

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS UFSCAR\UNESP**

**PAPEL DO EXERCÍCIO RESISTIDO NA ATROFIA  
MUSCULAR INDUZIDA POR DEXAMETASONA.**

ALUNO: André Luis de Oliveira Krug

ORIENTADORA: Profª Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso

**SÃO CARLOS - SP**

**MARÇO – 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS UFSCAR\UNESP**

**PAPEL DO EXERCÍCIO RESISTIDO NA ATROFIA**  
**MUSCULAR INDUZIDA POR DEXAMETASONA.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos - PIPGCF UFSCar/UNESP como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

ALUNO: André Luis de Oliveira Krug

ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup> Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso

**SÃO CARLOS - SP**

**MARÇO – 2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

K94pe

Krug, André Luis de Oliveira.

Papel do exercício resistido na atrofia muscular induzida por dexametasona / André Luis de Oliveira Krug. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

60 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Fisiologia. 2. Treinamento resistido. 3. Atrofia muscular. 4. Glicocorticoides. I. Título.

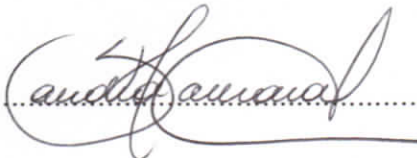
CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de André Luis de Oliveira Krug

Dia 28/03/2014

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Lia do Amaral Cardoso.....

Prof. Dr. Anderson Saranz Zago.....

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.....

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação primeiramente a Deus, pois sem ele nada é possível. A minha mãe e a meu pai, onde quer que ele esteja agora. A minha família maravilhosa, namorada e amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, e a todos os professores e funcionários que contribuíram durante minha jornada nessa pós-graduação.

Agradeço ao suporte financeiro realizado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

Agradeço ao suporte financeiro realizado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

Aos meus anfitriões na cidade de São Carlos: Julio César, Danilo Bertucci, Léo Ruffoni, Jose Campanholi Neto, Gustavo Canevazzi e outros que me acolheram durante o período de disciplinas, colaborando com discussões, caronas, etc.

Aos meus amigos na cidade de Bauru, seja no laboratório, academia da Unesp ou em casa. Todos tiveram contribuições em minha jornada.

A minha orientadora e mentora Dr<sup>a</sup> Sandra Lia do Amaral Cardoso, a qual acolheu um jovem vindo de longe em seu laboratório para pleitear uma de suas vagas de mestrado. Obrigado pela oportunidade, por mostrar os erros assim como os caminhos a serem seguidos. Saiba que levarei muito de seus ensinamentos.

A minhas tias, tios, avós e Nelito que sempre me apoiaram em minha jornada acadêmica e com muito entusiasmo me indagavam sobre meus estudos, além de sempre festejarem minha chegada a cidade morena. Obrigado.

A minha namorada Viviane que com certeza tem muita paciência para me ouvir, por também suportar nossa distância e por acreditar que faço algo por nós. Gata te amo!

A meu irmão que após a morte de meu pai tornou-se centro de minhas atenções, não por somente carregar uma centelha de meu pai querido, mas por saber que é uma pessoa com um potencial tremendo ainda a ser trabalhado, como um diamante bruto. Brother te amo.

Ao amigo Rodrigo Alvares Monteiro pelos bons papos, conselhos e suporte financeiro.

A minha mãe Marta que sempre me apoiou e confortou em todos os momentos que julguei difíceis. Mesmo a distância seu amor me completava e dava forças pra seguir. Obrigado por me fazer o que sou hoje.

Em memória a meu paizão Valdemir homem forte e dedicado à família, que hoje está na presença de Deus. Sem sombra de dúvidas o senhor foi e será minha inspiração, meu exemplo. Onde quer que o senhor esteja essa conquista é para o senhor! Obrigado por me fazer o homem que sou hoje, sempre o amarei.

## RESUMO

O uso de glicocorticoides como tratamento de quadros inflamatórios e alérgicos tem sido uma constante na atualidade, embora, cronicamente provoque vários efeitos colaterais como resistência periférica à insulina, hiperglicemia e hiperinsulinemia, hipertensão, dislipidemia, perda de peso corporal e atrofia muscular. Por outro lado o treinamento resistido (TR) tem sido recomendado como tratamento não farmacológico em alguns estados patológicos, embora pouco se conheça sobre seus efeitos sobre a atrofia muscular induzida pelo tratamento crônico com dexametasona (DEX). O objetivo principal deste trabalho foi verificar o efeito preventivo do TR a 80% do carregamento máximo sobre a atrofia muscular induzida pela DEX, bem como os mecanismos responsáveis por esta resposta. Foram utilizados 43 ratos Wistar (200-250g) distribuídos em 4 grupos: sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com DEX (TD). Após um período de adaptação na escada, foi realizado um teste de carregamento máximo (TCM) para determinação da intensidade do treino. Em seguida, os ratos foram submetidos ao treinamento resistido (80% da capacidade máxima, 4 dias/semana, 70 dias) ou mantidos sedentários. Os TCM foram realizados no início do protocolo experimental, após 4 semanas, antes e após o tratamento com DEX. Nos últimos 10 dias, os animais receberam DEX (0,5 mg/kg por dia, *i.p.*) ou solução salina. Após 24 horas da última sessão de exercício, os animais foram eutanasiados e os músculos flexor longo do hálux (FHL), tibial anterior (TA) e sóleo (SOL) foram coletados, pesados e seus valores normalizados pelo tamanho da tibia. Analisamos a produção das proteínas mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM,  $\alpha < 0,05$ . A DEX provocou redução do peso da glândula adrenal (-47%), peso corporal (-21%) e ingestão alimentar (-28%). O TR aumentou a capacidade física dos animais treinados (+215%). O tratamento com DEX reduziu a massa muscular do FHL e TA (-19,6% e -17,7%, respectivamente), que foi associada ao aumento da proteína MuRF-1 (+37% e +45,5%, respectivamente), não foram observadas alterações nas proteínas mTOR, p70S6K, FOXO3a e Atrogina-1 após o tratamento com DEX. O TR foi capaz de atenuar a atrofia no músculo FHL, pois conseguiu bloquear o aumento da proteína MuRF-1 (-3,5%), além de aumentar os níveis de mTOR (+63% para TC e TD) e p70S6K (+46% e +49% para TC e TD, respectivamente), embora não tenha alterado os valores de FOXO3a e Atrogina-1. O músculo SOL não foi alterado nem pelo tratamento nem pelo treinamento. Portanto, os resultados obtidos até o presente momento permite-nos sugerir que a atrofia observada nos músculos TA e FHL causadas por 10 dias de tratamento com DEX pode estar associada ao aumento da proteína MuRF-1. Por sua vez, o TR foi capaz de prevenir a atrofia no músculo FHL em decorrência do aumento de mTOR e p70S6K somados a manutenção dos valores de MuRF-1.

**Palavras chave:** Treinamento resistido em escada, Atrofia muscular, Glicocorticoides.



## ABSTRACT

The use of glucocorticoids as treatment for allergic and inflammatory conditions has become common nowadays, although, chronically it can cause many side effects such as peripheral insulin resistance, hyperglycemia and hyperinsulinemia, hypertension, dyslipidemia, body weight loss and muscle atrophy. On the other hand, resistance training (RT) has been recommended as non-pharmacological treatment for some pathological conditions, however little is known about its effects on muscle atrophy induced by chronic treatment with dexamethasone (DEX). The aim of this study was to verify the preventive effect of RT (80% of maximal carrying capacity) on DEX-induced muscle atrophy as well as the responsible mechanisms for this response. Forty-three wistar rats (200-250g) were allocated into four groups: sedentary control (SC), sedentary treated with DEX (SD), trained control (TC) and trained treated with DEX (TD). After a familiarization period on the ladder, a maximal voluntary carrying capacity test (MVCC) was performed to determine the training intensity and the rats underwent RT (80% MVCC, 4 days/week, 70 days) or remained sedentary. The MVCC was performed in the beginning, after 4 weeks, before and after the DEX treatment. Through the last ten days, the animals received DEX (0.5 mg/kg/day, *i.p.*) or saline solution. After 24 hours of the last training session, the animals were euthanized and the flexor hallucis longus (FHL), tibialis anterior (TA) and soleus (SOL) muscles were collected and weighted for further analysis of mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogin-1 and MuRF-1 protein levels. The results were presented as mean  $\pm$  SEM,  $\alpha < 0.05$ . DEX treatment evoked adrenal gland atrophy (-47%), body weight loss (-21%) and food intake reduction (-28%). The RT increased MVCC of trained animals (+215%). Also, DEX treatment reduced FHL and TA muscles mass (-19.6% and -17.7%, respectively), which was associated with the MuRF-1 protein level increase (+37% and +45.5%, respectively). We did not observe any alterations in mTOR, p70S6K, FOXO3a and Atrogin-1 protein levels after DEX treatment. RT was able to attenuate FHL muscle atrophy due to blockade of MuRF-1 increase (-3.5%). In addition, it did increase mTOR (+63% for TC and TD) and p70S6K (+46% and +49% for TC and TD, respectively) protein levels in FHL muscle. FOXO3a and Atrogin-1 protein levels were not altered by RT. SOL muscle was not affected by neither treatment nor training. Therefore, these results allow us to suggest that DEX-induced muscle atrophy observed in the FHL and TA muscles can be associated with increases in MuRF-1 protein level. RT-induced attenuation of FHL muscle atrophy involved increases in mTOR and p70S6K protein levels associated with maintenance of MuRF-1 protein levels.

**Key words:** Ladder-resistance training, muscle atrophy, Glucocorticoids.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração esquemática da sequência de eventos que controlam a homeostase do músculo esquelético. Proteínas responsáveis na síntese proteica/hipertrofia (sem preenchimento) e proteínas responsáveis pela degradação proteica/atróficas (preenchidas em cinza). Adaptado de Glass D. J. 2005 e Schakman et al. 2013..... 15
- Figura 2.** Demonstração esquemática do sistema ubiquitina-proteassoma. Ub: Molécula de ubiquitina, E1: Enzima ativadora de ubiquitina, E2: Enzima conjugadora de ubiquitina, E3: ubiquitinas ligases. (adaptado de MURTON; CONSTANTIN; GREENHAFFET, 2008). ..... 17
- Figura 3.** Desenho experimental durante os 70 dias de acompanhamento. PC: peso corporal, TCM: teste de carregamento máximo. ....23
- Figura 4.** Escada de madeira utilizada no protocolo de treinamento resistido. Contém 110 cm de altura com degraus de ferro e inclinação de 80 graus. Vista frontal (painel à esquerda) e vista lateral (painel à direita).....25
- Figura 5.** A: Resultados dos testes de carregamento máximo realizados na escada durante o protocolo experimental, nas 4 avaliações (TCM-1, TCM-2, TCM-3 e TCM-4) nos 4 grupos avaliados: sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Three-way. B: Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-3 e TCM-1 dos animais treinados versus sedentários, teste t-Student. C: Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-4 e TCM-3 em todos os grupos analisados, ANOVA Two-way. Significância: a: efeito do treinamento; c: efeito do momento; \* vs controles e sedentários,  $p < 0,05$ .....30
- Figura 6.** A: Resultados dos testes de carregamento máximo realizados na escada durante o protocolo experimental normalizados pelo PC, nas 4 avaliações (TCM-1, TCM-2, TCM-3 e TCM-4) nos 4 grupos avaliados: sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Three-way. B: Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-3 e TCM-1 dos animais treinados versus sedentários normalizados pelo PC, teste t-Student. C: Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-4 e TCM-3 normalizados pelo PC em todos os grupos analisados, ANOVA Two-way. Significância: a: efeito do treinamento; c: efeito do momento; \* vs controles e sedentários,  $p < 0,05$ .....31

**Figura 7.** Valores de massa da glândula adrenal ao final do protocolo experimental, nos diferentes grupos analisados: sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Two-way. Significância: \* vs controle,  $p < 0,05$ . .....32

**Figura 8.** Evolução do peso corporal durante 8 semanas de treinamento resistido e no período de 10 dias de tratamento com DEX (10 dias) nos grupos sedentário controle (SC) sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Three-way. Significância: a: efeito do treinamento; b: efeito do tratamento; c: efeito do momento,  $p < 0,05$ . .....33

**Figura 9.** Ingestão alimentar antes e durante os 10 dias de tratamento em todos os grupos analisados: Sedentário controle (SC), Sedentário tratado com dexametasona (SD), Treinado controle (TC), Treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Three-way. Significância: b: efeito do tratamento; c: efeito do momento,  $p < 0,05$ . ....35

**Figura 10.** Valores de massa muscular do Flexor Longo do Hálux (FHL), normalizado pelo tamanho da tíbia (cm) e análise densitométrica da produção proteica de mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1 em todos os grupos analisados: Sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Two-way. Significância: \*vs controle, + vs sedentário  $p < 0,05$ . .....36

**Figura 11.** Valores de massa muscular do Tibial Anterior (TA), normalizado pelo tamanho da tíbia (cm) e análise densitométrica da produção proteica de mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1 em todos os grupos analisados: Sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Two-way. Significância: \*vs controle,  $p < 0,05$ . .....38

**Figura 12.** Valores de massa muscular do músculo Sóleo (SOL), normalizado pelo tamanho da tíbia (cm) e análise densitométrica da produção proteica de mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1 em todos os grupos analisados: Sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Two-way. Significância:  $p < 0,05$  .....40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores de peso corporal (PC) e músculos tibial anterior (TA), flexor longo do hálux (FHL) e sóleo (SOL) normalizados pelo peso corporal e tibia nos quatro grupos analisados. ....	34.
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**4E-BP1:** Proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E.

**AA:** Aminoácidos.

**ACTH:** Hormônio adrenocorticotrófico.

**AKT:** Treonina\serina tirosina quinase.

**BSA:** Albumina bovina.

**CRH:** Fator liberador de corticotrofina.

**DEX:** Dexametasona.

**E1:** Enzima ativadora de Ubiquitina.

**E2:** Enzima conjugadora de Ubiquitina.

**E3:** Ubiquitina-ligases.

**EDL:** Extensor longo dos dedos.

**FHL:** Músculo Flexor longo do hálux.

**FOXO:** Família de proteínas sensoras das vias de sinalização da insulina.

**g:** Gramas.

**GC:** Glicocorticoides.

**IA:** Ingestão alimentar.

**IGFBP-5:** Proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina 5.

**IGF-I:** Fator de crescimento semelhante à insulina 1.

**IRS-1:** Substrato do receptor de insulina-1.

**Kg:** Quilogramas.

**MAFbx:** Muscle atrophy F-box protein.

**Mg:** Miligramas.

**mRNA:** RNA mensageiro.

**mTOR:** Proteína alvo da rapamicina em mamíferos.

**MuRF-1:** Muscle Ringer Finger Protein 1.

**MyoD:** Fator de regulação miogênica.

**PC:** Peso corporal.

**p70S6K:** Proteína Ribossomal S6 quinase.

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3 quinase.

**PIC:** Coquetel inibidor de proteases.

**REDD1:** Fator de regulação do desenvolvimento e respostas de dano no DNA-1.

**SC:** Ratos sedentários controle.

**SD:** Ratos sedentários tratados com dexametasona.

**SOL:** Músculo Sóleo.

**TA:** Músculo Tibial anterior.

**TC:** Ratos treinados controles.

**TCM:** Teste de carregamento máximo.

**TD:** Ratos treinados tratados com dexametasona.

**TR:** Treinamento resistido.

**Ub:** Ubiquitina.

**UPS:** Sistema Ubiquitina proteassoma.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
1.1 EFEITOS DA DEXAMETASONA.....	13
1.2. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO.....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
2.1. OBJETIVO GERAL .....	22
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	22
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
3.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	23
3.2. ADAPTAÇÃO DOS ANIMAIS AO PROTOCOLO DE TREINAMENTO.....	24
3.3. TESTE DE CARREGAMENTO MAXIMO DE PESO.....	25
3.4. CRONOGRAMA DE TREINAMENTO RESISTIDO .....	26
3.5. RETIRADA DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS.....	26
3.6. PROTOCOLO DE DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	27
3.7. PROCEDIMENTOS DE WESTERN BLOTTING.....	27
3.8. MÉTODOS ESTATÍSTICOS .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	29
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	52
<b>8. ANEXOS</b> .....	61
8.1. ANEXO 1 - PARECER DO COMITE DE ÉTICA .....	61

## 1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA

Os glicocorticoides (GC) são hormônios produzidos na região cortical das glândulas adrenais. Sua produção e secreção são controladas pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) liberado pela adenohipófise. O ACTH sofre regulação dos neurônios hipotalâmicos do núcleo paraventricular, por meio do fator liberador de corticotrofina (CRH) ou do mecanismo de *feedback* negativo neuroendócrino, realizado pelo próprio hormônio ao ligar-se a seu receptor no hipotálamo e/ou hipófise anterior causando a inibição da liberação de CRH e ACTH, respectivamente. Contudo, outras situações podem alterar esse controle, por exemplo o estresse físico, cirúrgico e hiperglicêmico, além de citocinas inflamatórias (interleucinas 1 e 6 e o fator de necrose tumoral). Os GC atuam em praticamente todos os tecidos e sistemas corporais (tecidos hepático, muscular, adiposo, epitelial, renal, ósseo e sistema cardiovascular, sistema nervoso central e sistema imunológico) (AIRES, 2008).

O cortisol (corticosterona em roedores) é o único representante fisiológico dos GC e atua na mobilização de carboidratos, lipídios, proteínas e recuperação de tecidos lesados visando manter a homeostase (AIRES, 2008). Sua ação é exercida ao usar sua natureza lipofílica, ultrapassando a membrana da célula alvo e ligando-se ao receptor de glicocorticoide presente no citosol, esse complexo droga-receptor muda sua conformação e adentra ao núcleo controlando a expressão de genes alvo (WRIGHT et al 1993; DE KLOET et al. 1993; SONG et al. 2005).

### 1.1 EFEITOS DA DEXAMETASONA

Atualmente a administração exógena de cortisol e GC sintéticos é muito utilizada devido a seus efeitos anti-inflamatórios, antialérgicos (MA et al., 2011, REBEYROL et al. 2012), e até mesmo antieméticos (BERNARDO; AIRES, 2013). Esses análogos sintéticos podem variar em função de sua meia vida plasmática, biológica e potência relativa anti-inflamatória. Os representantes mais potentes são a Betametasona e Dexametasona (DEX), com tempo de meia vida plasmática de 300



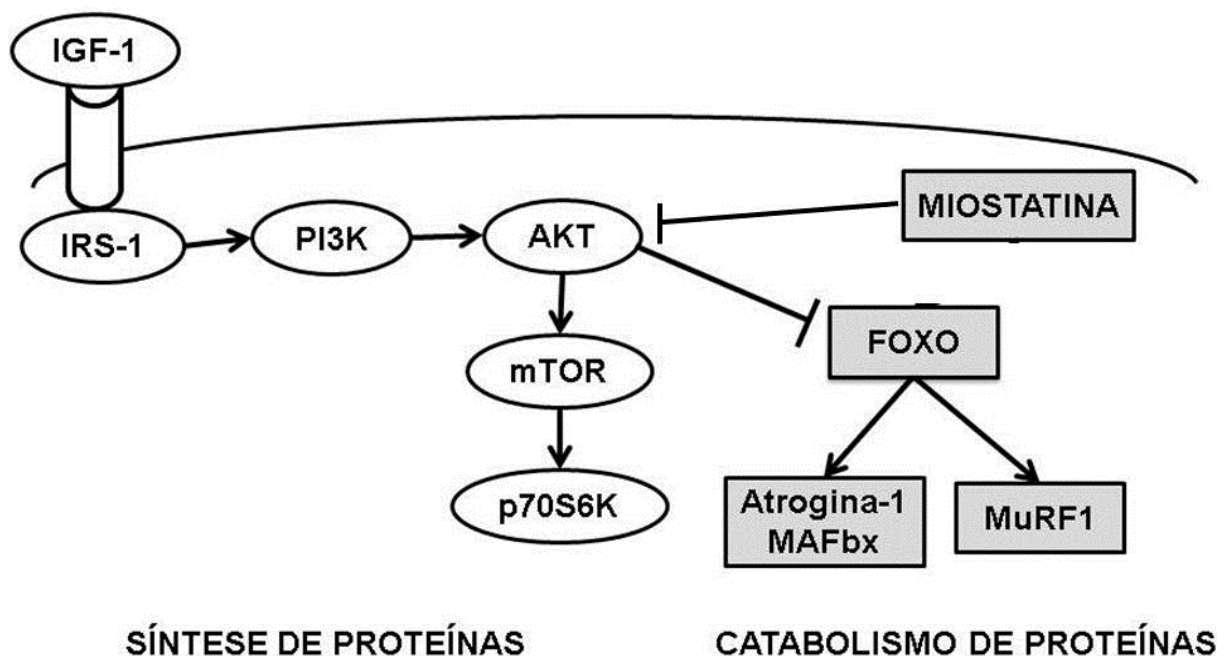
minutos, vida biológica de 36 a 72 horas e uma potência relativa anti-inflamatória de 30 vezes a ação da hidrocortisona (cortisol) (ANTI; GIORGI; CHACHADE, 2008).

A DEX, apesar de amplamente utilizada pode gerar severos efeitos colaterais que são verificados por vários grupos e por nosso laboratório. Seus efeitos adversos podem surgir tanto de forma aguda, provocando alterações significativas no metabolismo lipídico e glicídico (QI et al., 2004; SANTOS; RAFACHO; BOSQUEIRO, 2007; NICASTRO et al., 2012a, 2012b); como de forma crônica, desencadeando osteoporose (HURSON et al., 2007), sarcopenia (KAASIK et al., 2007), hiperglicemia (SANTOS; RAFACHO; BOSQUEIRO, 2007; BAREL et al., 2010, DIONÍSIO et al, 2014), resistência periférica à insulina, hiperinsulinemia, diminuição do glicogênio muscular (BAREL et al., 2010; DIONÍSIO et al, 2014) aumento de albumina e colesterol total (SANTOS; RAFACHO; BOSQUEIRO, 2007; PINHEIRO et al., 2009), atrofia da glândula adrenal (KARSSEN et al., 2005), hipertensão arterial (SEVERINO et al., 2002; CROSSLAND et al., 2010), sendo que em alguns casos foram encontrados aumento do glicogênio hepático, tanto de forma aguda como cronicamente (PAULI; GOMES; LUCIANO, 2006; SANTOS; RAFACHO; BOSQUEIRO, 2007).

Vários trabalhos têm mostrado que o tratamento crônico com DEX, independente da dosagem, promove redução do peso corporal (PC) (MA et al., 2003; AHTIKOSKI et al. 2004; GILSON et al. 2007; CHO et al. 2010; QIN et al., 2010) e estes efeitos foram confirmados por nosso laboratório (BAREL et al., 2010; MACEDO, A. G. 2013; DIONÍSIO, et al, 2014). O mecanismo exato pelo qual a DEX causa a diminuição do PC não é claro na literatura, mas é provável que esteja relacionado à redução da ingestão alimentar (IA) (PAULI et al., 2005; SANTOS, RAFACHO, BOSQUEIRO, 2007), que pode ser provocada pela redução dos níveis do neuropeptídeo Y e do CRH no núcleo paraventricular, ambos relacionados a regulação do apetite e da termogênese no hipotálamo (MCKIBBIN et al. 1992; MICHEL; CABANAC, 1999; BELL et al., 2000; GINSBERG et al., 2003). Dados recentes de nosso laboratório (MACEDO, A. G. 2013), confirmaram que o tratamento crônico com DEX reduz em cerca de 44% a IA.

Tem sido demonstrado que a diminuição do PC é sempre associada com a atrofia muscular (MA et al., 2003; GILSON et al. 2007; CHO et al. 2010). Podemos

observar na Figura 1 um esquema simplificado que retrata a homeostase do músculo esquelético. Essa homeostase é mantida por um rigoroso balanço entre proteínas hipertróficas como o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1), PI3K (Fosfatidilinositol 3 quinase), a AKT (treonina\serina tirosina quinase), mTOR (Proteína alvo da rapamicina de mamíferos) e a proteína p70S6K (Ribossomal S6 quinase) e atróficas representadas pela miostatina (diferenciação do fator-8 do crescimento), família FOXO (Forkead transcription factors), a Atrogina-1 ou MAFbx e MuRF-1 ou Muscle Ringer Finger protein 1 (LÉGER et al., 2006; LENK; SCHULER; ADAMS, 2010; LANGEN et al 2013; ; EGERMAN; GLASS, 2014 ).



**Figura 1.** Ilustração esquemática da sequência de eventos que controlam a homeostase do músculo esquelético. Proteínas responsáveis na síntese proteica/hipertrofia (sem preenchimento) e proteínas responsáveis pela degradação proteica/atróficas (preenchidas em cinza). Adaptado de Glass D. J. 2005 e Schakman et al. 2013.

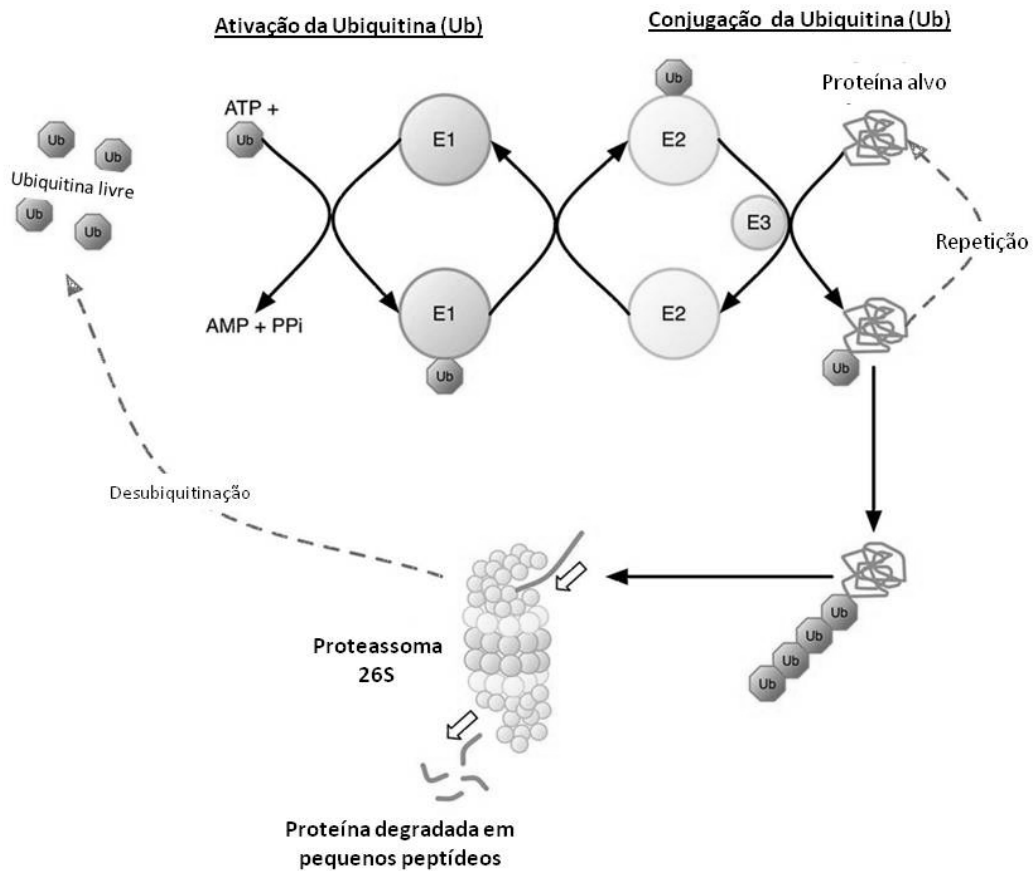
Não há consenso na literatura sobre se a hipertrofia ocorre pelo aumento nos níveis de proteínas hipertróficas (BAAR; ESSER, 1999; PSILANDER; DAMSGAARD; PILEGAARD, 2003) ou pela diminuição dos níveis de proteínas atróficas (MCPHERRON; LEE, 1997). Além disso, a atrofia pode ser desencadeada tanto por aumentos das proteínas atróficas (MA et al., 2003; SMITH et al., 2010); como pela diminuição nos níveis das proteínas hipertróficas (LONG; WEI;

BARRETT, 2001; LEWIS et al., 2003), ou pela interação de ambos os mecanismos (LÉGER et al., 2006; ADAMS et al., 2007).

Um possível mecanismo envolvido na diminuição da massa muscular em ratos submetidos à administração de DEX é a inibição da síntese proteica (MA et al., 2003; KAASIK et al., 2007). Essa inibição pode ocorrer devido à redução no influxo de aminoácidos (AA) para a musculatura (ADAMS, C. M. 2007), pelo bloqueio da ação da insulina e IGF-1, ou AA como a leucina sobre a proteína ligante 1 do fator de iniciação eucariótico 4E (4EBP-1) e p70S6K (LONG; WEI; BARRETT, 2001), pela inibição da miogênese, tanto pela diminuição na expressão, como no total proteico de miogenina (JOGO et al., 2009) somados a degradação do Myod (TINTIGNAC et al., 2005).

Outro mecanismo que contribui para a diminuição do peso muscular, talvez o mais estudado, é o aumento do catabolismo proteico no músculo esquelético (COMBARET et al., 2004; YANG et al., 2007). Este catabolismo pode ser provocado pela ativação das vias de degradação que envolve proteases específicas como as caspases (principalmente caspase-3), catepsinas (via lisossomal/catepsina-L) e calpains (cálcio dependentes) ou por ativação do principal regulador da atrofia muscular, o sistema Ubiquitina-proteassoma (UPS) (AUCLAIR et al., 1997; HASSELGREN; FISCHER, 2001; COMBARET et al., 2004; GILSON et al., 2007).

Nesse sistema, demonstrado na Figura 2, as proteínas são marcadas para serem degradadas pela ligação de moléculas de ubiquitina (Ub), em um processo realizado por 3 enzimas: E1 (ativadora de Ub), E2 (conjugadora de Ub) e E3 (Ubligases). Em um processo ativo, a enzima E1 ativa a molécula de Ub, que depois de ativada é transferida para a E2, que sofre a ação da E3, para ser ligada à proteína a ser degradada. Esse processo é repetido até que um mínimo de 4 moléculas de Ub sejam ligadas covalentemente à proteína alvo, para que então sejam reconhecidas e degradadas pelo proteassoma 26S (MURTON; CONSTANTIN; GREENHAFFET, 2008).



**Figura 2.** Demonstração esquemática do sistema ubiquitina-proteassoma. Ub: Molécula de ubiquitina, E1: Enzima ativadora de ubiquitina, E2: Enzima conjugadora de ubiquitina, E3: ubiquitinas ligases. (adaptado de MURTON; CONSTANTIN; GREENHAFFET, 2008).

Presentes na família das E3 Ub-ligases (contendo de 500 a 1000 representantes), que conferem extrema especificidade ao UPS, encontram-se dois representantes específicos para a musculatura esquelética e cardíaca; a MuRF-1 (Muscle Ring Finger Protein-1) e MAFbx (Muscle Atrophy F-box protein, também chamada de Atrogina-1). Tem sido demonstrado que estas E3 ligases são importantes no desenvolvimento da atrofia, uma vez estando presentes em situações de atrofia muscular provocadas por desnervação, imobilização e tratamento com DEX (BODINE et al., 2001). Estes atrogenes também estão envolvidos no processo de atrofia desencadeado pela Diabetes (LECKER et al., 2004; GOMES et al., 2001; WANG et al., 2006), sepsis (SMITH et al., 2010) e insuficiência cardíaca (GOMES et al., 2001; CUNHA et al., 2012).

Nesse sentido, Bodine et al. (2001) encontraram em ratos nocauteados para Atrogina-1 e MuRF-1, uma diminuição na atrofia induzida pela desnervação do músculo gastrocnêmio após 14<sup>o</sup> dias (56% e 36%, respectivamente). Estes mesmos autores verificaram o aumento da expressão desses atrogenes desencadeado pela suspensão/imobilização de membros, resultando em atrofia muscular do gastrocnêmio, mas com expressão de MuRF-1 e Atrogina-1 10 vezes menor do que a causada pelo tratamento com DEX (BODINE et al., 2001). Nesse sentido, Adams et al. (2007), ao submeterem ratos a suspensão unilateral dos membros inferiores, obtiveram diminuição do PC (7%) e aumento de mRNA de miostatina e Atrogina-1 (comparado ao grupo controle). No entanto, quando estimularam eletricamente o membro em condições normais, conseguiram aumentar a secção transversa do músculo gastrocnêmio e o mRNA de miogenina, MyoD, IGF-1, MGF (Fator de crescimento mecânico) e IGF-bp4 (proteína ligante de IGF-1 tipo 4), com aumento na fosforilação de p70S6K e 4EBP-1, além de prevenir o aumento da miostatina, mas curiosamente, a estimulação elétrica elevou a expressão de Atrogina-1.

Atrogina-1 e MuRF-1 vêm sendo implicadas na atrofia induzida pela DEX, mas os resultados ainda são conflitantes, principalmente pelos diferentes métodos e dosagens encontrados na literatura. Stitt et al. (2004) demonstraram em cultura celular que células musculares, expostas a DEX por 24 horas, apresentaram redução em seu tamanho e aumento na expressão de Atrogina-1 e MuRF-1. Por outro lado, Yamamoto et al. (2009), *in vivo*, administraram DEX (0,6 mg/kg) durante 5 dias em ratos, e verificaram a diminuição da secção transversa de fibras tipo I e II do músculo SOL e aumento da expressão de Atrogina-1, mas não de MuRF-1. Por outro lado, Nicastro et al. (2012b, 2012c) utilizaram uma dose de 5mg/kg/dia por 7 dias em ratos, que provocou a diminuição do PC, com redução do peso dos músculos plantar (-32,5%) e extensor longo dos dedos (-22%). Estes autores observaram uma redução nos valores de pAKT<sup>Ser473</sup>, e da razão pFOXO3a<sup>Ser253</sup>/total FOXO3a e aumento de MuRF-1 no músculo plantar dos grupos tratados com DEX (NICASTRO et al., 2012c).

Utilizando dosagens menores, Wu et al. (2010) verificaram que o tratamento com DEX (0,7 mg/kg) por 7 dias, diminuiu a expressão gênica da proteína de ligação do fator de crescimento semelhante a insulina-5 (IGFBP-5) e substrato do receptor

de insulina-1 (IRS-1) e aumentou a expressão gênica e produção da proteína 4E-BP1 e do fator de regulação do desenvolvimento e respostas de dano no DNA-1 (REDD1) no músculo gastrocnêmio, o que certamente prejudica a síntese proteica. Da mesma forma, Zhao et al. (2008) submeteram ratos ao tratamento com 0,7 mg/kg de DEX por 1 ou 7 dias e observaram redução do peso do músculo gastrocnêmio, com aumento significativo da expressão gênica de Atrogina-1.

## 1.2. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO

Algumas estratégias têm sido utilizadas com a intenção de bloquear ou atenuar os efeitos colaterais provocados pelo tratamento com DEX, no entanto, a maioria dos estudos envolve estratégias farmacológicas, como o inibidor do proteassoma Bortezomib (ADAMS et al., 1998), IGF-1 (SCHAKMAN et al., 2005; STITT et al., 2004), suplementação com crômio (DONG et al., 2009), AA (YAMAMOTO et al., 2010; NICASTRO et al., 2012a, 2012b), creatina (CAMPOS et al., 2006; MENEZES et al., 2007; NICASTRO et al., 2012c); hormônios esteroides androgênicos (ZHAO et al., 2008; WU et al., 2010) e utilização de Resveratrol que é um polifenol natural contido em amendoins, cascas de uvas e vinho tinto (ALAMDARI et al., 2012).

Além das medidas farmacológicas e nutricionais, o exercício físico tem sido utilizado como tratamento não farmacológico no combate aos efeitos colaterais provocados pela DEX. Pauli et al. (2005) submeteram ratos a natação (1 hora, 5 vezes semanais) durante 10 semanas concomitantemente ao tratamento com DEX (0,02 mg diluídos em NaCl a 0,9% s.c.) e observaram diminuição no PC nos grupos tratados e treinados, mas não observaram atrofia do músculo gastrocnêmio. Além disso, o exercício foi capaz de atenuar a resistência insulínica e a intolerância a glicose, causadas pelo tratamento com DEX. Outro efeito colateral causado pela administração de DEX é a dislipidemia, mas que pode ser atenuada pelo treinamento resistido combinado a suplementação de leucina (NICASTRO et al., 2012a).

Em relação ao tratamento da atrofia muscular com a utilização de exercício físico, observam-se resultados controversos na literatura. A maioria dos trabalhos utiliza o tratamento concomitante ao treinamento, e somente nosso laboratório utilizou o exercício antes e concomitante ao tratamento com DEX para observar os efeitos preventivos (BAREL et al., 2010; DIONÍSIO et al., 2014). Ahtikoski et al. (2004) observaram que ratas treinadas em esteira e tratadas com DEX simultaneamente por 3 ou 10 dias, utilizando uma dosagem de 1 mg/Kg apresentavam atrofia muscular nos músculos extensor longo dos dedos (EDL) e tibial anterior (TA), e o exercício foi capaz de atenuar a atrofia no EDL, mas não provocou mudanças no TA. Por outro lado, Campos et al. (2006), ao observarem a atividade voluntária de hamsters em roda, não encontraram alterações significativas no músculo gastrocnêmio medial entre os grupos tratados com DEX durante 18 dias (7,5 mg/kg *i.p.* e *s.c.*) ou controle, embora tenha causado a diminuição da distância percorrida e diminuição das fibras tipo II nos ratos tratados.

Czerwinski et al. (1989) obtiveram resultados positivos em relação ao exercício aeróbio em esteira com 10% de inclinação a uma velocidade de 29 m/min durante 90 minutos por 11 dias concomitantemente ao tratamento com DEX (100 mg/kg/dia). Esse protocolo aeróbio foi capaz de atenuar a atrofia em 30% no músculo plantar, embora não tenha revertido a diminuição da síntese proteica. Já Pinheiro et al. (2009), ao utilizarem um protocolo mais extenso com tratamento de DEX (0,5 mg/kg) e treinamento em esteira/roda durante 30 dias, verificaram a diminuição do músculo gastrocnêmio após o tratamento, que foi prevenida pelo treinamento físico. Demonstramos recentemente (BAREL et al., 2010) que exercício aeróbio contínuo em esteira, a 60% da capacidade física máxima dos animais durante 70 dias, foi efetivo em atenuar a atrofia no EDL, mas não no TA em ratos tratados com DEX (1mg/kg por 10 dias).

O treinamento resistido (TR) tem sido evidenciado como importante estratégia não farmacológica no combate a atrofia muscular e outros processos degenerativos. Assim, vários autores têm utilizado diferentes estratégias de exercícios resistidos em animais como é o caso da plataforma de agachamento com estímulos elétricos (BARAUNA et al., 2007; NICASTRO et al., 2012a, 2012b) e a subida em escada (HORNBERGER; FARRAR, 2004; DOMINGOS et al., 2012; MACEDO, A. G. 2013).

Recentemente, Nicastro et al. (2012b), ao tratarem ratos com uma dosagem de DEX de 5 mg/kg/dia administrada na água durante 7 dias, e submetê-los a suplementação com leucina e TR tipo agachamento (70% da capacidade física máxima voluntária), não verificaram efeitos sobre a redução do PC e IA. Estes autores verificaram maior secção transversa no músculo plantar dos animais treinados quando comparados aos animais tratados com DEX, além de apresentarem aumento na razão fosforilada/total das proteínas mTOR e p70S6K, e diminuição dessa razão na proteína FOXO3a, sem qualquer alteração nos valores de MuRF-1 causados pelo TR ou suplementação. Em nosso laboratório, Macedo (2013) observou que o TR em escada (60% do carregamento máximo) realizado previamente e durante o tratamento farmacológico com DEX, atenuou a atrofia no músculo flexor longo do hálux (FHL) induzida pelo tratamento farmacológico (0,5 mg/kg por 10 dias), mas não no TA.

Assim, até o presente momento, pode-se concluir que a atrofia muscular tem sido um efeito colateral frequentemente observado após tratamento com DEX, e há diversas formas de tratamento presentes na literatura, no entanto os resultados ainda são inconclusivos. Dentre as estratégias não farmacológicas destacam-se o exercício aeróbio e resistido, que vem sendo estudados em nosso laboratório e por outros autores. O exercício resistido apresenta-se como o mais promissor nesse contexto, principalmente por modular diretamente proteínas responsáveis pela hipertrofia muscular. Recentemente, demonstramos que, em intensidade moderada, o TR foi capaz de opor-se a atrofia muscular no FHL (MACEDO, 2013), provavelmente por ser o principal músculo solicitado durante o exercício em escada (PARK; FARRAR; LEE, 2008). Dessa forma, seria plausível a ideia de que um pequeno aumento da intensidade poderia trazer melhor eficiência no combate à atrofia muscular induzida pelo tratamento com DEX.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal deste trabalho foi verificar o efeito preventivo do TR a 80% do carregamento máximo sobre a atrofia muscular induzida pela DEX, bem como os mecanismos responsáveis por esta resposta.

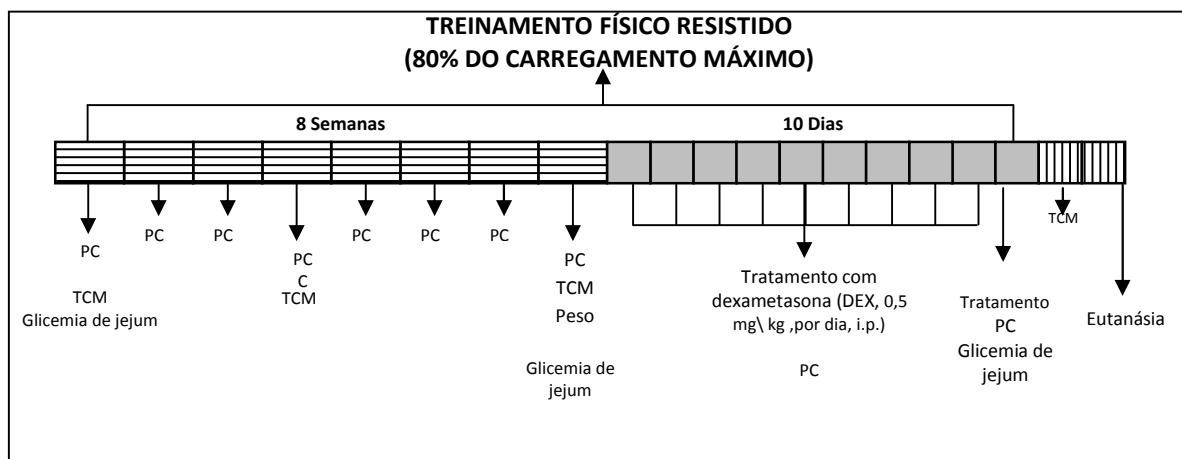
### **2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO**

Verificar os mecanismos responsáveis pelos efeitos do TR na musculatura esquelética de ratos submetidos ao tratamento farmacológico com DEX (0,5 mg/kg por 10 dias) por meio da quantificação da produção das seguintes proteínas: mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1 nos músculos FHL, TA e SOL.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos os procedimentos foram conduzidos seguindo as condutas apresentadas pelo conselho nacional de controle de experimentação animal (CONCEA) contidas na diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA, 2013) e os Princípios Éticos da experimentação Animal (COBEA), aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP (Protocolo n. 2012-02255) (Anexo 1). Foram utilizados 43 ratos Wistar (200-250 g), provenientes do centro de pesquisa e produção de animais da UNESP (Botucatu). Os animais permaneceram em gaiolas coletivas com no máximo 5 animais, no Biotério da Faculdade de Ciências da UNESP, campus Bauru. Com ciclo dia-noite de 12:12 horas e temperatura controlada (22 °C). Ração (BIOBASE) e água foram disponibilizadas *ad libitum*. Durante o tratamento os animais foram dispostos em

gaiolas individuais contendo 100 gramas de ração, após um período de 24 horas o total de ração remanescente era pesado e a diferença encontrada foi adotada como o valor de ingestão alimentar dos animais, esse processo foi repetido diariamente até o final do tratamento. Os ratos foram pesados semanalmente durante a fase de treinamento e diariamente durante o período de tratamento.



**Figura 3.** Desenho experimental durante os 70 dias de acompanhamento. PC: peso corpo teste de carregamento máximo.

### 3.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após avaliação do PC e capacidade física máxima, os animais foram distribuídos homogeneamente em quatro grupos.

**Grupo 1:** Sedentário Controle (**SC**, **n=11**): composto por animais que permaneceram sedentários durante todo o protocolo experimental (70 dias) e foram tratados com solução salina nos últimos 10 dias (salina, *i.p.*).

**Grupo 2:** Sedentário Tratado com Dexametasona (**SD**, **n=10**): composto por animais que permaneceram sedentários durante todo o protocolo experimental (70 dias) e foram tratados com DEX nos últimos 10 dias (Decadron<sup>®</sup>, 0,5 mg/kg/dia, *i.p.*).

**Grupo 3:** Treinado Controle (**TC**, **n=11**): composto por animais que realizaram o treinamento resistido durante todo o protocolo experimental (70 dias) e foram tratados com solução salina nos últimos 10 dias (salina, *i.p.*).

**Grupo 4:** Treinado Tratado com Dexametasona (**TD, n=11**): composto por animais que realizaram o treinamento resistido durante todo o protocolo experimental (70 dias) e foram tratados com DEX nos últimos 10 dias (Decadron<sup>®</sup>, 0,5 mg/kg/dia, *i.p.*).

Os animais sedentários foram adaptados à escada a cada 15 dias para que não perdessem a capacidade de escalar e foram submetidos a todas as avaliações impostas aos grupos treinados.

### **3.2. ADAPTAÇÃO DOS ANIMAIS AO PROTOCOLO DE TREINAMENTO**

O TR foi executado em escada (110 cm de altura, 54 degraus de ferro, dispostos a cada 2 cm e 80 graus de inclinação), conforme ilustrada na Figura 4, que foi validada para uso com animais por Hornberger e Farrar (2004). Os animais passaram por uma familiarização ao ato de escalar a escada por 5 dias. Ao atingirem o topo da escada (caixa com 20 x 20 x 20 cm), era-lhes permitido um intervalo de 2 minutos até a próxima subida, esse procedimento foi realizado sucessivamente até que os animais estivessem realizando 3 subidas consecutivas sem que houvesse necessidade de estímulo. No presente estudo, o único estímulo utilizado foi um toque com a mão na base da cauda do animal, o que difere do sugerido por Hornberger e Farrar (2004).



**Figura 4.** Escada de madeira utilizada no protocolo de treinamento resistido. Contém 110 cm de altura com degraus de ferro e inclinação de 80 graus. Vista frontal (painel à esquerda) e vista lateral (painel à direita).

### 3.3. TESTE DE CARREGAMENTO MÁXIMO DE PESO

Após 24 horas da última sessão de adaptação, os animais iniciaram o teste carregando uma carga de 75% de seu PC (acoplado na cauda) na escalada e, após um intervalo de 2 minutos, realizaram outras subidas com intensidade incrementada em 30 gramas, a cada tentativa. Foi considerada a carga máxima, quando os ratos não conseguiram completar a escalada, mesmo após três estímulos manuais em sua cauda. O teste de carregamento máximo foi realizado no início (TCM-1), após 4 semanas (TCM-2, para ajuste das intensidades), antes do início do tratamento farmacológico (TCM-3, para ajuste das intensidades) e ao final dos 10 dias de tratamento com DEX (TCM-4). A única diferença nestes momentos é que o incremento de carga entre as subidas foi de 30g (TCM-1), 50g (TCM-2) e 100g (TCM-3 e TCM-4). Os animais sedentários realizaram os testes nos mesmos momentos que os treinados.

### **3.4. CRONOGRAMA DE TREINAMENTO RESISTIDO**

O TR consistiu de cinco sessões semanais até a 4ª semana e de 4 sessões semanais nas 4 últimas semanas, culminando num total de oito semanas mais 10 dias de treinamento e tratamento (70 dias). O protocolo de TR foi adaptado de Sanches et al. (2014) e realizado da seguinte forma: nas quatro semanas iniciais a intensidade foi aumentada progressivamente de 40 a 80% da carga máxima obtida no TCM-1, de modo que os animais iniciassem a quarta semana treinando com 80% da carga máxima. Os animais iniciaram o treinamento com nove subidas, que foram aumentadas gradativamente até 17 subidas, no quarto dia da quarta semana. A partir da quinta semana, a carga foi mantida em 80% da carga máxima, de acordo com o TCM-2. Da 5ª - 8ª semana, as subidas variaram entre 9 e 10 repetições com 4 sessões semanais, sendo 2 sessões seguidas com um dia de intervalo mais 2 sessões. Ao final das oito semanas, foi realizado o TCM-3. Durante os dez dias de tratamento, foram repetidos os treinos da 7ª e 8ª semanas, com carga de treinamento calculada a partir do TCM-3. Após o período de tratamento foi realizado o TCM-4, para que fosse analisado o efeito do tratamento com DEX sobre a capacidade de força dos animais.

### **3.5. RETIRADA DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS.**

Os animais foram eutanasiados por sobrecarga de anestésico ANASEDAN® (cloridrato de xilasina, CEVA do Brasil, 20mg/kg) e DOPALEN® (cloridrato de quetamina, VETBRANDS do Brasil, 160mg/kg) na proporção de 1:1, 1mg/kg. Após a eutanásia, os músculos FHL, TA e SOL foram removidos e pesados imediatamente para a determinação do peso muscular. Os músculos FHL e TA foram escolhidos devido a sua predominância de fibras brancas (glicolíticas) e pelo fato do FHL ser o principal músculo solicitado durante a escalada (PARK; FARRAR; LEE, 2008). O músculo SOL foi escolhido por sua maior proporção de fibras vermelhas (Oxidativas). Uma vez que o tratamento com DEX age preferencialmente sobre fibras brancas (PELLEGRINO et al. 2004) este músculo serviu como controle dos

efeitos do tratamento. A tíbia direita foi cuidadosamente dissecada e medida (cm) para normalização dos pesos dos músculos. Este procedimento foi utilizado para a determinação do peso muscular dos animais e observação de atrofia e/ou hipertrofia após tratamento farmacológico com DEX e TR a 80% da capacidade máxima. Amostras dos músculos FHL, TA, e SOL foram homogeneizadas imediatamente após a retirada com um homogeneizador Polytron em uma solução de RIPA (cell signaling) , 1% de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF, Sigma aldrich) e 0,01% de Coquetel de inibidores de protease (PIC, Sigma aldrich), na hora de usar. As amostras foram centrifugadas a 7.490 g por 10 minutos sob refrigeração (4 °C), e o sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo e armazenados a uma temperatura de -80°C para análises de produção proteica. Os tecidos não homogeneizados também foram armazenados a uma temperatura de -80°C.

### **3.6. PROTOCOLO DE DOSAGEM DE PROTEÍNA.**

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando um kit comercial (Bio-Rad Kit, Protein Assay Standart II, Hercules, CA) com albumina como padrão, como previamente publicado (AMARAL; PAPANEK; GREENE, 2001). Os valores de absorvância foram analisados no leitor de Elisa (BMG labtech, spectro star nano) utilizando uma placa de 96 poços. Após a dosagem, as amostras foram estocadas a -80°C até serem utilizadas para os experimentos de Western Blotting.

### **3.7. PROCEDIMENTOS DE WESTERN BLOTTING.**

A proteína foi eletroforeticamente separada por tamanho molecular, usando-se um sistema de gel de poliacrilamida conforme publicação prévia do laboratório (AMARAL; PAPANEK; GREENE, 2001). Basicamente, foi utilizado um gel com duas camadas de poliacrilamida, em diferentes concentrações: 5% na camada superior e 10% (mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1, MuRF-1 e GAPDH) na camada inferior. A solução tampão de transferência consistiu de: 190 mM de glicina,

25 mM de Tris, 0,1% de SDS, pH 8,3. As amostras (80 µg para mTOR; 50 µg para p70S6k, FOXO3a Atrogina-1 e MuRF-1), foram colocadas para correr por 60 minutos a 200 V. Marcadores de peso molecular foram simultaneamente utilizados como tamanho padrão. As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose com aplicação de corrente de 120V por 90 minutos em um tampão que consistiu de: 190 mM de glicina, 25 mM de Tris, 20% de metanol, pH 8,3. Logo após a transferência, a equivalência da quantidade de proteína colocada em cada coluna foi conferida com a colocação de *Ponceau*. As membranas foram lavadas em solução TBS-T (0,95g de Trisma – HCl; 0,50g de Trisma Base; 8,8g de NaCl e 1ml de Tween 20 para um litro de água destilada). As membranas foram bloqueadas com 1,5% albumina bovina (BSA) diluída em TBS-T por 60 segundos. O Sistema de Detecção de Proteína (SNAP i.d.<sup>®</sup> 2.0 Protein Detection system - Millipore) foi usado para incubar as membranas por 10 minutos em seus anticorpos primários com a diluição descrita a seguir: mTOR (cell signalling #2972s, 1:1000 em 3% BSA), p70S6K (cell signalling #2708, 1:1000 em 3% BSA); FOXO3a (cell signalling #9464, 1:1000 em 3% BSA); Atrogina-1 (Abcam #a74023, 1:1000 em 3% BSA), MuRF-1 (Santa Cruz [C-20] sc-27642, 1:1000 3% BSA) e GAPDH (R&D SYSTEMS #AF5718, 1:1000 em 3% BSA). As membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos secundários por 10 minutos descritos a seguir: mTOR (IgG anti-rabbit 1:1,000 em 1% BSA), p70S6K (IgG anti-rabbit 1:2,000 em 1% BSA), FOXO3a (IgG anti-rabbit 1:1,000 em 1% BSA), Atrogina-1 (IgG anti-rabbit 1:1,000 em 1% BSA), MuRF-1 (anti-donkey 1:1000 em 1% BSA) e GAPDH (IgG anti-rabbit 1:1,000 em 1% BSA). O anticorpo foi detectado por luminescência química aumentada (Super Signal Pico, Pierce) e as membranas foram expostas a um filme radiográfico. Para minimizar variações nos resultados obtidos pela técnica de Western Blotting, realizamos a inserção de animais controle em cada membrana incubada, isto é, em cada membrana existiam animais dos quatro grupos estudados (SC, SD, TC e TD), incluindo os animais controle que ficaram sujeitos às mesmas variações que os outros grupos (tempo de corrida, transferência e exposição). Portanto, os resultados são apresentados normalizados pela proteína GAPDH e expressos em relação ao grupo controle. As bandas foram analisadas utilizando um programa de computador (Scion Image, Corporation, Beta 4.02).

### 3.8. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

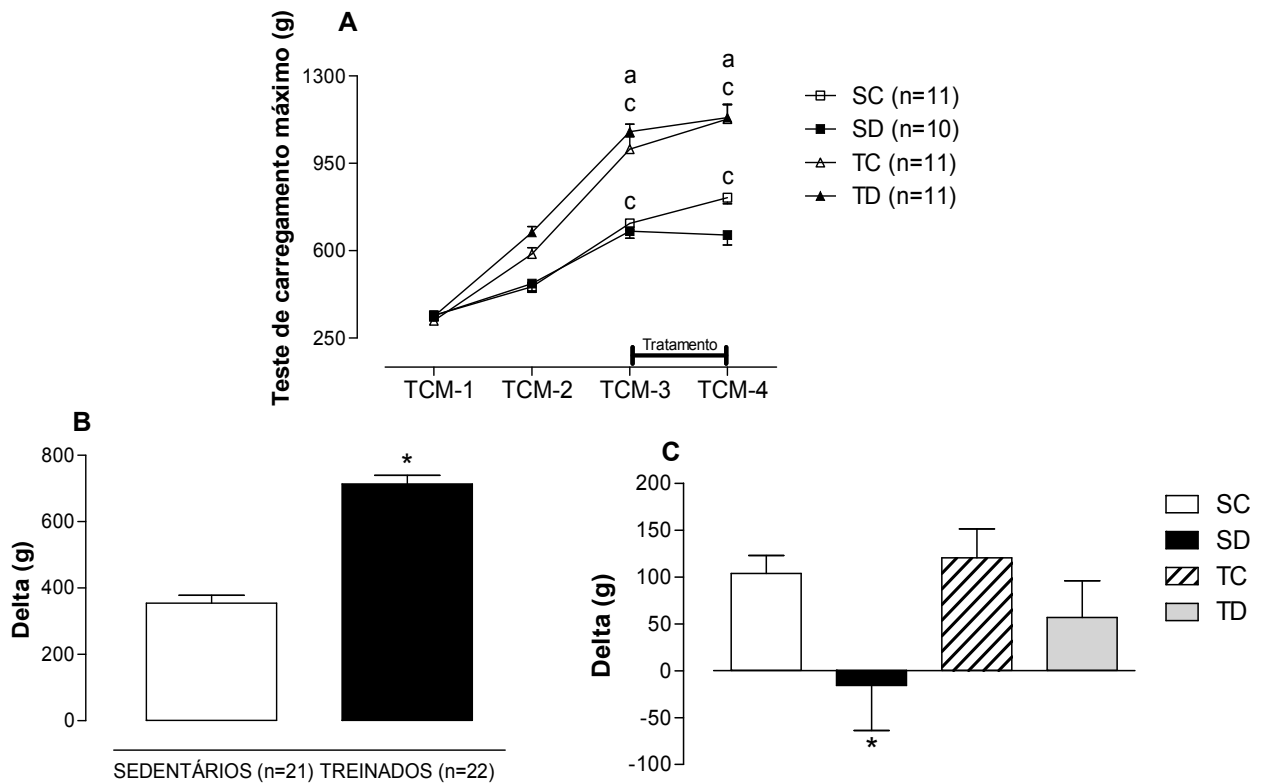
Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro médio padrão (EPM). Nas análises de PC, capacidade física máxima e ingestão alimentar foi utilizada a análise de variância de três caminhos (ANOVA), considerando treinamento e tratamento como dois caminhos e o tempo (antes e depois) como medida repetida. Nas demais variáveis utilizamos a análise de variância de dois caminhos (ANOVA) e teste t-Student para análises de Delta da capacidade física máxima. Quando houve diferenças significativas, foi utilizado o post-hoc de Tukey com nível de significância de  $\alpha < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

Os resultados dos 4 testes de carregamento máximo durante o protocolo experimental são expostos na Figura 5. Podemos observar na Figura 5A que os grupos avaliados partiram de valores de capacidade física máxima semelhante ( $340,6 \pm 20$  g,  $339,5 \pm 19,6$  g,  $320 \pm 18$  g e  $337 \pm 19$  g, para SC, SD, TC e TD, respectivamente no TCM-1). O TR em escada a 80% do carregamento máximo foi efetivo em aumentar significativamente (+215%) a capacidade física máxima dos animais tanto do grupo TC (de 320 g para 1007 g,  $p < 0,05$ ) como do grupo TD (de 337 g para 1076,6 g,  $p < 0,05$ ). Nota-se que os animais sedentários também obtiveram incrementos em seu carregamento máximo ao longo do protocolo experimental, com aumentos de 108% para o grupo SC e 100% para SD. O período de tratamento farmacológico não provocou alterações nos valores de carregamento máximo entre o TCM-3 e TCM-4. A Figura 5B ilustra a diferença (delta) entre o TCM-3 e TCM-1 para os animais treinados e sedentários, onde o treinamento proporcionou aumento significativo de 101% na capacidade física máxima dos animais treinados em relação aos sedentários. O delta entre os TCM-4 e TCM-3 são visualizados na figura 5C e podemos observar que o tratamento farmacológico provocou um delta negativo após o período de tratamento somente no grupo SD,



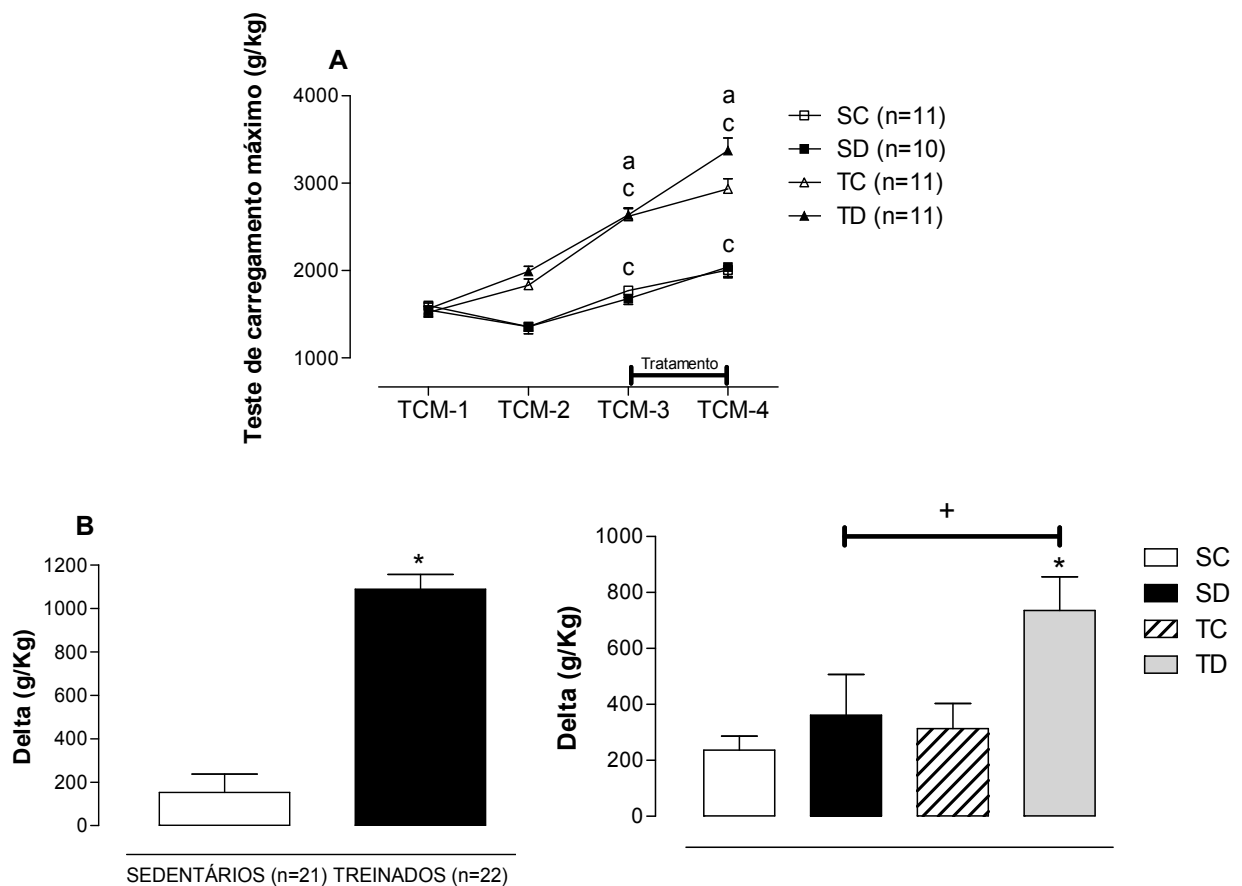
demonstrando assim que a DEX reduziu significativamente o peso carregado entre o TCM-3 e o TCM-4 para o grupo SD.



**Figura 5. A:** Resultados dos testes de carregamento máximo realizados na escada durante o protocolo experimental, nas 4 avaliações (TCM-1, TCM-2, TCM-3 e TCM-4) nos 4 grupos avaliados: sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Three-way. **B:** Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-3 e TCM-1 dos animais treinados versus sedentários, teste t-Student. **C:** Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-4 e TCM-3 em todos os grupos analisados, ANOVA Two-way. Significância: a: efeito do treinamento; c: efeito do momento; \* vs controles e sedentários,  $p < 0,05$ .

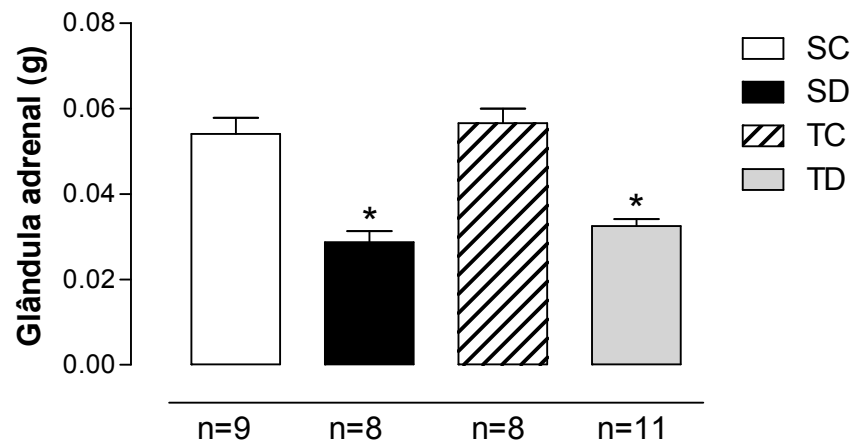
A figura 6 expõe os valores dos testes de carregamento máximo durante o protocolo experimental normalizado pelo PC dos animais, exibindo assim sua força relativa. Na figura 6A observa-se que todos os grupos avaliados partiram de valores semelhantes ( $1598 \pm 108,6$  g/kg,  $1548,5 \pm 80$  g/kg,  $1521 \pm 68$  g/kg e  $1563 \pm 65$  g/kg, para SC, SD, TC e TD respectivamente no TCM-1). O TR em escada a 80% do carregamento máximo aumentou significativamente a força relativa do grupo TC (+72%) e TD (+69%), ambos chegando ao TCM-3 com  $2622 \pm 97$  g/kg e  $2639 \pm 72$  g/kg respectivamente. Os animais sedentários apresentaram incrementos significativos no TCM-3 ( $1771,5 \pm 77,6$  g/kg e  $1678 \pm 66,6$  g/kg, para SC e SD respectivamente). O período de tratamento farmacológico não interferiu negativamente na força relativa dos animais tratados. A Figura 6B ilustra a diferença

de força relativa (delta) entre o TCM-3 e TCM-1 para os animais treinados e sedentários, verifica-se que o treinamento aumentou significativamente (+614%) a força relativa dos animais treinados em relação aos sedentários. O delta entre os TCM-4 e TCM-3 normalizados pelo PC são visualizados na figura 6C e podemos observar que o tratamento farmacológico não provocou efeito negativo sobre a força relativa dos animais tratados (SD), por outro lado, o grupo TD apresentou aumento significativo dos valores de delta sendo superiores ao grupo SD e TC, demonstrando que os animais treinados e tratados mantiveram a força independente da redução de PC.



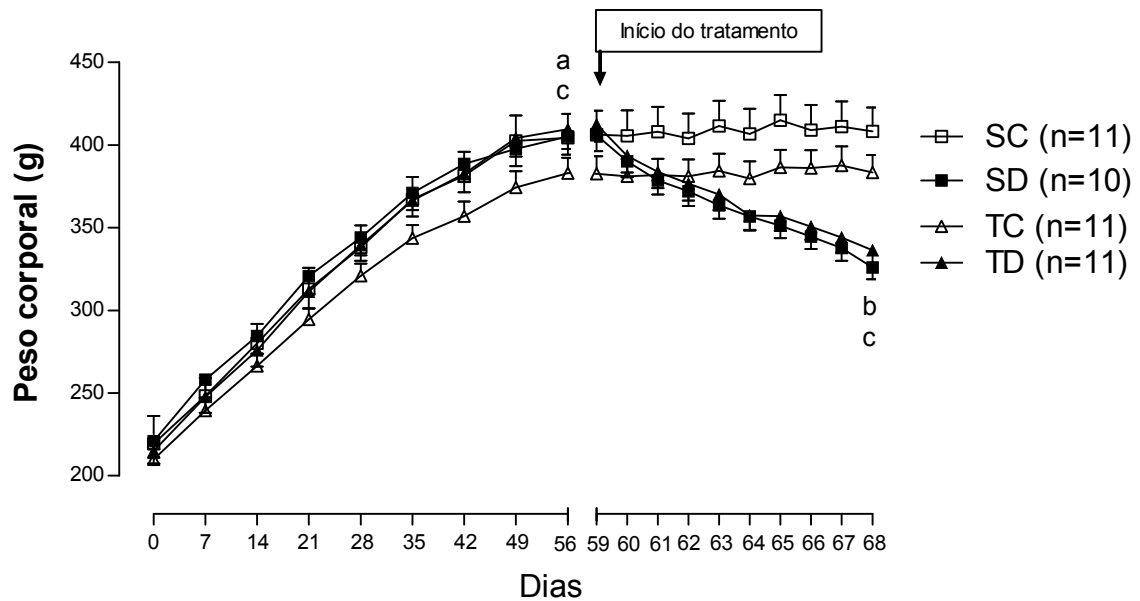
**Figura 6. A:** Resultados dos testes de carregamento máximo realizados na escada durante o protocolo experimental normalizados pelo PC, nas 4 avaliações (TCM-1, TCM-2, TCM-3 e TCM-4) nos 4 grupos avaliados: sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Three-way. **B:** Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-3 e TCM-1 dos animais treinados versus sedentários normalizados pelo PC, teste t-Student. **C:** Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-4 e TCM-3 normalizados pelo PC em todos os grupos analisados, ANOVA Two-way. Significância: a: efeito do treinamento; c: efeito do momento; \* vs controles e sedentários,  $p < 0,05$ .

Para confirmar a eficácia do tratamento com DEX, foram coletadas as glândulas adrenais dos animais dos 4 grupos estudados. Podemos observar na Figura 7 que o tratamento com DEX provocou redução significativa na massa da glândula adrenal ( $0,029 \pm 0,003$  g e  $0,032 \pm 0,002$  g, para SD e TD respectivamente comparado com  $0,054 \pm 0,004$  g e  $0,057 \pm 0,003$  g, para SC e TC respectivamente), resultando em uma diminuição de -47% e -42%, para SD e TD respectivamente, quando comparados aos seus respectivos controles.



**Figura 5.** Valores de massa da glândula adrenal ao final do protocolo experimental, nos diferentes grupos analisados: sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Two-way. Significância: \* vs controle,  $p < 0,05$ .

A evolução do PC dos animais é exposta na Figura 8. Todos os grupos iniciaram o protocolo com valores similares, assim como compartilharam o mesmo incremento até o final da oitava semana (SC: de  $219,4 \pm 16,7$  g para  $404 \pm 14,4$  g, SD: de  $221 \pm 10$  g para  $405 \pm 11$  g; TC: de  $210 \pm 6$  g para  $383 \pm 9$  g e TD: de  $215 \pm 7,4$  para  $409,5 \pm 7,4$  g). Durante os 10 dias de tratamento com DEX, houve a diminuição do PC dos animais tratados (SD e TD). Os animais controles não apresentaram alterações significativas em seu PC.



**Figura 6.** Evolução do peso corporal durante 8 semanas de treinamento resistido e no período de 10 dias de tratamento com DEX (10 dias) nos grupos sedentário controle (SC) sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Three-way. Significância: a: efeito do treinamento; b: efeito do tratamento; c: efeito do momento,  $p < 0,05$ .

A Tabela 1 demonstra o PC do último dia do protocolo experimental, os valores do osso da tíbia e dos músculos analisados (FHL, TA e SOL) normalizados pelo PC e osso da tíbia. Os animais tratados com DEX apresentaram valores de PC significativamente reduzidos quando comparados a seus respectivos controles (-21% e -13% para SD e TD, respectivamente). O comprimento do osso da tíbia não sofreu alterações. O valor absoluto da massa muscular do TA apresentou redução significativa nos animais tratados com DEX (18,3% e 13,6% para SD e TD respectivamente,  $p < 0,05$ ) e o TR não interferiu nessa resposta. Ao normalizarmos os valores pelo tamanho da tíbia, verificou-se comportamento semelhante aos encontrados no valor absoluto do músculo TA (-17,7% e -14,1% para SD e TD respectivamente,  $p < 0,05$ ). Em relação ao FHL, pode-se observar que seu valor absoluto foi alterado tanto pela DEX como pelo TR. O tratamento com DEX provocou redução de massa muscular no FHL (-19,6% para o grupo SD vs SC) que foi atenuada pelo TR (-16% para o grupo TD vs TC). Além disso, o TR aumentou 10% da massa muscular do FHL no grupo TC quando comparado ao SC ( $p < 0,05$ ). Quando os valores foram normalizados pelo comprimento do osso da tíbia, observou-se o mesmo comportamento obtido nos valores absolutos, sendo que o

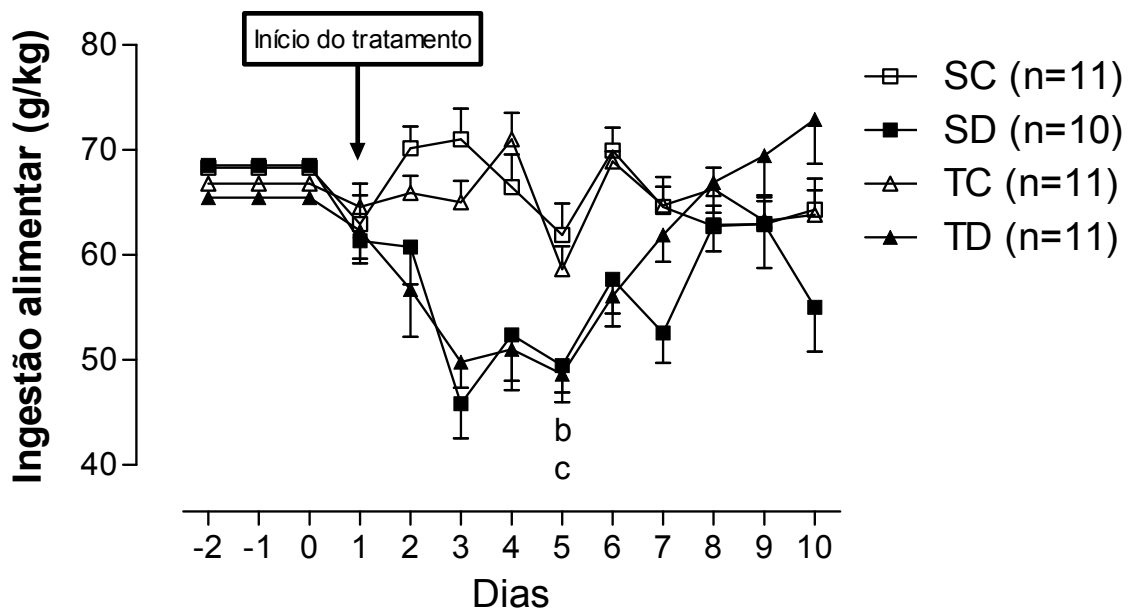
grupo SD apresentou redução de -19,6% (vs SC), que foi atenuada pelo TR (15,5% para o grupo TD vs TC), que também provocou hipertrofia no grupo TC vs SC (+9%,  $p < 0,05$ ). Os valores absolutos do músculo SOL não apresentaram alterações significativas.

**Tabela 1. Valores de peso corporal (PC) e músculos tibial anterior (TA), flexor longo do hálux (FHL) e sóleo (SOL) normalizados pelo peso corporal e tibia nos quatro grupos analisados.**

VARIÁVEIS ANALISADAS	SC (n=11)	SD (n=10)	TC (n=11)	TD (n=11)
PC (g)	404,27 ± 13,6	319,10 ± 9,2*	378,64 ± 9,9	328,09 ± 8,8*
TÍBIA (cm)	4,20 ± 0,03	4,20 ± 0,04	4,20 ± 0,04	4,30 ± 0,04
TA (mg)	0,71 ± 0,04	0,58 ± 0,02*	0,66 ± 0,02	0,57 ± 0,02*
TA/PC(mg/kg)	1,75 ± 0,06	1,78 ± 0,06	1,75 ± 0,06	1,74 ± 0,06
TA/TÍBIA (mg/cm)	167,14 ± 9,3	137,41 ± 5,5*	156,25 ± 3,8	134,06 ± 5,6*
FHL (mg)	0,51 ± 0,01	0,41 ± 0,01*	0,56 ± 0,01+	0,47 ± 0,01*+
FHL/PC (mg/kg)	1,27 ± 0,03	1,25 ± 0,03	1,47 ± 0,03+	1,45 ± 0,03+
FHL/TÍBIA (mg/cm)	120,74 ± 3,4	97,06 ± 4,1*	131,46 ± 2,8+	111,07 ± 3,06*+
SOL (mg)	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,009	0,17 ± 0,007	0,19 ± 0,007
SOL/PC (mg/kg)	0,47 ± 0,02	0,51 ± 0,02*	0,45 ± 0,02	0,57 ± 0,02
SOL/TÍBIA (mg/cm)	44,72 ± 2,1	39,81 ± 2,2	40,33 ± 1,3	43,65 ± 1,5

PC: peso corporal, TA: Tibial anterior, FHL: Flexor longo do hálux, SOL: Sóleo, SC: Sedentário controle; SD: Sedentário tratado com DEX; TC: Treinado controle e TD: Treinado tratado com DEX, ANOVA Two-way. Significância: \* vs controle; + vs sedentário,  $p < 0,05$ .

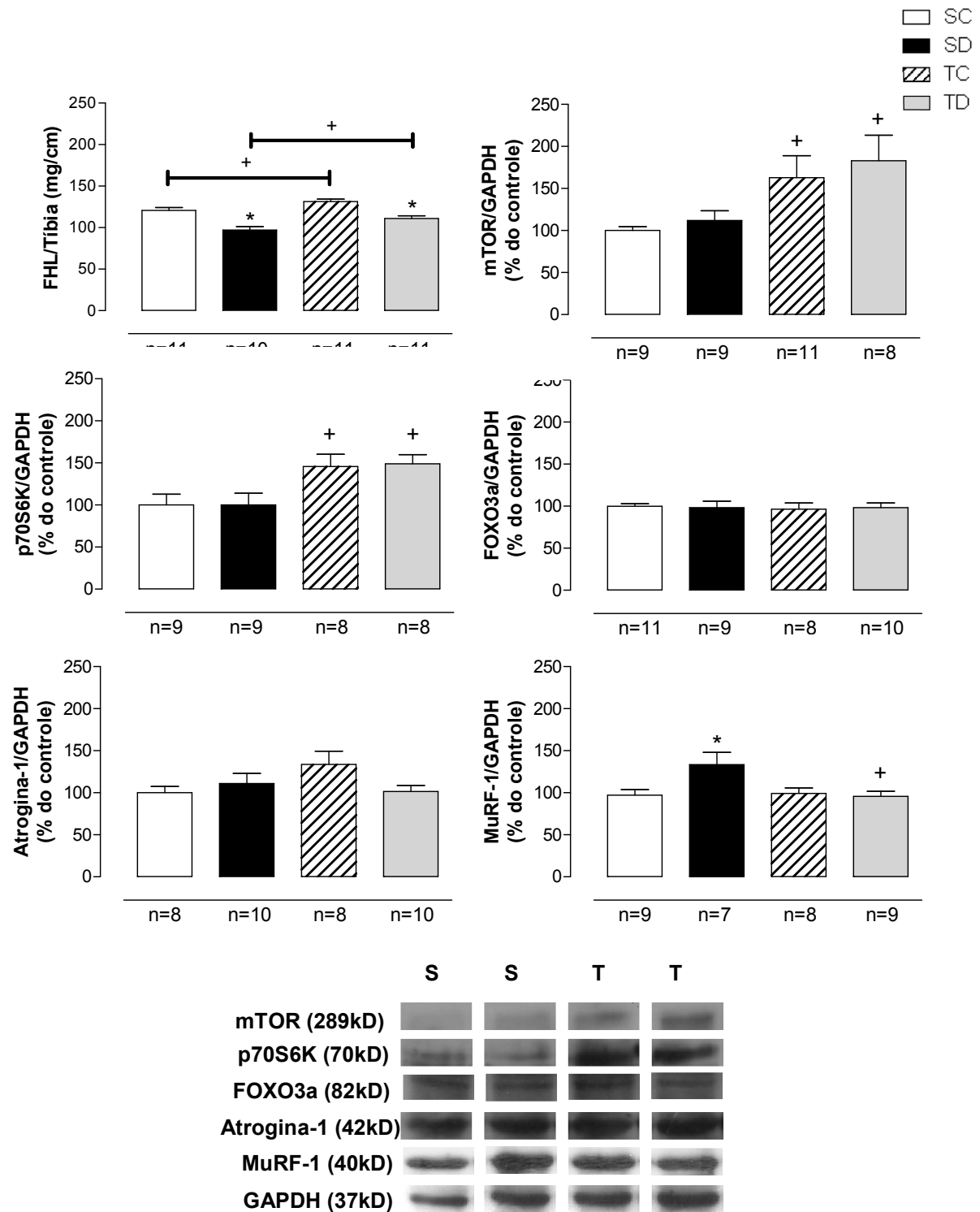
A Figura 9 ilustra os valores de ingestão alimentar dos animais durante o tratamento farmacológico. No período que antecedeu o tratamento com DEX, os animais compartilhavam valores semelhantes de ingestão alimentar ( $68,3 \pm 2,5$  g/kg,  $68,5 \pm 1,6$  g/kg,  $66,7 \pm 1,7$  g/kg e  $65,4 \pm 1,6$  g/kg para SC, SD, TC e TD, respectivamente). Os animais controle (SC e TC) não apresentaram alterações em sua ingestão alimentar durante o período analisado. Entretanto, os animais tratados com DEX apresentaram redução significativa na ingestão alimentar no quinto dia de tratamento.



**Figura 7.** Ingestão alimentar antes e durante os 10 dias de tratamento em todos os grupos analisados: Sedentário controle (SC), Sedentário tratado com dexametasona (SD), Treinado controle (TC), Treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Three-way. Significância: b: efeito do tratamento; c: efeito do momento,  $p < 0,05$ .

A Figura 10 ilustra os valores de massa muscular e análise densitométrica das proteínas mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1 no músculo FHL. Após o tratamento com DEX pode-se observar no grupo SD uma redução significativa da massa muscular do FHL (-19,6% vs SC). O TR, realizado prévio e concomitantemente ao tratamento, foi eficaz em atenuar essa resposta no grupo TD (-15,5% vs TC) e causar uma leve hipertrofia nos animais do grupo TC (+9% vs SC). A proteína mTOR não sofreu alterações pelo tratamento com DEX, entretanto o TR determinou aumento de sua produção nos grupos treinados (63% para TC e TD versus seus respectivos controles sedentários). A DEX não alterou a produção proteica da p70S6K, mas o TR causou aumento significativo nos grupos treinados (+46% e +49% para TC e TD versus seus respectivos controles sedentários). A produção proteica da FOXO3a e Atrogina-1 não foram influenciadas nem pela DEX nem pelo TR. Contudo, a administração exógena de GC provocou aumento significativo de +37% na produção proteica da MuRF-1, no grupo SD em comparação ao grupo SC, e o TR bloqueou totalmente esse aumento (-3,5% para o grupo TD vs TC).

## Flexor longo do hálux

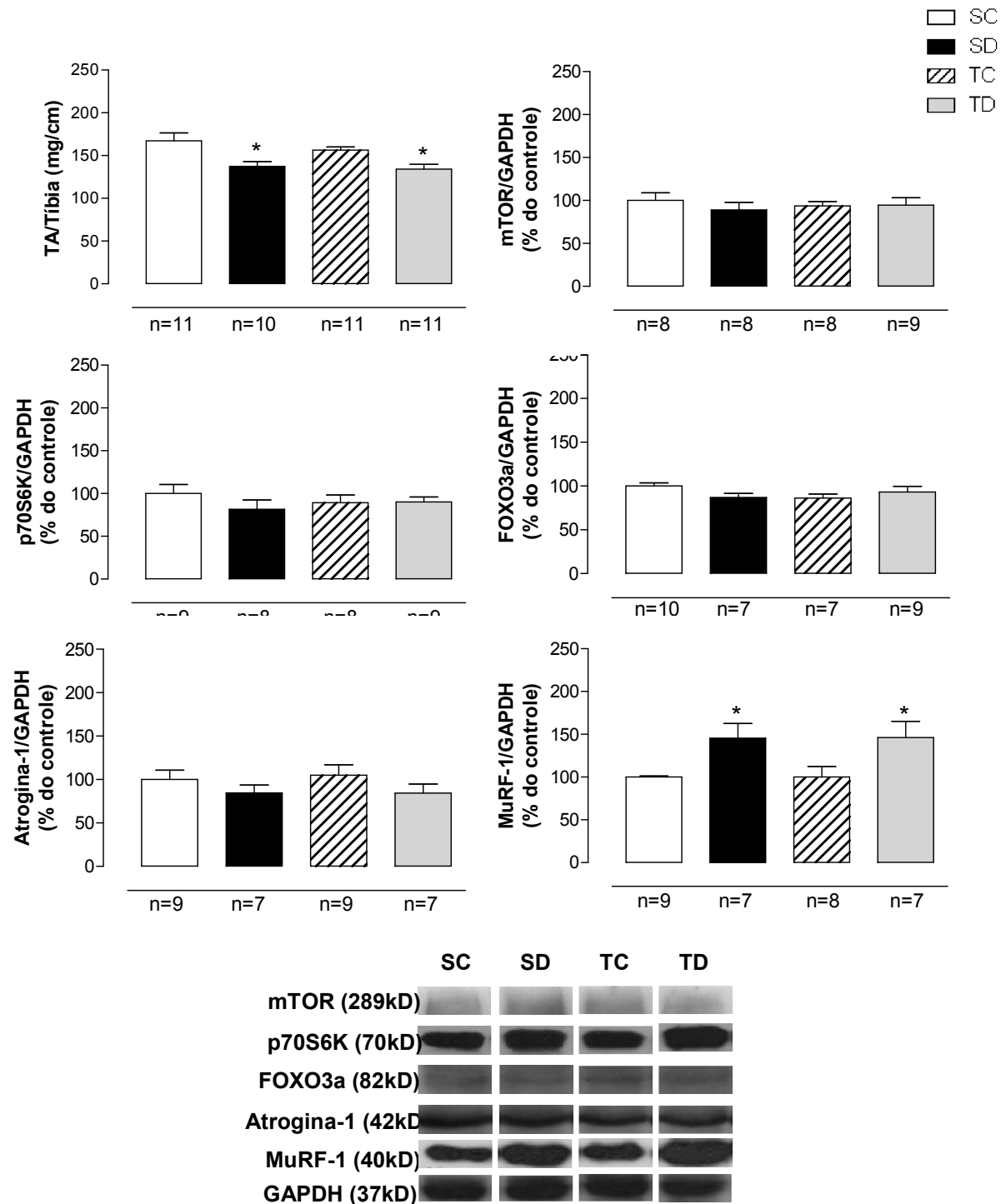


**Figura 8.** Valores de massa muscular do Flexor Longo do Hálux (FHL), normalizado pelo tamanho da tibia (cm) e análise densitométrica da produção proteica de mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1 em todos os grupos analisados: Sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Two-way. Significância: \*vs controle, + vs sedentário  $p < 0,05$ .

Pode-se observar na Figura 11 os valores de massa muscular e da produção proteica de mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1 no TA em todos os grupos analisados. Dez dias de tratamento com DEX provocaram uma redução significativa da massa muscular do TA, independente do nível de treinamento dos animais (-17,7% e -19,7% para os SD e TD, respectivamente). A análise densitométrica das proteínas mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 não apresentou alteração significativa provocada pelo tratamento farmacológico ou TR. O tratamento com DEX aumentou significativamente a produção proteica da MuRF-1 em relação ao grupo SC (+45,5%), e o TR não foi efetivo em atenuar esse aumento (+46% para o grupo TD versus TC).



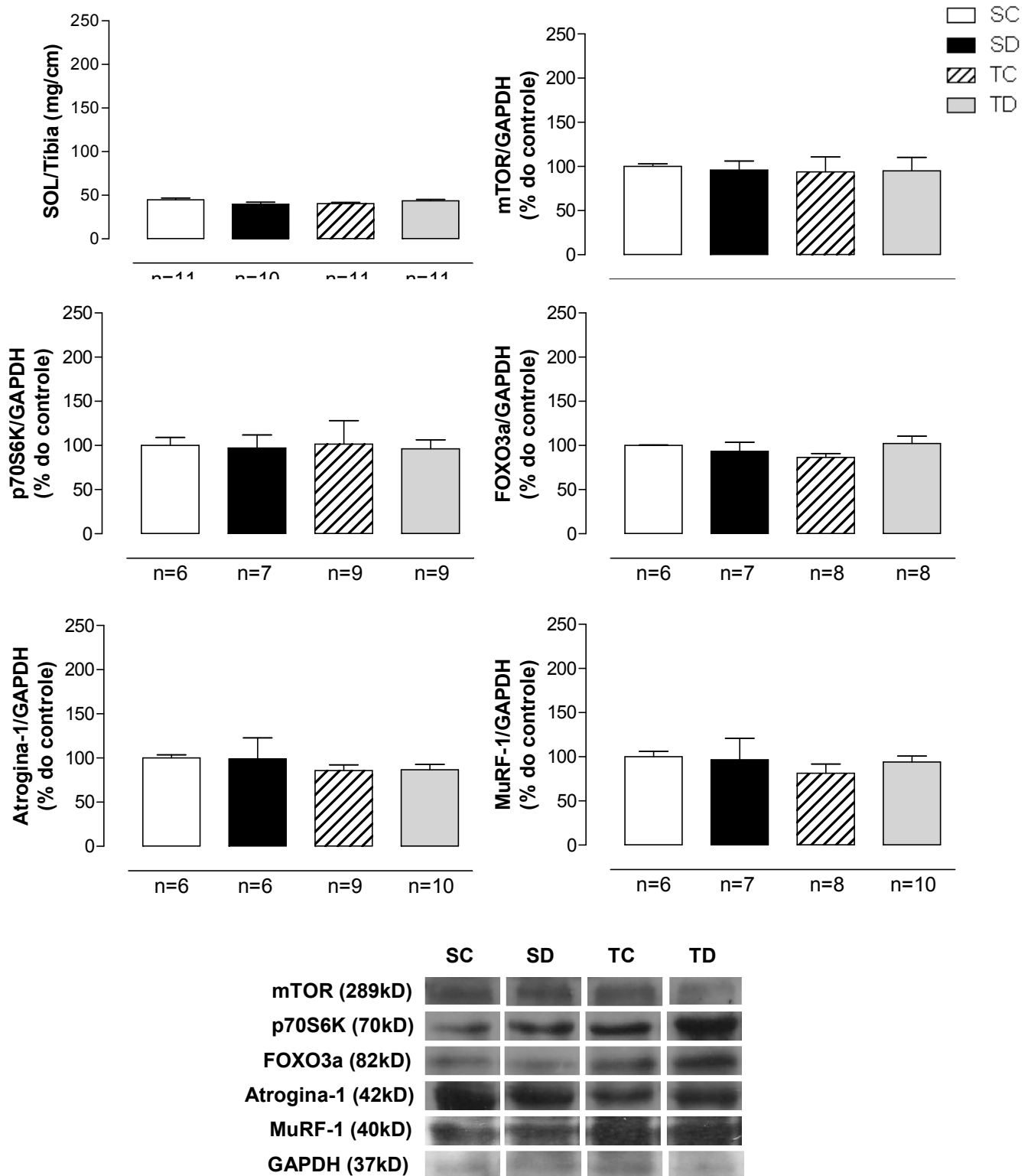
## Tibial anterior



**Figura 9.** Valores de massa muscular do Tibial Anterior (TA), normalizado pelo tamanho da tibia (cm) e análise densitométrica da produção proteica de mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1 em todos os grupos analisados: Sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Two-way. Significância: \*vs controle,  $p < 0,05$ .

A Figura 12 ilustra os valores de massa muscular e produção proteica relativa ao músculo SOL e pode-se verificar que tanto o tratamento farmacológico quanto o TR não provocaram alterações em nenhuma das variáveis apresentadas.

## Sóleo



**Figura 10.** Valores de massa muscular do músculo Sóleo (SOL), normalizado pelo tamanho da tíbia (cm) e análise densitométrica da produção proteica de mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1 em todos os grupos analisados: Sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD), ANOVA Two-way. Significância:  $p < 0,05$

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que o tratamento crônico com DEX determinou atrofia muscular no FHL e TA e o aumento da proteína atrofica MuRF-1 parece estar envolvida nessa resposta. Por outro lado, o TR foi eficaz em contrabalancear a atrofia provocada pela DEX somente no músculo FHL, que é o mais recrutado na escalada. O TR além de promover hipertrofia do FHL no grupo TC, atenuou a atrofia induzida pela DEX e os resultados sugerem que esta atenuação possa ser controlada pelo aumento de mTOR e p70S6k somados a reversão do aumento induzido pela DEX na proteína MuRF-1.

O TR a 80% do carregamento máximo, realizado antes e concomitante ao tratamento farmacológico com DEX, provocou aumento de 217% (média dos valores dos grupos treinados) na força máxima dos animais treinados, assim como provocou incrementos na força relativa. Resultado semelhante foi verificado por Hornberger e Farrar (2004) em animais treinados em escada de forma mais intensa e tiveram sua força máxima aumentada em 287% após 8 semanas de treinamento. Prestes et al. (2009) e Shiguemoto et al. (2012) também encontraram aumentos significativos na força de ratas ovariectomizadas após 6 e 12 semanas de TR em escada. Ao longo dos 4 TCMs os animais treinados aumentaram sua força absoluta e relativa, e não foi verificada alteração após o tratamento com DEX, embora quando observamos o delta entre o TCM-4 e TCM-3 podemos interpretar que o tratamento com DEX reduziu o peso carregado absoluto dos animais somente tratados (SD) e de forma relativa vemos um aumento significativo somente no grupo TD, o que demonstra que os animais treinados e tratados continuaram a ganhar força independente de terem seu PC reduzido. O fenômeno de redução da força pelo tratamento com DEX ainda é controverso, uma vez que Baehr, Furlow e Bodine (2011) também não observaram redução de força em camundongos após 14 dias de tratamento com DEX (3 mg/kg/dia, na água de beber). Embora Baptista et al. (2013) testaram o SOL (*in vivo*) de ratos tratados com DEX por 7 dias (0,6 mg/kg/dia) e observaram a diminuição de uma única contração máxima como também o pico de força tetânica. Sendo assim são necessários mais estudos para se determinar os mecanismos envolvidos nessas repostas antagônicas para um melhor entendimento deste fenômeno.

Um efeito colateral esperado pelo tratamento crônico com DEX é a atrofia da glândula adrenal, a qual muitas vezes é utilizada para avaliar a efetividade do tratamento. O presente estudo apresentou uma atrofia da glândula adrenal de 47% e 42% (para SD e TD, respectivamente) quando comparado a seus respectivos controles. Os resultados obtidos nesse trabalho são semelhantes aos reportados por Karszen et al. (2005), onde ratos tratados com DEX por 5 dias apresentaram redução de 51% no peso da glândula adrenal quando comparados ao grupo controle. Essa diminuição pode ser explicada pela inibição do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal que culmina na redução das concentrações de ACTH, que agem troficamente sobre essa glândula (KARSSEN et al., 2005).

Sabe-se que a diminuição do PC é um fenômeno presente no tratamento com GC e esta resposta vem sendo observada desde os primeiros estudos. Czerwinski et al. (1989) já haviam verificado reduções de 23% do PC em ratas submetidas a 11 dias de tratamento com acetato de cortisol (100 mg/kg/dia). Da mesma forma, Auclair et al. (1997) trataram ratos com corticosterona durante 7 dias, na dose de 10 mg/kg/dia e verificaram um decréscimo de 17% no PC e estes resultados foram confirmados por Cho et al. (2010), que observaram reduções de 3, 12 e 17% no PC de ratos tratados com triancinolona (1mg/kg/dia, *i.m.*) por 1, 3 ou 7 dias. Estes efeitos parecem estar diretamente relacionados com as dosagens, uma vez que dosagens ínfimas parecem não atuar tão severamente sobre o PC, pois ratos que foram tratados com DEX por 4 ou 10 semanas (1 µl diluídos em 75 µl de salina, 2 µl diluídos em 150 µl de salina, respectivamente. *s.c.*) não apresentaram redução de PC (SEVERINO et al., 2002; PAULI et al., 2005). Contudo, doses superiores de DEX apresentam reduções no PC de -4%, 13,4% e 17,2% em ratos tratados com 0,06, 0,6 e 1,2 mg/kg/dia de DEX por 5 dias, respectivamente (*i.p.*) (MA et al., 2003).

Outros autores utilizaram doses iguais ou superiores a 1 mg/kg/dia e todos verificaram reduções do PC após 5 (RAFACHO et al., 2007), 7 (NICASTRO et al., 2012c) e 10 dias de tratamento (AHTIKOSKI et al., 2004; GILSON et al., 2007; KAASIK et al., 2007). Os dados do presente estudo revelaram uma redução do PC após 10 de dias tratamento com DEX (0,5 mg/kg/dia, *i.p.*) de -21% para o grupo SD (vs SC). Yamamoto et al. (2010) observaram reduções do PC a partir do 4º dia em

animais tratados com DEX (0,6 mg/kg por 5 dias). Destaca-se aqui que a utilização de doses menores de DEX, como a utilizada no presente estudo, retarda a redução de PC, pois com uma dosagem de DEX a 1 mg/kg/dia (*i.p.*), durante 10 dias, observa-se redução de PC a partir do primeiro dia (GILSON et al., 2007; BAREL et al., 2010).

No presente estudo, embora o TR a 80% do carregamento máximo tenha aumentado a capacidade física dos animais, ele não foi efetivo em atenuar a redução do PC, uma vez que o grupo TD apresentou uma redução de -13% no PC, o que confirma os resultados do laboratório publicados anteriormente. Pode-se observar que nem o treinamento físico aeróbio em esteira, nem o TR a 60% do carregamento máximo foram efetivos em prevenir a redução de PC de ratos tratados com DEX (BAREL et al., 2010; MACEDO, A. G. 2013 e DIONÍSIO et al, 2014). Da mesma forma, Nicastro et al. (2012b) utilizaram TR em forma de agachamento, a 70% da capacidade física máxima voluntária, concomitante ao tratamento com DEX (5 mg/kg/dia por 7 dias na água de beber) e não verificaram inibição da redução de PC induzida pela DEX.

Apesar da redução de PC ser uma constante no tratamento com DEX, os mecanismos envolvidos e quando essa resposta se instala ainda não são totalmente conclusivos. Cogita-se que a redução na IA provocada pela DEX seja um dos fatores envolvidos na redução do PC. Dados prévios de nosso laboratório já apontavam a redução da IA (MACEDO, A. G. 2013) que foi confirmada no presente estudo, pois os animais tratados exibiram uma redução em sua IA no quinto dia de tratamento com DEX (-28% para o grupo SD). Estes resultados concordam com achados da literatura, como os obtidos por McKibbin et al. (1992) que observaram a redução da IA após 7 dias de tratamento com DEX (0,4 mg/kg). Esta resposta tem sido observada tanto em doses inferiores como superiores a do presente estudo (PAULI et al., 2005; SANTOS, RAFACHO E BOSQUEIRO, 2007). Essa redução da IA pode ser explicada pela alteração nas concentrações de duas adipocinas responsáveis pela sinalização e controle da saciedade e fome (leptina e grelina, respectivamente). Tulipano et al. (2007) verificaram que ratos tratados com DEX (0,4 mg/kg/dia por 14 dias) diminuiriam a IA e seu PC, mas quando um agonista da grelina era administrado juntamente com a DEX, os efeitos eram abolidos, sugerindo assim que a DEX provoca a redução da IA por uma menor atuação da grelina, o que geraria

uma menor fome. Da mesma forma, Jahng et al. (2008) verificaram que os níveis de leptina de ratos tratados com DEX por 4 dias (1 mg/kg/dia) estavam aumentados e a IA reduzida. Além disso, o tratamento com DEX poderia atuar reduzindo os níveis de neuropeptídeo Y e do CRH no núcleo paraventricular, ambos relacionados a regulação do apetite e da termogênese no hipotálamo (MCKIBBIN et al., 1992; MICHEL; CABANAC, 1999; BELL et al., 2000; GINSBERG et al., 2003).

Na tentativa de excluir os efeitos da redução da IA causada pelo tratamento crônico com DEX, outros pesquisadores têm realizado o controle por *pair-fed*, onde todos os animais controles recebem a mesma quantidade de ração ingerida pelo grupo tratado com DEX no dia anterior. Nicastro et al. (2012c) verificaram que o tratamento crônico com DEX (5 mg/kg/dia por 7 dias na água de beber) determinou a redução da IA e do PC a partir do primeiro dia, enquanto que o grupo *pair-fed*, só apresentou redução de PC a partir do 5º dia (vs início), mas mesmo assim ainda mantinham PC superior ao grupo tratado com DEX. Nesse sentido Ma et al. (2003) verificaram que o PC dos animais tratados com DEX (0,6 mg/kg/dia) por 5 ou 10 dias era significativamente menor em relação aos grupos *pair-fed*. Portanto, parece que a estratégia de controle *pair-fed* não é muito eficiente em simular a redução de PC induzida pela DEX. Estes resultados, associados ao fato de que a redução forçada de IA possa determinar um aumento no nível de estresse (FLAK et al. 2011) contribuíram para a decisão de não utilizar esta estratégia neste presente estudo. Os resultados do presente estudo mostram que a IA volta ao normal no décimo dia de tratamento, embora a redução de PC seja mantida, sugerindo assim que a redução da IA parecer estar envolvida no início da redução do PC, mas não na manutenção dessa resposta.

Outro fator envolvido na redução do PC é a atrofia muscular, que foi evidenciada no presente estudo nos músculos FHL e TA. Gilson et al. (2007) sugeriram que a redução do PC seja resultado da atrofia muscular, pois ao nocautear o gene que codifica a proteína miostatina em camundongos, estes autores não verificaram atrofia nem redução de PC, após submeter estes animais ao tratamento com DEX (1 mg/kg por 10 dias). Da mesma forma, Baehr, Furlow e Bodine (2011) demonstraram que camundongos fêmeas nocauteadas para o gene da MuRF-1 não apresentaram redução de PC após tratamento com DEX e os machos tiveram uma atenuação na redução de PC quando não tinham o gene da

MuRF-1. Vale ressaltar que neste estudo (BAEHR; FURLOW; BODINE, 2011) a atrofia muscular induzida pela DEX foi bloqueada nos animais *knock out*.

A atrofia muscular é um dos efeitos colaterais mais deletérios do tratamento crônico com a DEX. Recentemente, revisões muito bem conduzidas vêm tentando explicar os diferentes mecanismos que podem contribuir para a redução da massa muscular, induzida ou não por DEX (GLASS, 2010; SCHAKMAN, 2013; EGERMAN; GLASS, 2014). Apesar da existência de vários estudos sobre este assunto, ainda não está claro se a DEX provoca atrofia muscular por promover um aumento no catabolismo ou redução de síntese proteica, principalmente porque os estudos apresentam muitas diferenças em seus protocolos (doses, períodos de tratamento, modo de administração, etc). Alguns autores demonstraram que o tratamento com DEX reduz a síntese proteica de ratos tratados com 0,3 ou 1 mg/kg/dia durante 5 e 10, respectivamente (LONG; WEI; BARRETT, 2001; KAASIK et al., 2007). Estes resultados foram confirmados em culturas celulares expostas a DEX (10 e 100 nM por 48 horas), uma vez que Adams (2007) e Jogo et al. (2009) observaram redução da expressão gênica e produção proteica do fator de ativação de transcrição 4 (ATF4) e redução da produção proteica de miogenina, que resulta em um menor aporte de AA e reparação para a célula, respectivamente. Por outro lado, o aumento do catabolismo proteico causado pelo tratamento com DEX tem sido verificado tanto em culturas celulares expostas a DEX após 24 horas (YANG et al., 2007) como em ratos tratados com 0,54 mg/kg na água de beber durante 5 dias (COMBARET et al., 2004), sendo que esse aumento no catabolismo acontece em virtude da ativação dos sistemas de degradação proteica como as caspases, calpains e sistema Ubiquitina proteassoma (MURTON; CONSTANTIN; GREENHAFF, 2008).

Os resultados evidenciam uma atrofia de 19,6% no músculo FHL após tratamento crônico com DEX. Estes resultados eram esperados uma vez que o músculo FHL é composto principalmente por fibras do tipo IIx e em menor grau por fibras do tipo IIb (LEE et al., 2004; HORNBERGER; FARRAR, 2004). Pellegrino et al. (2004) já haviam demonstrado que a DEX age preferencialmente sobre fibras de contração rápida (tipo IIx) em detrimento das lentas (tipo I). Importante destacar que dados expondo o comportamento desta musculatura quando submetida ao tratamento farmacológico com DEX são inexistentes, e nosso grupo destaca-se por



ser um dos primeiros a investigar tais efeitos (MACEDO, A. G. 2013 e presente estudo).

Na tentativa de determinar se a atrofia estava associada a aumento do catabolismo ou redução de síntese proteicas, o presente estudo investigou a produção proteica de mTOR, p70S6K, FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1. Tanto a proteína mTOR como a p70S6K não sofreram alterações pelo tratamento com DEX, reforçando o encontrado por Nicastro et al. (2012b) que não verificaram redução no total destas proteínas após tratar ratos com DEX por 7 dias. Kukreti et al (2013) verificaram em cultura celular exposta a DEX que o total de mTOR também não era alterado. Em relação a proteína p70S6K, nosso laboratório já havia verificado que esta proteína não foi reduzida após tratamento com DEX (dados não publicados), estes dados vão de encontro aos obtidos por Long, Wei e Barrett (2001) que apesar de não analisarem o FHL, demonstraram que o músculo EDL de ratos tratados com DEX (0,3 mg/kg por 5 dias) não apresentava diminuição no total de p70S6K, embora a forma fosforilada desta proteína estava reduzida após tratamento com DEX.

Em relação às proteínas envolvidas no catabolismo proteico, o presente estudo verificou que o tratamento com DEX durante 10 dias não alterou o total de FOXO3a e Atrogina-1, mas provocou aumento de 37% na produção proteica de MuRF-1 no músculo FHL. A proteína FOXO3a funciona como um link entre a via de síntese proteica e a via de catabolismo proteico, sendo assim, era de se esperar que sua produção estivesse aumentada nos ratos tratados com DEX. Nossos dados não demonstraram aumentos na produção de FOXO3a, o que é corroborado pelos resultados observados por Nicastro et al. (2012c) após tratarem ratos com DEX durante 7 dias. Estes autores verificaram redução na razão  $p\text{FOXO3a}^{\text{Ser253}}/\text{total FOXO3a}$ . Baher, Furlow e Bodine (2011) também observaram que o total proteico de FOXO3a não se alterava após o tratamento com DEX por 3 ou 14 dias, embora possuísse sua expressão gênica aumentada nos períodos analisados, o que é reforçado por Cho et al (2010), que verificaram aumentos no mRNA de FOXO3a após 7 dias de tratamento com GC. Os estudos que analisaram os efeitos da DEX sobre a Atrogina-1 são escassos e inconclusivos, variando as respostas de acordo com o material e dosagem utilizados (músculos ou cultura celular). Dados relacionados ao mRNA foram apresentados por Cho et al. (2010) após tratarem ratos com triancinolona (1mg/kg/dia, *i.m.*) por 1, 3 ou 7 dias. Estes autores

verificaram aumentos de mRNA de Atrogina-1 a partir do 3º dia de tratamento e atrofia no músculo EDL no 7º dia. Da mesma forma, Alamdari et al. (2012) verificaram aumentos tanto no mRNA como no total proteico de Atrogina-1 após expor células (miotubos L6) a DEX por 24 horas (1 µM). Parece ser uma tendência recente de se encontrar aumentos na produção proteica de Atrogina-1 em cultura celular expostas a DEX por 24 horas em diferentes concentrações, variando de 1 µmol a 100 µM (CASTILLERO et al., 2013; KUKRETI et al., 2013). Baehr, Furlow e Bodine (2011), utilizando uma dosagem de DEX de 3 mg/kg durante 3 ou 14 dias em camundongos, conseguiram verificar aumentos no mRNA de Atrogina-1 no músculo tríceps sural (sóleo, plantar e gastrocnêmio lateral e medial) os quais também apresentaram atrofia, no entanto estes autores não conseguiram associar este aumento de gene da Atrogina-1 à atrofia muscular, uma vez que animais sem o gene desta proteína também apresentaram atrofia. Esses dados reforçam o papel chave da MuRF-1 na atrofia muscular induzida pela DEX, pois camundongos nocaute para esta proteína apresentaram prevenção de atrofia dos músculos TA e tríceps sural após tratamento com DEX. Por outro lado, quando os camundongos não apresentavam o gene da Atrogina-1, a atrofia induzida pela DEX permanecia (Baehr, Furlow e Bodine, 2011). Resultados semelhantes aos do presente estudo foram obtidos por Nicastro et al. (2012c), que observaram elevações na produção total da proteína MuRF-1 no músculo plantar de ratos tratados com DEX por 7 dias. Estes resultados, associados ao do presente estudo parecem sugerir que a atrofia provocada pela DEX no FHL envolva o aumento na produção proteica da MuRF-1.

O TR (80% do carregamento máximo), realizado antes e durante o tratamento com DEX por 10 dias, exerceu ação preventiva sobre a atrofia muscular do FHL induzida pela DEX, onde o grupo TD apresentou um atrofia de 15,5% (vs TC), significativamente menor quando comparada ao grupos SD, muito possivelmente pelo fato de ser o principal músculo a ser solicitado durante a escalada (PARK; FARRAR; LEE, 2008). Esta atenuação da atrofia do FHL parece envolver um aumento de 63% na proteína mTOR e 49% na p70S6K somados ao bloqueio do aumento da MuRF-1 no grupo TD. Os Estudos envolvendo TR e tratamento com DEX são escassos, mas Nicastro et al. (2012b) verificaram que o TR em forma de agachamento somado ao tratamento com DEX por 7 dias não resultou em aumento no total da proteína mTOR e p70S6K, mas aumentou a razão

pmTOR<sup>Ser2448</sup>/total mTOR e pp70S6K<sup>Thr389</sup>/total p70S6K. Da mesma forma nossos resultados não demonstraram alterações na produção total de FOXO3a pelo TR o que também foi verificado por Nicastro et al. (2012b), embora este autor tenha observado que o TR em forma de agachamento reduziu a razão fosforilada/total desta proteína. Em relação a Atrogina-1 outros autores têm demonstrado sua redução em músculos de contração rápida, após TR por longos períodos, mas parece que esta resposta está mais presente em protocolos de baixa intensidade (ZANCHI et al., 2009; MACEDO, A. G. 2013). Nicastro et al. (2012b) observaram em relação a proteína MuRF-1 que o TR não provocava mudança nos valores desta proteína quando comparados ao grupo somente tratado com DEX, já nossos dados mostram que o TR manteve a produção de MuRF-1 em níveis basais, isto é, os animais treinados e tratados compartilhavam valores de MuRF-1 semelhantes ao grupo somente treinado. A não observância de alteração no total das proteínas supracitadas na literatura, talvez seja devido ao curto tempo de emprego do TR (concomitante ao tratamento, ou seja, somente 7 dias). Assim, os resultados sugerem que o efeito protetor do TR sobre a atrofia muscular causada pela DEX no músculo FHL envolveu aumentos na produção total de mTOR e p70S6K somados a manutenção da produção total de MuRF-1.

Além dos efeitos preventivos sobre a atrofia muscular no FHL, o TR também foi eficaz em provocar hipertrofia no grupo TC em relação ao grupo SC (+9%), reproduzindo os dados obtidos anteriormente por Hornberger e Farrar (2004) e Park, Farrar e Lee (2008), obtidos após 8 semanas de TR intenso (intensidades maiores que a do presente estudo) realizado em escada. De acordo com os resultados do presente estudo, as proteínas mTOR e p70S6K parecem estar envolvidas nesta resposta, uma vez que suas produções estavam aumentadas após o TR, quando comparadas ao grupo controle (63% e 46%, respectivamente). Em relação à proteína mTOR, Léger et al (2006) verificaram aumento no músculo quadríceps de humanos após 8 semanas de TR, o que estava correlacionado com o aumento da fosforilação da mTOR. Baar e Esser (1999) já haviam verificado que a hipertrofia no músculo TA, plantar e EDL era dependente da fosforilação de p70S6K após 6 semanas de TR simulado por eletroestimulação.

Os dados obtidos até o presente momento demonstram uma atrofia do músculo TA de 17%, que concordam com os achados de Pellegrino et al. (2004) pois é um músculo glicolítico, de contração rápida e confirma os resultados obtidos anteriormente (BAREL et al., 2010 e DIONÍSIO et al, 2014). Assim como foi observado para o músculo FHL, a presente investigação verificou que após o tratamento farmacológico com DEX, a produção total de MuRF-1 encontrava-se elevada em 45,5% no TA. Clarke et al. (2007) verificaram aumentos dessa proteína somados a redução de miosina de cadeia pesada em cultura celular exposta a DEX (100  $\mu$ M por 24 ou 32 horas). Mais recentemente, Kukreti et al. (2013) também observaram aumentos na produção proteica de MuRF-1 em células expostas a DEX por 24, justificando a diminuição da área dos miotubos observada (-34%). Da mesma forma, Castillero et al. (2013) verificaram aumentos gênicos e proteicos de MuRF-1, associados ao aumento da degradação proteica e redução de 30% no tamanho celular em células expostas a DEX. Cho et al. (2010) submeteram ratos ao tratamento com triancinolona (1 mg/kg/dia, *i.m.*) por 1, 3 ou 7 dias, e verificaram aumentos de mRNA de MuRF-1 no 7º de tratamento no músculo EDL (fibras de contração rápida), correlacionados com atrofia desse músculo. Nicastro et al. (2012c) observaram aumentos na produção proteica de MuRF-1 após tratamento de 7 dias com DEX (5mg/kg/dia, água de beber), explicando a atrofia dos músculos plantar e EDL. Da mesma forma que no músculo FHL, não foi observada qualquer alteração de produção total de mTOR, p70S6K, FOXO3a e Atrogina-1 no TA após tratamento crônico com DEX por 10 dias, o que confirma resultados previamente observados por Nicastro et al. (2012b) e nosso laboratório (dados não publicados). Com isso, a partir dos dados obtidos até o presente momento, a atrofia muscular no músculo TA pode ser atribuída ao aumento na produção total da proteína MuRF-1.

Diferente do observado no FHL, o TR a 80% do carregamento máximo, realizado em escada, não foi capaz de atenuar a atrofia imposta pelo tratamento crônico com DEX no músculo TA, pois o grupo TD apresentou uma redução de -19,7% (vs TC). Acredita-se que por não ser o músculo mais requisitado durante o ato de escalar o TA não tenha se beneficiado dos efeitos protetores do TR. Além disso, TR não conseguiu modular a produção de nenhuma das proteínas analisadas nesse músculo. Uma possível explicação pode ser pelas diferenças na composição de fibras entre o TA e FHL. Enquanto FHL é composto predominantemente por

fibras MHC2a/x (IIa/x) e pequenas porcentagens de MHC2b (IIb) (LEE et al., 2004; HORNBERGER; FARRAR, 2004), o músculo TA é composto principalmente por MHC2b (IIb) (LEE et al., 2004; ZHONG et al., 2007). Nicastro et al. (2012b) utilizaram TR de agachamento (70% da capacidade física máxima voluntária) e também não observaram alterações na produção proteica total de mTOR, p70S6K, FOXO3a e MuRF-1 no músculo plantar dos animais treinados, com ou sem tratamento com DEX, mas verificaram aumentos da razão  $\text{pmTOR}^{\text{(Ser2448)}}/\text{total mTOR}$  e  $\text{p70S6K}^{\text{(thr389)}}/\text{total p70S6K}$  e redução dessa razão para  $\text{pFOXO3a}^{\text{(Ser253)}}/\text{total FOXO3a}$  nos ratos treinados.

Como esperado, por ser um músculo de fibras oxidativas (tipo I), o SOL não apresentou alterações em seu peso muscular após 10 dias de tratamento com DEX. Outros autores já haviam reportado que o músculo SOL não é grandiosamente sensível ao tratamento com DEX. Gilson et al. (2007) demonstraram que animais que receberam DEX não apresentaram redução de massa muscular do SOL. Nesse sentido, Yamamoto et al. (2010) também não verificaram redução do peso muscular do SOL após tratamento oral com DEX de 0,6 mg/kg por 5 dias, embora tenham verificado redução de área de secção transversa, juntamente com a redução simultânea de fibras tipo I e tipo II. Dados anteriores do laboratório também já haviam demonstrado a manutenção dos valores de peso muscular do músculo SOL após tratamento com DEX, mesmo em doses maiores que a do presente trabalho (BAREL et al., 2010). Uma possível explicação para o músculo SOL não ser afetado pela DEX baseia-se em sua composição de fibras, pois este músculo é composto principalmente de fibras tipo I, 2A e 2X com uma menor proporção de fibras tipo 2B, o oposto do encontrado no músculo TA que tem predominância de fibras do tipo 2B e 2X e como as fibras mais afetadas pela DEX são as fibras tipo 2X, a perda provocada nesse músculo seria quase imperceptível devido a baixa porcentagem dessas fibras (Pellegrino et al. 2004). A administração de DEX não alterou a produção de nenhuma proteína analisada. Apesar de escassos os estudos utilizando o músculo SOL, alguns autores que verificaram a redução no peso muscular ou na área de secção transversa desse músculo observaram aumentos somente na expressão gênica da Atrogina-1, após tratarem ratos com DEX (YAMAMOTO et al. 2010; BAPTISTA et al. 2013). Oito semanas e dez dias de TR em escada também não provocaram efeito sobre a massa muscular do SOL, como já observado por

outros autores após TR em escada de forma mais intensa (3 vezes por semana durante 8 semanas) (HORNBERGER; FARRAR, 2004; PARK; FARRAR; LEE, 2008). TR não alterou nenhuma das proteínas analisadas no músculo SOL.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos permite-nos sugerir que a atrofia muscular observada nos músculos FHL e TA após 10 dias de tratamento farmacológico com DEX está intimamente relacionada ao aumento da proteína atrofica MuRF-1. Por sua vez, o TR foi capaz de prevenir a atrofia no músculo mais recrutado ao ato de escalar, o FHL, devido a combinação de aumentos nas proteínas mTOR e p70S6K somados a reversão do aumento induzido pela DEX na proteína MuRF-1.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. M. **Role of the Transcription Factor ATF4 in the Anabolic Actions of Insulin and the Anti-anabolic Actions of Glucocorticoids.** *The Journal Of Biological Chemistry*, v. 282, n. 23, pp. 16744 -16753, June 8, 2007.
- ADAMS, G. R.; HADDAD, F.; BODELL, P. W.; TRAN, P. D.; BALDWIN, K. M. **Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats.** *Journal of Applied Physiology*, 103(5): 1644-1654. 2007.
- ADAMS, J.; BEHNKE, M.; CHEN, S.; CRUICKSHANK, A. A.; DICK, L. R.; GRENIER, L.; KLUNDER, J. M.; MA, Y-T.; PLAMONDON, L.; STEIN, R. L. **Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8, 333-338. 1998.
- AHTIKOSKI, A. M.; RISO, E-M.; KOSKINEN, S. O. A.; RISTELI, J.; TAKALA, T. E. S. **Regulation of type iv collagen gene expression and degradation in fast and slow muscles during dexamethasone treatment and exercise.** *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 448(1): 123-130. 2004.
- AIRES, M. M. **Fisiologia.** 3º ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008. 1232.
- ALAMDARI, N.; AVERSA, Z.; CASTILLERO, E.; GURAV, A.; PETKOVA, V.; TIZIO, S.; HASSELGREN, P-O. **Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle atrophy-related ubiquitin ligases Atrogin-1 and MuRF1 in cultured myotubes through a SIRT1-dependent mechanism.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417: 528-533. 2012.
- AMARAL, L. M.; PAPANÉK, E. P.; GREENE, A. S. **Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 281: H1163-H1169, 2001.
- ANTI, S. M. A; GIORGI, R. D. N; CHAHADÉ, W. H. **Antiinflamatórios hormonais: glicocorticóides.** *Einstein*, São Paulo; 6 (supl.1): s159-s165, 2008.
- AUCLAIR, D.; GARREL, D. R.; ZEROUALA, A. C.; FERLAND, L. H. **Activation of the ubiquitin pathway in rat skeletal muscle by catabolic doses of glucocorticoids.** *American Journal of Physiology*, 272 (3 Pt 1):C1007-16. Mar 1997.
- BAAR, K.; ESSER, K. **Phosphorylation of p70(s6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise.** *American Journal of Physiology*, 276(1 pt 1): c120-127. 1999.
- BAEHR, L.M., FURLLOW, J.D., BODINE, S.C. **Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids.** *The Journal of physiology*, v.19, p.4759-776, 2011.
- BAPTISTA, I. L.; SILVA, W. J.; ARTIOLI, G. G.; GUILHERME, J. P. L. F.; LEAL, M. L.; AOKI, M. S.; MIYABARA, E. H.; MORISCOT, A. S. **Leucine and HMB Differentially Modulate Proteasome System in Skeletal Muscle under Different Sarcopenic Conditions.** *PLoS ONE* 8(10): e76752. 2013.

BARAUNA, V. G.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C.; OLIVEIRA, E. M. **Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model.** *Clinical Medicine & Research*, v.5, n. 2:114-120. 2007.

BAREL, M.; PEREZ, O. A. B.; GIOZZET, V. A.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J. R.; AMARAL, S. L. **Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment.** *European Journal applied physiology*, 108(5): 999-1007. 2010.

BELL, M. E.; BHATNAGAR, S.; AKANA, S. F.; CHOI, S.; DALLMAN, M. F. **Disruption of Arcuate/Paraventricular Nucleus Connections Changes Body Energy Balance and Response to Acute Stress.** *The Journal of Neuroscience*, September 1, 20(17):6707-6713. 2000.

BERNARDO, W. M., AIRES, F. T. **Eficácia da dexametasona na profilaxia de náuseas e vômitos no pós-operatório de colecistectomia laparoscópica.** *Revista da associação médica brasileira*, 59(4):387-391. 2013.

BODINE, S. C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V. K.-M.; NUNEZ, L.; CLARKE, B. A.; POUYMIROU, W. T.; PANARO, F. J.; NA, E.; DHARMARAJAN, K.; PAN, Z.-Q.; VALENZUELA, D. M.; DECHIARA, T. M.; STITT, T. N.; YANCOPOULOS, G. D.; GLASS, D. J. **Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy.** *Science*, 294, 1704. 2001.

CAMPOS, A. R.; SERAFINI, L. M.; SOBREIRA, C.; MENEZES, L. G.; MARTINEZ, J. A. B. **Creatine intake attenuates corticosteroid-induced impairment of voluntary running in hamsters.** *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 31: 490-494. 2006.

CASTILLERO, E.; ALAMDARI, N.; LECKER, S. H.; HASSELGREN, P.-O. **Suppression of atrogin-1 and MuRF1 prevents dexamethasone-induced atrophy of cultured myotubes.** *Metabolism*, Oct; 62(10):1495-502. 2013

CHO, J. E.; FOURNIER, M.; DA, X.; LEWIS, M. I. **Time course expression of foxo transcription factors in skeletal muscle following corticosteroid administration.** *Journal of Applied Physiology*, 108(1): 137-145. 2010.

CLARKE, B. A.; DRUJAN, D.; WILLIS, M. S.; MURPHY, L. O.; CORPINA, R. A.; BUROVA, E. RAKHILIN, S. V.; STITT, T. N.; PATTERSON, C.; LATRES, E.; GLASS, D. J. **The e3 ligase murf1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle.** *Cell Metabolism*, 6, 376-385, November, 2007.

COMBARET, L.; TAILLANDIER, D.; DARDEVET, D.; BÉCHET, D.; RALLIÈRE, C.; CLAUSTRE, A.; GRIZARD, J.; ATTAIX, D. **Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulator y complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles.** *Biochemical Journal*, 378, 239-246. 2004.

CROSSLAND, H.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; GREENHAFF, P. L.; GARDINER, S. M. **Low-dose dexamethasone prevents endotoxaemia-induced muscle protein loss and impairment of carbohydrate oxidation in rat skeletal muscle.** *The Journal of Physiology*, 588(Pt 8): 1333-1347, 2010.



CUNHA, T. F.; BACURAU, A.V. N.; MOREIRA, J. B. N.; PAIXÃO, N. A.; CAMPOS, J. C.; FERREIRA, J.C. B.; LEAL, M. L.; NEGRÃO, C. E.; MORISCOT, A. S.; WISLØFF, U.; BRUM, P. C. **Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure.** *PLoS One*, 7(8):e41701.

CZERWINSKI, S. M.; ZAK, R.; KUROWSKI, T. T.; FALDUTO, M. T.; HICKSON, R. C. **Myosin heavy chain turnover and glucocorticoid deterrence by exercise in muscle.** *American Journal of Physiology*, 67(6):2311-2315. Dec. 1989.

DE KLOET E. R.; SUTANTO, W.; VAN DEN BERG, D. T.; CAREY, M. P.; VAN HAARST, A. D.; HORNSBY, C. D.; MEIJER, O. C.; ROTS, N. Y.; OITZL, M. S. **Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications.** *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 47(1-6):183-90. Dec 1993.

DIONÍSIO, T. J.; LOUZADA, J. C. A.; VISCELLI, B. A.; DIONÍSIO, E. J.; MARTUSCELLI, A. M.; BAREL, M.; PEREZ, O. A. B.; BOSQUEIRO, J. R.; BROZOSKI, D. T.; SANTOS, C. F.; AMARAL, S. L. **Aerobic training prevents dexamethasone-induced peripheral insulin resistance.** *Hormone and Metabolic Research*, 46(7):484-9. 2014.

DOMINGOS, M. M.; RODRIGUES, M. F. C.; STOTZER, U. S.; BERTUCCI, D. R.; SOUZA, M. V. C.; MARINE, D. A.; GATTO, C. V. G.; ARAÚJO, H. S. S.; PEREZ, S. E. A. **Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats.** *European Journal of Applied Physiology*, 112(4):1437-44. 2012.

DONG, F.; HUA, Y.; ZHAO, P.; REN, J.; DU, M.; SREEJAYAN, N. **Chromium supplement inhibits skeletal muscle atrophy in hindlimb-suspended mice.** *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20: 992 - 999. 2009.

EGERMAN, M. A.; GLASS, D. J. **Signaling pathways controlling skeletal muscle mass.** *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Jan-Feb; 49(1):59-68. 2014.

FLAK, J. N.; JANKORD, R.; SOLOMON, M. B.; KRAUSE, E. G.; HERMAN, J. P. **Opposing effects of chronic stress and weight restriction on cardiovascular, neuroendocrine and metabolic function.** *Physiology & Behavior*, 104, 228–234. 2011.

GILSON, H.; SCHAKMAN, O.; COMBARET, L.; LAUSE, P.; GROBET, L.; ATTAIX, D.; KETELSLEGERS, J. M.; THISSEN, J. P. **Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy.** *Endocrinology*, 148(1): 452-460. 2007.

GINSBERG, A. B.; CAMPEAU, S.; DAY, H. E.; SPENCER, R. L. **Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotropin-releasing hormone hnRNA but does not affect c-fos mRNA or fos protein expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.** *Journal of Neuroendocrinology*, v. 15, 1075-1083. 2003.

GLASS, D. J. **Signaling pathways perturbing muscle mass.** *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, may;13(3):225-9. 2010.

GLASS, D. J. **Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Oct;37(10):1974-84. 2005.

GOMES, M. D.; LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A. L. **Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, v. 98 n. 25, 14440 -14445, December 4, 2001.

HASSELGREN, P.; FISCHER, J. E. **Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation.** *Annals of Surgery*, v. 233, n. 1, 9 -17. 2001.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R.P. **Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat.** *Canadian Journal of Applied Physiology*, 29(1): 16-31. 2004.

HURSON, C. J.; BUTLER, J. S.; KEATING, D. T.; MURRAY, D. W.; SADLIER, D. M.; O'BYRNE, J. M.; DORAN, P. P. **Gene expression analysis in human osteoblasts exposed to dexamethasone identifies altered developmental pathways as putative drivers of osteoporosis.** *BMC Musculoskeletal Disorders*, 8:12. 2007.

JAHNG, J. W.; KIM, N. Y.; RYU, V.; YOO, S. B.; KIM, B-T.; KANG, D-W.; LEE, J-H. **Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats.** *European Journal of Pharmacology*, v. 508, p.64-70, 2008.

JOGO, M.; SHIRAISHI, S.; TAMURA, T. **Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase.** *FEBS Letters*, 583, 2715-2719. 2009.

KAASIK, P.; UMNOVA, M.; PEHME, A.; ALEV, K.; ARUA, M.; SELART, A.; SEENE, T. **Ageing and dexamethasone associated sarcopenia: peculiarities of regeneration.** *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 105 (1-5): 85-90. 2007.

KARSSSEN, A. M.; MEIJER, O. C.; BERRY, A.; SANJUAN PIÑOL, R.; DE KLOET, E. R. **Low doses of dexamethasone can produce a hypocorticosteroid state in the brain.** *Endocrinology*, 146(12): 5587-5595. 2005.

KUKRETI, H.; AMUTHAVALLI, K.; HARIKUMAR, A.; SATHIYAMOORTHY, S.; FENG, P. Z.; ANANTHARAJ, R.; TAN, S. L. K.; LOKIREDDY, S.; BONALA, S.; SRIRAM, S.; MCFARLANE, C.; KAMBADUR, R.; SHARMA, M. **Muscle-specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy.** *The Journal of Biological Chemistry*, 1; 288(9):6663-78. 2013.

LANGEN, R. C. J. **Triggers and mechanisms of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45, 2245– 2256, 2013.

LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; GILBERT, A.; GOMES, M.; BARACOS, V.; BAILEY, J.; PRICE, S. R.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. **Multiple types of skeletal**

**muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression.** *The FASEB Journal*, v. 18, 39-51, January 2004.

LEE, S.; BARTON, E. R.; SWEENEY, H. L.; FARRAR, R. P. **Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats.** *Journal of applied physiology*, 96:1097-1104, 2004.

LÉGER, B.; CARTONI, R.; PRAZ, M.; LAMON, S.; DÉRIAZ, O.; CRETENAND, A.; GOBELET, C.; ROHMER, P.; KONZELMANN, M.; LUTHI, F.; RUSSELL, A. P. **Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy.** *The Journal of Physiology*, 576 (Pt 3): 923-933. 2006.

LENK, K.; SCHULER, G.; ADAMS, V. **Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training.** *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 1(1): 9-21. 2010.

LEWIS, M. I.; LI, H.; HUANG, Z-S.; BIRING, M. S.; CERCEK, B.; FOURNIER, M. **Influence of varying degrees of malnutrition on IGF-I expression in the rat diaphragm.** *Journal of Applied Physiology*, 95(2): 555-562. 2003.

LONG, W.; WEI, L.; BARRET, E. J. **Dexamethasone inhibits the stimulation of muscle protein synthesis and PHAS-I and p70 S6-kinase phosphorylation.** *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 280: E570-E575, 2001.

MA, J.; YANG, A.; QIN, W.; SHI, Y.; ZHAO, B.; JIN, Y.; XIE, Y. **Alleviating allergic airway diseases by means of short-term administration of IL-2 and dexamethasone.** *The journal of Allergy and Clinical Immunology*, Jun; 127(6):1447-56.e6. 2011.

MA, K.; MALLIDIS, C.; BHASIN, S.; MAHABADI, V.; ARTAZA, J.; GONZALEZ-CADAVID, N.; ARIAS, J.; SALEHIAN, B. **Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression.** *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 285(2): E363-371. 2003.

MACEDO, A. G.; KRUG, A. L. O.; HERRERA, N. A.; ZAGO, A. S.; RUSH, J. W. E.; AMARAL, S. L. **Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle.** *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 143., 357-364. 2014.

MCKIBBIN, E. B.; COTTON, S. J.; H. MCCARTHY, D.; WILLIAMS, G. **The effect of dexamethasone on neuropeptide y concentrations in specific hypothalamic regions.** *Life Sciences*, Vol. 51, pp. 1301-1307. 1992.

MCPHERRON, A. C.; LEE, E. **Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences: Genetics*, Vol. 94, pp. 12457-12461, November 1997.

MENEZES, L. C.; SOBREIRA, C.; NEDER, L.; RODRIGUES-JÚNIOR, A. L.; MARTINEZ, J. A. B. **Creatine supplementation attenuates corticosteroid-**

**induced muscle wasting and impairment of exercise performance in rats.** *Journal of Applied Physiology*, 102: 698 -703, 2007.

MICHEL, C.; CABANAC, M. **Effects of dexamethasone on the body weight set point of rats.** *Physiology & Behavior*, 68, 145-150. 1999.

MURTON, A. J.; CONSTANTIN, D.; GREENHAFFET, P. L. **The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782(12): 730-743. 2008.

NICASTRO, H.; GUALANO, B.; MORAES, W. M. A. M.; PAINELLI, V. S.; LUZ, C. R.; COSTA, A. S.; GUIMARÃES, F. S.; MEDEIROS, A.; BRUM, P. C.; LANCHAJR, A. H. **Effects of creatine supplementation on muscle wasting and glucose homeostasis in rats treated with dexamethasone.** *Amino Acids*, 42:1695–1701. 2012c.

NICASTRO, H.; LUZ, C. R.; CHAVES, D. F. S.; NEVES, W.; VALENTE, K. S.; LANCHAJR, A. H. **Leucine supplementation combined with resistance exercise improves the plasma lipid profile of dexamethasone-treated rats.** *Lipids in Health and Disease*, 11:7, 2012a.

NICASTRO, H.; ZANCHI, N. E.; LUZ, C. R.; MORAES, W. M.A.M.; RAMONA, P.; FILHO, M. A. S.; CHAVES D. F. S.; MEDEIROS, A.; BRUM, P. C.; DARDEVET, D.; LANCHAJR, A. H. **Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats.** *Nutrition* 28, 465-471. 2012b.

PARK, H.; FARRAR, R. P.; LEE, S. **Resistance training results in selective hypertrophy of skeletal muscle in both young and middle-aged rats.** *The Korean Journal of Exercise Nutrition*, Vol. 12, No. 3, p. 127-132. 2008.

PAULI, J. R.; GOMES, R. J.; LUCIANO, E. **Hypothalamo-pituitary axis: effects of physical training in rats administered with dexamethasone.** *Revista Neurologia*, 42(6): 325-331. 2006.

PAULI, J. R.; LEME, J. A. C. A.; CREPILHO, D. M.; MELLO, M. A. R.; LUCIANO, E. **Efeitos do treinamento físico sobre o metabolismo de ratos administrados com dexametasona.** *Revista LOGOS*, n. 12: 25-40. 2005.

PELLEGRINO, M. A.; D'ANTONA, G.; BORTOLOTTI, S.; BOSCHI, F.; PASTORIS, O.; BOTTINELLI, R.; POLLA, B.; REGGIANI, C. **Clenbuterol antagonizes glucocorticoid-induced atrophy and fibre type transformation in mice.** *Experimental Physiology*, 89.1, pp. 89-100. 2004.

PINHEIRO, C. H. J.; FILHO, W. M. S.; NETO, J. O.; MARINHO, M. J. F.; NETO, R. M.; SMITH, M. M. R. L.; SILVA, C. A. B. **Exercise prevents cardiometabolic alterations induced by chronic use of glucocorticoids.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 93(4): 400-408, 392-400. 2009.

PRESTES, J.; MARQUETI, R. C.; SHIGUEMOTO, G. E.; LEITE, R. D.; PEREIRA, G. B.; ARAÚJO, H. S. S.; BALDISSERA, V.; PEREZ, S. E. A. **Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle.** *Applied physiology, nutrition, and metabolism*, Aug; 34(4):700-6. 2009.

PSILANDER, N.; DAMSGAARD, R.; PILEGAARD, H. **Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle.** *Journal of Applied Physiology*, 95: 1038-1044, 2003.

QI, D.; PULINILKUNNIL, T.; AN, D.; GHOSH, S.; ABRAHANI, A.; POSPISILIK, J. A.; BROWNSEY, R.; WAMBOLT, R.; ALLARD, M.; RODRIGUES, B. **Single-dose dexamethasone induces whole-body insulin resistance and alters both cardiac fatty acid and carbohydrate metabolism.** *DIABETES*, v. 53, July, 2004.

QIN, W.; PAN, J.; WU, Y.; BAUMAN, W. A.; CARDOZO, C. **Protection against dexamethasone-induced muscle atrophy is related to modulation by testosterone of FOXO1 and PGC-1alpha.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 403(3-4): 473-478. 2010.

RAFACHO, A.; ROMA, L. P.; TABOGA, S. R.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO, J. R. **Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets.** *Canadian journal of physiology and pharmacology*, May;85(5):536-45. 2007.

REBEYROL, C.; SAINT-CRIQ, V.; GUILLOT, L.; RIFFAULT, L.; CORVOL, H.; CHADELAT, K.; RAY, D. W.; CLEMENT, A.; TABARY, O.; ROUZIC, P. L. **Glucocorticoids reduce inflammation in cystic fibrosis bronchial epithelial cells.** *Cellular Signalling*, 24(5): 1093-1099. 2012

SANCHES, I. C.; CONTI, F. F.; SARTORI, M.; IRIGOYEN, M. C.; DE ANGELIS, K. **Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats.** *International Journal of Sports Medicine*, 35(04): 323-329 2014.

SANTOS, C. L.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J. R. **Efeitos da administração de dexametasona in vivo sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento.** *Bioscience Journal*, 23: 101-110. 2007.

SCHAKMAN, O.; GILSON, H.; DE CONINCK, V.; LAUSE, P.; VERNIERS, J.; HAVAUX, X.; KETELSLEGGERS, J. M.; THISSEN, J. P. **Insulin-like growth factor-i gene transfer by electroporation prevents skeletal muscle atrophy in glucocorticoid-treated rats.** *Endocrinology*, 146 (4):1789 -1797. 2005.

SCHAKMAN, O.; KALISTA, S.; BARBÉ, C.; LOUMAYE, A.; THISSEN, J. P. **Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Oct;45 (10):2163-72 2013.

SEVERINO, C.; BRIZZI, P.; SOLINAS, A.; SECCHI, G.; MAIOLI, M.; TONOLO, G. **Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance.** *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, Bethesda, MD, EUA, 283(2): E367-373. 2002.

SHIGUEMOTO, G. E.; PRESTES, J.; LEITE, R. D.; PEREIRA, G. B.; PONTES, C. L. S.; D'ÁVILA, F. V.; BOTERO, J. P.; BALDISSERA, V.; NONAKA, K. O.; ARAÚJO, H. S. S.; PEREZ, S. E. A. **Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats.** *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, Oct;22(5):607-17. 2012.

- SMITH, I. J.; ALAMDARI, N.; O'NEAL, P.; GONNELLA, P.; AVERSA, Z.; HASSELGREN, P-O. **Sepsis increases the expression and activity of the transcription factor Forkhead Box O 1 (FOXO1) in skeletal muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42, 701-71. 2010.
- SONG, I. H.; GOLD, R.; STRAUB, R.H.; BURMESTER, G.R.; BUTTGEREIT, F. **New glucocorticoids on the horizon: repress, don't activate!** *The Journal of Rheumatology*, 32 (7):1199-1207. Jul 2005.
- STITT, T. N.; DRUJAN, D.; CLARKE, B. A.; PANARO, F.; TIMOFEYVA, Y.; KLINE, W. O.; GONZALEZ, M.; YANCOPOULOS, G. D.; GLASS, D. J. **The igf-1/pi3k/akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors.** *Molecular Cell*, v. 14, 395-403. May 7, 2004.
- TINTIGNAC, L. A.; LAGIRAND, J.; BATONNET, S.; SIRRI, V.; LEBOVITCH, M. P.; LEBOVITCH, S. A. **Degradation of MyoD Mediated by the SCF (MAFbx) Ubiquitin Ligase.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 4, January 28, pp. 2847-2856, 2005.
- TULIPANO, G.; TAYLOR, J. E.; HALEM, H. A.; DATTA, R.; DONG, J. Z.; CULLER, M. D.; BIANCHI, I.; COCCHI, D.; GIUSTINA, A. **Glucocorticoid inhibition of growth in rats: partial reversal with the full-length ghrelin analog BIM-28125.** *Pituitary*, 10 (3):267-74. 2007.
- WANG, X.; HU, Z.; HU, J.; DU, J.; MITCH, W. E. **Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling.** *Endocrinology*, 147 (9):4160 - 4168. 2006.
- WRIGHT, A. P.; ZILLIACUS, J.; MCEWAN, I. J.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; ALMLÖF, T.; CARLSTEDT-DUKE, J.; GUSTAFSSON, J. A. **Structure and function of the glucocorticoid receptor.** *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 47(1-6):11-9. Dec 1993.
- WU, Y.; ZHAO, W.; ZHAO, J.; ZHANG, Y.; QIN, W.; PAN, J.; BAUMAN, W. A.; BLITZER, R. D.; CARDOZO, C. **REDD1 is a major target of testosterone action in preventing dexamethasone-induced muscle loss.** *Endocrinology*, 151: 1050 - 1059. 2010.
- YAMAMOTO, D.; MAKI, T.; HERNINGTYAS, E. H.; IKESHITA, N.; SHIBAHARA, H.; SUGIYAMA, Y.; NAKANISHI, S.; IIDA, K.; IGUCHI, G.; TAKAHASHI, Y.; KAJI, H.; CHIHARA, K.; OKIMURA, Y. **Branched-chain amino acids protect against dexamethasone-induced soleus muscle atrophy in rats.** *MUSCLE & NERVE*, June 2010.
- YANG, H.; WEI, W.; MENCONI, M.; HASSELGREN, P-O. **Dexamethasone-induced protein degradation in cultured myotubes is p300/HAT dependent.** *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292: R337-R344. 2007.
- ZANCHI, N. E.; FILHO, M. A. S.; LIRA, F. S.; ROSA, J. C.; YAMASHITA, A. S.; CARVALHO, C. R. O.; SEELAENDER, M.; LANCHAJR, A.H. **Chronic resistance training decreases MuRF-1 and Atrogin-1 gene expression but does not modify**

**Akt, GSK-3beta and p70S6K levels in rats.** *European journal of applied physiology*, Jun; 106(3):415-23. 2009.

ZHAO, W.; PAN, J.; ZHAO, Z.; WU, Y.; BAUMANNA, W.; CARDOZO, C. P.  
**Testosterone protects against dexamethasone-induced muscle atrophy, protein degradation and MAFbx upregulation.** *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 110: 125-129. 2008.

ZHONG, H.; ROY, R. R.; WOO, J.; KIM, J. A.; EDGERTON, V. R. **Differential modulation of myosin heavy chain phenotype in an inactive extensor and flexor muscle of adult rats.** *Journal of anatomy*, Jan; 210(1): 19-31, 2007.

## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO 1 - PARECER DO COMITE DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

### Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Papel do exercício resistido na atrofia muscular induzida por dexametasona"** sob responsabilidade do Pesquisador **SANDRA LIA DO AMARAL CARDOSO** e colaboração de André Luís de Oliveira Krug está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o protocolo **2012-02255**.

#### CERTIFICATE

We certify that the research **"The role of resistance training on muscle atrophy induced by dexamethasone"**, protocol number **2012-02255**, under responsibility of **SANDRA LIA DO AMARAL CARDOSO** and with collaboration of André Luís de Oliveira Krug agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

**Prof. Dr. Edilson Ervolino**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator