

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Expressão de Miostatina, ActRIIB, ALK 4 e Folistatina em músculo
esquelético e tecidos adiposos de ratos diabéticos submetidos ao
exercício de natação**

DANIELA BASSI DUTRA

SÃO CARLOS – SP

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Expressão de Miostatina, ActRIIB, ALK 4 e Folistatina em músculo
esquelético e tecidos adiposos de ratos diabéticos submetidos ao
exercício de natação**

DANIELA BASSI DUTRA

Orientadora: Prof^a Dr^a Ângela Merice de Oliveira Leal

**Dissertação de Mestrado
apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Fisioterapia da Universidade Federal
de São Carlos – PPG/UFSCar como
parte dos requisitos para obtenção
do Título de Mestre em Fisioterapia.**

SÃO CARLOS – SP

2011

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

D978em

Dutra, Daniela Bassi.

Expressão de miostatina, ActRIIB, ALK4 e folistatina em músculo esquelético e tecidos adiposos de ratos diabéticos submetidos ao exercício de natação / Daniela Bassi Dutra. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

47 f.

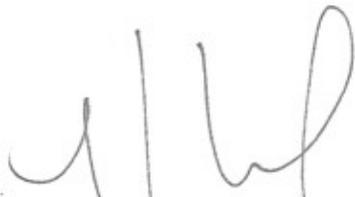
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Diabetes. 2. Miostatina. 3. ALK4. 4. Folistatina. 5. Exercício físico. I. Título.

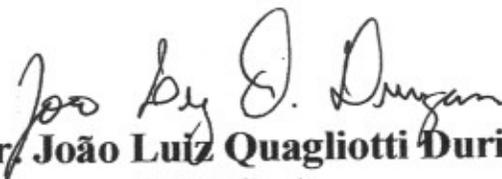
CDD: 616.462 (20ª)

Membros da banca examinadora para defesa de dissertação de mestrado de Daniela Bassi Dutra, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 11 de maio de 2011

Banca Examinadora:



**Prof.ª Dr.ª Angela Merice de Oliveira Leal
(UFSCar)**



**Prof. Dr. João Luiz Quagliotti Durigam
(UFSCar)**



**Prof.ª Dr.ª Marina Politi Okoshi
(UNESP-botucatu)**

Dedicatória

Dedico este trabalho...

Aos meus amados pais Audrei e Gilberto, que foram o alicerce para que um sonho se tornasse realidade... os quais não sabiam ao certo onde me levaria esse tal Mestrado, mas tinham a certeza que isso seria muito bom para o meu futuro...OBRIGADO!

Ao meu companheiro e marido, Glaucio, o qual muito me incentivou, me apoiou e principalmente teve muita paciência do princípio ao fim... OBRIGADO!

Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À Professora e orientadora **Ângela Merice de Oliveira Leal**, pela oportunidade, pela confiança, pelos ensinamentos e independência na pesquisa. Todos os momentos foram de grande aprendizado profissional e pessoal, os quais hoje me fazem forte e confiante no futuro. Uma etapa muito sonhada desde a graduação foi realizada: O Mestrado!*

OBRIGADO ÂNGELA!

*À Professora **Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo**, pela confiança e abertura que tive em seu laboratório, pela contribuição neste trabalho, pela paciência, pela amizade, pela vibração a cada resultado e o mais importante: Pelo ser humano que é! O mestrado não foi fácil!!! Mas com os amigos que ganhei nesse caminho... tornou-se até divertido...passaria por tudo novamente....Valeu muito à pena!*

OBRIGADO HELÔ!

*Ao Professor **Cássio Mascarenhas** o qual me guiou nos primeiros passos a pós-graduação, sempre me dando a maior força.*

OBRIGADO CÁSSIO!

*À Professora **Audrey Borghi e Silva** a qual me abriu as portas desse diferente Universo para que hoje eu pudesse estar aqui concluindo esta etapa tão importante em minha vida. Pela amizade e pela sinceridade que sempre despendeu e que foi tão importante.*

OBRIGADO AUDREY!

AGRADECIMENTOS

À Deus...

Muito obrigado Senhor por iluminar meu caminho e minha mente todos os dias! Por me dar forças e me encher de esperança diariamente!

Aos meus Pais...

Queridos Mestres da vida....pela compreensão quando aos sábados e domingos não podia participar do almoço em família pois as obrigações me chamavam

Ao meu bravo companheiro e marido

*Que meu deus força em todos os momentos de minha caminhada pessoal e profissional!
Que sempre me incentivou, acreditou em mim! Obrigado pela paciência, amor e companheirismo. Agradeço à Deus por colocar pessoa tão especial, sensível, esse espírito iluminado em minha vida!*

As minhas amigas e amigos

Thaís e Clayton Bevilacqua, Silvana e Júnior Victuri, Tatiana Guarino, Paula Bosi e Karyne Rios, pelo incentivo, amizade, compreensão e pelos momentos divertidos, descontraídos e muito necessários!

Aos amigos do NUPEF

Marlus, Viviane Castello, Rodrigo Polaquini, Luciana Di Thomazo, Soraia, pela amizade, pela troca de experiências, pelos conselhos e pela amizade!

As minhas novas amigas e amigos que vou levar para toda vida

Carol Martin, Carmen Lúcia, Rafaella Nascimento, Rita Marquetti, Silvia Naomi e Léo. Obrigado pessoal... não sei o que seria de mim sem vocês! Tenho que agradecer a Deus, pois esse Mestrado me trouxe muito mais do que eu esperava.... trouxe-me amigos, companheiros!

À Patrícia de Godoy Bueno

Descobri em você uma amiga e parceira que nas horas mais cruciais estava ali me ajudando sempre....Obrigado pela disposição, pela amizade e pelas risadas. Obrigado por me ensinar tanto no âmbito profissional como no pessoal

Ao meu amigo querido Charles

Pela amizade, paciência, pelos momentos de descontração na laje, pelos cafés, risadas pela grande ajuda neste trabalho, pela disposição pela amizade!

À FAPESP

Por ter acreditado e fomentado esta pesquisa. Sem ela a realização desse sonho não seria possível.

À Natalia Allenpach

Nossa super técnica de laboratório, obrigado pela paciência e pelos ensinamentos.

As amigas e colegas do laboratório de Bioquímica

Que sempre me ajudaram de uma forma ou de outra: Lívia, Cyntia, Patty, Araceli, Juliana Uema, Kelly Micocci, Verônica, Bete, Uliana, Fernanda Durte, Grazielle Deriggi.

Aos Professores Vilmar Baldissera e Sérgio Eduardo Perez

Por ceder o espaço para meu experimento,

Ao "Cacau"

Pela competente ajuda em meu experimento,

À Kelly

Secretária da Pós-graduação da Fisioterapia, por toda ajuda colaboração, galhos quebrados e cafezinhos tranquilizadores!

À Márcia Vidotti

Secretária da Fisiologia do Exercício pela amizade, pela confiança e pelas boas risadas

À Professora Marina Politi Okoshi e sua aluna Morango (Aline)

Da UNESP de Botucatu, as quais gentilmente me receberam e muito me ajudaram, mostrando uma luz no fim do caminho (blottings de miostatina)!

Ao Gabriel Delfino

Pela troca de experiências, pela disposição de sempre ajudar!

Às amigas de Ribeirão Preto

Valéria Papa, Débora, Thaís e Juliana pelo incentivo e pelas boas risadas!

Agradeço ainda aqueles que não acreditavam em mim, pois foram os que mais me impulsionaram para frente!!!

Ficaria aqui escrevendo por horas esses agradecimentos, uma vez que nesse caminho tive muitas pessoas perto e também de longe, me ajudando, torcendo de alguma forma contribuindo para que todo esse sonho e trabalho se tornassem realidade!

OBRIGADO A TODOS!!!!

*Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,
Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei*

Nada sei.

Renato Teixeira

RESUMO

Introdução: Miostatina (MSTN), é um membro da família TGF- β , é caracterizada como um regulador negativo da massa muscular e está presente em pequenas quantidades no tecido adiposo. Evidências sugerem sua participação no metabolismo energético. Folistatina (FS) é uma proteína que se liga a MSTN e inibe sua ação. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi determinar a influência do exercício na expressão da MSTN, seus receptores (ActRIIB e ALK4) e da FS no músculo (gastrocnêmio branco) e tecidos adiposos (gordura mesentérica, epididimal, subcutânea e tecido adiposo marrom – TAM) em ratos com diabetes induzido por STZ. **Material e métodos:** Animais controle e diabéticos eram randomicamente distribuídos no grupo natação (CE e DE) ou grupo sedentário (CS e DS). Os animais realizaram exercício por 4 semanas. O RNAm da MSTN, ActRIIB, ALK4 e FS foram quantificados por RT-PCR e expressão protéica por Western Blotting. Foi utilizado teste ANOVA *two-way (post-hoc* de Tukey). **Resultados:** A concentração glicêmica no sangue do DE foi menor quando comparado ao DS. A expressão de MSTN e FS aumentaram no DS comparado ao CS no músculo e na gordura subcutânea. A expressão do ActRIIB aumentou no DS comparado ao CS no músculo, gordura mesentérica e TAM. A expressão de ALK4 aumentou no DS comparado com CS somente no TAM. A expressão protéica da MSTN aumentou no músculo do DS comparado ao CS. A expressão do pró-peptídeo da MSTN aumentou no DS comparado ao CS na gordura mesentérica e TAM. Após o treinamento de natação a expressão da MSTN e ActRIIB foram menores no CE comparado ao CS no TAM. A expressão da MSTN aumentou na gordura mesentérica e a expressão da FS diminuiu no músculo, gordura mesentérica e subcutânea e TAM nos animais DE quando comparados ao DS. A expressão de ALK4 foi menor no TAM quando comparado DE com DS. A expressão do LAP da MSTN diminuiu no músculo e na gordura mesentérica do DE comparado ao DS. **Conclusão:** Os resultados indicam que as expressões da MSTN, de seus receptores e da FS mudaram tanto no músculo quanto no tecido adiposo de ratos diabéticos e que essa expressão pode ser modulada pelo exercício no *Diabetes Mellitus*.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus*, miostatina, receptores de miostatina, folistatina, exercício

ABSTRACT

Introduction: Myostatin (MSTN), a member of TGF- β family, is characterized as a negative regulator of muscle mass and is present in small quantities in adipose tissue. Accumulating evidences suggest its participation in energetic metabolism. Follistatin (FS) is a non-related protein which inhibits MSTN action. **Objective:** The objective of this study was to determine the influence of exercise in the expression of MSTN, its receptors (ActRIIB and ALK4), and FS in muscle (white gastrocnemius) and fat (epididymal, mesenteric, subcutaneous and brown adipose tissue – BAT) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Material and Methods:** Control and diabetic animals were randomly assigned to a swimming training group (EC and ED) or a sedentary group (SC and SD). Exercising animals swam for 4 weeks. MSTN, ActRIIB, ALK4 and FS mRNA was quantified by real time RT-PCR and protein expression by Western blotting. **Results:** Blood glucose was significantly lower in ED than in SD. MSTN and FS mRNA expression increased in SD compared to SC in muscle and subcutaneous fat. The expression of ActRIIB mRNA increased in SD compared to SC in muscle, mesenteric fat and BAT. Expression of ALK4 mRNA increased in SD compared to SC only in BAT. The protein expression of MSTN increased in muscle of the DS when compared to CS. The expression of N-terminal propeptide from the MSTN increased in DS compared to CS in mesenteric fat and TAM. After training, MSTN and ActRIIB were lower in EC compared to SC in BAT. MSTN increased in mesenteric fat and FS mRNA expression decreased in muscle, mesenteric, subcutaneous fat and BAT in ED when compared with SD. ALK4 mRNA expression was lower in BAT when compared to ED with SD. The expression of LAP of MSTN decreased in muscle and mesenteric fat of DE compared to DS. **Conclusion:** The results indicate that MSTN, its receptors and FS expression changes in both muscle and adipose tissues in diabetic rats and that their expression can be modulated by exercise in Diabetes Mellitus.

Key-words: *Diabetes mellitus*, myostatin, receptors of myostatin, follistatin, exercise

Lista de Abreviaturas

μg	micrograma
μL	microlitros
MSTN	Miostatina
ActRIIB	Receptor de Activina IIb
GAPDH	gliceraldeído fosfato desidrogenase
DNA	ácido desoxirribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
DM	Diabetes Mellitus
IR	Receptor de Insulina
IRS	Substrato de Receptor de Insulina
PI-3- Kinase	Fosfatidilinositol 3 quinase
Akt	quinase serina/treonina
GLUT	Transportador de glicose
AGL	ácidos graxos livres
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - α
KDa	Kilodaltons

1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes Mellitus* (DM) é uma doença crônica com alta morbi-mortalidade e elevado custo social. Segundo a *International Diabetes Federation* (IDF), a doença atinge hoje mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo e custou à economia global US\$ 376 bilhões em 2010 ou 11,6% da despesa mundial com saúde. A IDF (2010) prevê que até 2030 um total de 438 milhões de pessoas desenvolvam DM, com custos projetados podendo ultrapassar US\$490 bilhões.

A Organização Mundial de Saúde (Alberti e Zimmet, 1999) e a *American Diabetes Association* (ADA, 2009) classificam o DM nas principais formas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM 2), DM gestacional e outros tipos específicos de DM.

O DM caracteriza-se como um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos apresentando em comum a hiperglicemia, que resulta de defeitos na ação da insulina, secreção da insulina ou de ambos (SBD, 2009).

A insulina é o mais potente hormônio anabólico conhecido, sendo produzida pelas células β pancreáticas nas Ilhotas de Langerhans, e tendo a sua secreção estimulada pela glicose, arginina, gliceraldeído e leucina. No músculo, tecido adiposo e fígado, a captação de glicose é regulada pela ação da insulina. Ela promove o estoque de substratos (lipogênese, glicogênese e síntese protéica) e inibe a lipólise, glicogenólise e quebra de proteína (Saltiel e Kahn, 2001) além de estimular o crescimento e diferenciação celulares (Kahn, 2005).

A ação da insulina se inicia pela sua ligação aos seus receptores (IR), que pertencem à família das tirosinas quinases. Os IRs são proteínas tetraméricas constituídas por duas subunidades α (que se situam no lado externo da membrana) e duas subunidades β (que penetram na membrana e projetam-se no citoplasma celular). Funcionalmente, o receptor de insulina se comporta como uma enzima alostérica, em que a subunidade α inibe a atividade intrínseca da tirosina quinase da subunidade β (Saltiel e Kahn, 2001). A ligação da insulina à subunidade α leva à ativação da subunidade β causando mudança conformacional e aumento da atividade do domínio quinase. Logo após, ocorre a fosforilação de proteínas que são substrato do receptor de insulina (IRS). Já foram encontrados nove tipos de IRS, sendo IRS-3 a mais abundante no tecido adiposo e IRS-4 no músculo esquelético, fibroblastos, fígado, coração, hipotálamo e rim. Após a fosforilação das IRS, ocorre a ativação da fosfatidilinositol 3 quinase (PI-3-Kinase) que posteriormente ativa a quinase serina/treonina (Akt). A Akt desempenha um importante papel na ativação das vias metabólicas da insulina para a

translocação do transportador de glicose (GLUT) para a membrana celular (Furukawa *et al.*, 1995; Katsanos, 2004; Kahn, 2005).

O metabolismo energético tem como principais cenários, o músculo, o tecido adiposo e o fígado. Esses cenários se revezam e se comunicam entre si através de diversos mensageiros hormonais ou não para manutenção da homeostase.

O músculo esquelético representa um dos tecidos mais importantes na manutenção da homeostase de glicose, pois responde por 80% da captação da glicose estimulada pela insulina (Baron *et al.*, 1988). Em ambos os tipos de DM (DM 1 e 2) ocorre à perda de massa muscular esquelética, devido à quebra acentuada de proteínas miofibrilares por meio do aumento da atividade da via ubiquitina-proteassoma, bem como a depressão de síntese protéica (Anthony *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Russell *et al.*, 2009; Wieteska-Skrzeczynska *et al.*, 2009).

Já o tecido adiposo que se acreditava ser um depósito de armazenamento de energia relativamente inerte (Gil-Campos, Canete e Gil, 2004), revelou-se um órgão endócrino altamente dinâmico que modula o metabolismo energético pela liberação de ácidos graxos livres (AGL), glicerol, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e hormônios, incluindo a leptina e a adiponectina.

Os diferentes tecidos adiposos possuem comportamentos metabólicos distintos. Os depósitos de gordura visceral contribuem para o aumento AGL e citocinas pró-inflamatórias. A gordura visceral é mais sensível às ações lipolíticas das catecolaminas e menos sensível à ação antilipolítica da insulina. O aumento da lipólise na gordura visceral aumenta as concentrações de AGL que seguem pela veia porta para o fígado, causando resistência à insulina e levando ao aumento da produção hepática de glicose (Despres e Lemieux, 2006).

O tecido adiposo marrom (TAM) tem função distinta do tecido adiposo branco, sendo responsável pela termogênese. O TAM é rico em mitocôndrias, sendo a termogênese mediada pela expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) na membrana mitocondrial interna, que dissipa o gradiente de prótons, que é produzido pela cadeia transportadora de elétrons. A UCP1 é exclusiva do TAM. O produto final da metabolização de ácidos graxos é a produção de calor. O TAM pode causar modificações na massa corporal, porque participa do controle de gasto energético e afeta o metabolismo, aumentando a sensibilidade à insulina (Yoshioka, Yoshida e Kondo, 1992; Cinti, 2006). Entretanto, durante ativação induzida pelo frio, apenas 10% do metabolismo de TAM é derivado da captação de glicose (Virtanen *et al.*, 2009).

Estudos mais recentes mostram que o TAM também está presente no humano adulto, assim como em roedores e crianças, e é ativado pelo frio. Além disso, a quantidade de TAM é inversamente proporcional ao índice de massa corporal (IMC), ou seja, é menor em

indivíduos com sobrepeso e obesidade, especialmente em idosos, sugerindo possível papel desse tecido contra a obesidade e diabetes (Cypess *et al.*, 2009; Van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009; Cypess e Kahn, 2010).

O transporte de glicose no músculo esquelético pode ser ativado por, pelo menos, duas vias diferentes. Uma por ação da insulina e outra ativada pela hipóxia e/ou contração/exercício. A captação de glicose independente de insulina envolve a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato cíclico (AMP-K), que funciona como um metabólito na fosforilação de proteínas importantes em diversas vias metabólicas incluindo transporte de glicose, metabolismo de lipídeo hepático, lipólise do adipócito, oxidação de ácidos graxos e glicose no músculo (Krook, Wallberg-Henriksson e Zierath, 2004; Dulloo, 2005; Kramer e Goodyear, 2007).

O exercício físico é recomendado na prevenção do DM tipo 2 bem como no plano terapêutico do DM tipo 1 e tipo 2 (Lehti *et al.*, 2006). Sabe-se que o exercício de *endurance* ou aeróbico é essencial para o tratamento do DM, pois ajuda a regular a glicose sanguínea e diminui o risco a longo prazo de complicações cardiovasculares (SBD, 2009). Após o exercício, ocorre aumento da expressão e/ou atividade de proteínas das vias de sinalização de insulina, envolvidas no metabolismo de glicose. O aumento da captação de glicose pós-exercício está relacionado ao aumento da expressão de IRS e PI-3-Kinase, aumentando a sinalização da insulina (Hawley e Houmard, 2004).

Ambos os exercícios aeróbicos, em curto prazo e crônico, também aumentam a síntese de glicogênio e glicólise, atividade da hexoquinase e atividade do glicogênio sintetase (Kim *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2000; Kretschmer *et al.*, 2005). Em ratos diabéticos, o exercício também exerce efeito protetor, aumentando a sensibilidade à insulina e promovendo a manutenção das células β (Kiralý *et al.*, 2007; Leme *et al.*, 2007). Adicionalmente, foi demonstrada que a diminuição do conteúdo de glicogênio no fígado de ratos diabéticos pode ser aumentada pelo exercício aeróbico por adaptações crônicas no fígado permitindo que ratos diabéticos restaurem seus estoques hepáticos de glicogênio (Leme *et al.*, 2007).

A miostatina (MSTN) ou GDF-8 (Fator de Diferenciação e Crescimento 8) pertence à superfamília do TGF- β (Fatores β de transformação e crescimento). A família dos TGF- β é composta por mais de 35 membros peptídicos, que incluem as activinas, proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) e fatores de transformação do crescimento (TGFs). Esses fatores exercem ação regulatória sobre processos celulares fundamentais como crescimento e diferenciação, motilidade, adesão, reparo e morte,

e desempenham, portanto papel importante sobre o desenvolvimento e a homeostase tecidual (Massague, 1998).

A MSTN é uma proteína sintetizada em uma forma precursora composta por 375 aminoácidos, essencialmente no músculo esquelético. Após sofrer dois processamentos proteolíticos gera um N-terminal chamado de Peptídeo Associado à Latência (LAP), com peso molecular de 40 KDa e uma fração C-terminal que é denominada de MSTN madura com 26 KDa, sua parte biologicamente ativa (Mcmahon *et al.*, 2003; Mcfarlane *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de camundongos transgênicos deficientes na expressão de MSTN revelou que essa proteína funciona como regulador negativo do crescimento do músculo esquelético. Esses animais transgênicos apresentam aumento da massa muscular esquelética, resultante da combinação de hipertrofia e hiperplasia celulares (Mcpheeron, Lawler e Lee, 1997). Enquanto no tecido adiposo, a MSTN promove a diminuição adipogênese e o acúmulo de gordura (Lin *et al.*, 2002; Mcpheeron e Lee, 2002). Essas ações, no músculo e no tecido adiposo, têm motivado a busca de mecanismos de supressão da ação da MSTN visando aumento de massa muscular e diminuição de tecido adiposo.

A MSTN assemelha-se estruturalmente às activinas e a sua cascata de sinalização é semelhante a das activinas e TGF- β (Mcpheeron e Lee, 1997). Ela se liga aos receptores tipo II, principalmente IIB, e tipo I, principalmente ALK 4 e ativa as Smads 2 e 3, que são sinalizadores intracelulares (Lee *et al.*, 2005). Suas ações biológicas são neutralizadas pela folistatina (FS), pela FLRG (*follistatin-related gene family*) e por seu próprio pró-peptídeo (Hill *et al.*, 2002).

O papel desempenhado pela MSTN na regulação do aumento da massa muscular tem sido ativamente estudado, as implicações metabólicas de suas ações no músculo não estão definidas. Do mesmo modo, embora a MSTN seja expressa no tecido adiposo em menor quantidade do que no músculo, os resultados produzidos até agora sugerem ações fisiológicas e metabólicas também neste tecido (Lin *et al.*, 2002; Mcpheeron e Lee, 2002; Feldman *et al.*, 2006), despertando grande interesse terapêutico e comercial (Tsuchida, 2004; Matsakas e Diel, 2005).

Embora, não tenha sido demonstrada alteração da expressão da MSTN no músculo de modelos animais de deprivação de insulina (Barazzoni *et al.*, 2004), a mutação do gene da miostatina em camundongos que são modelos genéticos de obesidade e diabetes, agouti Ay e Lep ob/ob, levou à supressão parcial do acúmulo de gordura e da hiperglicemia, que são características desses animais (Mcpheeron e Lee, 2002). Em outra estratégia de também suprimir a ação da MSTN foram gerados camundongos com expressão elevada do pró-

peptídeo da MSTN, que é capaz de inibi-la (Zhao, Wall e Yang, 2005). Esses animais apresentaram além do aumento da massa muscular, manutenção da sensibilidade à insulina e normoglicemia, mesmo quando submetidos à dieta rica em gorduras, o que em animais normais levou à resistência insulínica. Por outro lado, o aumento da produção endógena de miostatina em camundongos adultos levou ao desenvolvimento de caquexia (Zimmers *et al.*, 2002). No homem, a concentração sérica e muscular de MSTN em pacientes com perda muscular na síndrome de imunodeficiência adquirida se eleva (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998) e a expressão de MSTN no músculo de indivíduos obesos diminui após redução de peso (Park *et al.*, 2006).

Chen e colaboradores (2010) sugerem que a MSTN pode potencialmente atuar como uma miocina, derivada do músculo, regulando diretamente o metabolismo energético por promover glicólise e captação de glicose, bem como diminuição no conteúdo de glicogênio em miotubos de células C₂C₁₂.

Em conjunto, os resultados sugerem a existência de função regulatória da MSTN sobre o metabolismo energético, no músculo e no tecido adiposo, e um possível papel benéfico da supressão da MSTN em doenças metabólicas, demonstrado tanto no homem como em animais experimentais (Gonzalez-Cadavid e Bhasin, 2004; Milan *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006; Lehti *et al.*, 2007).

Os relatos sobre as ações da MSTN no tecido adiposo são ainda muito contraditórios. Estudos *in vitro* mostram que em adipócitos maduros, a MSTN causa adipogênese, porém em pré – adipócitos ela inibe a adipogênese. Já em estudos *in vivo*, a inibição da MSTN no músculo causa diminuição do tecido adiposo, porém sua superexpressão no tecido adiposo resulta em pequenos adipócitos imaturos, com maior gasto energético e resistência à obesidade dietética e genética (Artaza *et al.*, 2005; Feldman *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2009).

O receptor de MSTN tipo IIB, ActRIIB, é expresso no tecido adiposo, onde a MSTN mostrou ser capaz de atuar na via de sinalização que envolve a fosforilação das Smads. Mesmo considerando-se a baixa expressão de MSTN no tecido adiposo quando comparada ao músculo, como a MSTN está presente na circulação, a sua ação poder-se-ia dar por via endócrina. Entretanto, injeções sistêmicas de MSTN não causaram efeitos diretos no tecido adiposo, apesar de ter ocorrido diminuição da massa muscular (Milan *et al.*, 2004; Stolz *et al.*, 2008).

A expressão da MSTN, em resposta ao exercício, tem sido estudada no homem e em modelos animais. Estes estudos têm demonstrado diminuição da expressão desta proteína e de seu receptor em resposta a exercícios de resistência de longa e curta duração (Matsakas e

Diel, 2005; Matsakas *et al.*, 2005; Heinemeier *et al.*, 2007; Hulmi *et al.*, 2007), o que pode indicar a importância da MSTN na hipertrofia muscular induzida pelo exercício. Em recente publicação, Lehti e colaboradores (2007), mostraram diminuição da expressão da MSTN no músculo de camundongos diabéticos e sua atenuação com exercício.

Modelos animais têm um longo caminho na história da pesquisa do DM. O uso da estreptozotocina (STZ) como indutora do DM é ampla. A STZ trata-se de um agente antibacteriano que também apresenta atividade anti-tumoral em sistemas *in vitro* e *in vivo* (Herr, Jahnke e Argoudelis, 1967) e diabetogênica (Rakieten, Rakieten e Nadkarni, 1963). A droga se acumula seletivamente nas células beta pancreáticas levando a uma toxicidade e morte dessas células (Lenzen, 2008). STZ age nas células β pancreáticas via transportador de glicose – GLUT 2. Estudos mostraram que a STZ restringe a expressão do GLUT 2 *in vivo* e *in vitro* quando administrada em múltiplas doses (Wang e Gleichmann, 1995). Porém há muita controvérsia sobre a quantidade aplicada *versus* tipo do DM desenvolvido (Barazzoni *et al.*, 2004; Lehti *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010). Em recente publicação, Lehti e colaboradores (2007), mostraram diminuição da expressão da MSTN no músculo de camundongos diabéticos e sua atenuação com exercício.

2. OBJETIVO

Investigar a participação da MSTN, de seus receptores (ActRIIB e ALK 4) e da FS no DM, no repouso e no exercício físico, pela quantificação de sua expressão no músculo esquelético e tecidos adiposos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Condições Experimentais

Ratos *Wistar*, adultos, pesando $156,75 \pm 3,68$ g (média \pm erro padrão da média) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e utilizados para a realização dos experimentos. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício, do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), sob condições constantes de temperatura (22°C), umidade e iluminação (8-18h: claro; 18-8h: escuro) e com oferta de água e dieta PRIMOR (São Paulo, Brasil) *ad libitum*. Todos os animais permaneceram durante uma semana em condições de aclimação com dieta padrão *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Protocolo n. 035/2007).

3.2 Indução do DM

Após período de aclimação, os animais foram divididos em 2 grupos:

- 1) Grupo controle (n = 25) - GC: animais receberam injeção de citrato de sódio (veículo).
- 2) Grupo diabético (n = 25) - GD: animais receberam injeção de estreptozotocina.

A aplicação intraperitoneal de 60mg/kg Estreptozotocina (*STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*).

Doze animais foram excluídos por não atingirem níveis glicêmicos considerados compatíveis com indução de DM (glicemia > 250 mg/dL).

3.3 Controle de Ingestão Alimentar e Massa Corporal

A ingestão alimentar e a massa corporal foram mensuradas diariamente durante todo o período experimental. A massa corporal e a ração foram aferidas com balança eletrônica (Bioprecisa, Minas Gerais, Brasil).

3.4 Controle Glicêmico

Durante a semana que foi realizada a indução do DM, a concentração glicêmica foi monitorada diariamente e durante as semanas de treinamento, a determinação da concentração glicêmica foi realizada três vezes por semana, duas vezes ao dia, 7H. às 8H. (pré-treino) e 18H. às 19H. (pós-treino). A confirmação da indução da DM se dava por glicemia > 250 mg/dL (Sanchez *et al.*, 2005). A concentração glicêmica foi determinada por glicosímetro portátil (*Accu-Chek Active®*, *AM Roche Diagnostics, EUA*), em amostras de sangue coletadas da cauda dos animais. Os animais recebiam injeções de insulina (*Lantus®*, 1U, *Sanofi Aventis, Alemanha*) em dias alternados e no final do período claro.

3.5 Exercício Físico

No sexto dia, após a indução do DM, os animais dos grupos controles e diabéticos foram subdivididos nos seguintes grupos:

- 1) Grupo Controle Sedentário (n=8) - CS: os animais permaneciam sedentários;
- 2) Grupo Controle Exercício (n=8) - CE: os animais exercitavam-se durante 4 semanas;
- 3) Grupo Diabético Sedentário (n=11) - DS: os animais permaneciam sedentários;
- 4) Grupo Diabético Exercício (n=11) - DE: os animais exercitavam-se durante 4 semanas.

3.5.1 Programa de Exercício Físico

Os animais do grupo exercício foram submetidos a exercício na modalidade natação, em 2 sessões diárias de 45 minutos, às 9H. e 17H., com frequência de 5 vezes por semana, durante 4 semanas (Matsakas *et al.*, 2006). O exercício era realizado em tanques individuais (50 cm de altura x 30 cm de diâmetro) com água em temperatura controlada (34°C) e com sobrecarga atada à cauda para garantir que o animal não flutuasse e se mantivesse em atividade durante toda a sessão (Matsakas *et al.*, 2006). Essa sobrecarga teve um acréscimo de 1% a cada semana até atingir 5% da massa corporal, permanecendo assim até o final da quarta semana (Matsakas e Diel, 2005; Matsakas *et al.*, 2006; Leme *et al.*, 2007; Sene-Fiorese *et al.*, 2008).

Para adaptação dos animais ao exercício, nos primeiro e segundo dias, a natação foi realizada sem adição de carga na cauda, por duração de 1h (2 x 30 min.), e no terceiro dia o exercício foi realizado com duração de 90 minutos (2 x 45 min.) sem adição de carga.

Durante o período de exercício, os grupos sedentários permaneciam durante 5 minutos em tanques, iguais ao do grupo exercício, com água rasa (5 cm) na mesma temperatura, simulando o estresse de exposição à água (Matsakas *et al.*, 2005; Matsakas *et al.*, 2006; Kiraly *et al.*, 2007).

3.6 Coleta de sangue truncanl e de tecidos

No dia seguinte à última sessão de treinamento, os animais foram decapitados. O sangue truncanl e os tecidos adiposos brancos (epididimal, subcutânea e mesentérico), tecido adiposo marrom (TAM) e músculo gastrocnêmio branco foram dissecados, pesados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80° C para posterior análise.

3.7 Quantificação da expressão de MSTN, ActRIIB, ALK 4 e FS

A quantificação da expressão do RNA mensageiro de MSTN, ActRIIB, ALK 4 e FS foram realizadas por PCR-RT. Esta análise foi realizada no Laboratório de Bioquímica E Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar.

3.7.1 Extração de RNA total

No dia da extração, 100mg de tecido foi homogenizado (*Homogenizador Power Gen – Fisher Scientific 1000*) em TRIzol® (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA*) (1ml) segundo os seguintes protocolos:

- **Músculo**

Após homogenização, adicionava-se 200 µL de clorofórmio e as amostras foram agitadas manualmente durante 15 segundos. A seguir as amostras permaneciam em temperatura ambiente (15 – 30° C) por 2,5 minutos. Centrifugavam-se (*Eppendorf 5804R*) as amostras por 15 minutos, a 12000 rpm, a 4° C. Seguindo a centrifugação transferia-se o sobrenadante para um microtubo limpo. Eram adicionados 500 µL de isopropanol e a amostra era agitada por inversão manual, permanecendo por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 12000 rpm (4° C) e ao sobrenadante era acrescentado 1 mL de etanol 75%. Após nova centrifugação, por 5 minutos a 7500 rpm (4° C), o *sedimento* restante permanecia à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após esse

tempo, acrescentava-se 30 μL de água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) 0,1%. As amostras eram então congeladas e armazenadas a -80°C para posterior análise.

- Tecido adiposo

Após homogenização as amostras permaneciam por 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionava-se 200 μL de clorofórmio às amostras e agitava-se manualmente durante 15 segundos. Logo após, as amostras permaneciam em temperatura ambiente por 15 minutos. As próximas etapas foram semelhantes às aquelas descritas em relação ao músculo. Porém, após a diluição do *sedimento*, as amostras eram incubadas à 60°C , em banho seco, por 15 minutos.

3.7.2 Quantificação do RNA total

As amostras de RNA total eram diluídas 20 vezes em água tratada com DEPC e eram feitas as leituras em espectrofotômetro (*Eppendorf*) para determinação das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Era utilizada a seguinte fórmula para determinar a concentração de RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$): concentração $\mu\text{g}/\mu\text{L} = (A_{260} \times 40 \times \text{diluição da amostra}) \times 1000^{-1}$.

O grau de pureza do RNA foi determinado pela razão A_{260}/A_{280} , considerando-se adequados os valores entre 1,8 e 2,0.

3.7.3 Determinação da integridade do RNA

A integridade do RNA foi confirmada pela visualização, em luz ultravioleta, do padrão de eletroforese das bandas 28S, 18S e 5S do RNA ribossomal, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Figura 1).

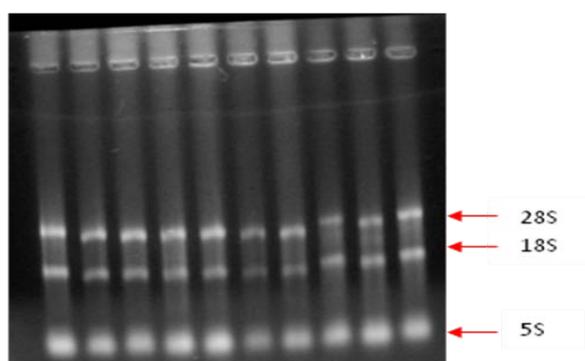


Figura 1: Exemplo do perfil eletroforético de um gel de agarose com amostras de TAM (1%) corado com brometo de etídio indicando a integridade do RNA totais, por meio da visualização das bandas ribossomais 28S, 18S e 5S

3.7.4 Transcrição Reversa

Inicialmente, as amostras de RNA total eram tratadas com DNase – Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia*). Ao RNA total (1 µg), adicionava-se solução tampão (1 µL, 10X DNase I Reaction Buffer), enzima (1 µL DNase I, Amp Grade) e quantidade suficiente para (QSP) 10 µL com água tratada com DEPC. A amostra era incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Logo após, adicionava-se ácido etilendiamino tetra acético (EDTA – 1 µL) e a amostra permanecia em banho seco a 65° C por 10 minutos.

Logo após o tratamento com DNase, adicionava-se 0,5 µL do *primer* Oligo (dT) 15 (*Promega Corporation, Madison, WI USA*) e a amostra permanecia em banho seco a 70° C por 5 minutos.

A seguir, adicionavam-se:

- 2,5 µL de M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) 5x tampão de reação (*Promega Corporation, Madison, WI, USA*)
- 0,625 µL dATP 10 mM
- 0,625 µL dCTP 10 mM
- 0,625 µL dGTP 10 mM
- 0,625 µL dTTP 10 mM
- 0,5 µL M-MLV RT (*transcriptase reverse*)

As amostras eram então incubadas por 60 minutos a 37°C e estocadas a -20° C.

3.7.5 Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real (PCR-RT)

Eram utilizados os seguintes reagentes para cada amostra de cDNA (40ng/µL), em duplicata.

- 10,5 µL de água DEPC
 - 1,25 µL *primer* senso
 - 1,25 µL *primer* antisenso
 - 0,5 µL de cDNA
 - 12,5 µL qPCR - SYBR® Green Rox Plus (*LGC Biotechnology*)
-

As amostras eram processadas no Termociclador *Rotor- Gene, R 3000 (Robertt Research)* e os ciclos consistiam de 95° C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 94° C – 15 segundos; Tm 53°C à 64° C – 30 segundos; 72° C – 60 segundos.

A seqüência de nucleotídeos utilizados e a Tm de cada gene (Debieve *et al.*, 2006; Garma *et al.*, 2007) estão apresentados na Tabela 1.

As temperaturas de anelamento (Tm) dos *primers* foram previamente padronizadas (Tabela 1) e os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de MELT (Figura 2).

Tabela 1. Seqüência de nucleotídeos dos *primers* utilizados.

Gene		Seqüência de Nucleotídeos dos <i>primers</i>	Tm
MSTN	Senso	5'CAA ACA GCC TGA ATC CAA CTT AG3'	60°C
	Antisenso	5'CCG TGA GGG GGT AGC GAC AG3'	60°C
ActRIIB	Senso	5'GAT GCT GGT GCT GAG TAT GTC G3'	64°C
	Antisenso	5'GTG GTG CAG GAT GCA TTG CTG A3'	64°C
ALK 4	Senso	5'CAC TGA CAC CAT AGA CAT TGC T3'	54°C
	Antisenso	5'GGC AGA GGA ACA GCT TAA ATC3'	54°C
FS	Senso	5'GGC GTA CTG CTT GAA GTG AA3'	53°C
	Antisenso	5'GGG AAG CTG TAG TCC TGG TC3'	53°C
GAPDH	Senso	5'GAT GCT GGT GCT GAG TAT GTC G3'	60°C
	Antisenso	5'GTG GTG CAG GAT GCA TTG CTG A3'	60°C

MSTN: miostatina, ActRIIB: receptor de miostatina tipo II, ALK 4: receptor de miostatina tipo I, FS: folistatina, GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Tm: temperatura de anelamento.

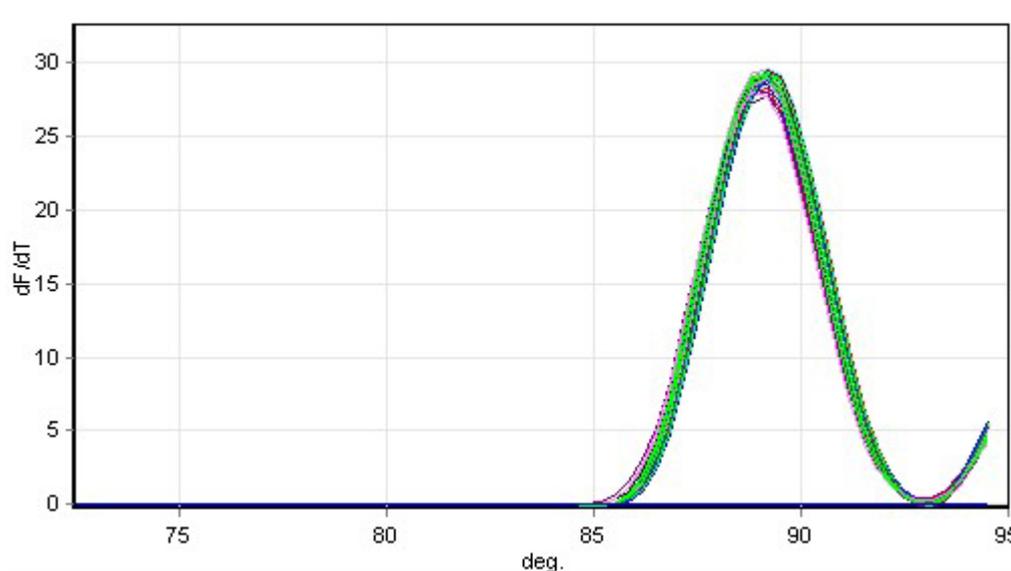


Figura 2. Exemplo de Curva de MELT Original Representativa dos ciclos do PCR-RT dos genes Miostatina e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase no músculo gastrocnêmio branco. dF/dT: derivada da fluorescência pela derivada da temperatura, deg: temperatura

Os valores de Ct (*Threshold cycle*) e as curvas de MELT foram fornecidos pelo *Software* Rotor Gene – 6. O Ct é o ponto onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com o menor número de ciclos durante a fase exponencial da amplificação (Figura 3).

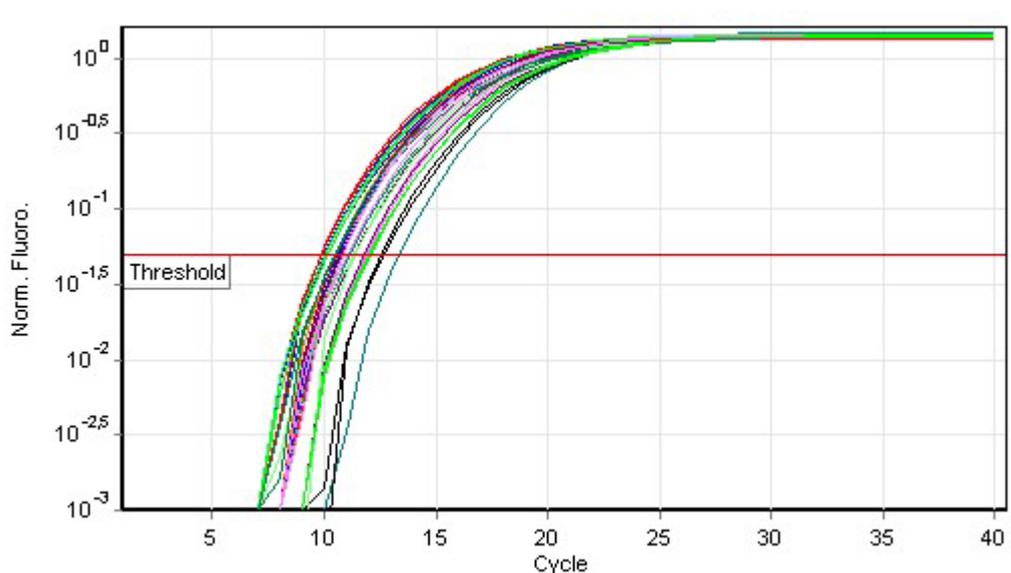


Figura 3: Exemplo de Curva de Amplificação Original Representativa dos ciclos do PCR-RT do gene GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) no músculo gastrocnêmio branco. Norm. Fluoro.: fluorescência normalizada, Cycle: ciclos

O nível de expressão comparativa de cada condição foi calculado pelo método de $\Delta\Delta Ct$. Depois de calculado a média dos Ct de cada gene (GAPDH, MSTN, ActRIIB, ALK 4 e FS) foi realizado:

- ΔCt (delta Ct) = Ct MSTN – Ct GAPDH; Ct ActRIIB - Ct GAPDH; Ct ALK 4 – Ct GAPDH e Ct FS – Ct GAPDH seguindo:
- Cálculo da média S: Média do ΔCt , seguindo:
- $\Delta\Delta CT$ (delta CT): ΔCT - média S

Os $\Delta\Delta CT$ dos grupos controle sedentário, controle exercício e diabético sedentário e diabético exercício, foram calculados em relação ao grupo controle sedentário. O valor em UA (unidades arbitrárias) da expressão da MSTN, ActRIIB, ALK 4 e FS foram calculados por $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Com os valores em UA foram utilizados testes estatísticos.

3.8 Análise da expressão protéica da MSTN por *Western blotting*

Análise da expressão protéica da MSTN no músculo gastrocnêmio, tecido adiposo mesentérico e TAM foi realizada por *Western blotting* de acordo com método previamente descrito por Costelli (2008).

3.8.1 Extração e determinação da concentração de proteínas totais

A quantidade de músculo e tecidos adiposos homogenizados foi 50 mg (*Homogenizador Power Gen – Fisher Scientific 1000*). As proteínas foram extraídas usando tampão Tris-Triton buffer (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0.2 nM PMSF). Após centrifugação de 20 minutos em 13.000 rpm, a proteína contida no sobrenadante foi quantificada pelo método colorimétrico BCA (*BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA*).

3.8.2 Eletroforese e transferência de proteínas totais

O total de 600 μ g de proteína foi acrescido de tampão *Laemmli 2x* (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*), aquecido a 100°C por 5 minutos e colocado no gel para eletroforese. As amostras selecionadas para análise em determinado gel deveriam provir de diferentes grupos experimentais.

As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 12% sob condições denaturantes por aproximadamente 2 horas com voltagem entre 50 e 120 volts. Após essa separação as proteínas foram transferidas por meio de sistema de imersão total, para uma

membrana de nitrocelulose (*BioRad, Hercules, CA, EUA*) por aproximadamente 1 hora com miliamperagem constante em 350 mA. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por duas horas a 4° com uma solução de 1,0g de leite em pó desnatado acrescida de 20 ml de uma solução TBST (Tris-Buffered Saline Tween 20 - Tris (6,05mM), NaCl (8,76mM) com pH 8,0 e Tween 20 (0,05%)). O gel foi corado com *Coomassie Blue* para confirmar a ótima transferência. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com a solução TBST por três vezes de 10 minutos e então incubada overnight (de 16 a 18 horas) a 4° em anticorpo específico, como o antimiosstatina (GDF-8 N-19-R sc-6885-R, *Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA*). Concentrações de proteína foram normalizadas por meio da Actina (I-19 – sc 1616, *Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA*) O anticorpo primário encontrava-se numa diluição com TBST de 1:200. A membrana foi lavada novamente e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (sc 2004 - *Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA*), diluído com TBST 1:1000.

3.8.3 Detecção e quantificação das bandas

A membrana foi banhada com ECL Plus *Western Blotting* Detection Reagents (*GE Healthcare Chalfont St. Giles, UK*) por 5 minutos. No cassete de exposição era colocada a membrana e sob ela o filme radiográfico, a exposição era feita por 10 minutos.

Após a revelação, a aquisição da imagem foi realizada pelo software LabScan 5.0 (*GE Healthcare Chalfont St. Giles, UK*) e a intensidade das bandas quantificadas (em unidades arbitrárias) com auxílio do software GeneTools v3.06 software (*Syngene, Cambridge, UK*).

3.9 Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizado o programa Statistica® 7. Inicialmente foi testada a distribuição normal dos dados (Kolmogorov-Smirnov e Levene). A análise estatística foi feita por análise de variância ANOVA *two-way* (DM e exercício) com *post-hoc* de Tukey. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado considera $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Ingestão Alimentar e Massa Corporal

A ingestão alimentar foi significativamente maior nos animais diabéticos (DS) a partir da segunda semana de treinamento, comparado com CS (Figura 4).

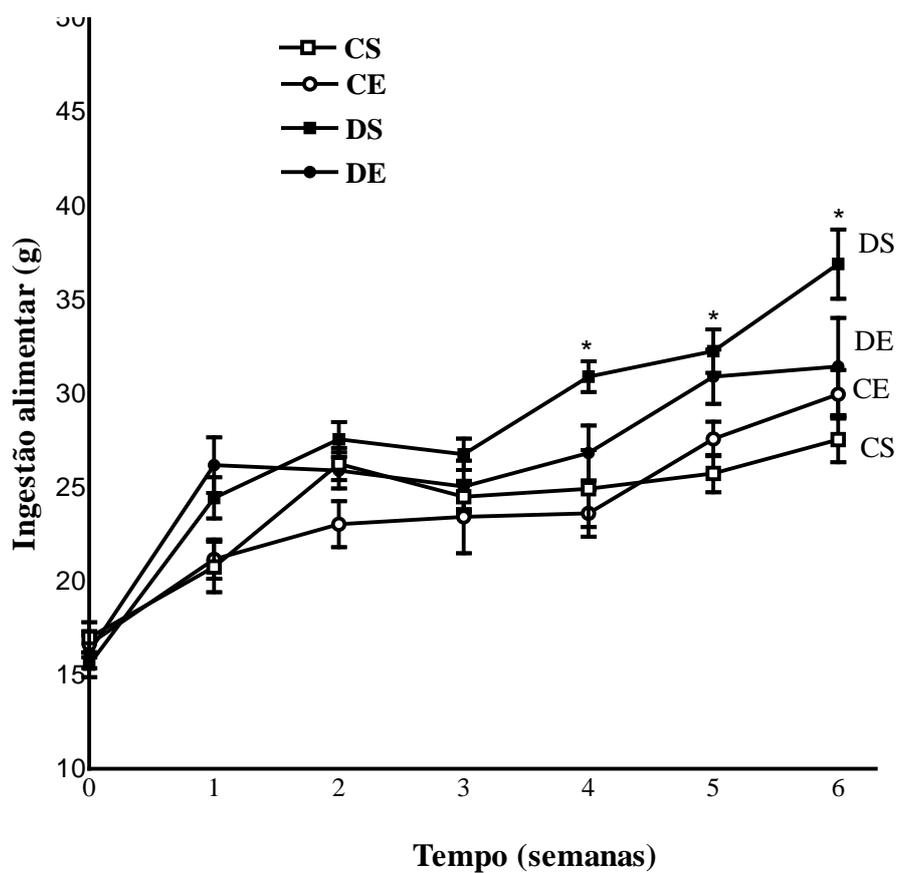


Figura 4: Os valores estão representados como média \pm EPM (erro padrão da média). n= 8-11 ratos/grupo. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE=Grupo diabético exercício. P < 0.05, * CS vs DS.

A massa corporal do DS foi significativamente menor a partir da semana 3 (semana que se refere à primeira semana de treino) comparado com CS (Figura 5).

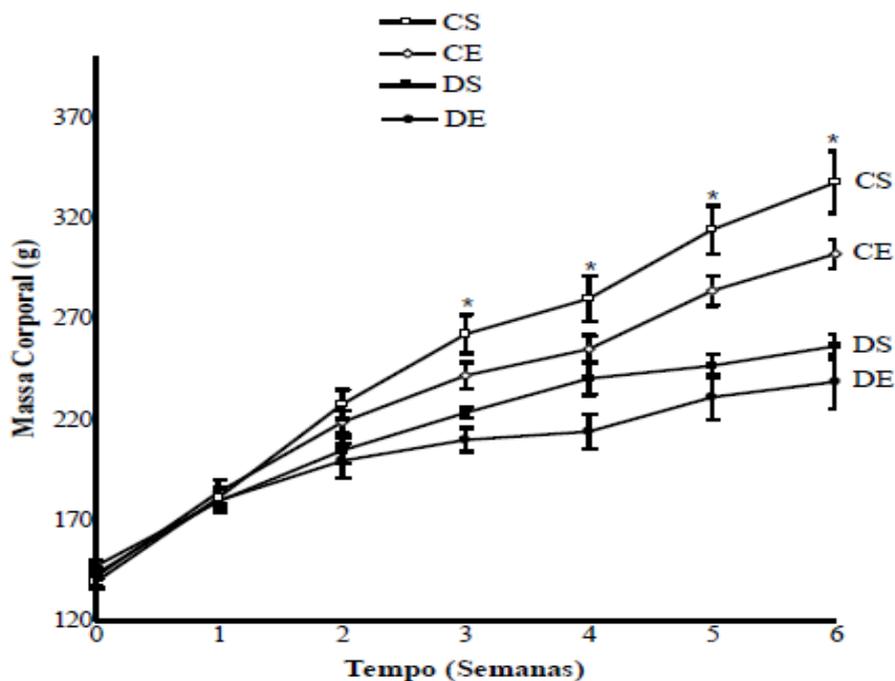


Figura 5: Massa Corporal (g). Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média. $n = 8-11$ ratos/grupo. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE = diabético exercício. $P < 0.05$, * CS vs DS.

4.2 Controle Glicêmico

Os animais diabéticos apresentaram aumento significativo da glicemia comparado com animais controle. O treinamento diminuiu significativamente a glicemia no grupo DE comparado ao DS, a partir da segunda semana de treinamento (Figura 6).

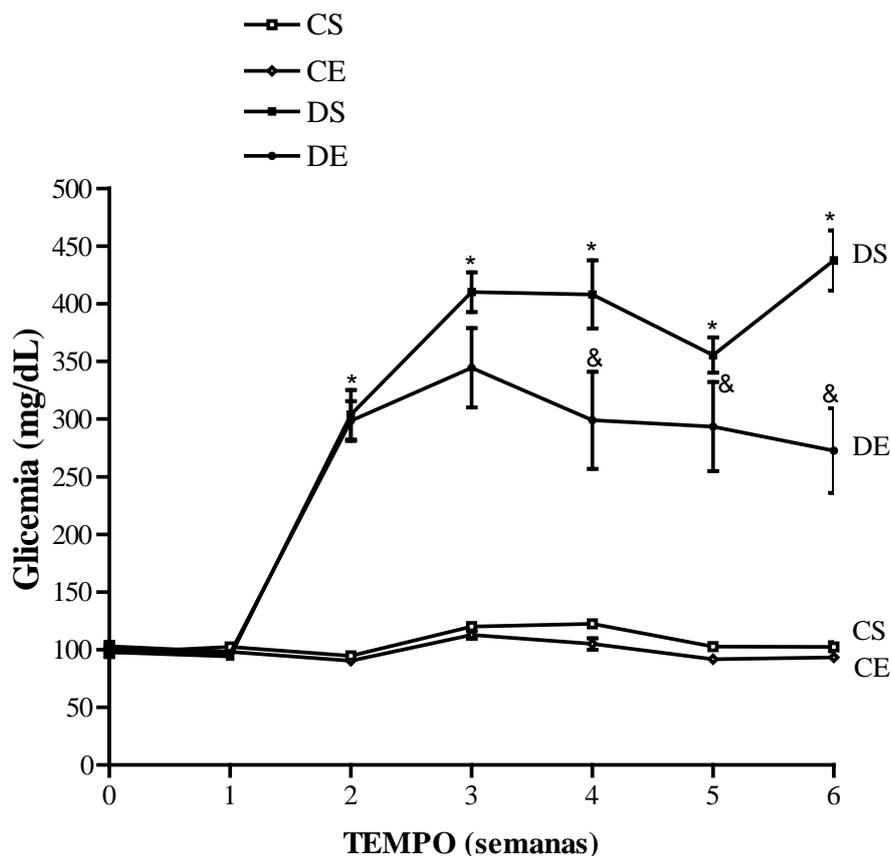


Figura 6: Valores estão representados como média \pm erro padrão da média, $n = 8-11$ ratos/grupo. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE = diabético exercício. $P < 0.05$, * CS vs DS; # CS vs CE; & DS vs DE.

4.3 Peso Relativo dos Tecidos

Os animais diabéticos sedentários (DS) diminuíram significativamente o peso relativo dos tecidos adiposos brancos (epididimal, retroperitoneal, mesentérica) e marrom e músculo gastrocnêmio branco comparado com CS. O treinamento diminuiu significativamente os tecidos adiposos brancos (epididimal, retroperitoneal e mesentérica) nos animais controle que realizaram exercício (CE), entretanto aumentou significativamente o tecido adiposo marrom comparado com CS. Nos animais diabéticos (DE), houve aumento significativo do peso relativo do músculo gastrocnêmio branco e tecido adiposo marrom comparado com DS (Figura 7).

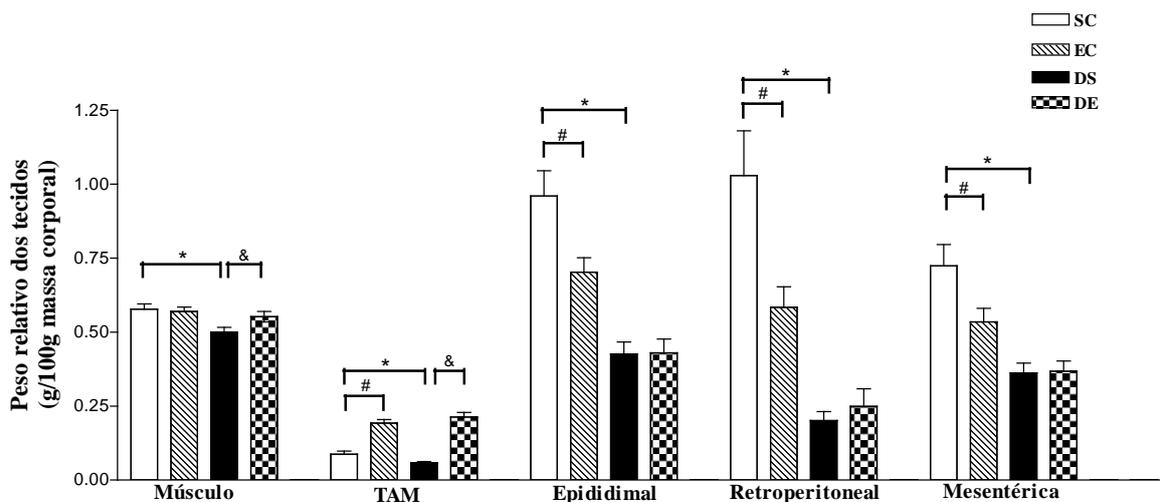


Figura 7: Peso relativo dos tecidos: músculo, tecido adiposo marrom (TAM) e tecidos adiposos brancos. Valores estão representados como média \pm erro padrão da média, $n = 8-11$ ratos/grupo. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE = diabético exercício. $P < 0.05$, *CS vs DS; # DS vs DE; & DS vs DE.

4.4 Quantificação da Expressão do RNAm de MSTN, ActRIIB, ALK 4 e FS

4.4.1 Músculo Gastrocnêmio Branco.

No músculo gastrocnêmio, a expressão de MSTN, ActRIIB e FS aumentaram significativamente nos animais DS comparado aos animais CS. O treino de natação resultou em diminuição significativa da expressão de ActRIIB e FS nos animais DE comparado com os animais DS. Não foi observada mudanças na expressão do ALK4 entre os grupos (Figura 8).

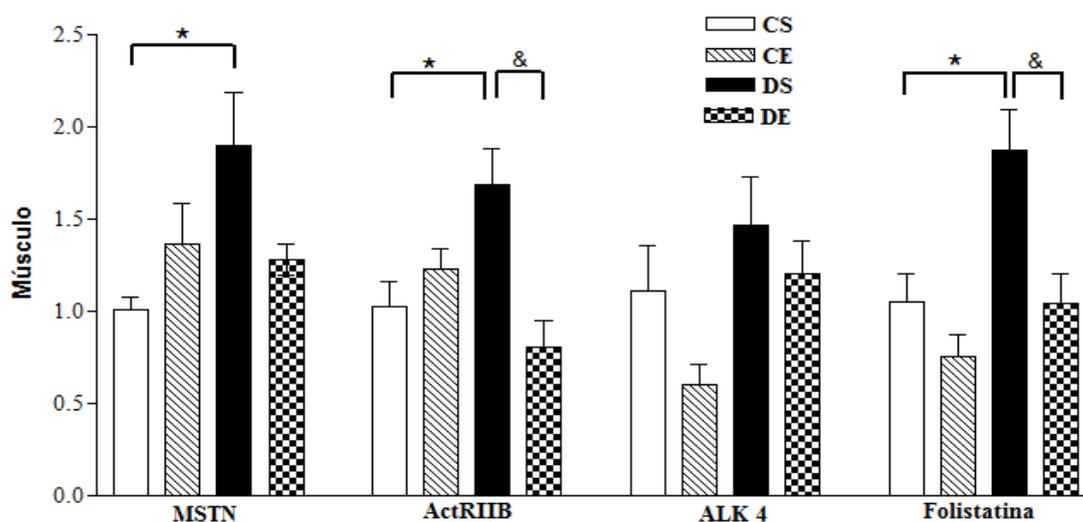


Figura 8: Expressão do RNAm da MSTN, ActRIIB, ALK 4 e FS no músculo de ratos. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE = diabético exercício. $p < 0.05$, * CS vs DS; & DS vs DE.

4.4.2 Tecido Adiposo Marrom

No TAM, a expressão de MSTN diminuiu significativamente e a expressão do ActRIIB, ALK 4 e FS aumentaram significativamente nos animais DS quando comparados aos CS. O treino de natação resultou em significativa redução da expressão da MSTN e ActRIIB nos animais CE comparados ao CS. Houve também diminuição significativa da expressão de ActRIIB, ALK 4 e FS nos animais DE quando comparados aos DS (Figura 9).

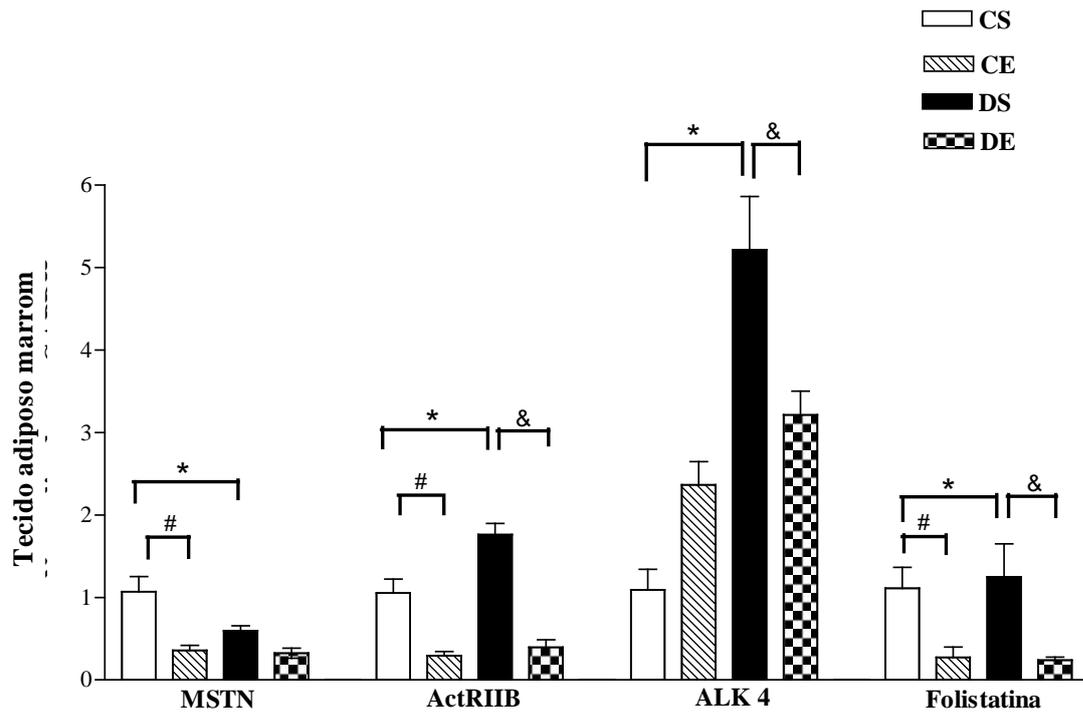


Figura 9: Expressão do RNAm da MSTN, ActRIIB, ALK 4 e FS no tecido adiposo marrom de ratos. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. $n = 5-6$ por grupo. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE = diabético exercício. $P < 0.05$, * CS vs DS; & DS vs DE; # CS vs CE.

4.4.3 Gordura epididimal

Na gordura epididimal não houve mudanças significativas na expressão de MSTN, ActRIIB, FS e ALK 4.

4.4.4 Gordura Mesentérica

Na gordura mesentérica a expressão de ActRIIB aumentou significativamente nos animais DS comparados aos animais CS. Nos animais diabéticos que praticaram exercício (DE) houve aumento significativo na expressão do RNAm de MSTN e uma diminuição da expressão de RNAm da FS quando comparados aos animais DS (Figura 10).

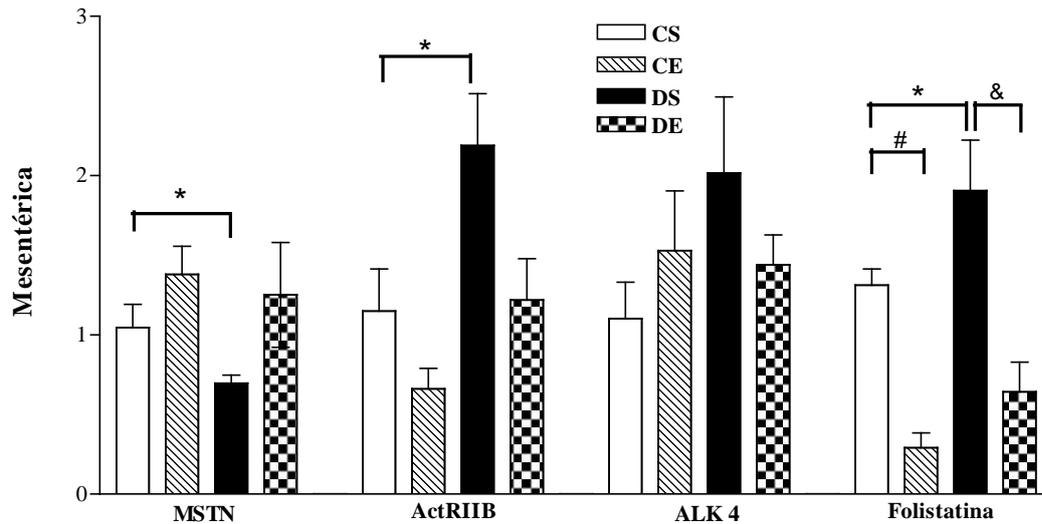


Figura 10: Expressão do RNAm da MSTN, ActRIIB, ALK 4 e FS na gordura mesentérica de ratos. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. n = 5-6 por grupo. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE = diabético exercício. $P < 0.05$ * CS vs DS; $^{\&}$ DS vs DE.

4.4.5 Gordura subcutânea

Na gordura subcutânea a expressão de RNAm de MSTN e FS aumentou significativamente nos animais diabéticos (DS) comparados com os animais CS. Nos animais diabéticos exercitados (DE) houve uma diminuição significativa na expressão de RNAm de MSTN e FS comparados com os animais DS (Figura 11).

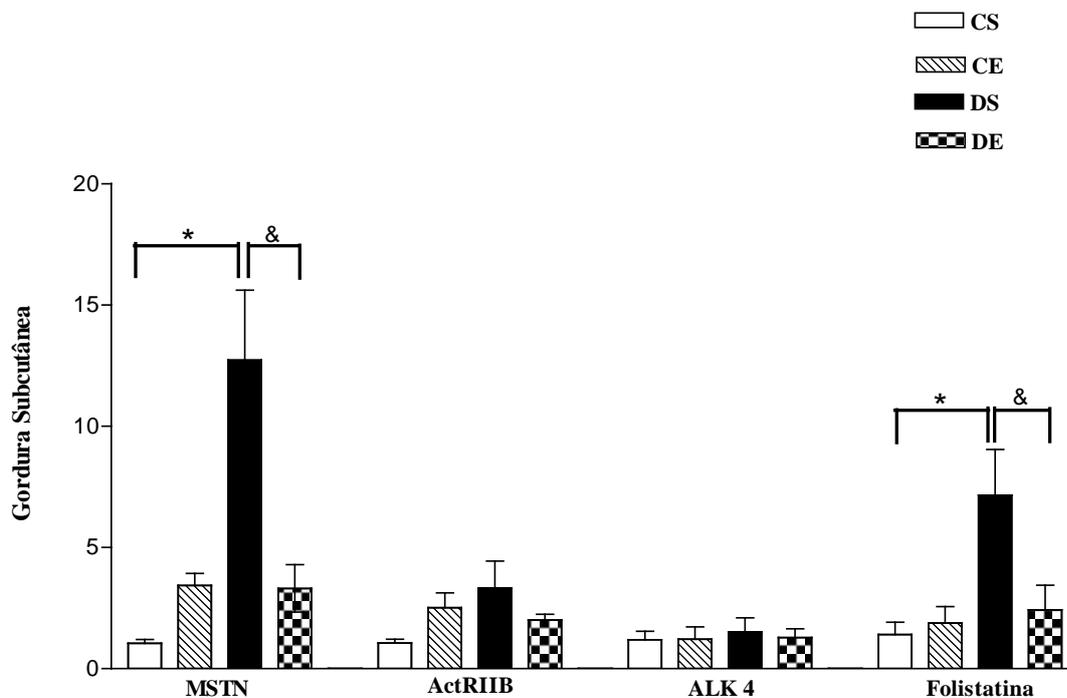


Figura 11: Expressão do RNAm MSTN; ActRIIB; ALK4 e FS na gordura subcutânea. Valores expressos em média \pm erro padrão da média, $n = 5-6$ por grupo. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE = diabético exercício. $P < 0.05$, * CS vs DS; & DS vs DE.

4.5 Análise da expressão protéica da MSTN por *Western Blotting*

4.5.1 Músculo Gastrocnêmio Branco

4.5.1.1 Pró-peptídeo (40 KDa - *latency associated peptide* – LAP)

A expressão protéica do pró-peptídeo da MSTN aumentou significativamente no DS comparado ao CS. O treinamento diminuiu significativamente a expressão protéica do pró-peptídeo da MSTN comparado ao DS (Figura 12 e 13).

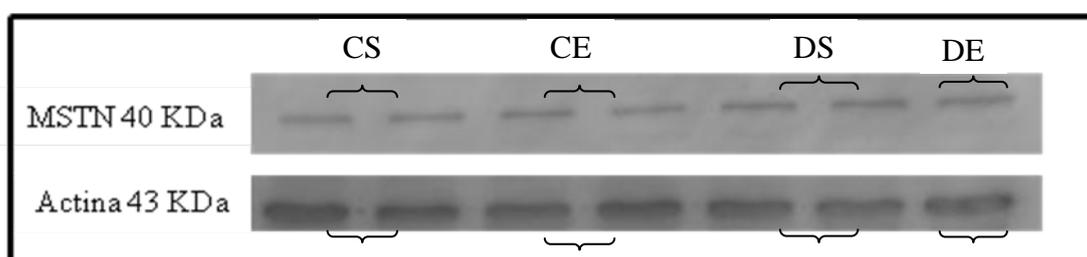


Figura 12. Representação do *Western Blotting* do pró-peptídeo da miostatina (MSTN) e Actina no músculo gastrocnêmio branco.

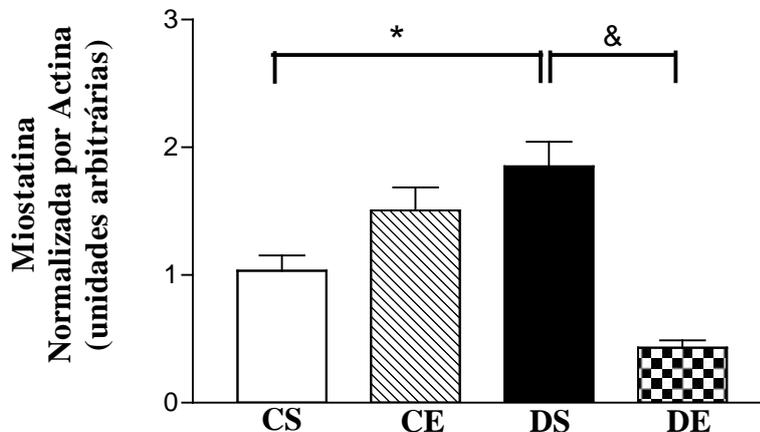


Figura 13: Expressão protéica do pró-peptídeo da MSTN no músculo gastrocnêmio branco de ratos, n=5-6 por grupo. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE = diabético exercício. $P < 0.05$, * CS vs DS; & DS vs DE.

4.5.1.2 Proteína madura (26 KDa)

A expressão protéica da MSTN madura aumentou significativamente no DS quando comparado ao CS (Figura 14 e 15).

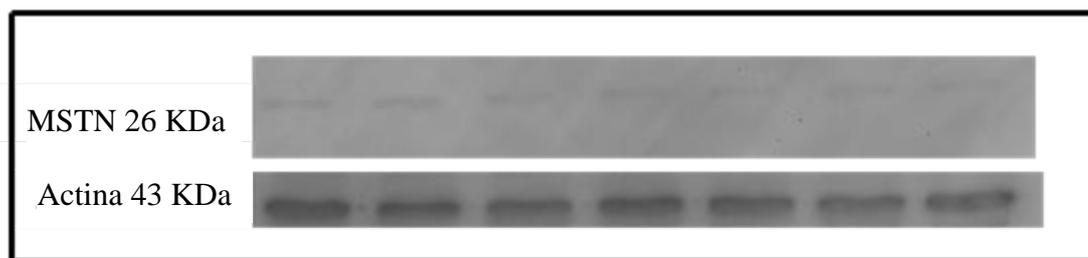


Figura 14: Representação do *Western Blotting* da proteína MSTN madura e Actina no músculo gastrocnêmio branco de ratos controle sedentários.

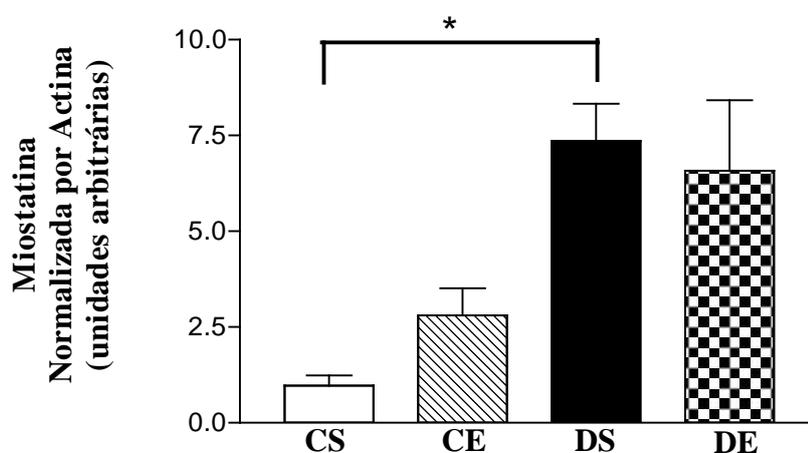


Figura 15: Expressão protéica de MSTN madura no músculo gastrocnêmio branco de ratos, $n = 5-6$ por grupo. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE = diabético exercício. $P < 0.05$, * CS vs DS.

4.5.2 Tecido Adiposo Marrom

4.5.2.1 Pró-peptídeo de MSTN no TAM

A expressão protéica do pró-peptídeo da MSTN aumentou significativamente no DS quando comparado ao CS (Figura 16 e 17).

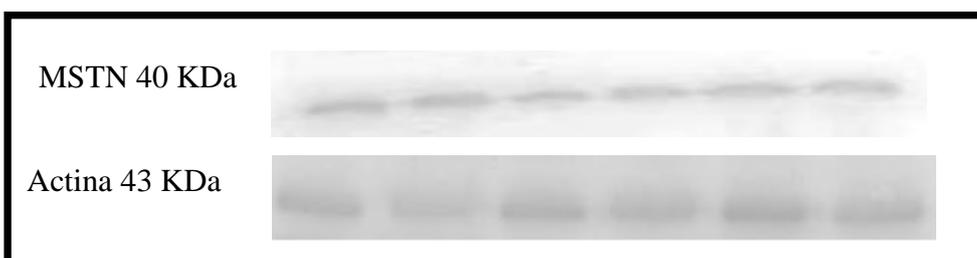


Figura 16: Representação do *Western Blotting* do pró-peptídeo da MSTN e Actina no tecido adiposo marrom de ratos diabéticos sedentários.

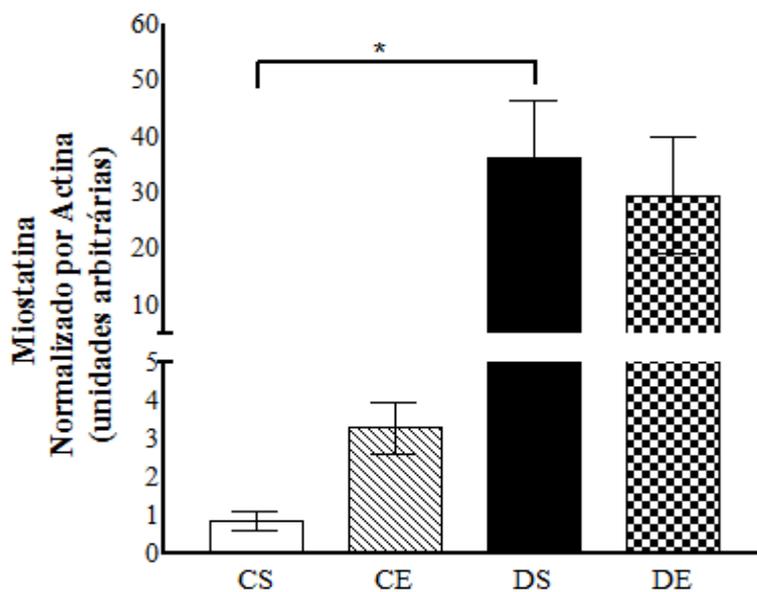


Figura 17: Expressão protéica do pró-peptídeo da MSTN no tecido adiposo marrom de ratos, n=5-6 por grupo. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE = diabético exercício. $P < 0.05$, * CS vs DS.

4.5.2.2 Proteína madura 26 KDa no TAM

Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.5.3 Gordura Mesentérica

4.5.3.1 Pró-peptídeo de MSTN na gordura mesentérica

A expressão protéica do pró-peptídeo da MSTN aumentou significativamente no DS quando comparado ao CS. O treinamento diminuiu significativamente a expressão protéica do pró-peptídeo da MSTN comparado ao DS (Figura 18).

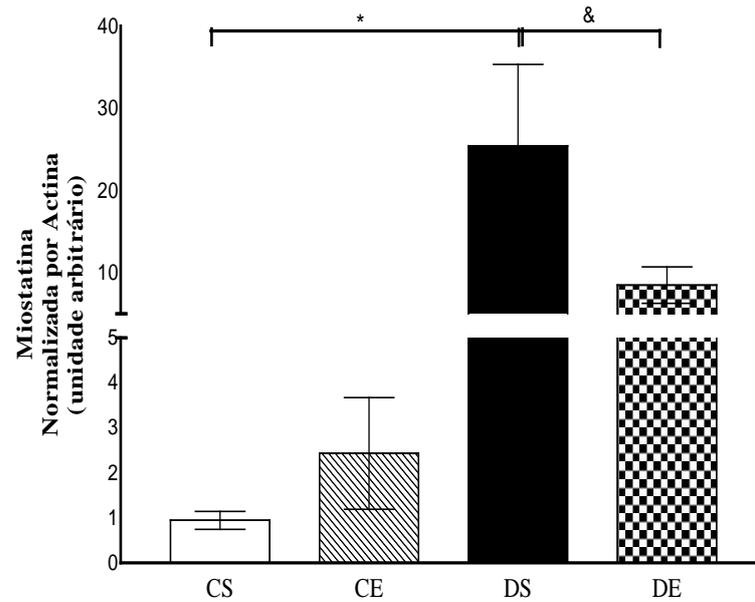


Figura 18: Expressão protéica do pró-peptídeo da MSTN na gordura mesentérica de ratos, n=5-6 por grupo. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. CS = controle sedentário; CE = controle exercício; DS = diabético sedentário; DE = diabético exercício. $P < 0.05$, * CS vs DS, & DS vs DE.

4.5.3.2 Proteína madura 26 KDa na gordura mesentérica

Não foi possível detectar a banda referente à proteína madura neste tecido. Especulamos que o anticorpo específico tenha falhado na detecção dessa banda.

5. DISCUSSÃO

Os resultados mostram que a expressão de RNAm e protéica de MSTN, e a expressão de RNAm de seus receptores, ActRIIB, ALK 4, e da FS se modificaram no músculo esquelético e tecidos adiposos de ratos diabéticos e exercitados.

Como esperado, os ratos diabéticos apresentaram sinais típicos de DM, tais como perda de peso, aumento da ingestão alimentar e da concentração plasmática de glicose (Enoki *et al.*, 2003; Loganathan *et al.*, 2007).

O exercício físico associou-se à diminuição da concentração plasmática de glicose, mas não da ingestão alimentar ou do peso corporal nos ratos diabéticos como observado em estudos prévios (Enoki *et al.*, 2003). Os efeitos do exercício no metabolismo energético no DM têm sido investigados e tem-se demonstrado que o exercício crônico altera de forma favorável o perfil metabólico, incluindo melhora da captação de glicose no músculo esquelético (ACSM e ADA, 2010). Adicionalmente, já está bem estabelecido que o exercício aumenta a sensibilidade à insulina melhorando a via de sinalização da insulina e da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato cíclico (AMP-K) (Bruce e Hawley, 2004; Yaspelkis *et al.*, 2007).

A expressão de RNAm de MSTN, ActRIIB, e FS aumentou no músculo gastrocnêmico branco de animais diabéticos sedentários comparado com controle sedentário. Esses resultados confirmam os achados por Chen *et al.* (2009) e Wieteska-Skrzeczynska *et al.* (2009) os quais demonstraram que a expressão de MSTN está aumentada em camundongos diabéticos tratados com STZ. Entretanto, outros estudos têm reportado que a expressão da MSTN não esta alterada pela deficiência da insulina no músculo esqueléticos de ratos e camundongos com DM induzido por STZ (Barazzoni *et al.*, 2004; Lehti *et al.*, 2007; Mastrocola *et al.*, 2008). Diferenças metodológicas podem explicar parcialmente as discrepâncias entre os estudos. Além disso, tem sido observado aumento na expressão de MSTN no músculo esquelético de ratos em outros estados de desarranjos metabólicos, tais como obesidade genética (ob/ob) em camundongos, e obesidade e resistência insulínica em humanos (Allen *et al.*, 2008; Hittel *et al.*, 2009).

Nosso estudo descreve pela primeira vez a expressão de RNAm de FS e ActRIIB no músculo e seu aumento no diabetes. A FS é produzida em muitos tecidos e é um importante inibidor extracelular da ação das activinas e outros membros da família dos TGF- β (Welt *et al.*, 2002). Vários estudos sugerem que a FS também pode se ligar a MSTN evitando a interação ligante-receptor, e antagonizar sua atividade (Lee e Mcpherron, 2001; Zimmers *et*

al., 2002; Abe *et al.*, 2009; Gilson *et al.*, 2009). O aumento na expressão tanto da MSTN quanto da FS pode indicar uma tentativa de modular a ação da MSTN no músculo esquelético. Na verdade, a modulação autócrina/parácrina de outros membros da família TGF- β já foi demonstrada (Bilezikjian *et al.*, 2004).

No presente estudo observamos também aumento da expressão proteica da MSTN. Nos animais diabéticos ocorreu aumento do pró-peptídeo e proteína madura quando comparado com animais controle. As formas predominantes detectadas da MSTN (pró-peptídeo e proteína madura) sugerem o aumento do processamento proteolítico (Mcfarlane *et al.*, 2005). Adicionalmente, é proposto por Wolfman *et al.* (2003) que as proteínas ósseas morfogenéticas-1 (BPM-1), membros da família das metaloproteinases, podem estar envolvidas na ativação do complexo latente da MSTN. Após o processamento proteolítico dos membros da superfamília dos TGF- β pode ocorrer sua secreção, então é possível que a MSTN madura seja secretada (Thomas, 2002). Além disso, é descrito na literatura que elevados níveis de MSTN causam diminuição da massa muscular (Mcpheeron e Lee, 1997) e, portanto o aumento da expressão da MSTN possivelmente pode estar relacionado à diminuição da massa relativa do músculo gastrocnêmio branco encontrado nos animais diabéticos sedentários quando comparados com controle sedentário (Figura 7).

Em contrapartida, nos animais diabéticos que realizaram exercício não houve mudança da expressão de RNAm de MSTN, entretanto houve uma diminuição do seu pró-peptídeo. Isso sugere que os níveis de proteína possivelmente foram regulados por mecanismos pós-transcricionais (Mcmahon *et al.*, 2003), mostrando o efeito benéfico do exercício na manutenção da massa muscular em diabéticos. Além disso, o treino de natação associou-se à redução significativa da expressão do ActRIIB e FS nos animais diabéticos.

A expressão gênica da MSTN, ActRIIB, ALK 4 e FS difere nos três diferentes tecidos adiposos estudados. Já é bem estabelecido que os diferentes depósitos de gordura exibem diferentes perfis metabólicos, em especial o tecido adiposo branco e o tecido adiposo marrom. Há escassez de dados sobre a expressão de MSTN no tecido adiposo e sua expressão nesse tecido é cerca de 50 a 100 vezes menor que no músculo esquelético (Allen *et al.*, 2008). Entretanto, foi previamente demonstrado aumento da expressão de MSTN em camundongos com obesidade induzida por dieta (Allen *et al.*, 2008). As ações da MSTN no tecido adiposo e seus efeitos metabólicos são ainda controversos e a MSTN tem sido citada tanto por promover como inibir a adipogênese. Em modelos genéticos em que a ação da MSTN é bloqueada, o tecido adiposo é reduzido e o metabolismo de glicose é benéficamente modificado (Mcpheeron e Lee, 1997; Lin *et al.*, 2002; Mcpheeron e Lee, 2002; Guo *et al.*,

2009; Tu *et al.*, 2009). Por outro lado, o aumento endógeno da MSTN sistêmica por aumento da expressão do seu pró-peptídeo resulta em redução da gordura visceral e melhora da tolerância a glicose e sensibilidade a insulina (Zhao, Wall e Yang, 2005). Entretanto, a administração da MSTN não afeta a massa gorda em animais adultos (Stolz *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* demonstraram que a MSTN pode modular diretamente a adipogênese (Kim *et al.*, 2001; Zimmers *et al.*, 2002; Rebbapragada *et al.*, 2003; Artaza *et al.*, 2005; Feldman *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2009), indicando que o bloqueio da sinalização de MSTN especificamente em adipócitos, não teve efeito na composição corporal, ganho de peso ou tolerância à glicose em ratos, sugerindo que a sensibilidade à insulina e redução no tecido adiposo observado em ratos nulos para MSTN é um resultado indireto de mudanças metabólicas no músculo esquelético (Guo *et al.*, 2009). Entretanto, é possível que pequena quantidade de MSTN expressa localmente no tecido adiposo como mostrada aqui e por outros (Allen *et al.*, 2008) afetem o metabolismo energético funcionando como fatores parácrinos e/ou endócrinos no tecido adiposo e outros tipos de células, como já demonstrado em relação a outros membros da família TGF- β . É bem estabelecido que o tecido adiposo é um órgão endócrino, rico em diferentes tipos de células, incluindo células imunes e adipocinas (Federico *et al.*, 2010). Dois estudos recentes (Wilkes, Lloyd e Gekakis, 2009; Lyons, Haring e Biga, 2010) demonstraram a estreita relação entre MSTN e sistema imune.

Lyons *et al.* (2010), mostraram variação local da expressão da MSTN e produção de citocinas pró-inflamatórias em células imunes do baço em resposta a ingestão de dieta hiperlipídica em ratos. Adicionalmente, Wilkes *et al.* (2009), observaram a correlação entre melhora da sensibilidade à insulina e diminuição na produção do fator alfa de necrose tumoral (TNF α), que é uma citocina inflamatória, no tecido adiposo e músculo de ratos com deficiência na MSTN alimentados com dieta hiperlipídica. Nesses animais, o tratamento com MSTN recombinante aumentou a circulação de TNF e resistência à insulina.

Em relação à expressão de RNAm de FS no tecido adiposo branco, nós observamos que as expressões da MSTN e da FS variaram reciprocamente na gordura mesentérica em ratos diabéticos sedentários e exercitados. O oposto ocorreu na gordura subcutânea. Os dados sobre a expressão de FS no tecido adiposo também são escassos e muito pouco se sabe sobre seu papel metabólico. Recentemente, tem sido descrita diminuição da expressão da FS na gordura subcutânea, mas não na gordura visceral em humanos obesos (Flanagan *et al.*, 2009). Além de ser demonstrado que a FS promoveu diferenciação adipogênica *in vitro* (Flanagan *et al.*, 2009) e neutralizou o efeito inibitório da MSTN sobre a diferenciação dos pré-adipócitos de bovinos (Hirai *et al.*, 2007). A importância fisiológica da modulação da MSTN por seu

antagonismo de proteínas ligantes à MSTN pode ser confirmada pela demonstração de camundongos *knockout* homozigotos de FSL3 que desenvolvem aumento do número e tamanho das ilhotas pancreáticas, hiperplasia das células β , diminuição da massa adiposa visceral, melhora da tolerância à glicose e aumento da sensibilidade à insulina. FSL3 é outra proteína ligante da MSTN que tem similaridade funcional e estrutural com a FS (Schneyer *et al.*, 2004).

Na gordura mesentérica dos animais diabéticos exercício ocorreu aumento do RNAm de MSTN e diminuição do pró-peptídeo comparado com controle sedentário, e o oposto ocorreu com os animais diabéticos sedentários comparado com controle sedentário. Níveis de RNAm inalterados ou aumentados apesar de, aumento ou diminuição do pró-peptídeo da MSTN sugere que os níveis protéicos são regulados por mecanismos pós-transcricionais (Smith *et al.*, 2010).

Nós mostramos, também pela primeira vez, que a expressão da MSTN, ActRIIB, ALK 4 e FS variam no TAM em diabetes e exercício. Tem sido mostrado que o TAM tem um importante papel na proteção da obesidade induzida por dieta, diabetes e resistência à insulina e a regulação da homeostase energética através de uma única função de dissipar energia em forma de calor em situações de abundância energética ou temperaturas ambientais baixas (Hamann, Flier e Lowell, 1996; Cannon e Nedergaard, 2004; Redinger, 2009). Adicionalmente, foi descrito que o exercício aumenta tanto o peso do TAM quanto a expressão da UCP-1 no TAM (Guerra *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2007). Além disso, a MSTN inibe seletivamente a sinalização de BMP7 (Rebbapragada *et al.*, 2003), cuja expressão é associada ao aumento da diferenciação do adipócito marrom e do gasto energético (Tseng *et al.*, 2008). Em conjunto, esses dados sugerem o envolvimento do TAM na homeostase energética no exercício e um possível papel da MSTN.

A expressão do pró-peptídeo do TAM diferiu apenas nos animais diabéticos sedentários comparado ao seu controle. Os menores níveis do RNAm de MSTN e aumento do pró-peptídeo deve-se as modificações pós-transcricionais além disso, os inalterados níveis da proteína madura da MSTN podem ser devido, a diminuição do processamento proteolítico. A discrepância observada no RNAm de MSTN e expressão protéica tem sido observada em outros estudos (Mcfarlane *et al.*, 2005; Konopka *et al.*, 2010).

O papel metabólico da MSTN não é claro. Estudos prévios têm mostrado que MSTN pode sinalizar através da via de sinalização intracelular da insulina e, portanto, afetar a sensibilidade à insulina no músculo. No músculo e tecido adiposo de camundongos nulos para MSTN e camundongos transgênicos com *upregulation* do pró-peptídeo da MSTN a

sinalização de insulina foi aumentada devido aos maiores níveis de fosforilação Akt (Zhao, Wall e Yang, 2005; Guo *et al.*, 2009; Tu *et al.*, 2009). Em adição, é demonstrado que a *upregulation* de genes envolvidos no metabolismo da glicose e ativação da AMPK pela MSTN podem estar envolvidas na absorção e metabolismo de glicose no músculo (Chen *et al.*, 2010). Interessantemente, tem sido mostrado que a AMPK está envolvida também na diferenciação do TAM e no consumo de glicose do mesmo (Hutchinson *et al.*, 2005; Vila-Bedmar, Lorenzo e Fernandez-Veledo, 2010).

Finalmente, devemos lembrar que a MSTN é uma proteína secretada e circulante podendo ter ação endócrina e parácrina. Ademais, assim como outros membros da família TGF- β , a sua ação é regulada por inibidores intra e extracelulares (Hill *et al.*, 2002; Forbes *et al.*, 2006). Sendo assim, torna-se fundamental que esses reguladores da bioatividade da MSTN sejam também investigados para que seu papel metabólico seja melhor compreendido.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que o *Diabetes Mellitus* e o exercício físico alteram a expressão do RNAm de Miostatina, ActRIIB, ALK 4 e Folistatina bem como a expressão protéica de Miostatina em importantes cenários metabólicos como músculo esquelético, tecido adiposo branco e marrom, sugerindo a participação de MSTN na homeostase energética.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, S., *et al.* Expression of myostatin and follistatin in Mdx mice, an animal model for muscular dystrophy. **Zoolog Sci**, v.26, n.5, May, p.315-20. 2009.

ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.32, n.(suppl. 1):, p.S62. 2009.

Alberti, K. e P. Zimmet. Definition, diagnosis and classification of *diabetes mellitus* and its complications. Part 1: diagnosis and classification of *diabetes mellitus*. . **Report of a WHO Consultation.**, Geneva:1999, p.66. 1999.

Allen, D. L., *et al.* Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.294, n.5, May, p.E918-27. 2008.

American College of Sports Medicine e American Diabetes Association. Exercise and Type 2 Diabetes. **Med Sci Sports Exerc**, v.42, n.12, Dec, p. 2282-303. 2010.

Anthony, J. C., *et al.* Orally administered leucine enhances protein synthesis in skeletal muscle of diabetic rats in the absence of increases in 4E-BP1 or S6K1 phosphorylation. **Diabetes**, v.51, n.4, Apr, p.928-36. 2002.

Artaza, J. N., *et al.* Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T(1/2) mesenchymal multipotent cells. **Endocrinology**, v.146, n.8, Aug, p.3547-57. 2005.

Barazzoni, R., *et al.* Myostatin expression is not altered by insulin deficiency and replacement in streptozotocin-diabetic rat skeletal muscles. **Clin Nutr**, v.23, n.6, Dec, p.1413-7. 2004.

Baron, A. D., *et al.* Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. **Am J Physiol**, v.255, n.6 Pt 1, Dec, p.E769-74. 1988.

Bilezikjian, L. M., *et al.* Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. **Mol Cell Endocrinol**, v.225, n.1-2, Oct 15, p.29-36. 2004.

Bruce, C. R. e J. A. Hawley. Improvements in insulin resistance with aerobic exercise training: a lipocentric approach. **Med Sci Sports Exerc**, v.36, n.7, Jul, p.1196-201. 2004.

Cannon, B. e J. Nedergaard. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**, v.84, n.1, Jan, p.277-359. 2004.

Chen, Y., *et al.* Upregulation of myostatin gene expression in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice is attenuated by insulin. **Biochem Biophys Res Commun**, v.388, n.1, Oct 9, p.112-6. 2009.

Chen, Y., *et al.* Myostatin regulates glucose metabolism via the AMP-activated protein kinase pathway in skeletal muscle cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v.42, n.12, Dec, p.2072-81. 2010.

- Cinti, S. The role of brown adipose tissue in human obesity. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v.16, n.8, Dec, p.569-74. 2006.
- Costelli, P., *et al.* Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. **Eur J Clin Invest**, v.38, n.7, Jul, p.531-8. 2008.
- Cypess, A. M. e C. R. Kahn. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v.17, n.2, Apr, p.143-9. 2010.
- Cypess, A. M., *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med**, v.360, n.15, Apr 9, p.1509-17. 2009.
- Debieve, F., *et al.* Activin receptor expression and induction of apoptosis in rat blastocysts in vitro. **Hum Reprod**, v.21, n.3, Mar, p.618-23. 2006.
- Despres, J. P. e I. Lemieux. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v.444, n.7121, Dec 14, p.881-7. 2006.
- Dulloo, A. G. A role for suppressed skeletal muscle thermogenesis in pathways from weight fluctuations to the insulin resistance syndrome. **Acta Physiol Scand**, v.184, n.4, Aug, p.295-307. 2005.
- Enoki, T., *et al.* Exercise training alleviates MCT1 and MCT4 reductions in heart and skeletal muscles of STZ-induced diabetic rats. **J Appl Physiol**, v.94, n.6, Jun, p.2433-8. 2003.
- Federico, A., *et al.* Fat: a matter of disturbance for the immune system. **World J Gastroenterol**, v.16, n.38, Oct 14, p.4762-72. 2010.
- Feldman, B. J., *et al.* Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.42, Oct 17, p.15675-80. 2006.
- Flanagan, J. N., *et al.* Role of follistatin in promoting adipogenesis in women. **J Clin Endocrinol Metab**, v.94, n.8, Aug, p.3003-9. 2009.
- Forbes, D., *et al.* Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. **J Cell Physiol**, v.206, n.1, Jan, p.264-72. 2006.
- Furukawa, M., *et al.* Initiation of insulin secretion in glucose-free medium by activin A. **Mol Cell Endocrinol**, v.113, n.1, Aug 30, p.83-7. 1995.
- Garma, T., *et al.* Similar acute molecular responses to equivalent volumes of isometric, lengthening, or shortening mode resistance exercise. **J Appl Physiol**, v.102, n.1, Jan, p.135-43. 2007.
- Gil-Campos, M., R. R. Canete e A. Gil. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. **Clin Nutr**, v.23, n.5, Oct, p.963-74. 2004.
-

Gilson, H., *et al.* Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.297, n.1, Jul, p.E157-64. 2009.

Gonzalez-Cadavid, N. F. e S. Bhasin. Role of myostatin in metabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.7, n.4, Jul, p.451-7. 2004.

Gonzalez-Cadavid, N. F., *et al.* Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.25, Dec 8, p.14938-43. 1998.

Guerra, R. L., *et al.* Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. **Lipids Health Dis**, v.6, p.16. 2007.

Guo, T., *et al.* Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. **PLoS One**, v.4, n.3, p.e4937. 2009.

Hamann, A., J. S. Flier e B. B. Lowell. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. **Endocrinology**, v.137, n.1, Jan, p.21-9. 1996.

Hawley, J. A. e J. A. Houmard. Introduction-preventing insulin resistance through exercise: a cellular approach. **Med Sci Sports Exerc**, v.36, n.7, Jul, p.1187-90. 2004.

Heinemeier, K. M., *et al.* Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. **J Appl Physiol**, v.102, n.2, Feb, p.573-81. 2007.

Herr, R. R., J. K. Jahnke e A. D. Argoudelis. The structure of streptozotocin. **J Am Chem Soc**, v.89, n.18, Aug 30, p.4808-9. 1967.

Hill, J. J., *et al.* The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. **J Biol Chem**, v.277, n.43, Oct 25, p.40735-41. 2002.

Hirai, S., *et al.* Myostatin inhibits differentiation of bovine preadipocyte. **Domest Anim Endocrinol**, v.32, n.1, Jan, p.1-14. 2007.

Hittel, D. S., *et al.* Increased secretion and expression of myostatin in skeletal muscle from extremely obese women. **Diabetes**, v.58, n.1, Jan, p.30-8. 2009.

Hulmi, J. J., *et al.* Postexercise myostatin and activin IIb mRNA levels: effects of strength training. **Med Sci Sports Exerc**, v.39, n.2, Feb, p.289-97. 2007.

Hutchinson, D. S., *et al.* Beta-adrenoceptors, but not alpha-adrenoceptors, stimulate AMP-activated protein kinase in brown adipocytes independently of uncoupling protein-1. **Diabetologia**, v.48, n.11, Nov, p.2386-95. 2005.

International Diabetes Federation (IDF). Disponível em: www.diabetesatlas.org. Acessado em: 30/10/2010.

- Kahn, C. H. E. A. **Jolin's Diabetes Mellitus**. Boston: Lippincott Williams & Wilkins. 2005
- Katsanos, C. S. Lipid-induced insulin resistance in the liver: role of exercise. **Sports Med**, v.34, n.14, p.955-65. 2004.
- Kim, C. H., *et al.* Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.278, n.6, Jun, p.E977-84. 2000.
- Kim, H. S., *et al.* Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. **Biochem Biophys Res Commun**, v.281, n.4, Mar 9, p.902-6. 2001.
- Kiraly, M. A., *et al.* Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. **Metabolism**, v.56, n.6, Jun, p.732-44. 2007.
- Konopka, A. R., *et al.* Molecular adaptations to aerobic exercise training in skeletal muscle of older women. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.65, n.11, Nov, p.1201-7. 2010.
- Kramer, H. F. e L. J. Goodyear. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v.103, n.1, Jul, p.388-95. 2007.
- Kretschmer, B. D., *et al.* Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life Sci**, v.76, n.14, Feb 18, p.1553-73. 2005.
- Krook, A., H. Wallberg-Henriksson e J. R. Zierath. Sending the signal: molecular mechanisms regulating glucose uptake. **Med Sci Sports Exerc**, v.36, n.7, Jul, p.1212-7. 2004.
- Lee, S. J. e A. C. Mcpherron. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.16, Jul 31, p.9306-11. 2001.
- Lee, S. J., *et al.* Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.50, Dec 13, p.18117-22. 2005.
- Lehti, T. M., *et al.* Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of extracellular matrix proteins in mouse skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.290, n.5, May, p.E900-7. 2006.
- Lehti, T. M., *et al.* Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of titin-based stretch-sensing complexes in mouse striated muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.292, n.2, Feb, p.E533-42. 2007.
- Leme, J. A., *et al.* Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in diabetic rats. **Growth Factors**, v.25, n.1, Feb, p.9-14. 2007.
- Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v.51, n.2, Feb, p.216-26. 2008.
-

Lin, J., *et al.* Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.291, n.3, Mar 1, p.701-6. 2002.

Livak, K. J. e T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, Dec, p.402-8. 2001.

Loganathan, R., *et al.* Exercise training improves cardiac performance in diabetes: in vivo demonstration with quantitative cine-MRI analyses. **J Appl Physiol**, v.102, n.2, Feb, p.665-72. 2007.

Lyons, J. A., J. S. Haring e P. R. Biga. Myostatin expression, lymphocyte population, and potential cytokine production correlate with predisposition to high-fat diet induced obesity in mice. **PLoS One**, v.5, n.9, p.e12928. 2010.

Massague, J. TGF-beta signal transduction. **Annu Rev Biochem**, v.67, p.753-91. 1998.

Mastrocola, R., *et al.* Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v.44, n.4, Feb 15, p.584-93. 2008.

Matsakas, A., *et al.* Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats. **Exp Physiol**, v.91, n.6, Nov, p.983-94. 2006.

Matsakas, A. e P. Diel. The growth factor myostatin, a key regulator in skeletal muscle growth and homeostasis. **Int J Sports Med**, v.26, n.2, Mar, p.83-9. 2005.

Matsakas, A., *et al.* Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. **Acta Physiol Scand**, v.183, n.3, Mar, p.299-307. 2005.

Mcfarlane, C., *et al.* Proteolytic processing of myostatin is auto-regulated during myogenesis. **Dev Biol**, v.283, n.1, Jul 1, p.58-69. 2005.

Mcmahon, C. D., *et al.* Sexual dimorphism is associated with decreased expression of processed myostatin in males. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.284, n.2, Feb, p.E377-81. 2003.

Mcperron, A. C., A. M. Lawler e S. J. Lee. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v.387, n.6628, May 1, p.83-90. 1997.

Mcperron, A. C. e S. J. Lee. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.23, Nov 11, p.12457-61. 1997.

Mcperron, A. C. e S. J. Lee. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. **J Clin Invest**, v.109, n.5, Mar, p.595-601. 2002.

Milan, G., *et al.* Changes in muscle myostatin expression in obese subjects after weight loss. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, n.6, Jun, p.2724-7. 2004.

- Oh, K. S., *et al.* Swim training improves leptin receptor deficiency-induced obesity and lipid disorder by activating uncoupling proteins. **Exp Mol Med**, v.39, n.3, Jun 30, p.385-94. 2007.
- Park, J. J., *et al.* GRB14, GPD1, and GDF8 as potential network collaborators in weight loss-induced improvements in insulin action in human skeletal muscle. **Physiol Genomics**, v.27, n.2, Oct 11, p.114-21. 2006.
- Rakieten, N., M. L. Rakieten e M. V. Nadkarni. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemother Rep**, v.29, May, p.91-8. 1963.
- Rebbapragada, A., *et al.* Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. **Mol Cell Biol**, v.23, n.20, Oct, p.7230-42. 2003.
- Redinger, R. N. Fat storage and the biology of energy expenditure. **Transl Res**, v.154, n.2, Aug, p.52-60. 2009.
- Reynolds, T. H. T., *et al.* Transient enhancement of GLUT-4 levels in rat epitrochlearis muscle after exercise training. **J Appl Physiol**, v.88, n.6, Jun, p.2240-5. 2000.
- Russell, S. T., *et al.* Mechanism of induction of muscle protein loss by hyperglycaemia. **Exp Cell Res**, v.315, n.1, Jan 1, p.16-25. 2009.
- Saltiel, A. R. e C. R. Kahn. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, n.6865, Dec 13, p.799-806. 2001.
- Sanchez, O. A., *et al.* Effects of endurance exercise-training on single-fiber contractile properties of insulin-treated streptozotocin-induced diabetic rats. **J Appl Physiol**, v.99, n.2, Aug, p.472-8. 2005.
- Schneyer, A., *et al.* Differential actions of follistatin and follistatin-like 3. **Mol Cell Endocrinol**, v.225, n.1-2, Oct 15, p.25-8. 2004.
- Sene-Fiorese, M., *et al.* Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v.16, n.10, Oct, p.2217-22. 2008.
- Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 3^o edição - Itapevi-SP, p. 9-318. 2009.
- Smith, I. J., *et al.* Sepsis downregulates myostatin mRNA levels without altering myostatin protein levels in skeletal muscle. **J Cell Biochem**, v.111, n.4, Nov 1, p.1059-73. 2010.
- Stolz, L. E., *et al.* Administration of myostatin does not alter fat mass in adult mice. **Diabetes Obes Metab**, v.10, n.2, Feb, p.135-42. 2008.
- Thomas, G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.3, n.10, Oct, p.753-66. 2002.
- Tseng, Y. H., *et al.* New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. **Nature**, v.454, n.7207, Aug 21, p.1000-4. 2008.
-

Tsuchida, K. Activins, myostatin and related TGF-beta family members as novel therapeutic targets for endocrine, metabolic and immune disorders. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord**, v.4, n.2, Jun, p.157-66. 2004.

Tu, P., *et al.* Genetic disruption of myostatin reduces the development of proatherogenic dyslipidemia and atherogenic lesions in Ldlr null mice. **Diabetes**, v.58, n.8, Aug, p.1739-48. 2009.

Van Marken Lichtenbelt, W. D., *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **N Engl J Med**, v.360, n.15, Apr 9, p.1500-8. 2009.

Vila-Bedmar, R., M. Lorenzo e S. Fernandez-Veledo. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase-mammalian target of rapamycin cross talk regulates brown adipocyte differentiation. **Endocrinology**, v.151, n.3, Mar, p.980-92. 2010.

Virtanen, K. A., *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. **N Engl J Med**, v.360, n.15, Apr 9, p.1518-25. 2009.

Wang, X., *et al.* Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. **Endocrinology**, v.147, n.9, Sep, p.4160-8. 2006.

Wang, Z. e H. Gleichmann. Glucose transporter 2 expression: prevention of streptozotocin-induced reduction in beta-cells with 5-thio-D-glucose. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v.103 Suppl 2, p.83-97. 1995.

Welt, C., *et al.* Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.227, n.9, Oct, p.724-52. 2002.

Wieteska-Skrzeczynska, W., *et al.* Transcriptional dysregulation of skeletal muscle protein metabolism in streptozotocin-diabetic mice. **J Physiol Pharmacol**, v.60 Suppl 1, May, p.29-36. 2009.

Wilkes, J. J., D. J. Lloyd e N. Gekakis. Loss-of-function mutation in myostatin reduces tumor necrosis factor alpha production and protects liver against obesity-induced insulin resistance. **Diabetes**, v.58, n.5, May, p.1133-43. 2009.

Wolfman, N. M., *et al.* Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.26, Dec 23, p.15842-6. 2003.

Yaspelkis, B. B., 3rd, *et al.* Exercise reverses high-fat diet-induced impairments on compartmentalization and activation of components of the insulin-signaling cascade in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.293, n.4, Oct, p.E941-9. 2007.

Yoshioka, K., T. Yoshida e M. Kondo. Brown adipose tissue thermogenesis and metabolic rate contribute to the variation in obesity among rats fed a high fat diet. **Jpn J Physiol**, v.42, n.4, p.673-80. 1992.

Zhao, B., R. J. Wall e J. Yang. Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun**, v.337, n.1, Nov 11, p.248-55. 2005.

Zhao, H., *et al.* Repetitive exposures to low-dose X-rays attenuate testicular apoptotic cell death in streptozotocin-induced diabetes rats. **Toxicol Lett**, v.192, n.3, Feb 15, p.356-64. 2010.

Zimmers, T. A., *et al.* Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. **Science**, v.296, n.5572, May 24, p.1486-8. 2002.
