

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

PEDRO ALEXANDRE SANTOS CARVALHO FIGUEIREDO

**ENVELHECIMENTO MUSCULAR ESQUELÉTICO E ALTERAÇÕES
MITOCONDRIAIS COM A IDADE: O PAPEL DO SEDENTARISMO E DOS ESTILOS
DE VIDA ACTIVA AO LONGO DA VIDA**

-PROJETO DE INVESTIGAÇÃO-

ÁREA CIENTÍFICA DE GERIATRIA

Realizado sob orientação do Professor Doutor Manuel Teixeira Veríssimo

Elaborado de acordo com o *Guião para elaboração e submissão de propostas de projetos de IC&DT, Fundação para a Ciência e Tecnologia, Ministério da Educação e Ciência, v6, 2012.*

SETEMBRO, 2013

Envelhecimento muscular esquelético e alterações mitocondriais com a idade: o papel do sedentarismo e dos estilos de vida activa ao longo da vida.

Pedro Alexandre Figueiredo ^{1,3}; Manuel Teixeira Veríssimo ^{1,2}

¹ Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

² Serviço de Medicina Interna, HUC-CHUC

³ CIAFEL, Faculdade de Desporto, Universidade do Porto

Endereço de correio eletrónico:

Pedro Alexandre Figueiredo: pascfigueiredo@gmail.com

Manuel Teixeira Veríssimo: mtverissimo@gmail.com

ÍNDICE

INDICE	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
I. Identificação do Projeto	3
II. Instituições Envolvidas	4
III. Componente Científica	5
III.1 Resumo	5
III.2 <i>Summary</i>	8
III.3 Descrição Técnica	11
III.3.1 Revisão da literatura	11
III.3.2 Plano de Investigação e Métodos	14
III.3.3 Tarefas	18
III.3.4 Calendarização e Gestão do Projeto	28
III.3.4.1 Descrição da Estrutura de Gestão	28
III.3.4.2 Lista de <i>Milestones</i>	30
III.3.4.3 Cronograma	32
III.3.5 Referências Bibliográficas	33
III.3.6 Publicações Anteriores	36
III.3.7 Resubmissão da Candidatura	36
IV. Equipa de Investigação	37
V. Projetos Financiados	37
VI. Indicadores Previstos	38
VII. Orçamento	39
VIII. Justificação do Orçamento	40
IX. Anexos	44
X. Conflitos de Interesse	44
ANEXO 1- Protocolo experimental	45
ANEXO 2- Cronograma	46
ANEXO 3- Normas de candidatura a projetos em todos os domínios científicos- FCT	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACON	Aconitase
ADP	Adenosina di-fosfato
ATP	Adenosina tri-fosfato
Ca²⁺	Calcio
CCCP	<i>Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone</i>
CS	Citrato sintetase
CTE	Cadeia transportadora de electrões
ERO	Espécies reactivas de oxigénio
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSSG	Glutathione oxidada
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
O₂^{•-}	Superóxido
RCR	<i>Respiratory control ratio</i>
SOD	Superoxido dismutase
MET	Microscopia electrónica de transmissão

I. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Domínio científico: Ciências da Vida e da Saúde

Área científica: Neurociências, Envelhecimento e Doenças Degenerativas

Sub-área científica: Biologia do Envelhecimento

Título do projeto (em português): Envelhecimento muscular esquelético e alterações mitocondriais com a idade: o papel do sedentarismo e dos estilos de vida activa ao longo da vida.

Título do projeto (em inglês): *Skeletal muscle aging and age-related mitochondrial alterations: the role of sedentary and active lifelong behaviors.*

Financiamento solicitado: 84.768,00 €

Palavra-chave 1: Envelhecimento

Palavra-chave 2: Músculo-esquelético

Palavra-chave 3: Sarcopenia

Palavra-chave 4: Sedentarismo

Palavra-chave 5: Exercício físico

Data de início do projeto: 01-01-2014

Duração do projeto em meses: 24 meses

II. INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Instituição Proponente

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Azinhaga de Santa Comba, Celas

3000-548 Coimbra

Unidade de Investigação

Faculdade de Medicina- Serviço de Medicina Interna, HUC-CHUC

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra

Unidade de Investigação Adicional

Centro de Investigação em Actividade Física, Saúde e Lazer- CIAFEL

Laboratório de Bioquímica e Morfologia Experimental

Faculdade de Desporto da Universidade do Porto

Rua Dr. Plácido Costa, 91

4200-450 Porto

Instituição de Acolhimento

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Azinhaga de Santa Comba, Celas

3000-548 Coimbra

III. COMPONENTE CIENTÍFICA

III.1 Resumo

O processo de envelhecimento biológico caracteriza-se por uma progressiva deterioração fisiológica com redução na capacidade funcional e aumento na incidência e susceptibilidade a determinadas doenças. A sarcopenia associada ao envelhecimento, caracterizada por uma redução da massa e força muscular com a idade é considerada uma característica *major* ao nível do envelhecimento do tecido muscular esquelético, sendo responsável por uma diminuição dramática na capacidade funcional dos idosos com consequente perda de independência e mobilidade. Várias teorias têm sido descritas com o objectivo de tentar explicar o fenómeno de envelhecimento. Neste contexto, a teoria do envelhecimento mitocondrial tem sido uma das mais prevalentes, relacionando o envelhecimento com a disfunção mitocondrial e o stress oxidativo. O aumento no stress oxidativo e consequente lesão oxidativa das biomoléculas, associado ao envelhecimento, será o resultado de uma maior produção de ERO mitocondrial e/ou uma diminuição nas defesas antioxidantes que associados a uma maior susceptibilidade dos tecidos à lesão oxidativa poderão ter consequências ao nível da diminuição na funcionalidade celular. Neste sentido, evidências recentes sugerem que muitas das alterações biológicas associadas ao processo de envelhecimento podem ser atenuadas pela adopção de estilos de vida activa e saudáveis, nomeadamente ao nível da prática regular de exercício físico.

Com este projeto pretendemos estudar as alterações estruturais do músculo esquelético associadas à idade. Adicionalmente é também nosso objectivo estudar mitocôndrias isoladas a partir do músculo esquelético, considerando as suas características morfológicas, bioquímicas e funcionais e verificar qual o papel que o sedentarismo e diferentes padrões de exercício físico realizado ao longo da vida poderão ter nas variáveis em estudo. Mais especificamente, pretendemos caracterizar o tecido muscular esquelético e as mitocôndrias isoladas a partir de

músculos esqueléticos de jovens, idosos sedentários e idosos activos. Com vista a atingir esses objectivos, usaremos 60 ratinhos machos C57BL/6J, com 3 meses de idade, posteriormente divididos em 4 grupos (grupo jovem- GJ; grupo velhos sedentários- GVS; grupo velhos activos- GVA; grupo velhos treinados- GVT). Os animais do GJ serão sacrificados logo após uma semana de quarentena no nosso laboratório, com 3 meses de idade. Os animais do GVS serão colocados individualmente em gaiolas pequenas; os animais do GVA serão colocados individualmente em gaiolas com livre acesso a uma roda de actividade durante todo o protocolo experimental e os animais do GVT serão submetidos a um protocolo de exercício de resistência em tapete rolante. A actividade física voluntária será monitorizada diariamente nos animais do GVA ao longo de todo o período experimental (20 meses). Todos os animais serão mantidos a temperatura constante (21-25°C) num ciclo diário de 12 horas dia-noite, com comida e bebida *ad libitum*. Após este período, os animais dos grupos GVS, GVA e GVT serão sacrificados (com 23 meses de idade) por deslocamento cervical e os músculos dos membros posteriores (*soleus*, *gastrocnemius*, *tibialis anterior*, e *quadriceps*) serão extraídos para análise morfológica e para o isolamento mitocondrial. A avaliação morfológica do musculo esquelético será realizada de acordo com métodos previamente descritos [1]. O isolamento das mitocôndrias musculares esqueléticas será realizado de acordo com métodos já descritos por Tonkonogi e Sahlin [2]. Da suspensão final de mitocôndrias serão separadas aliquotas de modo a proceder às análises funcional, bioquímica e morfológica. Para a avaliação da funcionalidade mitocondrial iremos recorrer à utilização de um eléctrodo de oxigénio (Hansatech DW 1, Norfolk,UK). Os ensaios da actividade respiratória mitocondrial consistirão na avaliação de determinados parâmetros respiratórios mitocondriais, nomeadamente, o estado 3, estado 4, RCR (um indicador de integridade mitocondrial) e o ADP/O (indicador de eficiência fosforilativa mitocondrial). Com vista a avaliar a permeabilidade da membrana interna e a taxa máxima de fosforilação

oxidativa em condições de desacoplamento, adicionaremos, durante o estado 3 da respiração mitocondrial, oligomicina e *carbonil cianide m-clorofenilhidrazona* (CCCP), respectivamente. Os dados da funcionalidade serão expressos em actividade respiratória/mg proteína mitocondrial e actividade respiratória/actividade CS. Considerando as análises bioquímicas, serão avaliados marcadores de stress oxidativo (GSH/GSSG, grupos-SH, aconitase), defesas antioxidantes (actividades da GSH, SOD e GPx), marcadores de lesão oxidativa (grupos carbonilo) e um marcador de actividade metabólica (actividade da citrato sintase). A avaliação morfológica e morfométrica das mitocôndrias será realizada por microscopia electrónica de transmissão usando métodos convencionais de modo a caracterizar quantitativamente e qualitativamente a suspensão mitocondrial. A análise estatística será efectuada com recurso à utilização de testes paramétricos ou não-paramétricos de acordo com o tipo de distribuição das variáveis dependentes. Para além da determinação de diferenças entre grupos serão realizadas igualmente correlações entre as variáveis dependentes e independentes.

III.2 Summary

Biological aging is characterized by a progressive decline of physiological function leading to a general impairment in functional capacity and increased susceptibility to disease. Age-related sarcopenia, characterized by a reduction in muscle mass and strength is considered one of the most striking features of aging at the level of the skeletal muscle. Age-related morphological alterations in skeletal muscle can be considered as one of the mechanisms responsible for muscle weakness in the aged population. Several theories have been postulated in an attempt to explain the foundations of biological aging. The mitochondrial theory of aging is one of the most prevalent in this field. This theory postulates that aging results from the progressive accumulation of oxidative damage and impairment of cellular function relating several factors, namely mitochondrial dysfunction and oxidative stress. The age-related increases in oxidative stress levels and oxidative damage to biomolecules will be the result of an increased production of reactive oxygen species or diminished antioxidant defenses, or both, together with an increased susceptibility to oxidative damage, ultimately leading to diminished cellular function. Recent evidences suggest that healthy and active lifestyles, namely with the practice of regular physical exercise could be an essential tool to counteract the adverse effects of aging.

The objective of the present project is to study the age-related structural alterations at the level of the skeletal muscle. Additionally, we intend also to characterize the effects of chronological age on skeletal muscle mitochondria, in terms of its morphological, biochemical and functional status and to verify the impact of sedentarism and different patterns of physical exercise in the observed alterations. In particular, we intend to characterize the skeletal muscle and mitochondria from young, aged and lifelong exercised aged skeletal muscle. In order to achieve these objectives we will use 60 C57BL/6J strain male mice, aged 3 months, further divided into 4 groups (young group- YG; sedentary old

group- SOG, voluntary activity old group- VAOG; and exercise trained old group- ETOG). Animals from YG will be sacrificed immediately at 3 months old. Animals from SOG group will be individually confined to small cages, animals from VAOG will be individually placed into cages with free access to a rodent wheel during the whole period of the experimental protocol and, animals from ETOG will be submitted to a treadmill exercise endurance training protocol. Voluntary physical activity will be assessed during the whole period of the experiment in the VAOG group (20 months). All animals will be kept at constant temperature (21–25°C) on a daily light schedule of 12 h of light vs. dark, provided with food and water *ad libitum*. After this period SOG, VAOG and ETOG animals will be sacrificed (aged 23 months) by cervical dislocation and hindlimb muscles (soleus, gastrocnemius, tibialis anterior, and quadriceps) will be extracted for morphological analysis and preparation of isolated mitochondria. Skeletal muscle morphological analysis will be performed as previously described [1]. Skeletal muscle mitochondria will be prepared as previously described by Tonkonogi and Sahlin [2]. From the final mitochondrial suspension aliquots will be separated for functional, biochemical and morphological analysis. Mitochondrial respiratory function will be measured using a polarographically Clark-type oxygen electrode (Hansatech DW 1, Norfolk, UK). The measures will consist in some of the standard respiratory parameters that include state 3 respiration; state 4 respiration; RCR (a measure of the dependence of the respiratory rate on ATP synthesis) and ADP/O (a measure of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency). To quantify mitochondrial inner membrane permeability and the maximal rate of uncoupled oxidative phosphorylation, oligomycin and carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), respectively, will be added during state 3 respiration with saturated amounts of ADP. Data will be presented as respiratory activity/mg mitochondrial protein and respiratory activity/CS activity. Regarding the biochemical analysis, oxidative stress markers (GSH/GSSG, sulfhydryl protein groups

(SH), aconitase), antioxidant levels (GSH, SOD, and GPx activities), oxidative damage markers (protein carbonyl derivatives) and a metabolic activity marker (citrate synthase activity) will be assessed. Morphologic and morphometric mitochondrial evaluation will be assessed by transmission electron microscopy using conventional methods in order to perform a qualitative and quantitative characterization of the mitochondrial suspensions. Statistical analysis will be performed using parametric or non-parametric tests according to the distribution of the dependent variables. In addition to the analysis of the differences between groups, the correlations between dependent and independent variables will be performed as well.

III.3 Descrição Técnica

III.3.1 Revisão da literatura

Numa perspectiva popular o conceito de envelhecimento tem por base um conjunto de características relacionadas com alterações morfológicas dos indivíduos, associadas a uma perda de capacidades físicas, cognitivas e sociais. O desenvolvimento científico veio permitir conhecer alguns mecanismos subjacentes a estas modificações. Neste contexto, envelhecimento biológico pode ser definido como um declínio progressivo e irreversível, associado à idade, da funcionalidade global dos órgãos, sistemas e tecidos do corpo humano, resultante da interacção de factores genéticos e estocásticos [3, 4]. Estas alterações levam a uma diminuição da capacidade adaptativa do indivíduo para resistir a estímulos e agressões endógenas e exógenas, juntamente com um aumento da susceptibilidade e incidência de doenças, aumentando a probabilidade de morte [5, 6]. Numa revisão sobre teorias do envelhecimento biológico, Rattan [4] questionou a existência de mais de 300 teorias do envelhecimento, qualificando-as como "*hypothesis*" ou "*aspect theories*". O autor refere que, dado a natureza multifacetada, diversificada e complexa do fenómeno de envelhecimento, é imperativo ter uma abordagem multifactorial do mesmo, uma vez que está documentado que ambos os factores, genéticos e estocásticos, o influenciam [4, 7]. De facto, dados na literatura sugerem a existência de uma enorme variabilidade biológica no processo de envelhecimento, não só entre indivíduos com idades cronológicas semelhantes, mas também entre os vários órgãos e sistemas do mesmo indivíduo [8].

O músculo esquelético é considerado um tecido com elevada susceptibilidade ao processo de envelhecimento, sofrendo várias alterações com a idade, caracterizadas globalmente por uma desorganização estrutural e declínio funcional progressivo [9-11]. A redução da massa e força muscular com a idade é considerada como sendo responsável por reduções dramáticas na

capacidade funcional dos idosos, sendo uma causa frequente da perda de independência e mobilidade [5, 10, 12-15]. As alterações morfológicas no músculo esquelético com a idade, podem ser responsáveis pelos decréscimos na força muscular em idosos [15-18]. De facto, a diminuição da força no músculo envelhecido está correlacionada com uma perda de massa muscular [10], documentada por uma diminuição na área de secção transversal do músculo e fibras musculares, bem como por uma redução no número de miócitos e diminuição na densidade capilar [19-21].

Os mecanismos da sarcopenia associada ao envelhecimento são complexos e até agora não totalmente esclarecidos. Sendo considerada uma inevitabilidade do envelhecimento humano [15], deve ser reconhecido que outros factores, tais como o sedentarismo, alimentação inadequada e estado patológico podem influenciar negativamente o desempenho muscular [9-11]. Neste sentido, vários mecanismos têm sido propostos para explicar as alterações na massa e força muscular com o envelhecimento, nomeadamente, a falta de actividade física, alterações no metabolismo proteico, alterações endócrinas, comprometimento da função neuromuscular, alterações na expressão genética, défices no recrutamento de células satélite, stress oxidativo, alterações mitocondriais e alterações no perfil apoptótico [22, 23].

Uma das mais reconhecidas teorias do envelhecimento é a “*Free radical theory of aging*”, inicialmente proposta por Harman em 1956 [24]. A base desta teoria sugere que a acumulação de lesões oxidativas nas células e tecidos ao longo dos anos, contribui para a diminuição da funcionalidade observada com o envelhecimento. A constatação de que o principal local de produção de espécies reactivas de oxigénio (ERO) seria a cadeia transportadora de electrões, levou à sugestão de que as mitocôndrias não seriam apenas o local primordial de produção de ERO, mas também um alvo principal das mesmas e conseqüentemente de dano oxidativo, conduzindo, deste modo para a “*Mitochondrial theory of aging*”, proposta por Miquel et al. em 1980 [25]. Neste contexto, foi sugerido que o processo de envelhecimento é causado

principalmente por danos oxidativos ao nível do DNA mitocondrial, levando a uma diminuição da função mitocondrial, diminuição na produção de energia e consequente comprometimento da funcionalidade celular. Estas lesões celulares, causadas pela produção endógena e contínua de ERO são a causa provável da disfunção mitocondrial associada com o envelhecimento [26], o que conduz, eventualmente, ao surgimento de várias condições relacionadas com a idade, nomeadamente, um aumento da resistência à insulina [27], intolerância ao exercício [28], sarcopenia [22, 29] e várias doenças neurodegenerativas [30].

A diminuição da funcionalidade mitocondrial com a idade foi demonstrada no músculo esquelético de humanos [29] e murganhos [31-33], bem como em outros tecidos, como o coração e fígado [34]. Apesar da maioria dos resultados apresentados na literatura sugerirem uma diminuição na funcionalidade mitocondrial com a idade, importa salientar que outros autores não encontraram alterações na actividade respiratória mitocondrial ao nível do músculo-esquelético [35] e músculo cardíaco [31], de ratos idosos. Além disso, em humanos Rasmussen et al [36] e Barrientos et al. [37] não relataram quaisquer alterações relacionadas com a idade na função de mitocôndrias isoladas a partir de músculo-esquelético.

Evidências na literatura sugerem que muitas alterações biológicas associadas ao envelhecimento podem ser atenuadas com a prática regular de exercício físico. O músculo esquelético é um tecido com uma enorme capacidade adaptativa a diversas formas de estimulação, nas quais se pode incluir o exercício físico [38]. A prática regular de exercício físico induz numerosas adaptações benéficas ao nível do músculo-esquelético, estrutura e funcionalidade mitocondrial [39-41]. De facto, indivíduos idosos treinados demonstram uma maior actividade enzimática mitocondrial e densidade capilar, quando comparados com indivíduos sedentários, independentemente da idade [42]. Adicionalmente, Waters et al. [43], concluíram que a diminuição da função mitocondrial associada ao envelhecimento pode ser atenuada com o exercício físico regular, e Adhietty et al. [38] demonstraram que a actividade

contráctil relacionada com a prática de exercício físico está associada com um aumento na densidade mitocondrial e actividade enzimática.

Deste modo, com este projeto pretendemos estudar as alterações induzidas pelo envelhecimento ao nível da estrutura do músculo esquelético, bem como as alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas em mitocôndrias isoladas a partir do músculo-esquelético de animais de diferentes idades. Adicionalmente, pretendemos avaliar o impacto do estilo de vida sedentário e de diferentes formas de exercício físico nas variáveis em estudo, recorrendo deste modo a uma forma de exercício físico programado e a uma forma de actividade física voluntária ao longo da vida (ver *III.3.2*).

III.3.2 Plano de Investigação e Métodos

Considerando os diversos mecanismos relacionados com a sarcopenia e com as lesões mitocondriais associadas ao envelhecimento, é possível identificar vários factores comportamentais, dos quais, o estilo de vida sedentário terá um impacto *major* na sarcopenia e disfunção mitocondrial relacionadas com a idade [9-11, 44-46]. Como já referido anteriormente, a prática regular de exercício físico induz numerosas adaptações benéficas ao nível do músculo-esquelético, incluindo um aumento na biogénese mitocondrial [39-41, 47], pelo que a adopção de estilos de vida activos, com a prática regular de exercício físico é fortemente recomendada [20, 39, 48]. Contudo, apesar da prática regular de exercício físico estar associada a uma menor perda de funcionalidade muscular esquelética com o envelhecimento, a literatura existente não identifica o impacto fisiológico de um estilo de vida sedentário em contraponto com estilos de vida activos, no que diz respeito às alterações na massa muscular e funcionalidade mitocondrial. De facto, uma das limitações apontadas aos estudos existentes na literatura assenta no facto destes recorrerem normalmente a programas de exercício de curta duração [49-51], e apenas à utilização de formas de exercício impostas

aos animais, tais como o tapete rolante ou a natação [49, 51-54]. Adicionalmente, os estudos disponíveis na literatura analisam essencialmente a actividade respiratória mitocondrial em tecidos envelhecidos. De facto, o envelhecimento tem sido associado com uma capacidade reduzida para a fosforilação oxidativa no músculo esquelético, mais provavelmente devido a uma diminuição do número de mitocôndrias e/ou função mitocondrial [55]. Neste sentido, as mitocôndrias disfuncionais não irão conseguir satisfazer as necessidades energéticas celulares, diminuindo a capacidade oxidativa do tecido, alterando o equilíbrio energético e comprometendo a capacidade das células em se adaptarem a vários estímulos com exigências funcionais distintas [56]. No entanto, de nosso conhecimento, pouco se sabe acerca dos efeitos do processo de envelhecimento na mitocôndria individualmente, ou seja, como podemos caracterizar as mitocôndrias relativamente ao seu estado morfológico, bioquímico e funcional, isoladas a partir de músculo esquelético de diferentes idades ou de músculo esquelético submetido a diferentes padrões de estimulação ao longo da vida (*e.g.* sedentarismo *vs.* exercício físico forçado *vs.* actividade física voluntária). Com estes conhecimentos, e considerando o papel crucial que as mitocôndrias desempenham na homeostasia celular, será possível com este projeto, contribuir para o desenvolvimento de intervenções específicas para prevenção das alterações musculares esqueléticas e mitocondriais com a idade, nomeadamente ao nível de uma prescrição adequada do exercício físico. Neste contexto, e como já referido, nos estudos com animais o exercício físico é normalmente realizado recorrendo a protocolos que utilizam tapetes rolantes ou treino de natação. Contudo, a imposição destas formas de exercício pode ser uma fonte de agressão mecânica, fisiológica e psicológica para os animais [57, 58]. Deste modo, no presente projeto, além da forma mais tradicional e objectiva de induzir a prática de exercício físico (tapete rolante), estudaremos igualmente uma forma de actividade física voluntária ao longo da vida. De facto, dados na literatura sugerem que a utilização deste método de exercício voluntário

em modelos animais, relaciona-se positivamente com o VO_2 máximo [58], saúde cardiovascular [59], aumento da expressão de enzimas mitocondriais no musculo-esquelético [59, 60], diminuição na produção basal de peróxido de hidrogénio em mitocôndrias de musculo cardíaco [61], culminando globalmente num melhor estado de saúde com o envelhecimento [57, 61, 62].

Deste modo, pretendemos com este projeto estudar, no modelo animal (ratinhos da estirpe C57BL/6J), as alterações induzidas pelo envelhecimento ao nível da estrutura do músculo esquelético, bem como as alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas de mitocôndrias isoladas a partir do músculo-esquelético de animais de diferentes idades. Adicionalmente, pretendemos avaliar o impacto do estilo de vida sedentário e de diferentes formas de exercício físico nas variáveis em estudo, recorrendo deste modo a uma forma de exercício físico programado e orientado (tapete rolante) e a uma forma de actividade física voluntária ao longo da vida (rodas de actividade física voluntária).

O trabalho desenvolvido neste projeto será dividido em 5 fases realizadas no CIAFEL- Laboratório de Bioquímica e Morfologia Experimental da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto e na Faculdade de Medicina- Serviço de Medicina Interna dos CHUC (ver Anexo 1).

Fase 1- Selecção dos animais, definição dos grupos e protocolos de exercício físico

Este projeto será desenvolvido recorrendo a um modelo animal adequado para estudos na área do envelhecimento (ver Tarefa 1). Os dados existentes na literatura relativos à linhagem C57BL/6 identificam uma esperança média de vida de 22 meses, em condições convencionais [63]. Com base nessas informações e nas curvas de sobrevivência [64], definem-se os 3 meses como critério para animal jovem, e os 23 meses como velhos. O manuseamento dos animais e protocolos utilizados durante todo o projeto seguem escrupulosamente o estipulado no *Guide*

for the Care and Use of Laboratory Animals- Institute for Laboratory Animal Research (ILAR, 1996) e no Resource book for the design of animal exercise protocols da American Physiological Society.

Fase 2- Avaliação e recolha de dados relativos a animais jovens (3 meses de idade)

Nesta fase do projeto serão sacrificados animais de idade jovem (3 meses; n= 15) com o objectivo de estudar os tecidos e organelos celulares provenientes de animais jovens. Deste modo pretendemos, (i) avaliar a estrutura do músculo-esquelético; (ii) avaliar a morfologia de mitocôndrias isoladas a partir do músculo esquelético; (iii) avaliar a funcionalidade de mitocôndrias isoladas a partir do músculo esquelético; (iv) avaliar parâmetros bioquímicos no homogeneizado muscular e nas mitocôndrias isoladas a partir do músculo esquelético (para toda a Fase 2 ver Tarefas 2, 3, 4, 5 e 6).

Fase 3- Acompanhamento e controlo diário dos animais (duração- 20 meses)

Nesta fase do projeto serão acompanhados todos os animais ao longo da duração do protocolo experimental, em função do que previamente se definiu para cada grupo (para toda a Fase 3 ver Tarefa 1).

Fase 4- Avaliação e recolha dos dados relativos aos animais velhos (23 meses de idade)

Nesta fase do projeto, os animais de cada grupo em avaliação (GVS, GVA, GVT) serão sacrificados com o objectivo de estudar o processo de envelhecimento e o impacto do sedentarismo e do exercício físico ao longo da vida, nas variáveis em estudo. Deste modo pretendemos, (i) avaliar a estrutura do músculo-esquelético; (ii) avaliar a morfologia de mitocôndrias isoladas a partir do músculo esquelético; (iii) avaliar a funcionalidade de mitocôndrias isoladas a partir do músculo esquelético; (iv) avaliar parâmetros bioquímicos no

homogeneizado muscular e nas mitocôndrias isoladas a partir do músculo esquelético (para toda a Fase 4 ver Tarefas 2, 3, 4, 5 e 6).

Fase 5- Análise final dos resultados

Nesta fase do projeto pretendemos analisar, interpretar e discutir os dados finais de todos os grupos em análise, o que irá permitir alcançar os objectivos do nosso projeto (ver Tarefa 7).

III.3.3 Tarefas

-Tarefa 1

Designação da tarefa- Selecção dos animais, distribuição dos grupos, controlo diário e intervenções experimentais.

Data de início de actividade (mês/ano)- 01/2014

Duração da tarefa (em meses)- Selecção dos animais e distribuição dos grupos (0,5 meses); controlo diário dos animais e intervenções experimentais (20,5 meses)- Total- 21 meses.

Pessoa*mês- 37,8

Descrição da tarefa e resultados esperados

Após uma semana de quarentena, 60 ratinhos C57BL/6J machos com 3 meses de idade serão divididos aleatoriamente em quatro grupos: grupo jovem (GJ, n= 15), grupo velhos sedentários (GVS, n= 15), grupo velhos activos (GVA, n= 15) e grupo velhos treinados (GVT; n= 15).

Os animais do GVS e do GVT serão confinados individualmente em gaiolas de roedores padrão (355x235x190 mm; Ref. 2150E, Tecniplast, Italy), e os animais do GVA serão colocados individualmente em gaiolas com acesso livre a uma roda de actividade física voluntária (364x258x350 mm; Ref.1284L0106, Tecniplast, Italy), durante todo o período do protocolo experimental (20 meses).

Os animais do GVT serão sujeitos a um protocolo de exercício de resistência, em tapete rolante, associado com adaptações cardiorespiratórias e adequado a animais de laboratório, respeitando as normas de familiarização, duração, intensidade e prevenção de lesões definidas no “*Resource book for the design of animal exercise protocols*” da *American Physiological Society*. Os animais do GVS não realizarão qualquer exercício físico, contudo, serão colocados num tapete rolante imobilizado, diariamente e à mesma hora do treino dos animais do GVT, com vista a obter condições ambientais semelhantes. Os animais do GVA realizarão actividade espontânea em função da sua vontade, ao longo de todo o protocolo experimental. Nestes animais, a actividade física voluntária será monitorizada diariamente com recurso a um sistema de *software* ligado a cada roda de actividade, que permitirá avaliar e registar diariamente a velocidade, distância percorrida e tempo de actividade de cada animal (ver VIII.7.2. *Discriminação do equipamento a adquirir*). Os animais do GJ serão sacrificados por deslocamento cervical, após a semana de quarentena, de modo a proceder à recolha dos dados morfológicos, bioquímicos e funcionais (ver Tarefas 2, 3, 4, 5 e 6).

Semanalmente será avaliado e registado o peso de todos os animais (*Digital balance, Cobos Precision, C-300-SX*).

Todos os animais serão mantidos a uma temperatura ambiente constante (21°-25° C) num ciclo diário de dia vs. noite (12 vs. 12 horas) até ao sacrifício. Comida e água serão fornecidas *ad libitum*.

Com esta tarefa esperamos que todos os animais tenham um bom estado de saúde e atinjam o término do protocolo experimental. Será de esperar que a actividade física voluntária no GVA, diminua com a idade. No que diz respeito às condições de alojamento, manuseamento, tratamento e controlo dos animais, bem como ao sacrifício e colheita de tecidos, como já referido, será cumprido o estipulado no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals-Institute for Laboratory Animal Research (ILAR, 1996)*.

Membros da equipa de investigação que participam na tarefa- Pedro Figueiredo; Bolseiro de Investigação Científica.

-Tarefa 2

Designação da tarefa- Sacrificio dos animais, colheita do tecido muscular esquelético e isolamento mitocondrial.

Data de início de actividade (mês/ano)- 02/2014

Duração da tarefa (em meses)- 2 meses

Pessoa*mês- 3,6

Descrição da tarefa e resultados esperados

Os animais serão sacrificados por deslocamento cervical e os músculos dos membros posteriores (*soleus*, *gastrocnemius*, *tibialis anterior*, e *quadriceps*) serão extraídos e pesados antes do isolamento das mitocôndrias. Um músculo *soleus* de cada animal será utilizado para análise morfológica e morfométrica em microscopia óptica (ver Tarefa 3). Os restantes músculos serão limpos de gordura e tecido conectivo visível e o peso de cada músculo individualmente será a diferença entre o peso de uma determinado volume de meio de isolamento sem o tecido e com a amostra de tecido. Seguidamente seguir-se-á o procedimento de isolamento mitocondrial que seguirá os procedimentos tradicionais de centrifugação diferencial como descrito previamente por Tonkonogi e Sahlin [2]. Resumidamente, o músculo será gentilmente cortado em meio de isolamento frio, contendo 100 mM de sacarose, 0,1 mM de EGTA, 50 mM de Tris-HCl, 100 mM de KCl, 1 mM de KH₂PO₄ e 0,2% de BSA, pH 7,4. O tecido resultante é lavado e suspenso em 10 ml de meio fresco contendo 0,2 mg/ml de proteinase bacteriana (Nagarse EC3.4.21.62, tipo XXVII; Sigma) agitando-se posteriormente durante 2 minutos. A amostra será, em seguida, cuidadosamente homogeneizada com um homogeneizador *Potter-Elvehjen* e um pistão de *Teflon*. Após a

homogeneização, três volumes de meio de isolamento, sem Nagarse, são adicionados ao homogeneizado. Após a extração de 1 mL de homogeneizado total para avaliação bioquímica da actividade da Citrato Sintetase (CS) e conteúdo de proteína total no músculo esquelético (ver Tarefa 6), o restante homogeneizado será centrifugado a 700 g durante 10 minutos. O sedimento resultante será removido, e o sobrenadante é centrifugado novamente a 10000 g durante 10 minutos. Seguidamente o sobrenadante é eliminado e o sedimento resultante será suavemente ressuspenso em meio de isolamento (1,3 ml/100 mg de tecido inicial) e centrifugado a 7000 g durante 3 minutos. No final desta última centrifugação rejeita-se o sobrenadante e o sedimento final, que contém a fracção mitocondrial, será suavemente ressuspenso (0,4 µl/mg de tecido inicial) num meio contendo 225 mM de manitol, 75 mM de sacarose, 10 mM Tris, e 0,1 mM EDTA, pH 7,4. A concentração total de proteínas na suspensão mitocondrial é estimada por espectrofotometria com o método do biureto usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (ver Tarefa 6). Todos os procedimentos de isolamento mitocondrial serão realizados entre 0-4° C. As suspensões mitocondriais serão usadas dentro do período de 2 horas após a excisão dos músculos, e serão mantidos em gelo (0-4° C) ao longo deste período.

Uma aliquota da suspensão final mitocondrial será utilizada para a avaliação bioquímica mitocondrial (ver Tarefa 6). Todos os parâmetros bioquímicos serão avaliados na suspensão mitocondrial após o tratamento com Triton X-100 a 1%. Outra alíquota será processada para análise morfológica e morfométrica mitocondrial (ver Tarefa 4). A restante suspensão mitocondrial será utilizada para avaliar a actividade respiratória mitocondrial *in vitro* (ver Tarefa 5).

Com esta tarefa esperamos obter tecido muscular esquelético em quantidade e condições excelentes. Adicionalmente, após o procedimento de isolamento esperamos obter

mitocôndrias viáveis, com níveis elevados de integridade de modo a cumprir os procedimentos inerentes à sua avaliação morfológica, funcional e bioquímica.

Membros da equipa de investigação que participam na tarefa- Pedro Figueiredo; Técnico de laboratório; Bolseiro de Investigação Científica.

-Tarefa 3

Designação da tarefa- Avaliação da morfologia e morfometria muscular esquelética.

Data de início de actividade (mês/ano)- 02/2014

Duração da tarefa (em meses)- 4 meses

Pessoa*mês- 7,2

Descrição da tarefa e resultados esperados

Pequenos pedaços de tecido muscular esquelético ($\approx 2 \text{ mm}^3$) serão fixados com formaldeído a 4% em PBS 0.1M, pH 7.2-7.4, com sacarose 2.5% e glutaraldeído 0.1%, durante 24 horas. Serão posteriormente desidratados gradativamente através do processo de incubação em etanol com diferentes concentrações (70%, 96% e absoluto; 90 minutos cada). Uma vez desidratados, o tecido será colocado em xileno durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido por um processo de inclusão em parafina de acordo com o processo histológico de rotina. Serão realizados cortes transversais dos blocos de parafina (Leica Microsystems, model RM2125) com uma lâmina descartável de aço inoxidável (Leica Microsystems, model 819) com a espessura de 5 μm , sendo as secções de tecido colocadas em lâminas de revestimento de silano (Sigma, S4651-72EA) de acordo com o processo de rotina e corados através da técnica de hematoxilina-eosina. Para avaliação morfológica e morfométrica será utilizado um microscópio óptico de transmissão (Axio Imager A1, Zeiss) e serão efectuadas cerca de 40 fotografias por lâmina. De cada fotografia serão analisadas 15 células aleatoriamente. Através da utilização de um programa de morfometria (ImageJ; Imagem NIH)

serão realizadas as análises morfométricas, nomeadamente área de cada fibra, número de núcleos, proporção de núcleos centrais e espaço intersticial.

Com esta tarefa esperamos obter tecido em qualidade excelente de modo a permitir a adequada visualização e interpretação dos dados da microscopia óptica.

Membros da equipa de investigação que participam na tarefa- Pedro Figueiredo; Bolseiro de Investigação Científica.

-Tarefa 4

Designação da tarefa- Avaliação da morfologia e morfometria mitocondrial.

Data de início de actividade (mês/ano)- 02/2014

Duração da tarefa (em meses)- 6 meses

Pessoa*mês- 10,8

Descrição da tarefa e resultados esperados

A preparação mitocondrial para microscopia electrónica de transmissão (MET) será realizada de acordo com métodos já descritos na literatura [32]. Resumidamente, 100 µL da suspensão mitocondrial serão centrifugados a 7000 g durante 10 minutos, e o sedimento resultante será fixado com glutaraldeído a 2,5%, pós-fixado com tetróxido de ósmio a 2%, desidratados em álcool e embebidos em LR White. Secções ultrafinas serão preparadas em grades de cobre (300 mesh) e contrastadas com acetato de uranilo e citrato de chumbo para posterior análise de MET (Zeiss EM 10A, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Para se obter uma caracterização global do *pellet* mitocondrial, serão preparadas várias grelhas (5-8 por animal) a partir de regiões diferentes do sedimento. A análise morfométrica será realizada em pelo menos 50 fotos por suspensão mitocondrial usando um programa de processamento morfométrico (ImageJ; Imagem NIH), conforme previamente descrito por Figueiredo et al.

[32]. Resumidamente, em cada fotografia serão determinadas as áreas das mitocôndrias e o seu número por micrómetro e micrómetro quadrado.

Com esta tarefa esperamos encontrar uma redução no número de mitocôndrias por volume (mL) nos animais pertencentes ao GVS quando comparado com os valores obtidos no grupo de animais jovens (GJ). Os animais activos (GVA e GVT) terão provavelmente um número aumentado de mitocôndrias, quando comparados com o grupo dos animais velhos sedentários. As áreas mitocondriais deverão diminuir com a idade e esta diminuição será provavelmente atenuada nos animais do GVA e GVT.

Membros da equipa de investigação que participam na tarefa- Pedro Figueiredo; Bolseiro de Investigação Científica.

-Tarefa 5

Designação da tarefa- Avaliação dos parâmetros de funcionalidade mitocondrial.

Data de início de actividade (mês/ano)- 02/2014

Duração da tarefa (em meses)- 3 meses

Pessoa*mês- 5,4

Descrição da tarefa e resultados esperados

A função respiratória mitocondrial será avaliada *in vitro* com recurso a um eléctrodo de oxigénio (Clark-type, Hansatech DW 1, Norfolk, UK). As variáveis que pretendemos avaliar consistem em parâmetros respiratórios padrão, nomeadamente o estado 3 da respiração mitocondrial (consumo de oxigénio na presença de ADP); estado 4 da respiração mitocondrial (taxa respiratória observada após conclusão da fosforilação de ADP para ATP); *respiratory control ratio* (RCR) (razão entre a taxa de consumo de oxigénio durante o estado 3 e estado 4 e um indicador de integridade mitocondrial) e o ADP/O (indicador de eficiência fosforilativa mitocondrial), que é definido como a razão entre o ADP adicionado e o oxigénio consumido

durante a fosforilação do ADP. Para quantificar a permeabilidade da membrana interna mitocondrial e a taxa máxima de desacoplamento da fosforilação oxidativa, adicionaremos oligomicina (concentração final de 1,5 µg/ml) e *carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone* (CCCP; 2 µM), respectivamente, durante a respiração em estado 3 com quantidades saturadas de ADP (concentração final de 1 mM). Os dados serão apresentados como actividade respiratória mitocondrial/mg de proteína, e actividade respiratória mitocondrial/actividade CS. No que diz respeito aos resultados esperados e considerando a função mitocondrial, espera-se que o estado 3 da respiração mitocondrial seja inferior no GVS quando comparado com os animais do GJ. Os animais sujeitos a actividade física voluntária (GVA) e exercício físico programado (GVT) terão uma taxa de respiração mitocondrial (estado 3) superior, quando comparados com os animais velhos sedentários (GVS) e, provavelmente, terão valores semelhantes aqueles apresentados pelo grupo de animais jovens. Espera-se que o estado 4 da respiração mitocondrial não sofra qualquer alteração com a idade e exercício. No que diz respeito ao RCR, um indicador da integridade mitocondrial, espera-se uma ligeira diminuição com a idade, no entanto não esperamos encontrar diferenças entre os animais activos e os jovens. Relativamente ao ADP/O, uma medida da eficiência da fosforilação oxidativa, espera-se que diminua com a idade. Esta diminuição relacionada com a idade não é esperado que ocorra nos animais activos (GVA e GVT). O estado oligomicina e o estado CCCP devem diminuir com a idade. Acreditamos que os animais activos terão valores semelhantes aos encontrados no GJ, quando se considera o estado oligomicina e o estado CCCP.

Membros da equipa de investigação que participam na tarefa- Pedro Figueiredo; Bolseiro de Investigação Científica.

-Tarefa 6

Designação da tarefa- Avaliação dos parâmetros bioquímicos no homogeneizado muscular e na fracção mitocondrial.

Data de início de actividade (mês/ano)- 03/2014

Duração da tarefa (em meses)- 4 meses

Pessoa*mês- 7,2

Descrição da tarefa e resultados esperados

Determinação das Proteínas totais- a determinação do conteúdo de proteína total no homogeneizado muscular e na suspensão mitocondrial será realizada seguindo o protocolo de Lowry et al [65] e o método do biureto, respectivamente. Em ambas as análises, albumina de soro bovino (BSA) será utilizada como padrão.

Actividade da Citrato Sintetase- a avaliação da capacidade oxidativa (actividade da CS) será realizada no homogeneizado muscular e na suspensão mitocondrial após tratamento com Triton X-100 a 0,1%. A actividade da CS será avaliada de acordo com Coore et al. [66].

Adicionalmente, aliquotas das suspensões mitocondriais serão usadas para determinação de vários marcadores de stress oxidativo, capacidade antioxidante e lesão oxidativa, nomeadamente:

Aconitase- A actividade da aconitase (ACON) será avaliada uma vez que a sua diminuição está associada a um aumento na produção de ERO e lesão oxidativa mitocondrial [67]. A sua determinação será feita por espectrofotometria, monitorizando a formação de cis-aconitate a 240 nm após a adição de 20 mM de isocitrato a 25° C, de acordo com Krebs e Holzach [68].

Superoxido dismutase- a actividade da superóxido dismutase (SOD) vai ser determinada de acordo com Beauchamp e Fridovich [69], utilizando o RANSOD-kit (Randox-Lab).

Glutationa peroxidase e Glutationa reductase- a actividade da glutaciona peroxidase e glutaciona reductase será avaliada utilizando o Ransel-kit (Randox-Lab).

Capacidade total antioxidante- a capacidade total antioxidante será avaliada espectrofotometricamente usando um kit comercial (Randox-Lab).

Glutathiona total (TGSH), reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)- para análise da TGSH, GSH e GSSG, uma alíquota de 500 µl de suspensão mitocondrial será tratada com ácido perclórico a 10% (500 µl), com posterior determinação da TGSH, GSH e GSSG de acordo com o descrito por Tietze [70].

Grupos carbonilo- a determinação da oxidação de proteínas (grupos carbonilo) será realizada por *slot-blot* após derivatização da amostra com dinitrofenilhidrazina (DNPH). A imunodeteção de carbonilos será realizada usando anti-DNP como primeiro anticorpo e *anti-rabbit IgG-peroxidase* como o segundo anticorpo.

Grupos-SH- Os grupos SH serão quantificados por espectrofotometria, como proposto por Hu [71].

Com esta tarefa pretendemos avaliar o estado oxidante com o envelhecimento e qual o impacto do exercício físico no mesmo. Esperamos, deste modo, que os marcadores de stress oxidativo e de lesão oxidativa mitocondrial aumentem com a idade. Adicionalmente, é esperado com os níveis de stress oxidativo nos animais sujeitos a exercício físico (GVA e GVT) sejam superiores aqueles encontrados nos animais jovens, mas inferiores aos avaliados nos animais velhos sedentários. Relativamente às defesas antioxidantes espera-se que exista uma diminuição com a idade, diminuição esta atenuada nos animais activos. A actividade metabólica da CS deve ser menor nos animais do GVS quando comparando com os do GJ. Nos animais do GVA e GVT, a actividade da CS deverá ser mais elevada quando comparada com os animais do GVS.

Membros da equipa de investigação que participam na tarefa- Pedro Figueiredo; Bolseiro de Investigação Científica.

-Tarefa 7

Designação da tarefa- Análise e discussão dos dados.

Data de início de actividade (mês/ano)- 03/2014

Duração da tarefa (em meses)- 22 meses

Pessoa*mês- 44,85

Descrição da tarefa e resultados esperados

O tratamento e análise dos dados será realizado recorrendo a procedimentos de análise estatística. Os resultados serão avaliados de acordo com a normalidade das distribuições utilizando os métodos gráficos de *Steam-and-Leaf* e *Box-and-Whisker*. Após a determinação da normalidade da amostra e consoante a mesma, serão utilizados testes paramétricos (ANOVA e teste *post-hoc* de *Scheffe*) ou não-paramétricos (*Wilcoxon*). As correlações entre variáveis serão realizadas utilizando o teste de *Pearson* (paramétrico) ou de *Spearmen* (não-paramétrico). A análise estatística será realizada utilizando o software *SPSS 12.0*. O nível de significância será estabelecido em 5%.

Membros da equipa de investigação que participam na tarefa- Pedro Figueiredo; Manuel Teixeira Veríssimo; Bolseiro de Investigação Científica.

III.3.4 Calendarização e Gestão do Projeto

III.3.4.1 Descrição da Estrutura de Gestão

O projeto terá início em Janeiro de 2014 e será desenvolvido pelo Investigador Pedro Figueiredo sob orientação e supervisão do Prof. Doutor Manuel Teixeira Veríssimo. Será feita a proposta de contratação de um bolseiro de investigação (Licenciado) que se prevê realizar logo no mês de Janeiro de 2014. A aquisição do material necessário será realizada em função das necessidades do projeto. Não obstante esta consideração deve-se salientar que a aquisição das gaiolas com roda de actividade e respectivo software terá de ser concretizada durante o

mês de Janeiro de 2014. As tarefas serão realizadas maioritariamente na unidade de investigação adicional (CIAFEL- Laboratório de Bioquímica e Morfologia Experimental-FADEUP). Em Abril de 2014 pretendemos ter concluída a caracterização dos animais jovens pelo que é nosso objectivo apresentar resultados preliminares do nosso estudo no *Annual Meeting of the American College of Sports Medicine* que se realizará em *Orlando, FL* no mês de Maio de 2014. De Junho até Novembro de 2014 estão previstas várias actividades, nomeadamente a divulgação dos resultados preliminares do projeto no *Annual Meeting of the Gerontological Society of América*, que se realizará em *Washington, DC* no mês de Outubro, e a preparação de um artigo científico que deverá ser submetido a periódico Internacional até ao final de Novembro de 2014. Em Dezembro de 2014 será preparado o relatório anual de actividades a submeter à FCT.

No 2º ano do projeto, durante a implementação dos protocolos inerentes aos animais em estudo, está previsto a submissão de um artigo científico até final de Março de 2015; adicionalmente será realizada a fundamentação teórica que servirá de base para os artigos que virão a ser realizados com os resultados finais do projeto. O final dos protocolos de exercício está previsto para o final de Setembro de 2015, e a conclusão da caracterização dos animais velhos (GVS, GVA e GVT) espera-se estar concluída no final de Novembro de 2015. No mês de Dezembro de 2015 serão terminados e preparados para submissão dois artigos científicos. No mesmo mês será realizado o relatório final de actividades para submeter à entidade financiadora-FCT.

De salientar que os resultados finais do projeto serão apresentados no *Annual Meeting of the American College of Sports Medicine* e no *Annual Meeting of the Gerontological Society of America*, ambos em 2016. Adicionalmente, prevê-se que alguns resultados do projeto venham a ser apresentados no âmbito de uma tese de Mestrado.

III.3.4.2 Lista de Milestones

Milestone M1

Data: 30-01-2014

Designação: Conclusão da selecção dos animais e definição de grupos. Recrutamento do bolsheiro de investigação.

Descrição: Nesta data estará finalizada a selecção dos animais e a sua distribuição por grupos.

Adicionalmente realizar-se-á a contratação do bolsheiro de investigação.

Milestone M2

Data: 30-04-2014

Designação: Conclusão da caracterização dos animais jovens (GJ).

Descrição: Nesta data estará finalizada a caracterização dos animais jovens, nomeadamente ao nível da estrutura do músculo esquelético e caracterização morfológica, bioquímica e funcional das mitocôndrias isoladas a partir do músculo esquelético dos animais jovens.

Milestone M3

Data: 30-05-2014

Designação: Apresentação de resultados preliminares.

Descrição: Serão apresentados resultados preliminares do projeto no *Annual Meeting of the American College of Sports Medicine* que se realizará em Maio de 2014 (*Orlando, FL*; EUA).

Milestone M4

Data: 30-09-2014

Designação: Apresentação de resultados preliminares.

Descrição: Serão apresentados resultados preliminares do projeto no *Annual Meeting of the Gerontological Society of America* que se realizará em Setembro de 2014 (*Washington, DC; EUA*).

Milestone M5

Data: 30-11-2014

Designação: Submissão de um artigo a periódico Internacional.

Descrição: Nesta data estará concluído para submissão a periódico Internacional um artigo do qual constarão resultados preliminares do projeto.

Milestone M6

Data: 30-12-2014

Designação: Relatório anual de actividades do projeto.

Descrição: Nesta data estará concluído para submissão à entidade financiadora- FCT, o relatório anual do 1º ano de actividades do projeto.

Milestone M7

Data: 30-03-2015

Designação: Submissão de um artigo a periódico Internacional.

Descrição: Nesta data estará concluído para submissão a periódico Internacional um artigo do qual constarão resultados preliminares do projeto.

Milestone M8

Data: 30-11-2015

Designação: Conclusão da caracterização dos animais velhos (GVS, GVA e GVT).

Descrição: Nesta data estará finalizada a caracterização dos animais velhos dos diferentes grupos em análise (GVS, GVA e GVT), nomeadamente ao nível da estrutura do músculo esquelético e caracterização morfológica, bioquímica e funcional das mitocôndrias isoladas a partir do músculo esquelético dos animais velhos e submetidos a diferentes padrões de actividade ao longo da vida.

Milestone M9

Data: 30-12-2015

Designação: Preparação e submissão de 2 artigos com resultados e conclusões finais do projeto. Apresentação de relatório final de actividades à FCT.

Descrição: Nesta data estarão concluídos para submissão a periódico Internacional dois artigos do qual constarão os resultados finais do projeto. Adicionalmente, estará concluído para submissão à entidade financiadora- FCT, o relatório final de actividades do projeto.

III.3.4.3 Cronograma

Para cronograma ver Anexo 2.

III.3.5 Referências Bibliográficas

1. Duarte, J.A., et al., *Strenuous exercise aggravates MDMA-induced skeletal muscle damage in mice*. Toxicology, 2005. **206**(3): p. 349-58.
2. Tonkonogi, M. and K. Sahlin, *Rate of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria from human skeletal muscle: effect of training status*. Acta Physiol Scand, 1997. **161**(3): p. 345-53.
3. Figueiredo, P.A., et al., *The role of mitochondria in aging of skeletal muscle*. Biogerontology, 2008. **9**(2): p. 67-84.
4. Rattan, S.I., *Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals*. Free Radic Res, 2006. **40**(12): p. 1230-8.
5. Adhietty, P. and D. Hood, *Mechanisms of apoptosis in skeletal muscle*. Basic Appl. Myol., 2003. **13**(4): p. 171-179.
6. Lenaz, G., et al., *Mitochondrial bioenergetics in aging*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1459**(2-3): p. 397-404.
7. Harman, D., *Aging: overview*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **928**: p. 1-21.
8. Cristofalo, V.J., G.S. Gerhard, and R.J. Pignolo, *Molecular biology of aging*. Surg Clin North Am, 1994. **74**(1): p. 1-21.
9. Carmeli, E., R. Coleman, and A.Z. Reznick, *The biochemistry of aging muscle*. Exp Gerontol, 2002. **37**(4): p. 477-89.
10. Doherty, T.J., *Invited review: Aging and sarcopenia*. J Appl Physiol, 2003. **95**(4): p. 1717-27.
11. Roubenoff, R., *Origins and clinical relevance of sarcopenia*. Can J Appl Physiol, 2001. **26**(1): p. 78-89.
12. Andersen, J.L., *Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle*. Scand J Med Sci Sports, 2003. **13**(1): p. 40-7.
13. Lexell, J., *Ageing and human muscle: observations from Sweden*. Can J Appl Physiol, 1993. **18**(1): p. 2-18.
14. Lexell, J., C.C. Taylor, and M. Sjostrom, *What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men*. J Neurol Sci, 1988. **84**(2-3): p. 275-94.
15. Vandervoort, A.A., *Aging of the human neuromuscular system*. Muscle Nerve, 2002. **25**(1): p. 17-25.
16. Akataki, K., et al., *Age-related change in motor unit activation strategy in force production: a mechanomyographic investigation*. Muscle Nerve, 2002. **25**(4): p. 505-12.
17. Kaminska, A.M., et al., *Ultrastructural Changes in the Skeletal Muscle of Senile Rats with Significant Age-Dependent Motor Deficits*. Basic Appl. Myol., 1998. **3**(3): p. 185-190.
18. Sakakima, H., et al., *The effects of aging and treadmill running on soleus and gastrocnemius muscle morphology in the senescence-accelerated mouse (SAMP1)*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004. **59**(10): p. 1015-21.
19. Frontera, W.R., et al., *Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study*. J Appl Physiol, 2000. **88**(4): p. 1321-6.
20. Porter, M.M., *The effects of strength training on sarcopenia*. Can J Appl Physiol, 2001. **26**(1): p. 123-41.
21. Figueiredo, P.A., et al., *Ceasing of muscle function with aging: is it the consequence of intrinsic muscle degeneration or a secondary effect of neuronal impairments?* Eur Rev Aging Phys Act, 2006. **3**(2): p. 75-83.
22. Bua, E.A., et al., *Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia*. J Appl Physiol, 2002. **92**(6): p. 2617-24.

23. Marcell, T., *Sarcopenia: causes, consequences and preventions*. Journal of Gerontology: Medical Sciences, 2003. **58A**(10): p. 911-916.
24. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
25. Miquel, J., et al., *Mitochondrial role in cell aging*. Exp Gerontol, 1980. **15**(6): p. 575-91.
26. Short, K.R. and K.S. Nair, *Does aging adversely affect muscle mitochondrial function?* Exerc Sport Sci Rev, 2001. **29**(3): p. 118-23.
27. Petersen, K.F., et al., *Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1140-2.
28. Conley, K.E., S.A. Jubrias, and P.C. Esselman, *Oxidative capacity and ageing in human muscle*. J Physiol, 2000. **526 Pt 1**: p. 203-10.
29. Tonkonogi, M., et al., *Reduced oxidative power but unchanged antioxidative capacity in skeletal muscle from aged humans*. Pflugers Arch, 2003. **446**(2): p. 261-9.
30. Mandavilli, B.S., J.H. Santos, and B. Van Houten, *Mitochondrial DNA repair and aging*. Mutat Res, 2002. **509**(1-2): p. 127-51.
31. Drew, B., et al., *Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **284**(2): p. R474-80.
32. Figueiredo, P.A., et al., *Age-induced morphological, biochemical, and functional alterations in isolated mitochondria from murine skeletal muscle*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2008. **63**(4): p. 350-9.
33. Figueiredo, P.A., et al., *Aging impairs skeletal muscle mitochondrial bioenergetic function*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2009. **64**(1): p. 21-33.
34. Ventura, B., et al., *Control of oxidative phosphorylation by Complex I in rat liver mitochondria: implications for aging*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1553**(3): p. 249-60.
35. Kerner, J., et al., *Aging skeletal muscle mitochondria in the rat: decreased uncoupling protein-3 content*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **281**(5): p. E1054-62.
36. Rasmussen, U.F., et al., *Experimental evidence against the mitochondrial theory of aging. A study of isolated human skeletal muscle mitochondria*. Exp Gerontol, 2003. **38**(8): p. 877-86.
37. Barrientos, A., et al., *Absence of relationship between the level of electron transport chain activities and aging in human skeletal muscle*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **229**(2): p. 536-9.
38. Adhietty, P.J., et al., *Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity*. Exp Physiol, 2003. **88**(1): p. 99-107.
39. Clarke, M.S., *The effects of exercise on skeletal muscle in the aged*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2004. **4**(2): p. 175-8.
40. Tracy, B.L., et al., *Muscle quality. II. Effects Of strength training in 65- to 75-yr-old men and women*. J Appl Physiol, 1999. **86**(1): p. 195-201.
41. Turner, D.L., et al., *Effects of endurance training on oxidative capacity and structural composition of human arm and leg muscles*. Acta Physiol Scand, 1997. **161**(4): p. 459-64.
42. Proctor, D.N., et al., *Oxidative capacity of human muscle fiber types: effects of age and training status*. J Appl Physiol, 1995. **78**(6): p. 2033-8.
43. Waters, D.L., et al., *Skeletal muscle mitochondrial function and lean body mass in healthy exercising elderly*. Mech Ageing Dev, 2003. **124**(3): p. 301-9.
44. Doherty, T.J., A.A. Vandervoort, and W.F. Brown, *Effects of ageing on the motor unit: a brief review*. Can J Appl Physiol, 1993. **18**(4): p. 331-58.
45. Roubenoff, R., *The pathophysiology of wasting in the elderly*. J Nutr, 1999. **129**(1S Suppl): p. 256S-259S.

46. Figueiredo, P.A., et al., *Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2009. **64**(9): p. 927-39.
47. Fiatarone, M.A., et al., *Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people*. N Engl J Med, 1994. **330**(25): p. 1769-75.
48. Cartee, G.D., *Aging skeletal muscle: response to exercise*. Exerc Sport Sci Rev, 1994. **22**: p. 91-120.
49. Evangelista, F.S., P.C. Brum, and J.E. Krieger, *Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice*. Braz J Med Biol Res, 2003. **36**(12): p. 1751-9.
50. Jones, T.E., et al., *Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(1): p. E96-101.
51. Kaplan, M.L., et al., *Cardiac adaptations to chronic exercise in mice*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 2): p. H1167-73.
52. Gleeson, T.T., W.J. Mullin, and K.M. Baldwin, *Cardiovascular responses to treadmill exercise in rats: effects of training*. J Appl Physiol, 1983. **54**(3): p. 789-93.
53. Tan, M.H. and A. Bonen, *Effect of exercise training on insulin binding and glucose metabolism in mouse soleus muscle*. Can J Physiol Pharmacol, 1987. **65**(11): p. 2231-4.
54. Wisloff, U., et al., *Intensity-controlled treadmill running in rats: VO₂ max and cardiac hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(3): p. H1301-10.
55. Short, K.R., et al., *Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(15): p. 5618-23.
56. Shigenaga, M.K., T.M. Hagen, and B.N. Ames, *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10771-8.
57. Morimoto, K., et al., *Spontaneous wheel running attenuates cardiovascular responses to stress in rats*. Pflugers Arch, 2000. **440**(2): p. 216-22.
58. Moraska, A., et al., *Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(4): p. R1321-9.
59. Allen, D.L., et al., *Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse*. J Appl Physiol, 2001. **90**(5): p. 1900-8.
60. Harrison, B.C., et al., *Skeletal muscle adaptations in response to voluntary wheel running in myosin heavy chain null mice*. J Appl Physiol, 2002. **92**(1): p. 313-22.
61. Judge, S., et al., *Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(6): p. R1564-72.
62. Davidson, S.R., M. Burnett, and L. Hoffman-Goetz, *Training effects in mice after long-term voluntary exercise*. Med Sci Sports Exerc, 2006. **38**(2): p. 250-5.
63. Storer, J.B., *Longevity and gross pathology at death in 22 inbred mouse strains*. J Gerontol, 1966. **21**(3): p. 404-9.
64. Hazelton, G.A. and C.A. Lang, *Glutathione contents of tissues in the aging mouse*. Biochem J, 1980. **188**(1): p. 25-30.
65. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
66. Coore, H.G., et al., *Regulation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase by insulin and other hormones*. Biochem J, 1971. **125**(1): p. 115-27.
67. Li, Q.Y., et al., *Dependence of excitotoxic neurodegeneration on mitochondrial aconitase inactivation*. J Neurochem, 2001. **78**(4): p. 746-55.
68. Krebs, H.A. and O. Holzach, *The conversion of citrate into cis-aconitate and isocitrate in the presence of aconitase*. Biochem J, 1952. **52**(3): p. 527-8.

69. Beauchamp, C. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels*. Anal Biochem, 1971. **44**(1): p. 276-87.
70. Tietze, F., *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues*. Anal Biochem, 1969. **27**(3): p. 502-22.
71. Hu, M.L., *Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma*. Methods Enzymol, 1994. **233**: p. 380-5.

III.3.6 Publicações Anteriores

Referência	Ano	Publicação
[21]	2006	Figueiredo PA , Mota MP, Appell HJ, Duarte J. Ceasing of muscle function with aging: is it the consequence of intrinsic muscle degeneration or a secondary effect of neuronal impairments? Eur Rev Aging Phys Act. 2006;3:75-83.
[3]	2008	Figueiredo PA , Mota MP, Appell HJ, Duarte JA. The role of mitochondria in aging of skeletal muscle. Biogerontology. 2008;9:67-84.
[32]	2008	Figueiredo PA , Ferreira RM, Appell HJ, Duarte JA. Age-induced morphological, biochemical, and functional alterations in isolated mitochondria from murine skeletal muscle. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2008;63:350-9.
[33]	2009	Figueiredo PA , Powers SK, Ferreira RM, Appell HJ, Duarte JA. Aging impairs skeletal muscle mitochondrial bioenergetic function. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2009;64:21-33.
[46]	2009	Figueiredo PA , Powers SK, Ferreira RM, Amado F, Appell HJ, Duarte JA. Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2009;64:927-39.

III.3.7 Ressubmissão da Candidatura

Esta candidatura não é uma ressubmissão.

IV. EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO

IV.1. Lista de membros

Nome	Função	Grau	% de tempo
Manuel Teixeira Veríssimo	Investigador responsável	Agregação	15%
Pedro Alexandre Figueiredo	Investigador	Doutoramento	80%

Total de membros: 2

IV.2. Lista de membros a contratar durante a execução do projeto

Membro da equipa	Função	Duração	% de tempo
Bolseiro de Investigação (BI) (Licenciado)	Bolseiro	24 meses	100%

V. PROJETOS FINANCIADOS

Sem outros projetos financiados.

V.1. Candidaturas similares

Sem candidaturas similares.

V.2. Projetos a associar à linha de investigação de excelência

Não se aplica.

VI. INDICADORES PREVISTOS

VI.1. Indicadores de realização previstos para o projeto

DESCRIÇÃO	2014	2015	2016*	Total
A- Publicações				
Livros	0	0	--	0
Artigos em revistas internacionais	1	3	--	4
Artigos em revistas nacionais	0	0	--	0
B- Comunicações				
Comunicações em encontros científicos internacionais	2	0	2	4
Comunicações em encontros científicos nacionais	0	0	--	0
C- Relatórios	1	1	--	2
D- Organização de seminários e conferências	0	0	--	0
E- Formação avançada				
Teses de Doutorado	0	0	--	0
Teses de Mestrado	0	1	--	1
Outras	0	0	--	0
F- Modelos	0	0	--	0
G- Aplicações computacionais	0	0	--	0
H- Instalações piloto	0	0	--	0
I- Protótipos laboratoriais	0	0	--	0
J- Patentes	0	0	--	0
L- Outros	0	0	--	0

(*) O ano de 2016 não faz parte integrante do projeto, contudo a apresentação dos resultados finais será realizada no decorrer desse ano razão pela qual se faz referência a 2016.

VI.2. Acções de divulgação da actividade científica

A divulgação dos resultados da actividade científica será realizada através da publicação dos resultados em periódicos Internacionais de referência. Serão igualmente apresentados os resultados (preliminares e finais) em *meetings* anuais do *American College of Sports Medicine* e da *Gerontological Society of America*.

VII. ORÇAMENTO

VII.1. Instituição proponente- Faculdade de Medicina- Universidade de Coimbra

Descrição	2014	2015	Total
Recursos Humanos	8.820,00	8.820,00	17.640,00
Missões	3.000,00	3.000,00	6.000,00
Consultores	0,00	0,00	0,00
Aquisição de bens e serviços	0,00	0,00	0,00
Registo de patentes	0,00	0,00	0,00
Adaptação de edifícios e instalações	0,00	0,00	0,00
Gastos gerais	4.764,00	2.364,00	7.128,00
TOTAL DESPESAS CORRENTES	16.584,00	14.184,00	
Equipamento	12.000,00	0,00	12.000,00
Total	28.584,00	14.184,00	42.768,00

VII.2. Instituições participantes- CIAFEL- Laboratório de Bioquímica e Morfologia Experimental

Descrição	2014	2015	Total
Recursos Humanos	0,00	0,00	0,00
Missões	0,00	0,00	0,00
Consultores	0,00	0,00	0,00
Aquisição de bens e serviços	15.000,00	20.000,00	35.000,00
Registo de patentes	0,00	0,00	0,00
Adaptação de edifícios e instalações	0,00	0,00	0,00
Gastos gerais	3.000,00	4.000,00	7.000,00
TOTAL DESPESAS CORRENTES	18.000,00	24.000,00	
Equipamento	0,00	0,00	0,00
Total	18.000,00	24.000,00	42.000,00

VII.3. Orçamento global

Descrição	2014	2015	Total
Recursos Humanos	8.820,00	8.820,00	17.640,00
Missões	3.000,00	3.000,00	6.000,00
Consultores	0,00	0,00	0,00
Aquisição de bens e serviços	15.000,00	20.000,00	35.000,00
Registo de patentes	0,00	0,00	0,00
Adaptação de edifícios e instalações	0,00	0,00	0,00
Gastos gerais	7.764,00	6.364,00	14.128,00
TOTAL DESPESAS CORRENTES	34.584,00	38.184,00	
Equipamento	12.000,00	0,00	12.000,00
Total	46.584,00	38.184,00	84.768,00

VII.4. Plano de financiamento

Descrição	2014	2015	Total
Financiamento solicitado à FCT	46.584,00	38.184,00	84.768,00
Financiamento próprio	0,00	0,00	0,00
Outro financiamento público	0,00	0,00	0,00
Outro financiamento privado	0,00	0,00	0,00
Total do Projeto	46.584,00	38.184,00	84.768,00

VIII. JUSTIFICAÇÃO DO ORÇAMENTO

VIII.1 Justificação dos recursos humanos

Tipo: Bolsa de investigação (Licenciado).

Nº de pessoas: 1

Duração (em meses): 24

Custo envolvido (€) 17.640,00

Justificação do financiamento solicitado: Considerando a variedade de análises bioquímicas, o trabalho laborioso inerente à preparação dos tecidos para análise microscópica

e todos os procedimentos relacionados com a manutenção, cuidado e treino diários dos animais, consideramos ser necessário a presença permanente de um jovem investigador que ajudará a realizar as tarefas inerentes ao projeto.

VIII.2. Justificação de missões

Tipo: Participação em congressos.

Nº de deslocações: 4

Local: Em 2014 (*Orlando, FL; Washington, DC*); em 2016 (*Boston, Massachusetts; New Orleans, LA*).

Custo envolvido (€) 6.000,00

Justificação do financiamento solicitado: Os resultados do projeto (preliminares e finais) serão apresentados em *meetings* anuais do *American College of Sports Medicine* e da *Gerontological Society of America*.

VIII.3. Justificação de consultores

Não haverá despesas com consultadoria de apoio ao projeto.

VIII.4. Justificação de aquisição de bens e serviços

Tipo: Aquisição e manutenção diária dos animais.

Custo envolvido (€): 7.500,00

Justificação do financiamento solicitado: Será necessário adquirir 60 animais C57BL/6J e manter 45 deles durante cerca de 20/21 meses, com todas as despesas inerentes a essa manutenção, nomeadamente alimentação e material de limpeza e esterilização das gaiolas.

Tipo: Material de laboratório, kits comerciais e reagentes.

Custo envolvido (€): 22.500,00

Justificação do financiamento solicitado: Será essencial a aquisição de material de laboratório diverso (e.g. micropipetas, tubos *eppendorf*, frascos de vidro, recipientes colectores, luvas, entre outro material consumível), bem como kits comerciais e reagentes de modo a cumprir as tarefas inerentes ao projeto. Salientamos, neste âmbito, a elevada quantidade de análises previstas em cada tarefa o que aumenta os custos laboratoriais, nomeadamente ao nível da aquisição de reagentes específicos não só para as análises bioquímicas e funcionais mas também para a preparação dos tecidos com vista à análise em microscopia electrónica de transmissão.

Tipo: Manutenção do microscópio electrónico.

Custo envolvido (€): 5.000,00

Justificação do financiamento solicitado: Assegurar a manutenção do microscópio electrónico é crucial uma vez que a interpretação dos resultados do projeto dependem em parte da análise dos resultados da morfologia. Deste modo a manutenção técnica do microscópio pela *Zeiss Company* será importante para garantir a sua funcionalidade.

VIII.5. Registo de patentes

Não aplicável.

VIII.6. Adaptação de edifícios e instalações

Não aplicável.

VIII.7. Justificação do equipamento

VIII.7.1. Equipamento já disponível para a execução do projeto

Tipo de equipamento	Fabricante	Modelo	Ano
<i>Refrigerated centrifuge</i>	<i>Sigma/Braun</i>	<i>2K15</i>	2001
<i>Plate reader</i>	<i>Labsystems</i>	<i>iEMS</i>	2002
<i>Tissue homogeneizer</i>	<i>Stuart Scientific</i>	<i>Stirrer ss3</i>	1999
<i>pH meter</i>	<i>WTW</i>	<i>pH526</i>	2004
<i>Refrigerator</i>	<i>Balay</i>	<i>Pentan</i>	2003
<i>-80°C freezer</i>	<i>Sanyo</i>	<i>MDF-U3086S</i>	2001
<i>Oven</i>	<i>WTC Binder</i>	<i>E28</i>	2000
<i>Analytical balance</i>	<i>Kern</i>	<i>870</i>	2000
<i>Digital balance</i>	<i>Cobos Precision</i>	<i>C-300-SX</i>	2000
<i>Destilator</i>	<i>GFL</i>	<i>2002</i>	2000
<i>Purified Water System</i>	<i>Purelab</i>	<i>Plus UV/UF</i>	2000
<i>Spectrophotometer UV-Vis</i>	<i>Milton Roy</i>	<i>Genesys 5</i>	1995
<i>Power source</i>	<i>Amersham Pharmacia</i>	<i>EPS 601</i>	2001
<i>Power source</i>	<i>Amersham Pharmacia</i>	<i>EPS 301</i>	2002
<i>Electrophoresis tank</i>	<i>Amersham Pharmacia</i>	<i>Hoefler mini ve</i>	2002
<i>Transmission electron microscope</i>	<i>Zeiss</i>	<i>EM 10A</i>	1985
<i>Photomicroscope</i>	<i>Zeiss</i>	<i>Phomix III</i>	1990
<i>Ultramicrotome</i>	<i>Reichert</i>	<i>Ultracut</i>	1995
<i>Knife Maker</i>	<i>LKB</i>	<i>7800B</i>	1995
<i>nanoHPLC</i>	<i>LC Packings, Dionex</i>	<i>Ultimate 3000</i>	2006
<i>Two-dimensional gel electrophoresis systems</i>	<i>Amersham Biosciences</i>	<i>IpGphor, Hoefler 600, Hoefler 300</i>	2001
<i>Oxygen electrode</i>	<i>Hansatech</i>	<i>Oxytherm</i>	2004
<i>Light microscope</i>	<i>Zeiss</i>	<i>Axio Imager A1</i>	----

VIII.7.2. Discriminação do equipamento a adquirir

Tipo de equipamento: Gaiolas para roedores com rodas de actividade e sistema telemétrico

Fabricante: Tecniplast

Modelo: Mice

Custo envolvido (€): 12.000,00

Justificação do financiamento solicitado: Será necessário adquirir 20 gaiolas com sistema de roda de actividade espontânea de modo a registar a actividade física voluntária realizada pelos animais ao longo do protocolo experimental. O sistema de *software* permitirá registar continuamente o tempo de actividade, a velocidade e a distância percorrida por cada animal.

IX. ANEXOS

Ver Anexo 1- Protocolo experimental

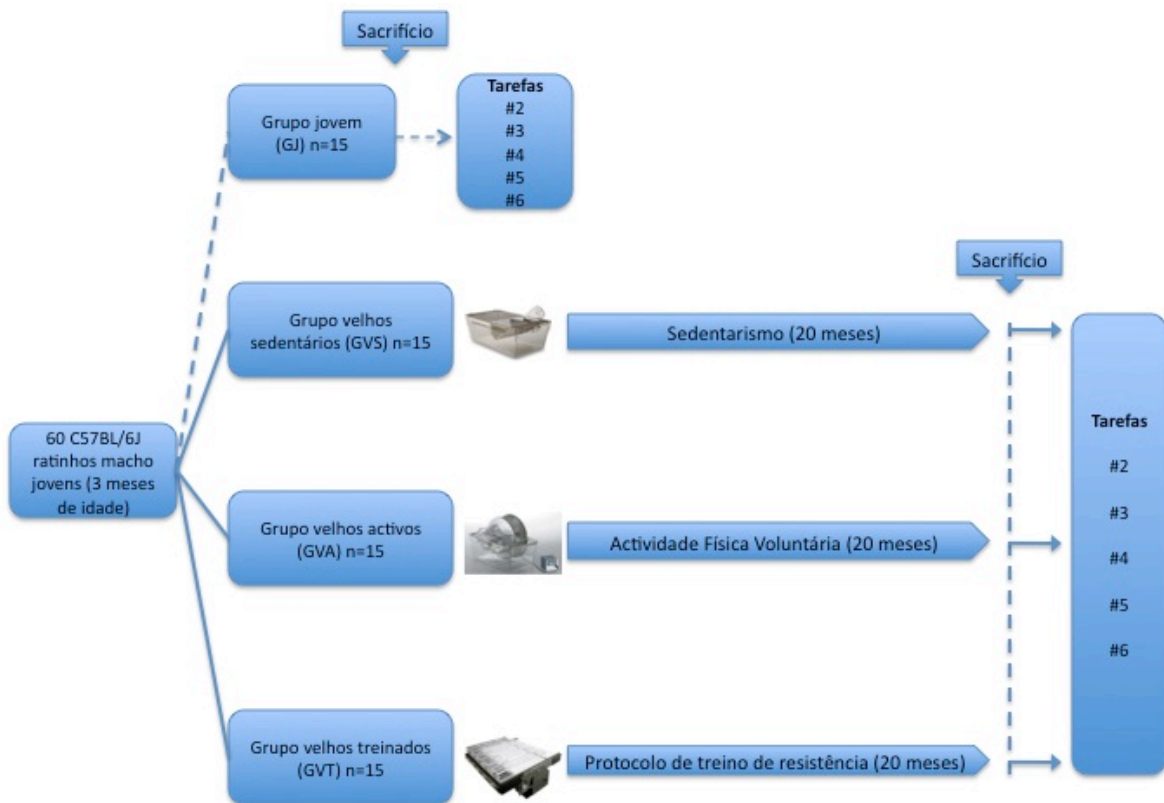
Ver Anexo 2- Cronograma

X. CONFLITOS DE INTERESSE

Não existem conflitos de interesse.

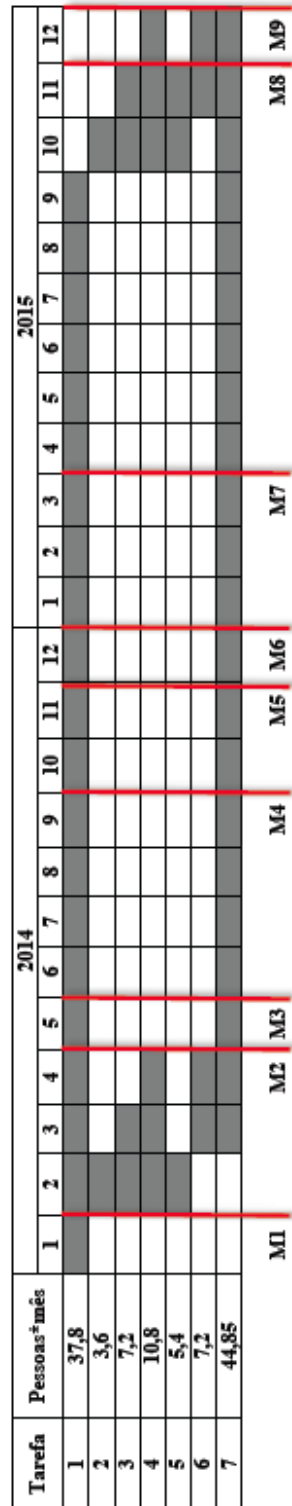
ANEXO 1

-Protocolo experimental



ANEXO 2

-Cronograma



Legenda:

- M1- Conclusão da selecção dos animais e definição de grupos
 - M2- Recrutamento do bolsheiro de investigação
 - M3- Conclusão da caracterização dos animais jovens (GJ)
 - M4- Apresentação de resultados preliminares (*Annual Meeting of the American College of Sports Medicine*)
 - M5- Apresentação de resultados preliminares (*Annual Meeting of the Gerontological Society of America*)
 - M6- Submissão de um artigo a revista internacional
 - M7- Apresentação de relatório de actividades anual à FCT
 - M8- Submissão de um artigo a revista internacional
 - M9- Conclusão da caracterização dos animais velhos (GVS, GVA e GVT)
- Preparação e submissão de 2 artigos com resultados e conclusões finais do projecto
- Apresentação de relatório final de actividades à FCT

ANEXO 3¹

O formulário de candidatura tem 10 secções:

1. Identificação do projeto
2. Instituições envolvidas
3. Componente científica
4. Equipa de investigação
5. Projetos financiados
6. Indicadores previstos
7. Orçamento
8. Justificação do orçamento
9. Anexos
10. Conflitos de Interesse

1. Identificação do projeto: Informação sobre o título e área científica (principal e secundária) do projeto, palavras chave, data de início do projeto e sua duração. O financiamento solicitado é calculado automaticamente a partir do preenchimento dos quadros do orçamento.

2. Instituições participantes. As instituições estão classificadas em:

- Instituição Proponente
- Instituições Participantes
- Unidade de Investigação Principal
- Unidades de Investigação Adicionais
- Instituição de Acolhimento

As instituições participantes são inseridas uma a uma dentro do respectivo quadro. Se a instituição pretendida não se encontrar na lista deverá preencher o formulário disponibilizado para o efeito e seguir as instruções. A designação de Unidade de Investigação está reservada de acordo com critérios da FCT incluindo nomeadamente as que são objecto de financiamento plurianual.

¹ Adaptado de *Guião para elaboração e submissão de propostas de projetos de IC&DT, Fundação para a Ciência e Tecnologia, Ministério da Educação e Ciência, v6, 2012.*

3. Componente Científica.

A Componente Científica da candidatura organiza-se da seguinte forma:

- 3.1-Sumário (em português e inglês)
- 3.2-Descrição Técnica
 - 3.2.1-Revisão da Literatura
 - 3.2.2-Plano de Investigação e Métodos
 - 3.2.3-Tarefas
 - 3.2.4-Calendarização e Gestão do Trabalho
- 3.3-Referências Bibliográficas
- 3.4-Publicações Anteriores (máx. 5 referências)
- 3.5-Ressubmissão de Candidatura

4. Equipa de Investigação.

O quadro da equipa de investigação divide-se em 2 secções:

4.1-Lista de elementos da equipa

Nesta lista cada investigador deverá fornecer a sua chave de associação para ser adicionado como membro da equipa. Após efectuada esta operação, é apresentada para escolha a percentagem de participação no projeto.

4.2-Lista de outros elementos a contratar durante a execução do projeto

Estes elementos são automaticamente adicionados à equipa através do quadro justificação dos recursos humanos, indicando o nº de pessoas e o tipo de vínculo.

5. Outros projetos

5.1-Projetos financiados

Os projetos financiados do mesmo IR podem ser adicionados de duas formas conforme se trate de um financiamento da FCT ou de outra entidade. No caso de se tratar de um financiamento atribuído pela FCT deverá ser fornecida a referência do projeto o que aciona a importação automática de dados referentes ao projeto, alguns dos quais passíveis de correção ou de completação. Para projetos financiados por outras instituições, é necessário preencher a referência e, seguidamente, todos os elementos do projeto.

5.2-Candidaturas similares

É obrigatório referir qualquer outra candidatura similar à corrente que possa vir a configurar, se ambas forem aceites, uma situação irregular. A interface é análoga à usada para indicar projetos financiados.

5.3-Projetos a Associar à Linha de Investigação de Excelência

Tipicamente os projetos de IC&DT em linhas de investigação de excelência devem agrupar pelo menos três projetos de investigação com financiamento obtido em concursos competitivos nos últimos 5 anos.

Os projetos financiados do mesmo IR ou de outros membros da equipa de investigação podem ser adicionados de duas formas conforme se trate de um financiamento da FCT ou de outra entidade.

No caso de se tratar de um financiamento atribuído pela FCT deverá ser fornecida a referência do projeto o que aciona a importação automática de dados referentes ao projeto, alguns dos quais passíveis de correção ou de completação.

Para projetos financiados por outras instituições, é necessário preencher a referência e, seguidamente, todos os elementos do projeto.

6. Indicadores previstos

7. Orçamento

É obrigatório preencher um quadro de orçamento para a Instituição Proponente e para cada uma das Instituições Participantes. O total dos valores inscritos representa o financiamento solicitado. Adicionalmente, e quando aplicável, deve ser preenchido o quadro Plano de Financiamento. As rubricas orçamentais podem incluir (dependendo do estabelecido no edital do concurso):

-Recursos humanos: Os recursos humanos propostos nesta rubrica aparecerão automaticamente na secção de Equipa de investigação.

-Missões: O total desta rubrica deve corresponder ao total que é apresentado no quadro *Orçamento Global* na secção Orçamento.

-Consultores: O total desta rubrica deve corresponder ao total que é apresentado no quadro *Orçamento Global* na secção Orçamento. Dada a importância dos Consultores para a avaliação da execução do projeto e da equipa, as indicações de nome e instituição devem ser não ambíguas de maneira a possibilitar a sua fácil identificação pelo painel de avaliação.

Recomenda-se a existência na Internet de um pequeno currículo público atualizado e facilmente localizável.

-Aquisição bens e serviços: O total desta rubrica deve corresponder ao total que é apresentado no quadro *Orçamento Global* na secção Orçamento.

-Registo de patentes: O total desta rubrica deve corresponder ao total que é apresentado no quadro *Orçamento Global* na secção Orçamento.

-Adaptação de edifícios e instalações: As adaptações de edifícios e instalações imprescindíveis à realização do projeto, nomeadamente por razões ambientais ou de segurança.

-Equipamento: O total desta rubrica deve corresponder ao total que é apresentado no quadro *Orçamento Global* na secção Orçamento.

-Despesas Gerais

8. Justificação do orçamento

A justificação do orçamento deverá ser inscrita por rubrica. O total de cada uma das rubricas deverá ser igual ao indicado no quadro *Orçamento Global*. Não existe transferência automática de verbas entre os dois quadros.

9. Ficheiros Anexos

Esta secção destina-se à inserção de documentos que contendo informação não transmissível nos campos de texto: fórmulas, esquemas, diagramas, gráficos ou imagens.

10. Conflitos de Interesse: Esta secção destina-se a identificar os avaliadores que constituam um claro conflito de interesse na avaliação do projeto.

Limites de número de caracteres dos vários campos do formulário:

Campo	Limite
1. Identificação do projeto - Título PT	255
1. Identificação do projeto - Título EN	255
3.1. Sumário PT	5000
3.1. Sumário EN	5000
3.2.1. Revisão da Literatura	6000
3.2.2. Plano de Investigação e Métodos	10000
3.2.3. Tarefas - Descrição e resultados esperados	4000
3.2.4.a. Descrição da Estrutura de Gestão	3000
3.2.4.b. Descrição de <i>Milestone</i>	300
5. Projetos financiados – Resultados	5000
6. Indicadores previstos - Ações de divulgação da atividade científica	3000
8.1. Justificação dos Recursos Humanos	600
8.2. Justificação de Missões	600
8.3. Justificação de Consultores	600
8.4. Justificação de Aquisições de Bens e Serviços	600
8.5. Justificação de patentes	600
8.6.2. Discriminação do equipamento a adquirir - Justificação	600
8.7. Justificação da adaptação de edifícios	600