

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

ANDRÉ LUIS DE OLIVEIRA KRUG

**ANÁLISE TEMPORAL DOS EFEITOS PREVENTIVOS DO
EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE A ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA
POR DEXAMETASONA.**

**SÃO CARLOS - SP
FEVEREIRO- 2018**

ANDRÉ LUIS DE OLIVEIRA KRUG

**ANÁLISE TEMPORAL DOS EFEITOS PREVENTIVOS DO
EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE A ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA
POR DEXAMETASONA.**

Tese de doutorado apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor junto ao programa interinstitucional de pós-graduação em ciências fisiológicas associação ampla UFSCar\UNESP.

Orientadora: Prof^a Adj. Sandra Lia do Amaral Cardoso

**SÃO CARLOS - SP
FEVEREIRO- 2018**

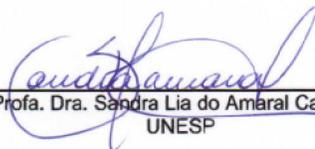


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato André Luis de Oliveira Krug, realizada em 27/03/2018:



Prof. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso
UNESP



Prof. Dr. Anderson Saranz Zago
UNESP



Prof. Dr. Alessandro Moura Zagatto
USP



Prof. Dr. Thiago José Dionísio
USP



Prof. Dr. Yuri Martins Costa
USP

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese primeiramente a Deus, pois sem ele nada é possível. A minha mãe e a meu pai (*in memoriam*) por serem os exemplos que guiaram-me até hoje, e que continuarão a guiar até o fim de meus dias. A minha esposa e filhos, aos quais dedico todas minhas intenções diárias. A minha família maravilhosa e amigos que foram de fundamental importância e que apesar de tamanha distância fizeram-se presentes da melhor forma possível.

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.

Aos secretários do programa interinstitucional de pós-graduação em ciências fisiológicas associação ampla UFSCar\UNESP por sua dedicação e disponibilidade.

Aos professores Jesus Carlos Andreo, André Luis Shinohara, Alessandra Medeiros e Patricia C. Brum, ao aluno de doutorado Mizaél Pereira e ao Dr. Wilson M. A. de Moraes pelo inenarrável auxílio das análises.

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

Aos meus amigos e anfitriões na cidade de São Carlos.

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

A minha orientadora e mentora Dr^a Sandra Lia do Amaral Cardoso, a qual acolheu um jovem vindo de longe em seu laboratório para pleitear uma de suas vagas de mestrado há muito tempo. Obrigado pela oportunidade de realizar o doutorado sobre sua supervisão, por entender as dores da distância de casa, da necessidade de estar mais presente a minha família e filhos, 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 esposa Viviane que com certeza tem muita paciência para me ouvir, por ter suportado nossa distância, por segurar toda a responsabilidade de nossos filhos sozinha e por acreditar que faço algo por nós. Gata te amo! Você é uma mulher guerreira!

Ao irmão, que colaborou imensamente com a manutenção da qualidade de vida de nossa mãe em toda minha ausência. Brother te amo.

A minha mãe Marta que sempre me apoiou e confortou em todos os momentos que julguei difíceis. A felicidade em seu olhos com minhas conquistas é o que me faz prosseguir. Seu amor me completa. 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

Os glicocorticoides sintéticos possuem potente ação anti-inflamatória e imunossupressora, entretanto seu uso crônico pode desencadear atrofia muscular. Por outro lado o treinamento resistido (TR) contrapõe-se a situações atroficas, embora seus efeitos sobre a atrofia muscular induzida pelo tratamento com dexametasona (DEX) são pouco conhecidos. O presente trabalho teve como objetivo verificar qual é o momento em que o efeito preventivo do TR (80% do carregamento máximo) é mais efetivo sobre a redução peso corporal e atrofia muscular induzidas pelo tratamento com DEX. Separamos 100 ratos Wistar machos em 10 grupos: sedentário controle (SED CTRL); sedentário tratado com DEX (SED DEX); treinado controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL e TR100 CTRL) e treinado tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX). Utilizamos o TR em escada (80% TCM). Nos 10 últimos dias os animais receberam DEX (0,5 mg/kg por dia, *i.p.*) ou o mesmo volume de salina. O músculo flexor longo do hálux (FHL) foi removido, limpo, pesado e armazenado para determinação da área de seção transversa, atividade do proteassoma 26s, e produção proteica de p70S6K total, p-p70S6K^{Thr389}, MuRF1, REDD1 e GAPDH. Os resultados são apresentados como média±EPM. Foi utilizada análise de variância de dois caminhos (ANOVA) para medidas repetidas para ingestão alimentar e para as variáveis restantes foi utilizada a ANOVA de dois caminhos. Na presença de interação, foi utilizado o *posthoc* de Tukey, com significância de $\alpha < 0,05$. A DEX reduziu 26% a massa muscular do FHL, mas o grupo TR70 e TR100 DEX apresentaram essa atrofia atenuada. O tratamento com DEX reduziu a atividade do proteassoma nos grupos SED (-33%) e TR70 DEX (-44%). O grupo TR70 CTRL teve sua atividade do proteassoma aumentada em relação aos grupos TR10 e TR40 CTRL (+48% e +51%, respectivamente), além do mais, o grupo TR100 CTRL teve sua atividade reduzida (-56%). A DEX reduziu a razão p-p70S6K^{Thr389}/p70S6k total no grupo SED DEX (-24%), mas essa resposta foi revertida no grupo TR10 (+48%) e TR70 (+70%) DEX. O grupo TR70 CTRL apresentou valores superiores dessa razão em relação aos grupos SED, TR40 e TR100 CTRL. A DEX aumentou a produção proteica de REDD1 (+47%) somente no grupo SED DEX. A produção proteica de MuRF1 foi aumentada nos grupos SED (+50%), TR10 (+45%) e TR40 (+46%) DEX, mas essa resposta foi completamente bloqueada nos grupos TR70 TR100 DEX. Com base nos resultados do presente estudo, pode-se sugerir que a atrofia muscular induzida por DEX no músculo FHL necessita de pelo menos 70 dias de TR para ser atenuada e essa resposta parece envolver o completo bloqueio dos aumentos de MuRF1 e REDD1, somados ao bloqueio da redução da razão p-p70S6K^{Thr389}/p70S6k. Além disso, 100 dias de TR não provocaram nenhum efeito preventivo adicional. É interessante notar que o TR, mesmo realizado por curto período (10 dias), promove melhorias na via de síntese de proteínas, o que sugere que alguns ajustes moleculares são necessários em estágios iniciais da manutenção da massa muscular.

Palavras chave: treinamento resistido em escada, atrofia muscular, glicocorticoides, músculo esquelético, força, hipertrofia muscular, p70S6k fosforilada.

ABSTRACT

Synthetic glucocorticoids have potent anti-inflammatory and immunosuppressive action, though its chronic usage can trigger muscle atrophy. On the other hand the resistance training (RT) acts in opposition to atrophic situations, although its effects on muscle atrophy induced by treatment with dexamethasone (DEX) are poorly known. The purpose of this study was to determine how long RT is required to promote preventive effects in flexor hallucis longus (FHL) muscle atrophy induced by dexamethasone (DEX). After maximal voluntary carrying capacity (MVCC), 100 rats were separated in sedentary (SED) or resistance trained for 10 (RT10), 40 (RT40), 70 (RT70) and 100 (RT100) days. Groups were divided as control (CTRL) or treated with DEX. RT was performed with 80% of maximal voluntary carrying capacity (MVCC). During the last 10 days, the animals either received DEX (0.5 mg/kg/day, *i.p.*) or vehicle (saline, same volume as DEX treatment, *i.p.*). The FHL muscle was removed, cleaned, weighed and stored for determining the cross-sectional area, proteasomal activity 26s, and total p70S6K, p-p70S6K^{Thr389}, MuRF1, REDD1 and GAPDH protein level. The results are presented as mean \pm SEM. The repeated measures two-way analysis of variance (ANOVA) were used for food intake and, for further analysis, it was used two-way ANOVA, both with Tukey post hoc test and significance level set as $\alpha < 0.05$. DEX reduced FHL mass (-26%), but RT70 and RT100 DEX groups presented atrophy attenuation. DEX reduced proteasome activity in SED (-33%) and RT70 (-44%) DEX. RT70 CTRL had increased proteasome activity when compared with RT10 and RT40 CTRL (+48% and +51%, respectively) groups and RT100 CTRL had reduced activity (-56%). DEX reduced phospho-p70S6K^{Thr389}/total p70S6k ratio in SED DEX (-24%), but it was reverted in RT10 (+48%) and RT70 DEX (+70%). RT70 CTRL presented higher values of this ratio than SED, RT40 and RT100 CTRL groups. DEX increased REDD1 (+47%) protein level only in SED DEX. MuRF-1 protein level increased in SED (+50%), RT10 (+45%) and RT40 (+46%) DEX groups, but it was blocked in RT70 and RT100 DEX groups. In summary, we suggest that DEX-induced FHL muscle atrophy requires at least 70 days of RT to be attenuated and this response involves a complete blockade of MuRF-1 and REDD1 protein level increase and the blockade phospho-p70S6K^{Thr389}/total p70S6k ratio reduction. Also, 100 days of RT did not promote any additional effects. It is interesting to note that only 10 days of RT evoked improvements in the synthesis pathway, which suggest that some molecular adjustments are required in early stages of skeletal muscle mass maintenance.

Keywords: glucocorticoids; ladder climbing; muscle atrophy; skeletal muscle; p70S6k phosphorylation; strength; hypertrophy training.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema 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). Setas pontiagudas representam estimulação/aumento de atividade e setas sem pontas representam inibição/diminuição da atividade. IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, IRS-1: substrato do receptor de insulina tipo 1, PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase, AKT: treonina\serina tirosina quinase ou proteína quinase B - PKB, mTOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos, p70S6K: proteína quinase ribossomal S6, miostatina: fator de crescimento e diferenciação-8, FOXO: família de proteínas das vias de sinalização da insulina ou Forkhead transcription factors, atrogina-1 ou MAFbx: Muscle Atrophy F-box protein, MuRF1: Muscle Ringer Finger – 1 e REDD1: Fator de regulação do desenvolvimento e respostas de dano no DNA-1. Adaptado de Engerman e Glass (2014). 16
- Figura 2.** Esquema do Sistema Ubiquitina-Proteassoma (UPS). Ub: Molécula de ubiquitina, E1: Enzima ativadora de ubiquitina, E2: Enzima conjugadora de ubiquitina, E3: ubiquitinasligases. Adaptado de Murtonet al. 2008. 17
- Figura 3.** Linha de tempo do protocolo experimental composta por 12 semanas mais 10 dias de tratamento. PC: Peso corporal, TCM: Teste de carregamento máximo. Quadrados em preenchimento representam semanas sem realização de treinamento nem exposição ao tratamento; quadrados preenchidos em cinza claro implicam na realização de treinamento resistido, quadrados hachurados representam dias de tratamento, quadrados preenchidos em preto representam dia da eutanásia. 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). 24
- Figura 5.A:** Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-4 e TCM-1 normalizados pelo PC; **B:** Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-5 e TCM-4 normalizados pelo PC. Grupos avaliados: sedentário controle (SED CTRL), sedentário tratado com DEX(SED DEX), treinado Controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL e TR100 CTRL) e treinado tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX). ANOVA Two-way. Significância: * vs respectivo controle, + vs respectivo sedentário, 10 vs respectivo TR10, 40 vs respectivo TR40, $p < 0,05$ 29
- Figura 6.** A: Valores de peso corporal (PC) pré-tratamento; B: Valores de peso corporal (PC) ao final do protocolo experimental. Grupos avaliados: sedentário controle (SED CTRL), sedentário tratado com DEX (SED DEX), treinado Controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL e TR100 CTRL) e treinado tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX). ANOVA Two-way. Significância: * vs respectivo controle, $p < 0,05$ 31
- Figura 7.** A: Ingestão alimentar relativa 3 dias antes e durante os 10 dias de tratamento com DEX onde foram reunidos todos os animais CTRL e DEX em dois grupos distintos, B: Média dos valores de área sob a curva (AUC) da ingestão alimentar de 3 dias antes e durante os 10 dias de tratamento com DEX em todos os grupos analisados. Grupos avaliados: sedentário controle (SED CTRL), sedentário tratado com DEX(SED DEX), treinado Controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL e TR100 CTRL) e treinado tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40

DEX, TR70 DEX e TR100 DEX). ANOVA Two-way (B). ANOVA Two-way para medidas repetidas (A). Significância: * vs respectivo controle, + vs respectivo sedentário, # vs início. $p < 0,05$ 33

Figura 8. Atividade proteossomal no sítio da quimiotripsina e estrutura muscular do flexor longo do hálux (FHL). A: Atividade do proteossoma no sítio da quimiotripsina. B: Área de secção transversa (AST) do músculo FHL. Grupos avaliados: sedentário controle (SED CTRL), sedentário tratado com DEX (SED DEX), treinado Controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL e TR100 CTRL) e treinado tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX). ANOVA Two-way. Significância: * vs respectivo controle, + vs respectivo sedentário, 10 vs respectivo TR10, 40 vs respectivo TR40, 70 vs respectivo TR70. $p < 0,05$ 34

Figura 9. Correlação entre o teste de carregamento máximo final (TCM) e a área de secção transversa (AST) do FHL após o tratamento com DEX. Significância: * Correlação significativa utilizando o teste de correlação de Pearson, $p < 0,05$ 35

Figura 10. Efeito do treinamento resistido de alta intensidade sobre a via atrófica e hipertrófica do músculo flexor longo do hálux (FHL). A: Análise densitométrica razão entre as proteínas p-p70S6K^{Thr389}/p70S6k. B: REDD1 e C: MuRF1. Grupos avaliados: sedentário controle (SED CTRL), sedentário tratado com DEX (SED DEX), treinado Controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL e TR100 CTRL) e treinado tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX). ANOVA Two-way. Significância: * vs respectivo controle, + vs respectivo sedentário, 40 vs respectivo TR40, 100 vs respectivo TR100. $p < 0,05$ 36

Figura 11. Correlação entre a produção proteica de p-p70S6K^{Thr389}/p70S6k (A), REDD1 (B) e MuRF1 (C) e a área de secção transversa (AST) do FHL após o tratamento com DEX. Significância: * Correlação significativa utilizando o teste de correlação de Pearson, $p < 0,05$ 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valor total ds glândulas adrenais (GA), ingestão alimentar total (IA), tamanho do osso da tíbia e massa muscular normalizada pela tíbia do flexor longo do hálux (FHL) nos 10 grupos analisados	28
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- AKT:** Treonina\serina tirosina quinase.
- ANOVA:** Análise de variância.
- AST:** Área de secção transversa.
- ATP:** Trifosfato de adenosina.
- BSA:** Albumina bovina.
- CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais.
- DEX:** Dexametasona.
- E1:** Enzima ativadora de Ubiquitina.
- E2:** Enzima conjugadora de Ubiquitina.
- E3:** Ubiquitina-ligases.
- EDL:** Extensor longo dos dedos.
- EPM:** Erro padrão da média.
- FHL:** Músculo Flexor longo do hálux.
- FOXO:** Família de proteínas sensoras das vias de sinalização da insulina.
- g:** Gramas.
- GA:** Gastrocnêmio
- GAPDH:** Gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase
- GC:** Glicocorticoides.
- IA:** Ingestão alimentar.
- IGF-I:** Fator de crescimento semelhante à insulina 1.
- IRS-1:** Substrato do receptor de insulina-1.
- Kg:** Quilogramas.
- LLVY-AMC:** Substrato fluorogênico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin.
- MAFbx:** Atrogin-1/Muscle Atrophy F-box
- Mg:** Miligramas.
- MgCl₂:** Cloreto de magnésio.
- Miostatina:** Fator de crescimento e diferenciação-8.
- mTOR:** Proteína alvo da rapamicina em mamíferos.
- MuRF-1:** Muscle Ringer Finger Protein 1.
- OCT:** Optimal Cutting Temperature.
- p70S6K:** Proteína Ribossomal S6 quinase.
- PC:** Peso corporal.

PI3K:Fosfatidilinositol 3 quinase.

PIC: Coquetel inibidor de proteases.

PMSF: Fluoreto de fenilmetanosulfonil.

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

RIPA: Tampão de lise celular.

SED CTRL: Ratos sedentários controle.

SED DEX : Ratos sedentários tratados com dexametasona.

SOL: Músculo sóleo.

TA: Músculo Tibial anterior.

TCM: Teste de carregamento máximo.

TR: Treinamento resistido.

TR10 CTRL: Animais que realizaram TR somente durante o período de tratamento (10 dias) e receberam solução salina nos últimos 10 dias (salina, mesmo volume que a DEX, *i.p.*).

TR10 DEX: Animais que realizaram o TR somente durante o período de tratamento (10 dias) e receberam tratamento farmacológico com DEX nos últimos 10 dias.

TR100 CTRL: Animais que realizaram TR durante 100 dias e receberam solução salina nos últimos 10 dias (salina, mesmo volume que a DEX, *i.p.*).

TR100 DEX: Animais que realizaram o TR durante 100 dias e receberam tratamento farmacológico com DEX nos últimos 10 dias.

TR40 CTRL: Animais que realizaram TR durante 40 dias e receberam solução salina nos últimos 10 dias (salina, mesmo volume que a DEX, *i.p.*).

TR40 DEX: Animais que realizaram o TR durante 40 dias e receberam tratamento farmacológico com DEX nos últimos 10 dias.

TR70 CTRL: Animais que realizaram TR durante 70 dias e receberam solução salina nos últimos 10 dias (salina, mesmo volume que a DEX, *i.p.*).

TR70 DEX: Animais que realizaram o TR durante 70 dias e receberam tratamento farmacológico com DEX nos últimos 10 dias.

TRIS:Trisaminometano.

Ub:Ubiquitina.

UNESP: Universidade Estadual Paulista.

UPS: Sistema Ubiquitinaproteassoma.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. HIPÓTESES	21
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS	22
4.2. TESTE DE CARREGAMENTO MÁXIMO E PROTOCOLO TREINAMENTO RESISTIDO	24
4.3. RETIRADA DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS.	25
4.4. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	25
4.5. ANÁLISES DA ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA	25
4.6. ATIVIDADE DO PROTEASSOMA	25
4.7. PROCESSAMENTO PARA WESTERN BLOTTING – PRODUÇÃO PROTEICA	26
5. ANÁLISE DE RESULTADOS E MÉTODOS ESTATÍSTICOS	27
6. RESULTADOS	28
6.1 TESTE DE CARREGAMENTO MÁXIMO	28
6.2 GLÂNDULA ADRENAL E OSSO DA TÍBIA	29
6.3 PESO CORPORAL	31
6.4 INGESTÃO ALIMENTAR	32
6.5 MÚSCULO ESQUELÉTICO – FHL (PESO MUSCULAR, ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA E ATIVIDADE DO PROTEASSOMA)	33
6.6 ANÁLISE DE PRODUÇÃO PROTEICA	35
7. DISCUSSÃO	38
8. CONCLUSÃO	43
9. REFERÊNCIAS	44
10. ANEXOS	54
10.1. ANEXO 1- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	54
10.2. ANEXO 2 - PARECER DO PIPGCF	55

1. INTRODUÇÃO

A administração exógena de cortisol e glicocorticoides (GC) sintéticos é muito utilizada na clínica devido a seus efeitos anti-inflamatórios e antialérgicos (Tsigos e Chrousos, 2002; Ma *et al.*, 2011; Rebeyrol *et al.*, 2012). Embora sejam importantes no tratamento de diversas afecções, os GC sintéticos podem vir a gerar diversos efeitos deletérios se sua administração for negligenciada quanto ao tempo de tratamento e dose utilizada. A dexametasona (DEX), potente glicocorticoide sintético, pode vir a desencadear hiperglicemia, resistência periférica à insulina, hiperinsulinemia, diminuição do glicogênio muscular, aumento de albumina e colesterol total, redução do peso corporal (PC) e atrofia muscular (Kaasik *et al.*, 2007; Lellis-Santos, 2007; Pinheiro *et al.*, 2009; Barel *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2010; Nicastro, Gualano, *et al.*, 2012; Dionisio *et al.*, 2014; Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2016).

A redução do PC causada pelo tratamento com DEX é comumente reportada na literatura e manifesta-se independente da dosagem (Ma *et al.*, 2003; Ahtikoski *et al.*, 2004; Gilson *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2010; Macedo *et al.*, 2014). Embora os mecanismos envolvidos nesta resposta não estejam totalmente elucidados, uma possível explicação é a redução da ingestão alimentar (IA) (Lewis *et al.*, 2003; Lellis-Santos, 2007). Outra possível explicação para a redução do PC seria a atrofia muscular (Ma *et al.*, 2003; Gilson *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2010). A homeostase muscular é mantida por um balanço entre o total de síntese de proteínas/regeneração e degradação proteica/apoptose. Sendo assim, há uma interação entre múltiplas vias de sinalização responsáveis pela formação tanto de proteínas hipertróficas como proteínas atroficas, como visto na Figura 1. Dentre as proteínas hipertróficas destaca-se o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), substrato do receptor de insulina tipo 1 (IRS-1), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), a treonina/serina tirosina quinase ou proteína quinase B – PKB (AKT), proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e a proteína quinase ribossomal S6 (p70S6K). Por outro lado, encontram-se as proteínas relacionadas ao catabolismo proteico, como o fator de crescimento e diferenciação-8 (miostatina), família de proteínas das vias de sinalização da insulina ou Forkhead transcription factors (FOXO), MuscleAtrophy F-box protein(MAFbx), também chamada de atrogina-1, Muscle Ringer Finger – 1(MuRF1)e Fator de regulação do desenvolvimento e respostas de dano no DNA-1 (REDD1) (Schakman *et al.*, 2013; Egerman e Glass, 2014).

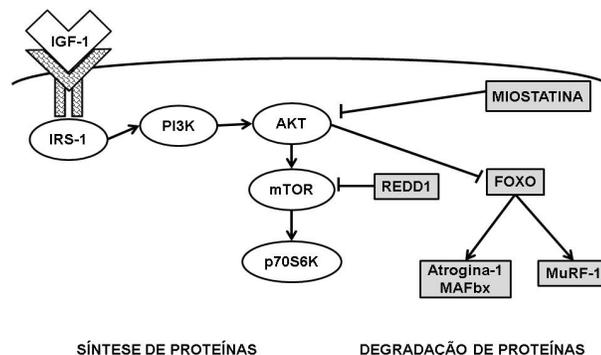


Figura 1. Esquema da sequência de eventos que controlam a homeostase do músculo esquelético. Proteínas responsáveis na síntese proteica/hipertrofia (sem preenchimento) e proteínas responsáveis pela degradação proteica/atróficas (preenchidas em cinza). Setas pontiagudas representam estimulação/aumento de atividade e setas sem pontas representam inibição/diminuição da atividade. IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, IRS-1: substrato do receptor de insulina tipo 1, PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase, AKT: treonina/serina tirosina quinase ou proteína quinase B - PKB, mTOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos, p70S6K: proteína quinase ribossomal S6, miostatina: fator de crescimento e diferenciação-8, FOXO: família de proteínas das vias de sinalização da insulina ou Forkhead transcription factors, atrogina-1 ou MAFbx: Muscle Atrophy F-box protein, MuRF1: Muscle Ringer Finger – 1 e REDD1: Fator de regulação do desenvolvimento e respostas de dano no DNA-1. Adaptado de Engerman e Glass (2014).

O mecanismo pelo qual a DEX provoca a atrofia muscular não se encontra totalmente elucidado. Alguns autores têm demonstrado que a DEX age sobre a musculatura esquelética inibindo a síntese proteica (Ma *et al.*, 2003; Adams, 2007; Kaasik *et al.*, 2007; Castellero *et al.*, 2013), no entanto, outros autores sugerem que a DEX aumenta o catabolismo proteico pelo aumento de miostatina (Ma *et al.*, 2003; Gilson *et al.*, 2007) ou pela ativação do sistema ubiquitina proteassoma (UPS) (Li *et al.*, 2014; Macedo *et al.*, 2014). O UPS, demonstrado na Figura 2, é a principal via de degradação celular e tem a função de marcar proteínas a serem degradadas. O processo depende de 3 enzimas (E1: ativadora de Ub; E2: conjugadora de Ub e E3: Ub-ligases) e inicia-se com a ativação da molécula de Ub pela E1 (processo ativo) (Murton *et al.*, 2008). Tem sido demonstrado que as E3 Ub-ligases conferem especificidade ao UPS e estão sendo consideradas como marcadores de atrofia. Em relação à atrofia muscular, existem duas representantes expressas na musculatura esquelética e cardíaca: a MuRF1 e a atrogina-1. Foram evidenciados aumentos tanto de MuRF1 como de atrogina-1 em modelos experimentais atrofícos de desnervação, imobilização e suspensão de musculatura (Bodine *et al.*, 2001; Adams, 2007), bem como em outras situações atrofícas causadas por patologias (Gomes *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2010). Em relação à atrofia induzida por DEX, uma simples dose de DEX determina aumento de vários genes incluindo atrogina-1 e MuRF1 no músculo gastrocnêmio (GA) (Shimizu *et al.*, 2011). De forma aguda, 24 horas de DEX (1µmol/L) provoca a redução no diâmetro de miotubos (Castillero *et al.*, 2013) e, de forma crônica (3 ou 14 dias), a DEX (3mg/kg)

promove atrofia muscular no tibial anterior (TA) e tríceps sural de camundongos (Baehr *et al.*, 2011), ambas essas respostas foram atribuídas ao aumento gênico e proteico de atrogina-1 e MuRF1.

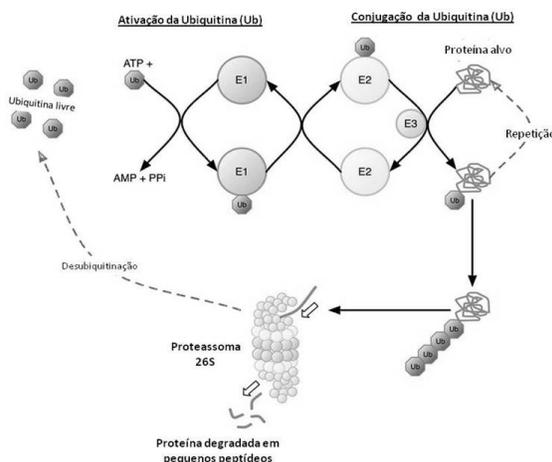


Figura 2. Esquema do Sistema Ubiquitina-Proteassoma (UPS). Ub: Molécula de ubiquitina, E1: Enzima ativadora de ubiquitina, E2: Enzima conjugadora de ubiquitina, E3: ubiquitinasligases. Adaptado de Murtonet al. 2008.

Apesar de atrogina-1 e MuRF1 serem consideradas importantes em modelos de atrofia induzidos por DEX (Cho *et al.*, 2010; Castellero *et al.*, 2013), demonstramos recentemente (Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2016) que a atrofia muscular induzida por tratamento crônico com DEX estava mais associada a aumentos de MuRF-1 do que atrogina-1. O que tem respaldo nos achados que demonstram que camundongos nocauteados para o gene da MuRF1 não apresentaram atrofia induzida pela DEX, diferente daqueles nocauteados para o gene da atrogina-1, que ainda apresentaram redução de massa do músculo tríceps sural e tibial anterior (Baehr *et al.*, 2011).

Importante destacar que tem sido observado que a DEX age preferencialmente sobre músculos de contração rápida (glicolíticos) comparados a músculos de contração lenta (oxidativos) (Pellegrino *et al.*, 2004), fato este que vem sendo confirmado por nosso laboratório (Barel *et al.*, 2010; Dionisio *et al.*, 2014; Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2016). Uma das possíveis explicações para essa maior sensibilidade dos músculos glicolíticos, tais como o TA e GA, seria a maior quantidade de receptores de GC quando comparados a músculos oxidativos, como o sóleo (SOL) (Shimizu *et al.*, 2011). Outra explicação seria a diminuição da atividade da enzima succinato desidrogenase (enzima que confere proteção contra atrofia) após tratamento com DEX. A redução da atividade dessa enzima foi verificada nas fibras tipo II do diafragma e GA superficial (glicolítico) de hamsters tratados com DEX

(7,5mg/kg por 21 dias, *s.c.*) (Lewis *et al.*, 1992). Embora controversa, a atrofia muscular no SOL, com concomitante aumento gênico de atrogina-1 e MuRF1 após tratamento com DEX por 5 ou 7 dias com 0,6mg/kg pode ser observada na literatura (Yamamoto *et al.*, 2010; Baptista *et al.*, 2013).

O exercício físico de maneira geral provoca inúmeros benefícios na musculatura esquelética a quem o pratica, com isso tem sido recomendado como tratamento não farmacológico para diversas patologias como hipertensão, obesidade, sarcopenia, diabetes, osteoporose e câncer (Carvalho T *et al.*, 1996; Hanson *et al.*, 2009). Da mesma forma, alguns trabalhos, assim como de nosso laboratório, têm utilizado o exercício físico na atenuação dos efeitos colaterais provocados pela DEX (Barel *et al.*, 2010; Nicastro, Zanchi, *et al.*, 2012; Dionisio *et al.*, 2014; Macedo *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2016; Krug *et al.*, 2016; Constantino *et al.*, 2017; Herrera *et al.*, 2017).

Nosso grupo destaca-se por utilizar o exercício físico anteriormente ao tratamento com DEX, o que permite verificar o efeito preventivo do treinamento físico. Demonstramos recentemente que o treinamento aeróbio a 60% da capacidade física máxima dos animais, realizado durante 8 semanas, foi efetivo em atenuar a atrofia no músculo extensor longo dos dedos (EDL), mas não no TA, induzidas por 10 dias de tratamento com DEX a 1 mg/kg por dia e atenuar a hiperglicemia de jejum e hiperinsulinemia provocadas pelo tratamento, possivelmente pela melhora no transporte de glicose dependente de insulina (Barel *et al.*, 2010; Dionisio *et al.*, 2014).

Por outro lado, o treinamento resistido (TR) na escada de baixa intensidade, ou seja, a 60% do carregamento máximo dos animais, foi efetivo em atenuar a atrofia no músculo flexor longo do hallux (FHL) e aboliu totalmente a resposta hiperglicêmica encontrada após tratamento com DEX (0,5 mg/kg por 10 dias). A atenuação da atrofia muscular foi atribuída a um menor aumento do conteúdo total proteico de MuRF1, redução de AKT e atrogina-1 (Macedo *et al.*, 2014). Utilizando uma intensidade maior, de 80% do carregamento máximo dos animais, observamos que a atenuação da atrofia muscular estava associada à atenuação do aumento da MuRF-1 e aumentos de mTOR e p70S6K (Krug *et al.*, 2016).

Em relação à musculatura esquelética, resultados controversos são observados na literatura, principalmente devido à utilização de diferentes protocolos, intensidades, duração e momento do treinamento (concomitante ou não ao tratamento). Além disso, as diferentes dosagens e vias de administração também podem influenciar nas respostas observadas. Seguindo essa linha, ratas tratadas com DEX (1 mg/Kg, *i.p.*) e treinadas em esteira por 3 ou 10 dias apresentaram atenuação da atrofia do EDL (Ahtikoski *et al.*, 2004), concordando com

resultados prévios que verificaram 30% de atenuação da atrofia no músculo plantar após 11 dias de treinamento e tratamento com DEX (100 mg/kg) (Czerwinski *et al.*, 1989). Por outro lado, existem relatos de que não foram verificadas reduções da atrofia no músculo GA após 30 dias de treinamento aeróbico espontâneo e tratamento com DEX (0,5 mg/kg) (Pinheiro *et al.*, 2009). Da mesma forma, não foi observada atenuação da atrofia no diafragma e GA de ratos tratados com DEX (7,5mg/kg por 18 dias), após realizarem um curto treinamento aeróbico em esteira (7 dias) que foi interrompido durante o tratamento (Menezes *et al.*, 2007). Resultados de nosso laboratório revelaram que o treinamento aeróbico também não foi efetivo em atenuar atrofia muscular induzida por DEX (1mg/kg por dia, 10 dias) (Barel *et al.*, 2010; Dionisio *et al.*, 2014).

O TR aparece na literatura como o mais efetivo em atenuar a atrofia muscular, pois atua diretamente sobre a musculatura esquelética. Com isso vários autores têm se dedicado ao uso do TR sob diversas perspectivas (Baar e Esser, 1999; Hornberger e Farrar, 2004; Barauna *et al.*, 2007; Zanchi *et al.*, 2009; Domingos *et al.*, 2012). Neste sentido, nosso grupo vem se empenhando em encontrar a melhor estratégia para atenuar a atrofia muscular induzida pela DEX. Já demonstramos que ao utilizar o TR a 60% do carregamento máximo dos animais por 8 semanas antes e concomitante ao tratamento com DEX (0,5 mg/kg por 10 dias) obtivemos atenuação da atrofia muscular no FHL, mas não no TA, além disso, não houve aumento no peso muscular (hipertrofia) de nenhum músculo analisado (Macedo *et al.*, 2014). Observamos recentemente que o treinamento numa intensidade maior, ou seja, a 80% do carregamento máximo na escada, atenuou a resposta atrofica induzida por DEX no músculo FHL além de promover hipertrofia nos animais não tratados (Krug *et al.*, 2016). Assim, parece que a intensidade do TR influencia positivamente a resposta muscular. No entanto, a resposta ainda foi restrita ao FHL.

Concordando com estes resultados, observamos na literatura que foram verificados aumentos no peso muscular e da área de secção transversa do FHL após 8 semanas de TR de alta intensidade em escada (Hornberger e Farrar, 2004). Nove semanas de TR foram suficientes para provocar o aumento na massa muscular e área de secção transversa do GA (Luo *et al.*, 2013) e 10 semanas de TR, aumentou o peso total da perna de ratos treinados em escada (Domingos *et al.*, 2012). Maiores períodos de tempo, como 26 semanas de TR na escada, foram eficientes em promover aumentos na massa muscular normalizada pelo PC dos músculos EDL, SOL e reto femoral dos ratos treinados (Duncan *et al.*, 1998). Utilizando outra forma de TR, pode-se observar aumentos da massa muscular do flexor plantar, SOL e GA após submeter ratos ao TR tipo agachamento de alta intensidade por 8 semanas (Wirth *et al.*,

2003) e, mais recentemente, o TR tipo agachamento de curta duração (por apenas 3 dias) a 70% da capacidade física máxima, concomitante ao tratamento com DEX (5 mg/kg/dia, água de beber) provocou atenuação da atrofia do músculo plantar nos grupos treinados, quando comparados aos sedentários tratados com DEX (Nicastro, Zanchi, *et al.*, 2012). Já havia sido reportado um aumento da massa muscular do TA e EDL após 6 semanas de estimulação elétrica (alta intensidade-100Hz) que simulava o TR (Baar e Esser, 1999).

Observando estes estudos em conjunto, destaca-se que muito pouco se sabe em relação ao TR frente aos efeitos colaterais do tratamento com DEX. Apenas dois grupos (incluindo nosso grupo) dedicam-se ao estudo desse contexto. Outro grupo verificou que ratos tratados com DEX (5 mg/kg/ por 7 dias em água de beber) concomitantemente treinados por 3 dias a 70% da capacidade física máxima apresentavam maior peso muscular do plantar total e normalizado pelo PC basal do que dos animais somente tratados com DEX (Nicastro, Zanchi, *et al.*, 2012). Nosso grupo já verificou que ratos treinados por 8 semanas em escada a 60% ou 80% do carregamento máximo apresentavam menor atrofia do músculo FHL induzida pela DEX (0,5 mg/kg por 10 dias) quando comparados aos ratos sedentários tratados com DEX (Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2016).

Os resultados disponíveis até o presente momento permitem a observação de que os protocolos de TR e período de realização são muito diversificados, desde protocolos curtos (3 dias) a muito longos (26 semanas), o que dificulta a determinação de um período de treinamento ideal. Além disso, apesar da atrofia muscular ser um importante efeito colateral da DEX, existem poucos estudos que realmente avaliam os efeitos do treinamento físico resistido como estratégia não farmacológica para este efeito. Dentre os que estudam, existe muita diferença nos protocolos, tanto de administração da DEX como de tipo e tempo de TR. Neste sentido, mais estudos são necessários para que se defina qual o tempo mínimo de exercício para a obtenção de resultados benéficos.

2. HIPÓTESES

Foi hipótese deste estudo que os animais submetidos a um maior tempo de TR de alta intensidade tivessem maiores efeitos preventivos em comparação aos animais que realizaram o TR por curto período de tempo ou permaneceram sedentários.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar as alterações morfo-funcionais e moleculares induzidas pelo treinamento físico resistido de alta intensidade em diferentes períodos de treinamento, no sentido de se determinar qual momento é mais efetivo sobre a redução do PC e atrofia muscular induzidas pelo tratamento com dexametasona.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

1. Avaliar a efetividade do TR realizado por 10, 40, 70 ou 100 dias, e se este resultado pode ser comprometido pelo tratamento com DEX. Para tanto será observada a capacidade de carregamento máximo na escada durante e após estes 4 períodos de treinamento nos animais sedentários e treinados, tratados ou não com DEX;
2. Avaliar os mecanismos moleculares responsáveis pela atrofia muscular induzida pela DEX. Para tanto serão avaliados: Massa muscular, atividade do proteossoma 26S e produção proteica de p70S6K total e fosforilada, MuRF1 e REDD1 no músculo FHL
3. Analisar as alterações morfo-funcionais promovidas pela DEX e os ajustes induzidos pelos diferentes protocolos de TR. Para isso foi realizada a análise histológica para a determinação da área de secção transversa das fibras do músculo FHL.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 100 ratos Wistar machos (200g) com 2 meses de idade e provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de Animais da UNESP (Campus de Botucatu) que foram mantidos no Biotério de Manutenção da Faculdade de Ciências da UNESP (Campus de Bauru) com ciclo dia-noite de 12:12 horas e temperatura controlada (22 °C). Ração (NUVILAB®) e água foram fornecidas *ad libitum*. O projeto foi analisado e aprovado junto a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências de Bauru, da Universidade Estadual Paulista – UNESP (processo nº 1435/2014 Vol. 1 CEUA/FC-ANEXO 1). A Figura 3 ilustra a linha do tempo dos diferentes grupos experimentais que foram avaliados. Todos os animais foram expostos às avaliações, treinamentos e tratamentos com a mesma idade, sendo assim, a idade inicial do treinamento sofreu alterações. Os animais sedentários foram adaptados à escada a cada 15 dias para que não perdessem a capacidade de escalar. Os animais foram separados homogeneamente pelo PC para constituir os grupos descritos a seguir.

Grupos sedentários:

Sedentário Controle (SED CTRL, n:10): composto por animais que permaneceram sedentários durante todo o protocolo experimental (100 dias) e foram tratados com solução salina nos últimos 10 dias (salina, mesmo volume que a DEX, intraperitoneal (*i.p.*)).

Sedentário Tratado com DEX (SED DEX, n:10): composto por animais que permaneceram sedentários durante todo o protocolo experimental (100 dias) e foram tratados com DEX nos últimos 10 dias (Decadron®, 0,5 mg/kg por dia, *i.p.* Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. Guarulhos, SP, Brasil).

Grupos treinados:

Treinado Controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70CTRL e TR100 CTRL. n:10 por grupo): composto por animais que realizaram o TR somente durante o período de tratamento (10dias) ou 40, 70 e 100 dias e receberam solução salina nos últimos 10 dias (salina, mesmo volume que a DEX, *i.p.*).

Treinado Tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX. n:10 por grupo): composto por animais que realizaram o TR somente durante o período de tratamento (10dias) ou 40, 70 e 100 dias e receberam tratamento farmacológico com DEX nos últimos 10 dias (Decadron®, 0,5 mg/kg por dia, *i.p.* Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. Guarulhos, SP, Brasil).

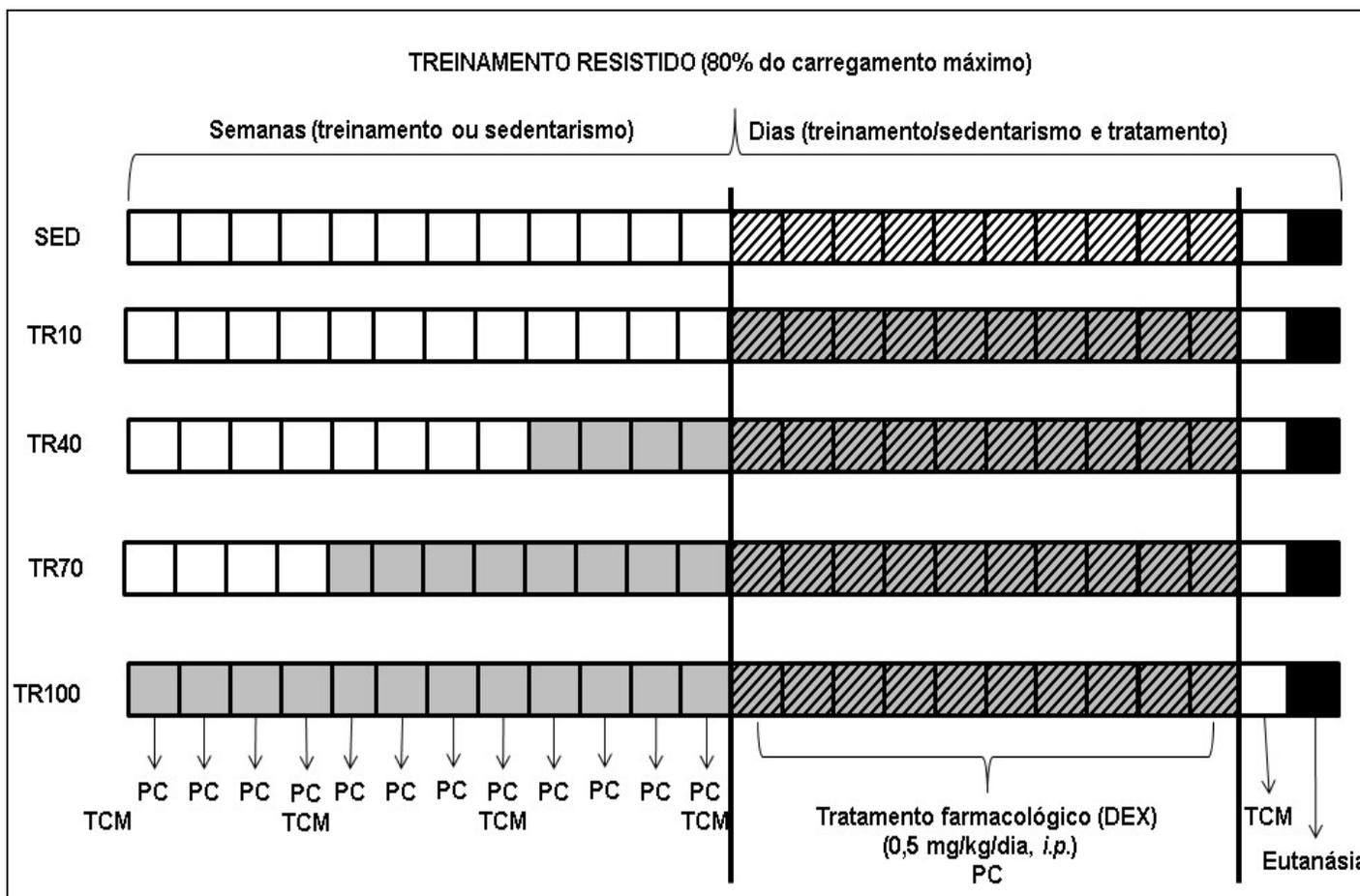


Figura 3. Linha de tempo do protocolo experimental composta por 12 semanas mais 10 dias de tratamento. PC: Peso corporal, TCM: Teste de carregamento máximo. Quadrados em branco representam semanas sem realização de treinamento nem exposição ao tratamento; quadrados preenchidos em cinza representam a realização de treinamento resistido, quadrados hachurados representam dias de tratamento, quadrados preenchidos em preto representam dia eutanásia.

4.2. TESTE DECARREGAMENTO MÁXIMO E PROTOCOLO TREINAMENTO RESISTIDO

A avaliação da carga máxima e o TR foram executados em escada (110 cm de altura, com 54 degraus de ferro posicionados a cada 2 cm e 80 graus de inclinação) como pode-se observar na Figura 4. O protocolo seguiu descrito previamente por nosso grupo (Macedo *et al.*, 2014), mas com intensidade de 80% do carregamento máximo. Os Animais passaram por um período de adaptação de 5 dias, onde foram colocados na base da escada e ao atingirem o topo (caixa com 20 x 20 x 20 cm) descansaram 2 minutos até a próxima subida. Esse procedimento foi realizado sucessivamente até que os animais realizassem 3 subidas consecutivas sem que houvesse necessidade de estímulo (leve toque em sua cauda). Após a familiarização, os animais realizaram o teste de carregamento máximo (TCM) que iniciou com 75% de seu PC fixado a cauda na escalada inicial. Após um intervalo de 2 minutos, os animais realizaram outras subidas com intensidade incrementada em 30g a cada tentativa até a exaustão. Foi considerada carga máxima quando os ratos não conseguiram completar a escalada, mesmo após três estímulos em sua cauda. O TCM foi realizado antes do início do protocolo experimental, após 4, 8 e 12 semanas de treinamento (para ajuste das cargas e manutenção das intensidades) e ao final dos 10 dias de tratamento com DEX (efeito do tratamento). Os animais sedentários realizaram os testes nos mesmos momentos em que os treinados. O TR consistiu de 4 a 5 sessões semanais e foi realizado por 10, 40, 70 ou 100 Dias, contendo de 9 a 10 escaladas por sessão. Durante os dez dias de tratamento foram utilizadas as cargas relativas ao TCM-4.



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).

4.3. RETIRADA DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS.

Os animais foram eutanasiados por sobrecarga de anestésico ANASEDAN[®] (cloridrato de xilasina, 20mg/kg) e DOPALEN[®] (cloridrato de quetamina, 160mg/kg) na proporção de 1:1, 1mg/kg obtidos junto a Ceva[®], Paulínia, SP, Brasil. Após eutanásia o músculo FHL foi retirado, limpo, pesado e armazenado para demais técnicas como descrito nos próximos tópicos. As glândulas adrenais foram retiradas e pesadas para determinação da eficácia do tratamento com DEX, visto que ao ofertar um hormônio, a glândula responsável por esse hormônio sofreria uma atrofia em decorrência de não produzir mais a quantidade necessária dos hormônios em questão.

4.4. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As porções ventrais do FHL foram removidas, envoltas em talco neutro, recobertas com Optimal Cutting Temperature (OCT -*TISSUE-TEK*[®] - SakuraFinetek, Torrance, CA, USA), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a uma temperatura de -80°C. As amostras foram colocadas por uma hora na câmara de um micrótomo criostato a -20°C (Leica R, CM 1850, Nussloch, Alemanha), fixadas aos suportes metálicos com o auxílio de OCT para realização de cortes transversais (12µm de espessura)(Pullen, 1977).

4.5. ANÁLISES DA ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA

Os cortes transversais obtidos foram submetidos à técnica de hematoxilina e eosina como previamente publicado (Kohnen *et al.*, 1995; Herrera *et al.*, 2016). Seções transversas do FHL foram randomicamente selecionadas e fotografadas com o auxílio do programa DP Controller(Olympus micro DP70, Tokyo, Japão, v. 3.2.1.276) usando um microscópio de luz (Olympus BX50, Tokyo, Japão) e uma câmera digital (objectiva de 40x, Olympus DP71, Tokyo, Japão). A área de seção transversa (AST) dos feixes musculares individuais foi determinada em pelo menos 220 fibras musculares por animal e expressas como µm² usando o programa Image-Pro Plus 6.2.0.424 (Media Cybernetics, Inc.). Áreas com artefatos de corte, bordas e coloração excessiva foram evitadas no passo de obtenção das imagens (Dare *et al.*, 2015; Giron *et al.*, 2015) .

4.6. ATIVIDADE DO PROTEASSOMA

A atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina da porção 20S foi analisada no músculo FHL em todos os grupos analisados pelo ensaio fluorimétrico a partir do substrato fluorogênico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC)(Lu *et al.*,

2008). As amostras foram homogeneizadas com um tampão fosfato (50 mM de fosfato de sódio, 1mM de EDTA, pH 7.4) e centrifugadas por 15 min a 12,000g a 4°C, para obtenção do sobrenadante. A atividade do proteassoma 26S foi determinada a partir da taxa de clivagem do LLVY-AMC (Enzo Life Sciences, USA). A mistura de reação foi composta por 25 mM de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (pH 7.4), 5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 25µM de trifosfato de adenosina (ATP), 25µM LLVY-AMC e 25µg de amostra. A formação do produto fluorescente foi acompanhada por uma hora e meia (440nm e 350nm foram as ondas de emissão e excitação, respectivamente) a 37 °C com ou sem epoxomicina (20µM, um inibidor altamente específico da atividade do proteassoma no sítio da quimiotripsina), a diferença entre as duas taxas de clivagem foi considerada a atividade do proteassoma 26S (Bechara *et al.*, 2014).

4.7. PROCESSAMENTO PARA WESTERN BLOTTING – PRODUÇÃO PROTEICA

Amostras do músculo FHL foram homogeneizadas utilizando um homogenizador (IKA, Staufen, Alemanha) em tampão de lise celular (RIPA, CellSignaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA), 1% de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 0,1% de coquetel de inibidores de protease (PIC, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), centrifugadas a 11752,4g por 10 minutos a 4°C e armazenadas em temperatura -80°C. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bio-Rad Kit, ProteinAssayStandart II, Hercules, CA) como previamente publicado (Amaral *et al.*, 2001).

As amostras foram eletroforéticamente separadas por tamanho utilizando um gel de poliacrilamida de 8%. 50 µg de amostras foram colocadas para correr a 200V e transferidas para uma membrana de nitrocelulose com corrente de 120V em tampão específicos (Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2016). Coloração com *Ponceau* foi utilizada como controlada quantidade de proteínas entre os animais. As membranas foram lavadas em TBS-Te bloqueadas com soro de albumina bovina (BSA) diluída em TBS-T na concentração de 3% por 2 minutos. Para então serem incubadas por 10 minutos em seus anticorpos primários, na concentração de 1:1.000 em 3% de BSA (p70S6K total, p-p70S6K^{Thr389}, MuRF1 total, REDD1 total e gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase [GAPDH]) obtidos junto a cell signalling, Santa Cruz Biotechnology, Inc. e R&D SYSTEMS, utilizando o Sistema de Detecção de Proteína (SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System – Millipore, Darmstadt, Hessen, Germany). Após essa incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes em TBS-T e incubadas por 10 minutos em seus anticorpos secundários na diluição de 1:1.000 em 1% BSA

(Goat Anti-Rabbit IgG e Donkey Anti-Goat IgG, Jackson Immuno Research Inc, West Grove, PA, USA).

O anticorpo foi detectado por luminescência química aumentada (Super Signal Pico, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) em um filme radiográfico (Fuji Film® super HR-U, Minato-ku - Tokyo, Japão). Para minimizar as variações existentes na técnica de Western Blotting foram inseridos animais controle em todas as membranas, ficando assim, todos expostos às mesmas condições (tempo de corrida, transferência e exposição), além da utilização da proteína GAPDH como normalizador. As bandas foram analisadas utilizando o programa de computador (ScionImage, Corporation, Beta 4.02).

5. ANÁLISE DE RESULTADOS E MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Todos os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Na análise de IA foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de dois caminhos para medidas repetidas. Nas demais variáveis foi utilizada a ANOVA de dois caminhos. Nas análises que apresentaram diferença significativa foi utilizado o *post-hoc* de Tukey. Os dois fatores considerados foram o treinamento e o tratamento. Os dados de massa muscular do FHL foram correlacionados com as medidas de TCM e produção proteica (p-p70S6K^{Thr389}/p70S6K, REDD1 e MuRF1) utilizando o teste de correlação de Pearson. O programa G*Power 3.1.9.2 foi utilizado para determinar o tamanho do efeito e poder de teste para os resultados de TCM final (1,45 e 0,87, respectivamente) e PC final (2,28 e 0,99, respectivamente) comparando os grupos CTRL e DEX, massa muscular do FHL do grupo TR70 DEX comparado ao grupo SED DEX (1,47 e 0,87, respectivamente). Nível de significância considerado foi de $\alpha < 0,05$. A área embaixo da curva de IA foi mensurada e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias a partir do teste de correlação de Pearson, ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 TESTE DE CARREGAMENTO MÁXIMO

Para demonstrar a efetividade do TR foram analisados os resultados do TCM durante o protocolo experimental normalizado pelo PC dos animais, resultando assim na força relativa dos animais. Podemos observar que os grupos avaliados partiram de valores diferentes de TCM (1696±61 g/kg, 1627±74 g/kg, 1114±52 g/kg, 1186±47 g/kg, 1582±142 g/kg, 1560±155 g/kg, 1273±44 g/kg, 1373±60 g/kg, 1290±33 g/kg, 1297±38 g/kg, para SED CTRL, SED DEX, TR10 CTRL, TR10 DEX, TR40 CTRL, TR40 DEX, TR70 CTRL, TR70 DEX, TR100 CTRL e TR100 DEX, respectivamente no TCM-1). Ambos os grupos treinados por 10 dias (TR10 CTRL e TR10 DEX) iniciaram o protocolo com valores inferiores aos sedentários e aos animais treinados por 40 dias (SED CTRL, SED DEX, TR40 CTRL e TR40 DEX, respectivamente), assim como os grupos TR70 CTRL, TR100 CTRL e TR100 DEX, que também iniciaram o protocolo com valores inferiores aos seus respectivos sedentários.

A Figura 5A exibe os valores de delta relativo (variação) entre o TCM4 e o TCM1 para todos os grupos, que representa o delta de treinamento, pois nenhum animal havia recebido o tratamento com DEX. Pode-se observar que um período de 12 semanas sem treinamento determinou uma redução de $201,3 \pm 159$ g/kg para o grupo SED CTRL e um aumento de $100,6 \pm 109$ g/kg para o grupo SED DEX na carga carregada durante o TCM. Todos os grupos treinados CTRL apresentaram aumento em seus valores de delta de treinamento quando comparados ao SED CTRL (+442%, +500%, +675% e +777% para TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL, TR100 CTRL, respectivamente), assim como os grupos TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX (+312%, +682%, +963% e +1372%, respectivamente). O grupo TR70 DEX obteve variação de TCM superior ao SED DEX no período analisado ($1070,4 \pm 58$ g/kg vs $415,5 \pm 47$ g/kg, respectivamente). Os animais treinados por 100 dias apresentaram valores de delta superiores aos animais treinados por 10 e 40 dias ($689,9 \pm 84$ g/kg; $806,6 \pm 196$ g/kg e $1363,7 \pm 56$ g/kg para TR10 CTRL, TR40 CTRL e TR100 CTRL e $415,5 \pm 47$ g/kg; $787,6 \pm 191$ g/kg e $1482,8 \pm 107$ g/kg para TR10 DEX, TR40 DEX e TR100 DEX). O delta obtido entre o TCM5 e o TCM4, foi denominado como delta de tratamento, pois expõe a variação de força dos animais no período de 10 dias de tratamento farmacológico, é exposto na Figura 5B. Na Figura 5B pode-se observar que todos os animais tratados apresentaram valores de delta superiores a seus respectivos controles (SED DEX +56%, TR10 DEX +187%, TR40 DEX +135%, TR70 DEX +697% e TR100

DEX +173%). O grupo TR70 CTRL apresentou uma variação menor de TCM (-80%) do que o grupo SED CTRL no período de 10 dias.

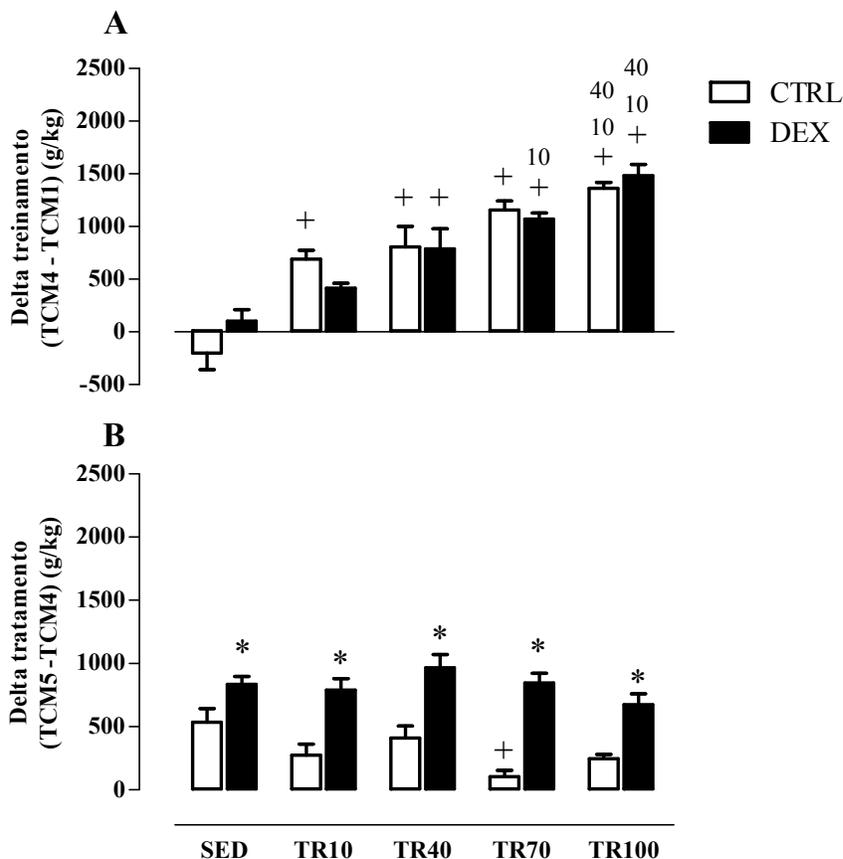


Figura 5.A: Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-4 e TCM-1 normalizados pelo PC; **B:** Variação (delta) do peso carregado entre o TCM-5 e TCM-4 normalizados pelo PC. Grupos avaliados: sedentário controle (SED CTRL), sedentário tratado com DEX (SED DEX), treinado Controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL e TR100 CTRL) e treinado tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX). ANOVA Two-way. Significância: * vs respectivo controle, + vs respectivo sedentário, 10 vs respectivo TR10, 40 vs respectivo TR40, $p < 0,05$.

6.2 GLÂNDULA ADRENAL E OSSO DA TÍBIA

Para comprovar a eficácia do tratamento com DEX a Tabela 1 apresenta os valores da massa da glândula adrenal, as quais encontram-se reduzidas em todos os grupos tratados após 10 dias de tratamento farmacológico (SED DEX -54%, TR10 DEX -41%, TR40 DEX -49%, TR70 DEX -42% e TR100 DEX -54%). O grupo TR100 CTRL apresentou valor superior da massa da glândula adrenal (+39%) quando comparado ao grupo TR10 CTRL. O tamanho do osso da tíbia não sofreu alterações, seja pelo treinamento ou tratamento (Tabela 1).

Tabela 2. Valor total ds glândulas adrenais (GA), ingestão alimentar total (IA), tamanho do osso da tibia e massa muscular normalizada pela tibia do flexor longo do hálux (FHL) nos 10 grupos analisados.

VARIÁVEIS	SED CTRL	SED DEX	TR10 CTRL	TR10 DEX	TR40 CTRL	TR40 DEX	TR70 CTRL	TR70 DEX	TR100 CTRL	TR100 DEX
Peso coporal (g)	241 ± 8	244 ± 5	251 ± 7	262 ± 6	259 ± 10	263 ± 11	267 ± 12	268 ± 9	266 ± 11	258 ± 7
GLÂNDULA ADRENAL (mg)	0,06±0,004	0,03±0,002*	0,05±0,003	0,03±0,002*	0,06±0,006	0,03±0,002*	0,06±0,005	0,03±0,005*	0,07±0,004 ¹⁰	0,03±0,002*
IA TOTAL (g)	759±14	656±21*	836±16	745±20* ⁺	793±22	673±21*	782±13	683±26*	833±16	719±18*
TÍBIA (cm)	4,2±0,03	4,3±0,04	4,2±0,05	4,2±0,03	4,3±0,02	4,3±0,03	4,3±0,03	4,3±0,02	4,4±0,04	4,3±0,03
FHL/TÍBIA (g/cm)	140±5	103±3*	130±7	109±5*	142±7	117±5*	165±7 ^{+,10,40}	130,5±4* ⁺	166,5±6 ^{+,10,40}	128±4* ⁺

IA: ingestão alimentar total, SED CTRL: sedentário controle, SED DEX: sedentário tratado com DEX, TR10 CTRL: treinado por 10 dias controle, TR10 DEX: treinado por 10 dias e tratado com DEX, TR40 CTRL: treinado por 40 dias controle, TR40 DEX: treinado por 40 dias e tratado com DEX, TR70 CTRL: treinado por 70 dias controle, TR70 DEX: treinado por 70 dias e tratado com DEX, TR100 CTRL: treinado por 100 dias controle, TR100 DEX: treinado por 100 dias e tratado com DEX. ANOVA Two-way. Significância: * vs controle; + vs sedentário, p<0,05.

6.3 PESO CORPORAL

Os valores de PC no início do protocolo experimental foram semelhantes (Tabela 1). Após 12 semanas do protocolo experimental e antes do tratamento farmacológico observou-se que os animais obtiveram ganhos semelhantes de PC e não demonstraram alterações entre os grupos (Figura 6A). Já a Figura 6B apresenta os valores de PC após o tratamento com DEX e deixa evidente sua redução nos grupos tratados. O grupo SED DEX apresentou uma redução de -23% ($437,1 \pm 17g$ vs $335 \pm 10g$ para SED CTRL e SED DEX, respectivamente), redução esta que não foi atenuada ou prevenida pelo TR, como pode-se observar pela redução do PC de -14%, -18%, -23% e -23% para para os grupos TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX, quando comparados a seus controles.

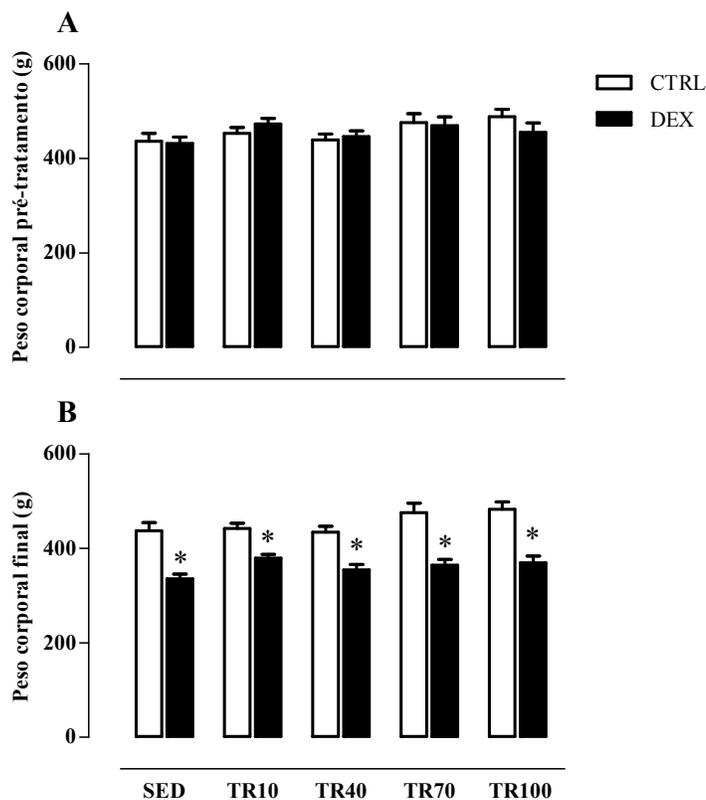


Figura 6. A: Valores de peso corporal (PC)pré-tratamento; **B:** Valores de peso corporal (PC) ao final do protocolo experimental. Grupos avaliados: sedentário controle (SED CTRL), sedentário tratado com DEX(SED DEX), treinado Controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL e TR100 CTRL) e treinado tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX). ANOVA Two-way. Significância: * vs respectivo controle, $p < 0,05$.

6.4 INGESTÃO ALIMENTAR

A Tabela 1 apresenta a soma do valor diário ingerido por cada animal durante os 14 dias analisados em todos os grupos estudados. Pode-se notar que o tratamento com DEX determinou uma menor quantidade de ração ingerida -14% (SED DEX vs SED CTRL), e que o TR não foi capaz de melhorar essa resposta, pois houve uma redução de -11%, -15%, -13% e -14% para TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX, respectivamente.

A Figura 7 aborda os resultados referentes a IA relativa dos animais 3 dias antes e durante o tratamento farmacológico. A Figura 7A representa a IA durante o período de 14 dias analisados nos animais divididos em CTRL e DEX, onde pode-se visualizar que todos os animais possuíam valores semelhantes de IA no período pré-tratamento (-2,-1 e 0) ($55,5 \pm 0,9$ g/kg e $55,4 \pm 0,8$ g/kg, para CTRL e DEX, respectivamente). Após o primeiro dia de tratamento, a IA foi reduzida no grupo DEX, permanecendo com valores reduzidos em relação ao basal até o 7º dia de tratamento. Os valores de IA do grupo DEX apresentaram-se menores que o grupo CTRL durante quase todo o período de tratamento (exceto dia 10). A figura 7B representa a área sob a curva (AUC) alimentar em todos os grupos analisados e pode-se observar que houve uma redução no grupo SED DEX de -9% ($661,3 \pm 18$ g/kgxdia vs $599,6 \pm 20$ g/kgxdia, para SED CTRL e SED DEX, respectivamente), assim como o TR não foi capaz de melhorar essa resposta, onde os grupos TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX apresentaram uma redução de -11%, -16%, -13% e -14, respectivamente, quando comparados a seus controles. Os grupos TR10 CTRL, TR40 CTRL e TR100 apresentaram valores superiores de AUC quando comparados ao grupo SED CTRL ($661,3 \pm 17,5$ g/kgxdia vs $776,4 \pm 15$ g/kgxdia, 738 ± 21 g/kgxdia e $772,7 \pm 15$ g/kgxdia, para SED CTRL, TR10 CTRL, TR40 CTRL e TR100 respectivamente).

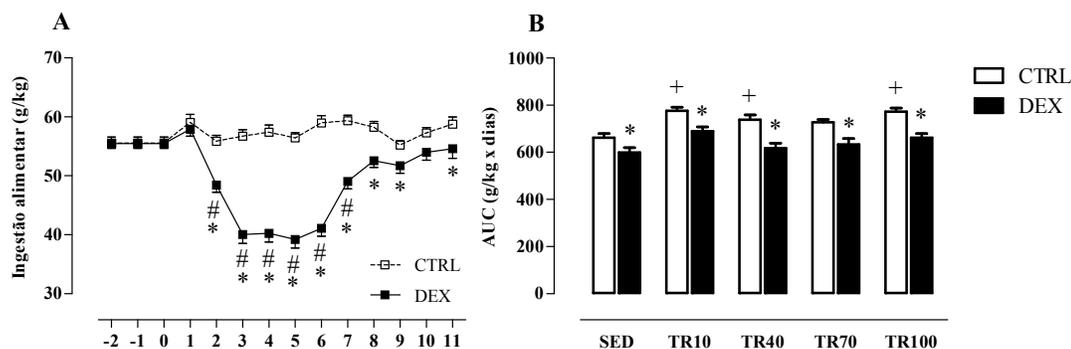


Figura 7. A: Ingestão alimentar relativa 3 dias antes e durante os 10 dias de tratamento com DEX onde foram reunidos todos os animais CTRL e DEX em dois grupos distintos, **B:** Média dos valores de área sob a curva (AUC) da ingestão alimentar de 3 dias antes e durante os 10 dias de tratamento com DEX em todos os grupos analisados. Grupos avaliados: sedentário controle (SED CTRL), sedentário tratado com DEX (SED DEX), treinado Controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL e TR100 CTRL) e treinado tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX). ANOVA Two-way (B). ANOVA Two-way para medidas repetidas (A). Significância: * vs respectivo controle, + vs respectivo sedentário, # vs início. $p < 0,05$.

6.5 MÚSCULO ESQUELÉTICO – FHL (PESO MUSCULAR, ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA E ATIVIDADE DO PROTEASSOMA)

A Tabela 1 mostra que dez dias de tratamento farmacológico diminuiu significativamente a massa muscular do FHL independente do nível de treinamento, quando comparado ao seu respectivo grupo CTRL (-26,4%, -16,3%, -17,9%, -20,8% and -23% para SED, TR10, TR40, TR70 e TR100 DEX, respectivamente). Entretanto, esta redução foi atenuada nos grupos TR70 e TR100 DEX, que apresentaram valores (-20,8% e -23%, respectivamente) superiores de massa muscular ao grupo SED DEX (-26,4%). O TR isoladamente foi capaz de aumentar a massa muscular do FHL nos grupos TR70 e TR100 CTRL (+18% e +19%, respectivamente). Esses valores também foram superiores quando comparados aos grupos TR10 e TR40 CTRL.

A Figura 8A apresenta os valores de atividade do proteassoma após o protocolo experimental. Como pode-se observar, a DEX reduziu a atividade do proteassoma nos grupos SED e TR70 DEX, comparados ao grupo CTRL (-33% e -44%, respectivamente), além do mais, no grupo TR100 DEX, a atividade do proteassoma foi menor que a encontrada nos grupos TR10 e TR40 (-55% e -56%, respectivamente). O grupo TR70 CTRL teve um aumento na atividade do proteassoma quando comparado ao grupo TR10 e TR40 CTRL (+44% e +51%, respectivamente), entretanto o grupo TR100 CTRL apresentou uma redução em sua atividade, quando comparado aos grupos SED, TR10, TR40 e TR70 CTRL (-72%, -

70%, -69% e -79%, respectivamente). A Figura 8B demonstra que após o tratamento com DEX, todos os grupos tratados apresentaram redução de sua AST (-28%, -20%, -21%, -27% e -29%, para SED, TR10, TR40, TR70 e TR100 DEX, respectivamente). Entretanto, o grupo TR70 e TR100 DEX apresentaram valores superiores de AST quando comparados ao grupo somente tratado, o que demonstra uma atenuação da atrofia muscular (+45% e +47%, respectivamente). O TR realizado por 70 ou 100 dias provocou um aumento da AST quando comparado ao grupo SED CTRL (+44% e +50% para TR70 e TR100 CTRL, respectivamente), TR10 CTRL (+25% e +30%, para TR70 e TR100 CTRL, respectivamente) e TR40 CTRL (+27% e +31%, para TR70 e TR100 CTRL, respectivamente).

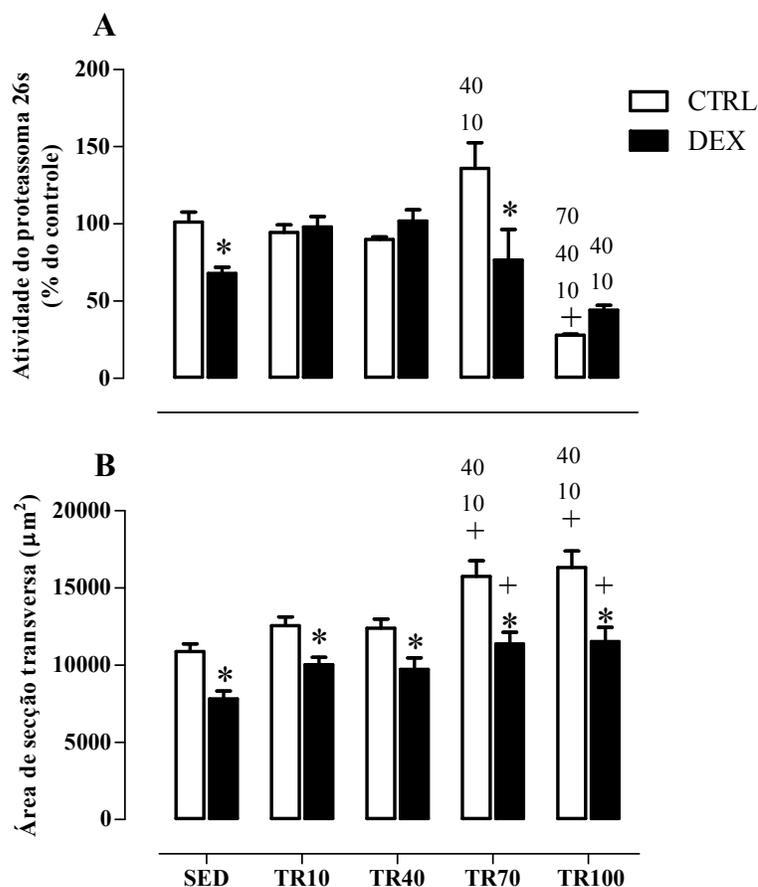


Figura 8. Atividade proteossomal no sítio da quimiotripsina e estrutura muscular do flexor longo do hálux (FHL). **A:** Atividade do proteossoma no sítio da quimiotripsina. **B:** Área de secção transversa (AST) do músculo FHL. Grupos avaliados: sedentário controle (SED CTRL), sedentário tratado com DEX (SED DEX), treinado Controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL e TR100 CTRL) e treinado tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX). ANOVA Two-way. Significância: * vs respectivo controle, + vs respectivo sedentário, 10 vs respectivo TR10, 40 vs respectivo TR40, 70 vs respectivo TR70. $p < 0,05$.

Para ressaltar novamente os benefícios do TR de alta intensidade, pode-se observar, na Figura 9, a correlação entre a AST do FHL após o tratamento com DEX e o TCM, demonstrando que elevados valores de TCM foram associados com altos valores de AST do FHL ($r=0,4992$).

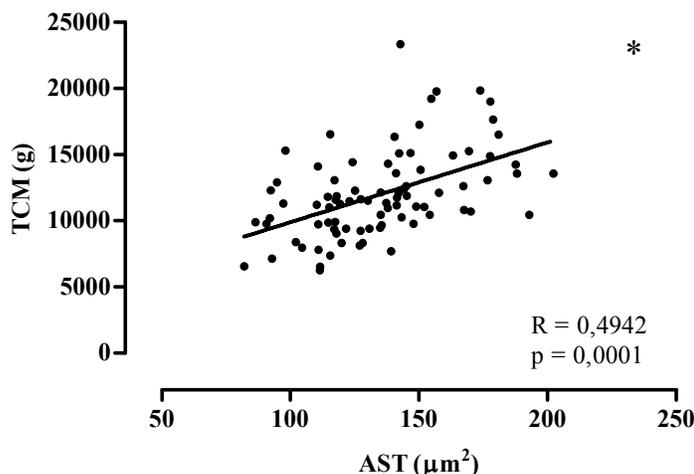


Figura 9. Correlação entre o teste de carregamento máximo final (TCM) e a área de seção transversa (AST) do FHL após o tratamento com DEX. Significância: * Correlação significativa utilizando o teste de correlação de Pearson, $p < 0,05$.

6.6 ANÁLISE DE PRODUÇÃO PROTEICA

Como demonstrado pela Figura 10A, dez dias de tratamento com DEX causaram uma redução de 40% na razão $p70S6K^{Thr389}/p70S6K^{total}$ no grupo SED DEX, mas essa redução foi revertida no grupo TR10 e TR40 DEX (+109% e 193%, comparados ao grupo SED DEX, respectivamente); o grupo TR70 DEX teve valores superiores ao grupo TR40 e TR100 DEX. TR70 CTRL apresentou o mesmo comportamento do grupo TR70 DEX, uma vez que seus valores foram superiores aos grupos SED, TR40 e TR100 CTRL. Os grupos TR40 e TR100 não demonstraram alterações. A Figura 10B mostra que o tratamento com DEX aumentou a produção proteica de REDD1 quando comparada ao grupo SED CTRL (+47%) e o TR bloqueou o aumento de REDD1 em todos os grupos treinados. A Figura 10C ilustra que o tratamento com DEX provocou um aumento de 50% da produção proteica de MuRF-1 no grupo SED DEX, quando comparado ao grupo CTRL. O TR não foi capaz de reduzir ou bloquear esse aumento nos grupos TR10 e TR40 DEX (+45% e 46%, respectivamente), mas o TR foi capaz de bloquear completamente esse aumento nos grupos TR70 e TR100 DEX. Os grupos treinados CTRL não demonstraram alterações.

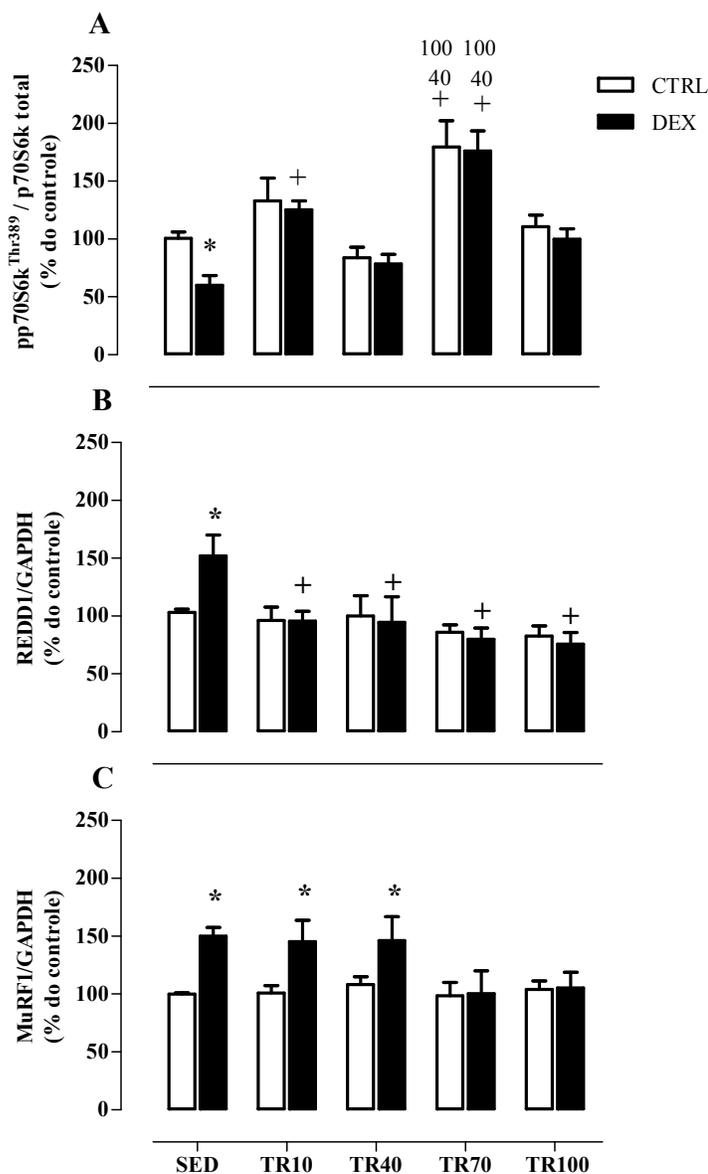


Figura 10. Efeito do treinamento resistido de alta intensidade sobre a via atrófica e hipertrófica do músculo flexor longo do hálux (FHL). **A:** Análise densitométrica da razão entre as proteínas p-p70S6K^{Thr389}/p70S6k. **B:** REDD1 e **C:** MuRF1. Grupos avaliados: sedentário controle (SED CTRL), sedentário tratado com DEX (SED DEX), treinado Controle 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 CTRL, TR40 CTRL, TR70 CTRL e TR100 CTRL) e treinado tratado com DEX 10, 40, 70 e 100 dias (TR10 DEX, TR40 DEX, TR70 DEX e TR100 DEX). ANOVA Two-way. Significância: * vs respectivo controle, + vs respectivo sedentário, 40 vs respectivo TR40, 100 vs respectivo TR100. $p < 0,05$.

A Figura 11 apresenta as correlações entre a produção proteica da razão p-p70S6K^{Thr389}/p70S6k total, REDD1 e MuRF1 com a AST do FHL. Como podemos observar, houve associação positiva ($r=0,3325$) entre os valores da razão p-p70S6K^{Thr389}/p70S6k total

com a AST do FHL, demonstrando que quanto mais elevada são as razões de p-p70S6K^{Thr389}/p70S6k total maiores são os valores de AST (A). Por outro lado, não houve correlação entre REDD1 e AST (B) ($r=0,1729$), mas houve associação negativa entre MuRF1 e AST do FHL ($r=0,2524$) demonstrando que quando maiores os valores de MuRF1, menores são os valores de AST (C).

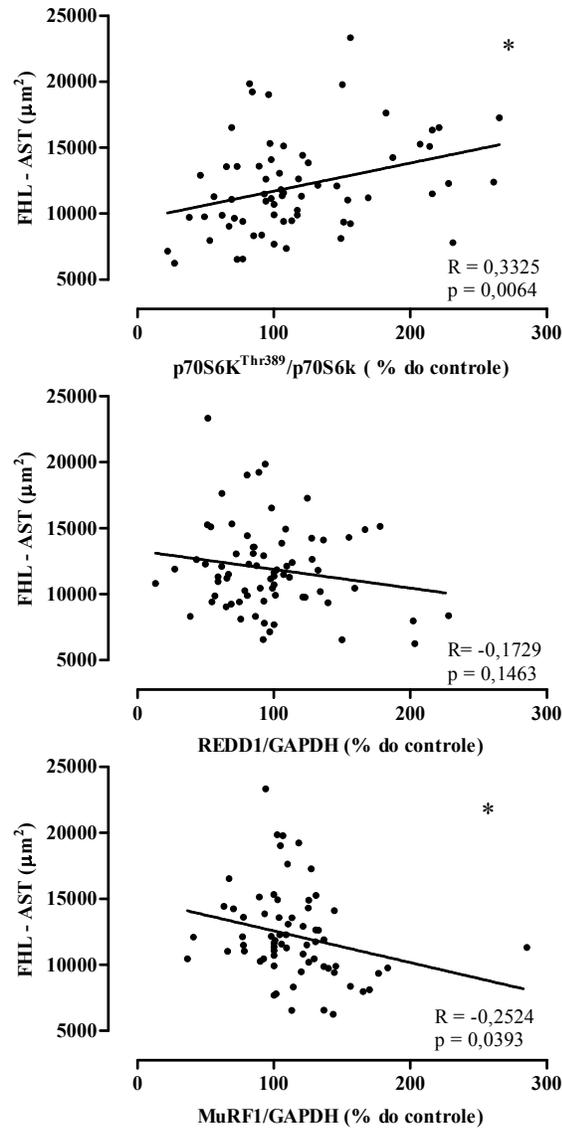


Figura 11. Correlação entre a produção proteica de p-p70S6K^{Thr389}/p70S6k (A), REDD1 (B) e MuRF1(C) e a área de secção transversa (AST) do FHL após o tratamento com DEX. Significância: * Correlação significativa utilizando o teste de correlação de Pearson, $p < 0.05$.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo focou em avaliar o momento em que os efeitos preventivos do TR de alta intensidade apareceriam sobre a atrofia muscular induzida pela DEX. Os principais resultados encontrados demonstraram que o TR, realizado por 70 e 100 dias, mas não 10 ou 40, atenuaram a atrofia muscular do FHL induzida pela DEX e esta resposta envolveu um balanço mais refinado entre os níveis de proteínas atroficas e hipertróficas.

O TR aumentou o TCM dos animais treinados a partir do grupo TR40 até o TR100, o que está de acordo com estudos prévios com TR em escada e outros tipos de aparatos (Lee *et al.*, 2004; Barauna *et al.*, 2007; Park H, 2008; Shiguemoto *et al.*, 2012; Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2016). Da mesma forma, nossos trabalhos prévios já haviam demonstrado que todos os grupos tratados com DEX aumentaram os valores de TCM quando comparados com os grupos CTRL, o que indica um efeito protetivo do TR de alta intensidade (Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2016).

Independente do nível de treinamento, o tratamento com DEX determinou a redução do PC em todos os grupos tratados, estando em acordo nossos trabalhos anteriores e de outros grupos (Ma *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2016; Krug *et al.*, 2016; Macedo *et al.*, 2016), embora alguns autores não tenham mostrado alterações no PC de ratos (Severino *et al.*, 2002) ou humanos tratados com DEX (Wallace *et al.*, 2003; Lindemulder *et al.*, 2015). Esta redução pode ser explicada pela redução da IA observada, independente do nível de treinamento (Ma *et al.*, 2003; Nicastro, Zanchi, *et al.*, 2012; Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2016). Embora não tenhamos avaliado os mecanismos envolvidos na redução da IA, é proposto na literatura que essa redução possa ser provocada pela redução das concentrações de grelina somados ao aumento nos níveis de leptina (Tulipano *et al.*, 2007; Jahng *et al.*, 2008), além da redução do neuropeptídeo Y e do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular, ambos relacionados com a regulação do apetite e da termogênese no hipotálamo (Mckibbin *et al.*, 1992; Michel e Cabanac, 1999; Bell *et al.*, 2000; Ginsberg *et al.*, 2003).

A atrofia muscular após tratamento farmacológico com DEX é comumente reportada na literatura. Além do mais, a DEX promove maior atrofia e redução da AST em músculos compostos predominantemente de fibras rápidas (glicolíticas), como o FHL, do que em músculos compostos por fibras de contração lenta (oxidativas) (Bodine e Furlow, 2015). Os resultados do presente estudo demonstraram atrofia do músculo FHL em todos os grupos tratados, o que é confirmado pela redução na AST, concordando com outros achados na

literatura (Baehr *et al.*, 2011; Macedo *et al.*, 2014; Giron *et al.*, 2015; Umeki *et al.*, 2015; Krug *et al.*, 2016). Por outro lado, 70 e 100 dias de TR preveniram a atrofia muscular nos animais tratados, estando em acordo com outros estudos que utilizaram TR (Nicastro, Zanchi, *et al.*, 2012; Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2016; Luciano *et al.*, 2017). Entretanto, até o momento, este é o primeiro estudo a demonstrar que o TR realizado por 100 dias não provocou efeitos preventivos adicionais sobre a atrofia muscular e redução da AST, comparado a 70 dias de TR. Além disso, 70 e 100 dias de TR foram capazes de promover hipertrofia no FHL, comparado aos grupos SED, TR10 e TR40 CTRL. Este aumento já foi documentado em animais que realizaram diferentes tipos de TR por 70 (Hornberger e Farrar, 2004; Krug *et al.*, 2016) e 100 dias (Luciano *et al.*, 2017), embora este estudo seja o único a mostrar que o TR de alta intensidade, realizado em escada por 70 ou 100 dias, promove aumentos similares de massa muscular e AST do FHL.

Para melhor entender a atrofia muscular induzida pela DEX e os efeitos preventivos do TR de alta intensidade, foi analisada a atividade do proteassoma 26s e também a produção das proteínas p-p70S6K^{Thr389}/p70S6k total, REDD1 e MuRF1. Poucos estudos têm se dedicado a estudar a atividade do proteassoma 26s, no entanto os trabalhos são apresentados em diferentes condições (insuficiência cardíaca e desnervação). A atividade do proteassoma apresenta-se aumentada em músculos glicolíticos e oxidativos de ratos e humanos com insuficiência cardíaca, mas esse aumento é bloqueado pelo treinamento aeróbio (Cunha *et al.*, 2012; Bechara *et al.*, 2014; De Andrade *et al.*, 2015; Bacurau *et al.*, 2016). Em outro estudo, a atividade do proteassoma 26s e a produção proteica de MuRF1 encontram-se aumentadas após 7 dias de desnervação, embora esses valores retornem ao basal após 14 dias (Baumann *et al.*, 2016).

Em relação ao tratamento com DEX, os resultados ainda não são conclusivos. Tratamentos com altas doses de DEX (10 mg/kg, 6 dias) apresentaram atrofia do EDL, seguido de um aumento da 3 metil histidina (marcador de degradação proteica miofibrilar) no segundo e terceiro dia, retornando aos valores basais no quinto dia (Auclair *et al.*, 1997). Nesse sentido, parece que o tratamento farmacológico com DEX aumenta os componentes do proteassoma 26s nos estágios iniciais de tratamento (até o terceiro dia, entretanto esse aumento já não é observado no quinto dia (Auclair *et al.*, 1997). Outro estudo demonstrou que após 6 dias de tratamento com baixas doses de DEX (0,54 mg/kg) causaram atrofia no GA de ratos, aumento na proteólise dependente do proteassoma, dos RNA mensageiros e produção proteica dos componentes do proteassoma 26s e sua atividade (Combaret *et al.*, 2004). Por outro lado, longos períodos de tratamento com DEX (28 dias com 3mg/kg) reduziram a

atividade do proteassoma 26s (componentes ATP-dependente e independente) no coração de camundongos (Hwee *et al.*, 2011) e não mostraram alterações no complexo do triceps sural de camundongos ratados com DEX (3 mg/kg) por 3 ou 14 dias (Baehr *et al.*, 2011). Nossos resultados evidenciaram uma redução da atividade do proteassoma 26s após dez dias de tratamento com DEX e esta resposta pode ser explicada, em parte, porque a atividade do proteassoma 26s aumenta em estágios iniciais do tratamento com DEX (até o terceiro dia) e retorna aos valores basais após 5-6 dias, como sugerido pela restrita literatura (Auclair *et al.*, 1997; Combaret *et al.*, 2004; Hwee *et al.*, 2011). Portanto, um estudo de *time-course* seria necessário para fornecer mais informações sobre o comportamento da atividade do proteassoma 26s ao longo do tratamento com DEX. No presente estudo, o TR aumentou a atividade do proteassoma 26s no grupo TR70 CTRL e diminuiu no TR100 CTRL. Pouco se sabe na literatura sobre a atividade do proteassoma 26s e o TR. Entre esses poucos estudos, um grupo têm demonstrado que camundongos submetidos a uma sobrecarga funcional apresentaram hipertrofia e aumento da atividade do proteassoma 26s e 20s no sítio da quimiotripsina do primeiro para o décimo quarto dia (Baehr *et al.*, 2014). Contrariando esse estudo, o TR em humanos não mostrou alterações na expressão de E3 ligases ou outros marcadores do SUP entre 0 e 22 horas após o exercício, mas eles não avaliaram a atividade específica do proteassoma 26s no sítio da quimiotripsina (Stefanetti *et al.*, 2015). Uma possível explicação para esse aumento da atividade do proteassoma 26s após 70 dias de TR é que pode ser que esse aumento seja necessário para que a hipertrofia ocorra, e então, quando a hipertrofia já estiver instaurada (100 dias), essa super ativação já não seria mais necessária.

É sabido que a DEX reduz a síntese de proteínas e aumenta a degradação proteica (Bodine e Furlow, 2015). Apesar dos resultados do presente estudo não demonstrarem aumento na atividade do proteassoma 26s após o tratamento com DEX, a produção proteica de MuRF1 e REDD1 apresentaram aumentos significativos (Bodine e Furlow, 2015). A proteína MuRF1 é um componente chave no processo atrófico (Baehr *et al.*, 2011) e apresenta produção elevada nos grupos SED, TR10 e TR40 DEX que também apresentaram atrofia muscular do FHL, que foi atenuada pelo TR. Entretanto, 70 e 100 dias de TR bloquearam completamente o aumento da produção proteica de MuRF1, resultando em atenuação da atrofia muscular. Este resultado sugere que é preciso ao menos 70 dias para desencadear os efeitos preventivos do TR sobre os valores de produção proteica de MuRF1, como já havíamos demonstrado (Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2016). Além disso, o presente trabalho revelou que mais de 70 dias de TR não provocaram nenhum efeito preventivo adicional, estando em acordo com outro estudo que utilizou o TR em forma de agachamento

(Zanchi *et al.*, 2009). Estes resultados vão ao encontro de achados prévios que utilizaram o TR por 3 dias e não demonstram nenhuma alteração na produção proteica de MuRF1 induzida pela DEX (Nicastro, Zanchi, *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo demonstram pela primeira vez uma correlação inversa entre produção de MuRF-1 e massa muscular do FHL, confirmando a relevância desta proteína no controle da atrofia muscular induzida por DEX.

Adicionalmente, os resultados presentes neste estudo mostraram que a produção proteica de REDD1 estava aumentada após o tratamento de dez dias com DEX, concordando com os achados de outros estudos (Wang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010; Britto *et al.*, 2014). Da mesma forma que a proteína MuRF-1, os resultados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, uma correlação inversa entre produção de REDD1 e massa muscular do FHL, sugerindo que esta proteína REDD1 também tem grande relevância no controle da atrofia muscular induzida por DEX. Por outro lado, o TR foi capaz de bloquear esse aumento e os resultados desse estudo demonstram, pela primeira vez, que o efeito preventivo do TR sobre a proteína REDD1 manifesta-se desde os primeiros dias de TR (10 dias de TR). Recentemente, outro grupo demonstrou que vários protocolos de TR, usados para melhorar a resistência, força e hipertrofia, foram capazes de reduzir os níveis de produção proteica da proteína REDD1 após dias de TR (Luciano *et al.*, 2017).

Tem sido demonstrado que a REDD1 apresenta-se aumentada após o tratamento com DEX e diminui a atividade da mTOR (Wang *et al.*, 2006; Bodine e Furlow, 2015), entretanto pouco sabe-se sobre os efeitos do TR sobre esse mecanismo. Nesse sentido, os resultados do presente estudo demonstraram uma significativa redução da razão $p\text{-p70S6k}^{\text{Thr389}}/p\text{70S6k}$ total após o tratamento com DEX, comparado aos animais CTRL, o que já foi verificado em ratos (Nicastro, Zanchi, *et al.*, 2012; Britto *et al.*, 2014) e cultura de células (Wu *et al.*, 2010), mas essa redução foi completamente abolida pelo TR (comparado ao seu respectivo grupo CTRL). Os grupos TR10 e TR70 DEX apresentaram valores superiores da razão $p\text{-p70S6k}^{\text{Thr389}}/p\text{70S6k}$ quando comparados ao grupo SED DEX, como já verificado na literatura após apenas 3 sessões de TR de alta intensidade tipo agachamento (Nicastro, Zanchi, *et al.*, 2012). Embora o grupo TR100 também tenha apresentado hipertrofia, sua razão $p\text{-p70S6k}^{\text{Thr389}}/p\text{70S6k}$ retornou a valores basais. A comprovação desses resultados é limitada em virtude da grande variação de protocolos e aparatos de TR presentes na literatura, além do mais, a razão $p\text{-p70S6k}^{\text{Thr389}}/p\text{70S6k}$ não foi observada em todos os trabalhos. Por exemplo, um grupo demonstrou que em humanos o TR para as pernas (80% de uma repetição máxima) provocou aumentos na razão $p\text{-p70S6k}^{\text{Thr389}}/p\text{70S6k}$ nas primeiras duas horas pós-treino das duas primeiras sessões de treinamento (Mascher *et al.*, 2008), sugerindo que este aumento da

p70S6k é observado no início de um período de treinamento. Da mesma forma, humanos submetidos ao TR (70 dias) separados em grupo de alta (90% de uma repetição máxima) ou moderada intensidade (70% de uma repetição máxima), demonstraram valores elevados da razão $p\text{-p70S6k}^{\text{Thr389}}/p70S6k$, quando comparados ao período de inatividade de suas pernas (Figueiredo *et al.*, 2015), mas os autores não avaliaram períodos de tempos maiores. Ratos que foram submetidos ao treinamento isométrico com estimulação elétrica exibiram altos valores da razão $p\text{-p70S6k}^{\text{Thr389}}/p70S6k$ após 1, 12 ou 18 sessões de treinamento e aumento na produção proteica de p70S6k total após 12 ou 18 sessões (Ogasawara *et al.*, 2013).

8. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a atrofia muscular induzida por DEX no FHL necessita de pelo menos 70 dias de TR de alta intensidade em escada para ser atenuada e esta resposta envolve o completo bloqueio do aumento da produção proteica de MuRF1 (a partir de 70 dias) e do aumento de REDD1 (a partir de 10 dias), os quais demonstram uma menor interferência na via de síntese proteica, verificado pela diminuição da redução da razão $p\text{-p70S6k}^{\text{Thr389}}/p\text{70S6k}$. Além do mais, 100 dias de TR não provocaram nenhum efeito adicional sobre essas respostas. É interessante notar que apenas 10 dias de TR provocaram melhorias na via de síntese de proteínas, o que sugere que alguns ajustes moleculares são necessários nos estágios iniciais da manutenção da massa muscular.

9. REFERÊNCIAS

ADAMS, C. M. Role of the transcription factor ATF4 in the anabolic actions of insulin and the anti-anabolic actions of glucocorticoids. **J Biol Chem**, v. 282, n. 23, p. 16744-53, Jun 8 2007. ISSN 0021-9258 (Print). 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430894>>.

AHTIKOSKI, A. M. et al. Regulation of type IV collagen gene expression and degradation in fast and slow muscles during dexamethasone treatment and exercise. **Pflugers Arch**, v. 448, n. 1, p. 123-30, Apr 2004. ISSN 0031-6768 (Print). 0031-6768 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685862>>.

AMARAL, S. L.; PAPANEK, P. E.; GREENE, A. S. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, n. 3, p. H1163-9, Sep 2001. ISSN 0363-6135 (Print). 0363-6135 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514283>>.

AUCLAIR, D. et al. Activation of the ubiquitin pathway in rat skeletal muscle by catabolic doses of glucocorticoids. **Am J Physiol**, v. 272, n. 3 Pt 1, p. C1007-16, Mar 1997. ISSN 0002-9513 (Print). 0002-9513 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9124503>>.

BAAR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **Am J Physiol**, v. 276, n. 1 Pt 1, p. C120-7, Jan 1999. ISSN 0002-9513 (Print). 0002-9513 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886927>>.

BACURAU, A. V. et al. Akt/mTOR pathway contributes to skeletal muscle anti-atrophic effect of aerobic exercise training in heart failure mice. **Int J Cardiol**, v. 214, p. 137-47, Jul 01 2016. ISSN 1874-1754 (Electronic). 0167-5273 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27060274>>.

BAEHR, L. M.; FURLOW, J. D.; BODINE, S. C. Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 19, p. 4759-76, Oct 01 2011. ISSN 1469-7793 (Electronic). 0022-3751 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21807613>>.

BAEHR, L. M.; TUNZI, M.; BODINE, S. C. Muscle hypertrophy is associated with increases in proteasome activity that is independent of MuRF1 and MAFbx expression. **Front Physiol**, v. 5, p. 69, 2014. ISSN 1664-042X (Print). 1664-042X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600408>>.

BAPTISTA, I. L. et al. Leucine and HMB differentially modulate proteasome system in skeletal muscle under different sarcopenic conditions. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76752, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic). 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24124592>>.

BARAUNA, V. G. et al. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. **Clin Med Res**, v. 5, n. 2, p. 114-20, Jun 2007. ISSN 1554-6179 (Electronic). 1539-4182 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17607046>>.

BAREL, M. et al. Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. **Eur J Appl Physiol**, v. 108, n. 5, p. 999-1007, Mar 2010. ISSN 1439-6327 (Electronic). 1439-6319 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967395>>.

BAUMANN, C. W.; LIU, H. M.; THOMPSON, L. V. Denervation-Induced Activation of the Ubiquitin-Proteasome System Reduces Skeletal Muscle Quantity Not Quality. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0160839, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic). 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27513942>>.

BECHARA, L. R. et al. NADPH oxidase hyperactivity induces plantaris atrophy in heart failure rats. **Int J Cardiol**, v. 175, n. 3, p. 499-507, Aug 20 2014. ISSN 1874-1754 (Electronic). 0167-5273 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25023789>>.

BELL, M. E. et al. Disruption of arcuate/paraventricular nucleus connections changes body energy balance and response to acute stress. **J Neurosci**, v. 20, n. 17, p. 6707-13, Sep 1 2000. ISSN 0270-6474 (Print). 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964976>>.

BODINE, S. C.; FURLOW, J. D. Glucocorticoids and Skeletal Muscle. **Adv Exp Med Biol**, v. 872, p. 145-76, 2015. ISSN 0065-2598 (Print). 0065-2598 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26215994>>.

BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-8, Nov 23 2001. ISSN 0036-8075 (Print). 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679633>>.

BRITTO, F. A. et al. REDD1 deletion prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 307, n. 11, p. E983-93, Dec 01 2014. ISSN 1522-1555 (Electronic). 0193-1849 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25315696>>.

CARVALHO T et al. Posição oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: atividade física e saúde. **Rev Bras Med Esporte**, v. 2, n. 4, p. 3, 1996.

CASTILLERO, E. et al. Suppression of atrogen-1 and MuRF1 prevents dexamethasone-induced atrophy of cultured myotubes. **Metabolism**, v. 62, n. 10, p. 1495-502, Oct 2013. ISSN 1532-8600 (Electronic). 0026-0495 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23866982>>.

CHO, J. E. et al. Time course expression of Foxo transcription factors in skeletal muscle following corticosteroid administration. **J Appl Physiol (1985)**, v. 108, n. 1, p. 137-45, Jan 2010. ISSN 1522-1601 (Electronic). 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850732>>.

COMBARET, L. et al. Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles. **Biochem J**, v. 378, n. Pt 1, p. 239-46, Feb 15 2004. ISSN 1470-8728 (Electronic). 0264-6021 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636157>>.

CONSTANTINO, P. B. et al. Exercise attenuates dexamethasone-induced hypertension through an improvement of baroreflex activity independently of the renin-angiotensin system. **Steroids**, v. 128, p. 147-154, Dec 2017. ISSN 1878-5867 (Electronic). 0039-128X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054562>>.

CUNHA, T. F. et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e41701, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic). 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22870245>>.

CZERWINSKI, S. M. et al. Myosin heavy chain turnover and glucocorticoid deterrence by exercise in muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 67, n. 6, p. 2311-5, Dec 1989. ISSN 8750-7587 (Print). 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2606837>>.

DARE, L. R. et al. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in masticatory muscles of rats. **J Anat**, v. 226, n. 1, p. 40-6, Jan 2015. ISSN 1469-7580 (Electronic). 0021-8782 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25400135>>.

DE ANDRADE, L. H. et al. Aerobic exercise training improves oxidative stress and ubiquitin proteasome system activity in heart of spontaneously hypertensive rats. **Mol Cell Biochem**, v. 402, n. 1-2, p. 193-202, Apr 2015. ISSN 1573-4919 (Electronic). 0300-8177 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25626892>>.

DIONISIO, T. J. et al. Aerobic training prevents dexamethasone-induced peripheral insulin resistance. **Horm Metab Res**, v. 46, n. 7, p. 484-9, Jun 2014. ISSN 1439-4286 (Electronic). 0018-5043 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710698>>.

DOMINGOS, M. M. et al. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, n. 4, p. 1437-44, Apr 2012. ISSN 1439-6327 (Electronic). 1439-6319 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830097>>.

DUNCAN, N. D.; WILLIAMS, D. A.; LYNCH, G. S. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 77, n. 4, p. 372-8, Mar 1998. ISSN 0301-5548 (Print). 0301-5548 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9562367>>.

EGERMAN, M. A.; GLASS, D. J. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 49, n. 1, p. 59-68, Jan-Feb 2014. ISSN 1549-7798 (Electronic). 1040-9238 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24237131>>.

FIGUEIREDO, V. C. et al. Ribosome biogenesis adaptation in resistance training-induced human skeletal muscle hypertrophy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 309, n. 1, p. E72-83, Jul 01 2015. ISSN 1522-1555 (Electronic). 0193-1849 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25968575>>.

GILSON, H. et al. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 452-60, Jan 2007. ISSN 0013-7227 (Print). 0013-7227 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038559>>.

GINSBERG, A. B. et al. 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. **J Neuroendocrinol**, v. 15, n. 11, p. 1075-83, Nov 2003. ISSN 0953-8194 (Print). 0953-8194 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14622438>>.

GIRON, M. D. et al. beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) normalizes dexamethasone-induced autophagy-lysosomal pathway in skeletal muscle. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117520, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic). 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25658432>>.

GOMES, M. D. et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 25, p. 14440-5, Dec 04 2001. ISSN 0027-8424 (Print). 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717410>>.

HANSON, E. D. et al. Effects of strength training on physical function: influence of power, strength, and body composition. **J Strength Cond Res**, v. 23, n. 9, p. 2627-37, Dec 2009. ISSN 1533-4287 (Electronic). 1064-8011 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910811>>.

HERRERA, N. A. et al. Exercise Training Prevents Dexamethasone-induced Rarefaction. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 70, n. 3, p. 194-201, Sep 2017. ISSN 1533-4023 (Electronic). 0160-2446 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28678054>>.

HERRERA, N. A. et al. Exercise training attenuates dexamethasone-induced hypertension by improving autonomic balance to the heart, sympathetic vascular modulation and skeletal muscle microcirculation. **J Hypertens**, v. 34, n. 10, p. 1967-76, Oct 2016. ISSN 1473-5598 (Electronic). 0263-6352 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27434101>>.

HORNBERGER, T. A., JR.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, v. 29, n. 1, p. 16-31, Feb 2004. ISSN 1066-7814 (Print). 1066-7814 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001801>>.

HWEE, D. T.; GOMES, A. V.; BODINE, S. C. Cardiac proteasome activity in muscle ring finger-1 null mice at rest and following synthetic glucocorticoid treatment. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 5, p. E967-77, Nov 2011. ISSN 1522-1555 (Electronic). 0193-1849 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21828340>>.

JAHNG, J. W. et al. Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 581, n. 1-2, p. 64-70, Feb 26 2008. ISSN 0014-2999 (Print). 0014-2999 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18164702>>.

KAASIK, P. et al. Ageing and dexamethasone associated sarcopenia: peculiarities of regeneration. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 105, n. 1-5, p. 85-90, Jun-Jul 2007. ISSN 0960-0760 (Print). 0960-0760 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17587565>>.

KOHNEN, G. et al. The monoclonal antibody GB 42--a useful marker for the differentiation of myofibroblasts. **Cell Tissue Res**, v. 281, n. 2, p. 231-42, Aug 1995. ISSN 0302-766X (Print). 0302-766X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7648618>>.

KRUG, A. L. et al. High-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy. **Muscle Nerve**, v. 53, n. 5, p. 779-88, May 2016. ISSN 1097-4598 (Electronic). 0148-639X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26355638>>.

LEE, S. et al. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 96, n. 3, p. 1097-104, Mar 2004. ISSN 8750-7587 (Print). 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766764>>.

LELLIS-SANTOS, C. R., 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** v. 23, n. 3, p. 9, 2007. ISSN 1981-3163.

LEWIS, M. I. et al. Influence of varying degrees of malnutrition on IGF-I expression in the rat diaphragm. **J Appl Physiol (1985)**, v. 95, n. 2, p. 555-62, Aug 2003. ISSN 8750-7587 (Print). 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704096>>.

LEWIS, M. I.; MONN, S. A.; SIECK, G. C. Effect of corticosteroids on diaphragm fatigue, SDH activity, and muscle fiber size. **J Appl Physiol (1985)**, v. 72, n. 1, p. 293-301, Jan 1992. ISSN 8750-7587 (Print). 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1537729>>.

LI, W. et al. Noninvasive imaging of in vivo MuRF1 expression during muscle atrophy. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94032, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic). 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710205>>.

LINDEMULDER, S. J. et al. Survivors of standard risk acute lymphoblastic leukemia do not have increased risk for overweight and obesity compared to non-cancer peers: a report from the Children's Oncology Group. **Pediatr Blood Cancer**, v. 62, n. 6, p. 1035-41, Jun 2015. ISSN 1545-5017 (Electronic). 1545-5009 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25663378>>.

LU, H. et al. Revealing the dynamics of the 20 S proteasome phosphoproteome: a combined CID and electron transfer dissociation approach. **Mol Cell Proteomics**, v. 7, n. 11, p. 2073-89, Nov 2008. ISSN 1535-9484 (Electronic). 1535-9476 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18579562>>.

LUCIANO, T. F. et al. Responses of skeletal muscle hypertrophy in Wistar rats to different resistance exercise models. **Physiol Res**, v. 66, n. 2, p. 317-323, May 04 2017. ISSN 1802-9973 (Electronic). 0862-8408 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27982685>>.

LUO, L. et al. Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 4, p. 427-36, Apr 2013. ISSN 1873-6815 (Electronic). 0531-5565 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23419688>>.

MA, J. et al. Alleviating allergic airway diseases by means of short-term administration of IL-2 and dexamethasone. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 6, p. 1447-56 e6, Jun 2011. ISSN 1097-6825 (Electronic). 0091-6749 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21377197>>.

MA, K. et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n. 2, p. E363-71, Aug 2003. ISSN 0193-1849 (Print). 0193-1849 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721153>>.

MACEDO, A. G. et al. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 143, p. 357-64, Sep 2014. ISSN 1879-1220 (Electronic). 0960-0760 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24861267>>.

MACEDO, A. G. et al. Time-course changes of catabolic proteins following muscle atrophy induced by dexamethasone. **Steroids**, v. 107, p. 30-6, Mar 2016. ISSN 1878-5867 (Electronic). 0039-128X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26730720>>.

MASCHER, H. et al. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 1, p. E43-51, Jan 2008. ISSN 0193-1849 (Print). 0193-1849 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17971512>>.

MCKIBBIN, P. E. et al. The effect of dexamethasone on neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions. **Life Sci**, v. 51, n. 16, p. 1301-7, 1992. ISSN 0024-3205 (Print). 0024-3205 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1406050>>.

MENEZES, L. G. et al. Creatine supplementation attenuates corticosteroid-induced muscle wasting and impairment of exercise performance in rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 102, n. 2, p. 698-703, Feb 2007. ISSN 8750-7587 (Print). 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053101>>.

MICHEL, C.; CABANAC, M. Effects of dexamethasone on the body weight set point of rats. **Physiol Behav**, v. 68, n. 1-2, p. 145-50, Dec 1-15 1999. ISSN 0031-9384 (Print). 0031-9384 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627073>>.

MURTON, A. J.; CONSTANTIN, D.; GREENHAFF, P. L. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1782, n. 12, p. 730-43, Dec 2008. ISSN 0006-3002 (Print). 0006-3002 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992328>>.

NICASTRO, H. et al. Effects of creatine supplementation on muscle wasting and glucose homeostasis in rats treated with dexamethasone. **Amino Acids**, v. 42, n. 5, p. 1695-701, May 2012. ISSN 1438-2199 (Electronic). 0939-4451 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21373767>>.

NICASTRO, H. et al. Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats. **Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 465-71, Apr 2012. ISSN 1873-1244 (Electronic). 0899-9007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079394>>.

OGASAWARA, R. et al. mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 114, n. 7, p. 934-40, Apr 2013. ISSN 1522-1601 (Electronic). 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23372143>>.

PARK H, F. R., LEE S. Resistance training results in selective hypertrophy of skeletal muscle in both young and middle-aged rats. **Kor J Exerc Nutr** v. 12, p. 127–132, 2008.

PELLEGRINO, M. A. et al. Clenbuterol antagonizes glucocorticoid-induced atrophy and fibre type transformation in mice. **Exp Physiol**, v. 89, n. 1, p. 89-100, Jan 2004. ISSN 0958-0670 (Print). 0958-0670 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109214>>.

PINHEIRO, C. H. et al. Exercise prevents cardiometabolic alterations induced by chronic use of glucocorticoids. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, n. 4, p. 400-8, 392-400, Oct 2009. ISSN 1678-4170 (Electronic). 0066-782X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19936461>>.

PULLEN, A. H. The distribution and relative sized of fibre types in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. **J Anat**, v. 123, n. Pt 2, p. 467-86, Apr 1977. ISSN 0021-8782 (Print). 0021-8782 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/140160>>.

REBEYROL, C. et al. Glucocorticoids reduce inflammation in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. **Cell Signal**, v. 24, n. 5, p. 1093-9, May 2012. ISSN 1873-3913 (Electronic). 0898-6568 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22285804>>.

SCHAKMAN, O. et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 10, p. 2163-72, Oct 2013. ISSN 1878-5875 (Electronic). 1357-2725 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23806868>>.

SEVERINO, C. et al. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 2, p. E367-73, Aug 2002. ISSN 0193-1849 (Print). 0193-1849 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110544>>.

SHIGUEMOTO, G. E. et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scand J Med Sci Sports**, v. 22, n. 5, p. 607-17, Oct 2012. ISSN 1600-0838 (Electronic). 0905-7188 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362057>>.

SHIMIZU, N. et al. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. **Cell Metab**, v. 13, n. 2, p. 170-82, Feb 02 2011. ISSN 1932-7420 (Electronic). 1550-4131 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284984>>.

SMITH, I. J. et al. Sepsis increases the expression and activity of the transcription factor Forkhead Box O 1 (FOXO1) in skeletal muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 5, p. 701-11, May 2010. ISSN 1878-5875 (Electronic). 1357-2725 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20079455>>.

STEFANETTI, R. J. et al. Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training. **Pflugers Arch**, v. 467, n. 7, p. 1523-1537, Jul 2015. ISSN 1432-2013 (Electronic). 0031-6768 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104573>>.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **J Psychosom Res**, v. 53, n. 4, p. 865-71, Oct 2002. ISSN 0022-3999 (Print). 0022-3999 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377295>>.

TULIPANO, G. et al. Glucocorticoid inhibition of growth in rats: partial reversal with the full-length ghrelin analog BIM-28125. **Pituitary**, v. 10, n. 3, p. 267-74, 2007. ISSN 1386-341X (Print). 1386-341X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17587180>>.

UMEKI, D. et al. Protective Effects of Clenbuterol against Dexamethasone-Induced Masseter Muscle Atrophy and Myosin Heavy Chain Transition. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128263, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic). 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26053620>>.

WALLACE, A. M. et al. Short-term effects of prednisolone and dexamethasone on circulating concentrations of leptin and sex hormone-binding globulin in children being treated for acute lymphoblastic leukaemia. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 58, n. 6, p. 770-6, Jun 2003. ISSN 0300-0664 (Print). 0300-0664 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12780755>>.

WANG, H. et al. Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. **J Biol Chem**, v. 281, n. 51, p. 39128-34, Dec 22 2006. ISSN 0021-9258 (Print). 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17074751>>.

WIRTH, O. et al. Control and quantitation of voluntary weight-lifting performance of rats. **J Appl Physiol** (1985), v. 95, n. 1, p. 402-12, Jul 2003. ISSN 8750-7587 (Print). 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12665538>>.

WU, Y. et al. REDD1 is a major target of testosterone action in preventing dexamethasone-induced muscle loss. **Endocrinology**, v. 151, n. 3, p. 1050-9, Mar 2010. ISSN 1945-7170 (Electronic). 0013-7227 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032058>>.

YAMAMOTO, D. et al. Branched-chain amino acids protect against dexamethasone-induced soleus muscle atrophy in rats. **Muscle Nerve**, v. 41, n. 6, p. 819-27, Jun 2010. ISSN 1097-4598 (Electronic). 0148-639X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169591>>.

ZANCHI, N. E. et al. Chronic resistance training decreases MuRF-1 and Atrogin-1 gene expression but does not modify Akt, GSK-3beta and p70S6K levels in rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 106, n. 3, p. 415-23, Jun 2009. ISSN 1439-6327 (Electronic). 1439-6319 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19306017>>.

10. ANEXOS

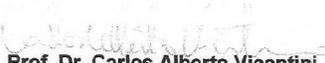
10.1. ANEXO 1- PARECER DO COMITE DE ÉTICA

	<small>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" Câmpus de Bauru</small>	 <small>Faculdade de Ciências</small>
---	---	---

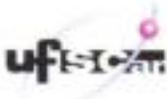
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - FC/UNESP BAURU

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Análise temporal aos efeitos preventivos do exercício resistido sobre a atrofia muscular induzida por dexametasona**", (processo nº **1435/2014 Vol. 1 - CEUA/FC**), sob a responsabilidade da Prof^ª. Dr^ª. **SANDRA LIA DO AMARAL CARDOSO**, está de acordo com a legislação (Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008), com as resoluções normativas aplicáveis e à luz dos Princípios Éticos de Experimentação Animal elaborados pelo CONCEA, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, em reunião de 26 de fevereiro de 2015.


Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini
Presidente da CEUA

10.2. ANEXO 2 - PARECER DO PIPGCF

	<p>PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCAR/UNESP Via Washington Luiz, km 235 - Caixa Postal 676. Fone/Fax: (016) 3351 8328 - e-mail: ppgcf@power.ufscar.br 13565-906 - São Carlos, SP - Brasil</p>	
<p>PARECER SOBRE PLANO DE PESQUISA - MESTRADO E DOUTORADO DO PIPGCF</p>		
<p>CANDIDATO:</p>		
<p>NÍVEL: () MESTRADO (X) DOUTORADO</p>		
<p>ORIENTADOR:</p>		
<p>RELATOR:</p>		
		
<p>ASSINATURA: _____</p>		
<p>PARECER</p>		
<p><u>OBS.: Devolver, juntamente com o parecer, o original do projeto</u></p>		
<p>1. Adequação do tema do ponto de vista da área de concentração (Fisiologia) do PIPGCF</p>		
<p>2. Racionalidade da proposta de pesquisa frente ao tempo estabelecido para a sua conclusão: 24 meses - Mestrado 48 meses - Doutorado</p>		
<p>3. Qualidade do projeto: abrangência, abordagem, metodologia e referências bibliográficas:</p>		
<p>4. Cronograma das atividades apresentadas, incluindo prazo para defesa pública (Tese/Dissertação) dentro do período de 24 e 48 meses:</p>		
<p>5. Recomendação final:</p>		
<p><input checked="" type="checkbox"/> aprovado sem alterações</p>		
<p><input type="checkbox"/> aprovado com alterações sem necessidade de voltar ao relator</p>		
<p><input type="checkbox"/> aprovado com alterações, devendo voltar ao relator</p>		
<p><input type="checkbox"/> reprovado</p>		
<p>6. Sugestões: (utilizar folha anexa, se necessário)</p>		
<p><i>Rever o cronograma de atividades na página 15</i></p>		