’, *European Journal of Applied Physiology*, 105(6), pp. 861–867..

Simões, I. C. M., Fontes, A., Pinton, P., Zischka, H. *et al.* (2018) ‘Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease’, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 95(2017), pp. 93–99.

Singh, A., Bhat, T. K. e Sharma, O. P. (2011) ‘Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity’, *Journal of Clinical Toxicology*, pp. 1–19.

Siu, P. M., Donley, D. A., Bryner, R. W. e Always, S. E. *et al.* (2003) ‘Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles’, *Journal of Applied Physiology*, 94(2), pp. 555–560.

Srinivasan, S. e Avadhani, N. G. (2012) ‘Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress’, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 53(6), pp. 1252–1263.

Srividhya, R., Zarkovic, K., Stroser, M., Waeg, G. *et al.* (2009) ‘Mitochondrial alterations in aging rat brain: effective role of (-)-epigallo catechin gallate’, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27, pp. 223–231.

Steinbacher, P. e Eckl, P. (2015) ‘Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle’, *Biomolecules*, 5(2), pp. 356–377.

Sun, L., Shen, W., Liu, Z., Guan, S. *et al.* (2010) ‘Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients’, *Life Sciences*, 86(1–2), pp. 39–44.

Tatarková, Z., Kuka, S., Račay, P., Lehotský, J. *et al.* (2011) ‘Effects of Aging on Activities of Mitochondrial Electron Transport Chain Complexes and Oxidative Damage in Rat Heart’, *Physiological Research*, 60, pp. 281–289.

Taysi, S., Oztasan, N., Efe, H., Polat, M. F. *et al.* (2008) ‘Endurance training attenuates the oxidative stress due to acute exhaustive exercise in rat liver’, *Acta Physiologica Hungarica*, 95(4), pp. 337–347.

Thirumalai, T., Therasa, V., Elumalai, E. e David, E. (2011) ‘Intense and exhaustive exercise induce oxidative stress in skeletal muscle’, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. Asian Pacific Tropical Medicine Press, 1(1), pp. 63–66.

Trefts, E., Williams, A. S. e Wasserman, D. H. (2015) ‘Exercise and the Regulation of Hepatic Metabolism’, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 135, pp. 203–225.

Ventura, B., Genova, M. L., Bovina, C., Formiggi, G., *et al.* (2002) ‘Control of oxidative phosphorylation by Complex I in rat liver mitochondria: implications for aging’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1553, pp. 249–260.

Whitehead, N. P., Yeung, E. W., Froehner, S. C. e Allen D. G. (2010) ‘Skeletal Muscle NADPH Oxidase Is Increased and Triggers Stretch-Induced Damage in the mdx Mouse’, *PLoS ONE.*, 5(12), pp. 1–10.

WHO (2010) *Global recommendations on Physical Activity for Health*, WHO Library

Cataloguing-in-Publication Data.

Williams, P. T. e Thompson, P. D. (2014) ‘Increased Cardiovascular Disease Mortality Associated With Excessive Exercise in Heart Attack Survivors’, *Mayo Clinic Proceedings*, 89(9), pp. 1187–1194.

Ye, Z., Zhang, J., Townsend, D. M. e Tew K. D. (2015) ‘Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850, pp. 1607–1621.

Yoon, G. e Park, S. (2014) ‘Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats’, *Nutrition Research and Practice*, 8(6), pp. 618–624.

Zorov, D. B., Juhaszova, M. e Sollott, S. J. (2014) ‘Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release’, *Physiological Reviews*, 94(3), pp. 909–950.

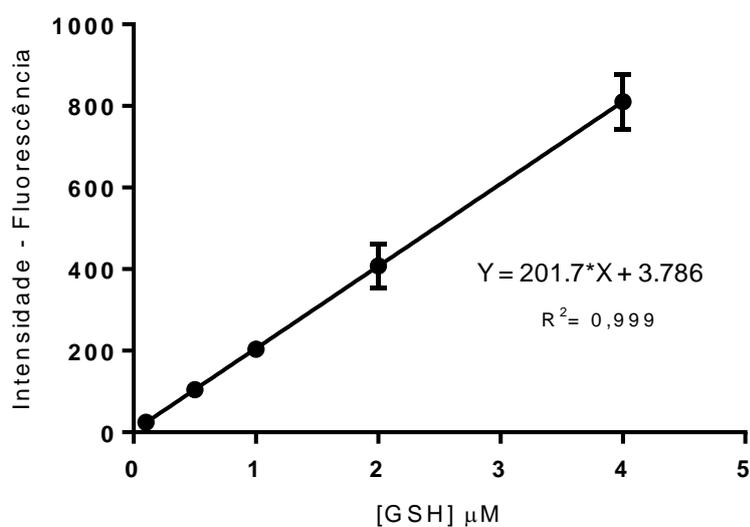
Capítulo VII

Anexos

ANEXO A

Curva de calibração utilizada para o cálculo do teor de GSH no homogeneizado de fígado e gráfico obtido

[GSH] μM	Volume de GSH (100 μm)	Volume de tampão fosfato	Volume de OPT (1 mg/ml)
0	0 μL	2300 μL	200 μL
0,1	2,5 μL	2297,5 μL	200 μL
0,5	12,5 μL	2287,5 μL	200 μL
1	25 μL	2275 μL	200 μL
2	50 μL	2250 μL	200 μL
4	100 μL	2200 μL	200 μL

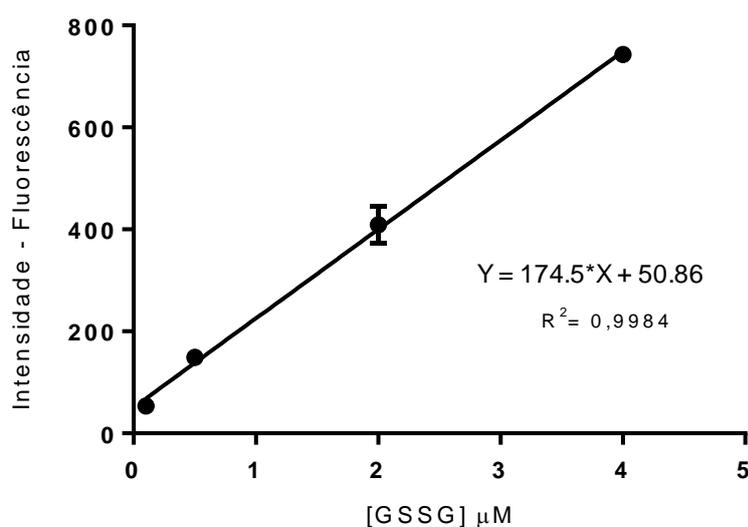


A leitura da fluorescência foi realizada usando emissão a 426 nm, com excitação a 339, depois de decorridos 15 minutos de reação com o OPT.

ANEXO B

Curva de calibração utilizada para o cálculo do teor de GSSG no homogeneizado de fígado e grábio obtido

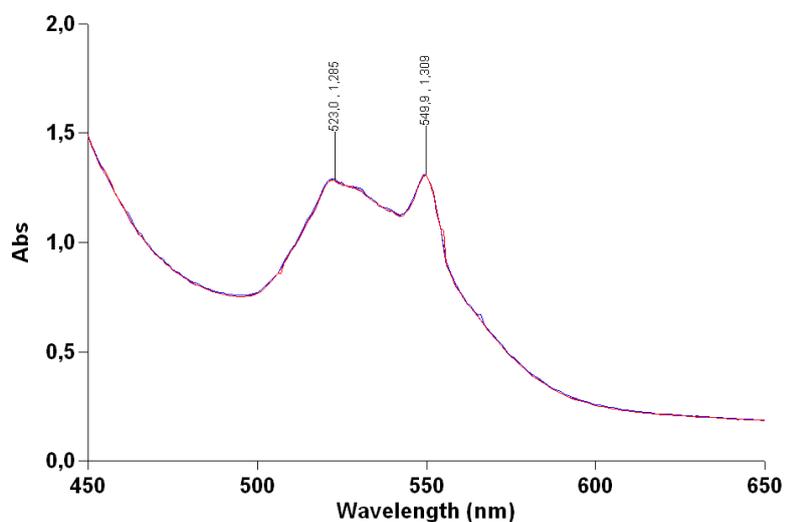
[GSSG] μM	Volume de GSSG (100 μM)	Volume de NaOH (100 mM)	Volume de OPT (1 mg/ml)
0	0 μL	2300 μL	200 μL
0,1	2,5 μL	2297,5 μL	200 μL
0,5	12,5 μL	2287,5 μL	200 μL
2	50 μL	2250 μL	200 μL
4	100 μL	2200 μL	200 μL



A leitura da fluorescência foi realizada usando emissão a 426 nm, com excitação a 339, depois de decorridos 15 minutos de reação com o OPT.

ANEXO C

Espectro de absorção correspondente ao citocromo *c* 100% reduzido



ANEXO D

Representação de um registo tipo obtido num ensaio de respirometria de alta resolução.

