

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCAR/UNESP

**EFEITOS PREVENTIVOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO NA EXPRESSÃO DE  
PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ATROFIA MUSCULAR EM RATOS TRATADOS  
COM DEXAMETASONA.**

Aluno: Anderson Geremias Macedo

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral

São Carlos/Bauru

Março – 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCAR\UNESP

**EFEITOS PREVENTIVOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO NA EXPRESSÃO DE  
PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ATROFIA MUSCULAR EM RATOS TRATADOS  
COM DEXAMETASONA.**

Dissertação submetida ao programa de pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aluno: Anderson Geremias Macedo

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral

São Carlos/Bauru

Março – 2013

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

M141ep

Macedo, Anderson Geremias.

Efeitos preventivos do exercício resistido na expressão de proteínas envolvidas na atrofia muscular em ratos tratados com dexametasona / Anderson Geremias Macedo. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
56 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fisiologia. 2. Dexametasona. 3. Músculo esquelético. 4. Treinamento resistido. I. Título.

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

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

Folha de Aprovação

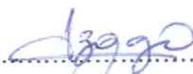
Dissertação de Mestrado de Anderson Geremias Macedo

Dia 25/03/2013

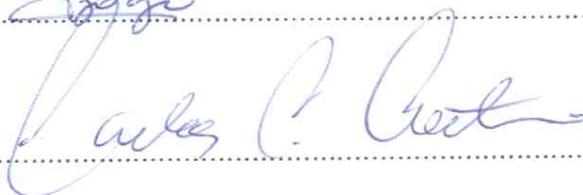
Profª. Drª. Sandra Lia do Amaral Cardoso.....



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



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



## **Dedicatória**

Dedico essa Dissertação a Deus e principalmente a minha família,  
os quais sempre estiveram comigo em todos os passos da minha vida

## **Agradecimentos**

A todos os professores que tiveram participação em minha formação e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas e do Programa Inter-Institucional de Pós-Graduação em Ciências fisiológicas - associação ampla UFSCAR/ UNESP.

A CNPQ pela bolsa estudantil e FAPESP.

Ao secretário Alexandre por sua atenção e disponibilidade.

Aos meus amigos de São Carlos Igor, Rafael e Diego pelas hospedagens. Aos amigos e companheiros da Ufscar de pós graduação em especial Fábio e Camila pelo companheirismo e atenção .

Aos meus companheiros e amigos de laboratório Paula, Aline e André Krug este último acabou sendo muito importante neste trabalho, onde todos contribuíram para a conclusão desta dissertação e não esquecendo do suporte técnico da futura mestrandia Lidiane .

À minha tutora, orientadora Sandra, a qual com o tempo aprendi a admirar, respeitar e espelhar-me tanto como orientadora e pessoa. O carinho que adquiri por ela vai além do sentimento de orientado/orientador. Muito obrigado pela atenção, perseverança e por acreditar em mim!

À minha família que sem eles jamais seria possível tudo isso. Sem dúvida é o suporte para tudo, infelizmente me ausentei um pouco nestes últimos dois anos. Meu pai Israel, minha mãe Flávia e meu irmão (meu pai mais novo) Robson, não existem palavras para descrever meu sentimento por eles, me ensinaram tudo que sou como pessoa, profissional, etc. Esta conquista não é só minha, mas deles também. Como sempre digo: sou apenas um cara simples de São João que resolveu ousar um pouco.

Obrigados a todos que durante este período de alguma forma fizeram parte desta conquista.

## RESUMO

A Dexametasona (Dexa) vem sendo amplamente usada no tratamento de inflamações e alergias, porém seu uso crônico provoca resistência periférica à insulina, hipertensão arterial, perda de peso corporal e atrofia muscular. O exercício físico aeróbio contínuo, de baixa intensidade, tem sido empregado na prevenção e tratamento de diabetes, hipertensão arterial e síndrome metabólica, no entanto, seus efeitos sobre a atrofia muscular ainda são incertos. Atrofia muscular pode ser determinada por um desequilíbrio entre proteínas atroficas (FOXO3a, atrogina-1 Murf-1) e hipertróficas (AKT, mTOR), mas quase nada se sabe sobre os efeitos da Dexa sobre estas proteínas. O exercício resistido (TR) tem sido recomendado como tratamento de patologias que envolvem atrofia muscular, no entanto pouco se sabe sobre os efeitos do TR de baixa intensidade sobre a atrofia muscular induzida pela Dexa. Este estudo investigou se o TR de baixa intensidade, realizado antes e concomitante ao tratamento com Dexa, poderia prevenir e/ou atenuar a atrofia muscular. Além disso, verificou o papel das proteínas que controlam a homeostase muscular nesta resposta. Quarenta e oito ratos foram alocados em 4 grupos: sedentário controle (SC), sedentário e tratado com Dexa (SD), treinado controle (TC) e treinado e tratado com Dexa (TD). Após um período de adaptação, estes ratos foram submetidos ao protocolo de treinamento resistido (escalada, 60% do carregamento máximo, 5 dias / semana, 70 dias) ou mantidos sedentários. Durante os últimos 10 dias, os animais foram tratados com Dexa (0,5 mg/kg de peso corporal por dia, *i.p.*). A glicemia de jejum foi medida antes e após os períodos de treinamento físico e tratamento com a Dexa. O peso corporal (PC) foi mensurado semanalmente antes do tratamento e diariamente durante o tratamento. Os músculos tibial anterior (TA), flexor longo do Halux (FHL) e sóleo foram retirados e homogeneizados. Verificou-se a produção das proteínas AKT, mTOR, FOXO3a, Atrogina-1 e Murf-1 nos músculos. Anova de 2 caminhos, com post-hoc de Tukey, foram utilizados ( $p < 0,05$ ). O tratamento com Dexa determinou aumento da glicemia de jejum em 46%, redução de 19% do PC e de 45% na ingestão alimentar nos sedentários. O TR, que foi efetivo em aumentar a capacidade física dos animais (+118%) preveniu o aumento da glicemia, mas não atenuou a redução de PC. A Dexa promoveu atrofia muscular no TA (-21%), que foi causada por redução da produção proteica de AKT (-29%) e aumento da Murf-1 (+25%). O TR atenuou o aumento da Murf-1 (-37%), no entanto, não foi efetivo em atenuar a atrofia no TA. No FHL, ocorreu atrofia (-28%) determinada pela redução da AKT (-27%) e aumento da Murf-1 (+55%). O TR promoveu aumento da mTOR no TC (+36%) e no TD (+72%) bem como reduziu a produção proteica de atrogina-1 no TD, o que contribuiu para atenuar a atrofia muscular no FHL. O sóleo não foi alterado nem pela Dexa nem pelo TR. Estes dados sugerem que o TR, de baixa intensidade, foi eficaz em atenuar a atrofia muscular no FHL por uma combinação entre redução de proteínas atroficas acompanhada de aumento de proteínas hipertróficas.

**Palavras chave:** Atrofia muscular, hipertrofia muscular, musculatura esquelética glicocorticóides e treinamento resistido

## ABSTRACT

Dexamethasone (Dexa) has been widely used as anti-inflammatory and anti-allergic treatment, however, its chronic use provokes peripheral insulin resistance, hypertension, weight loss and muscle atrophy. Low intensity aerobic training has been indicated for prevention and treatment of diabetes, hypertension and metabolic syndrome, however, its effects on muscle atrophy are still uncertain. Muscle atrophy may be determined by an imbalance between atrophic (FOXO3a, atrogin-1, Murf-1) and hypertrophic (AKT, mTOR) proteins, but almost nothing is known about the effects of Dexa on these proteins. Resistance training (RT) has been recommended for treatment of pathologies which involves muscle atrophy, however little is known about the effects of low intensity RT on the muscle atrophy induced by Dexa. This study investigated whether low intensity RT, performed before and concomitant with Dexa treatment could prevent and / or attenuate muscle atrophy induced by Dexa. Also, it examined the role of proteins that control muscle homeostasis in this response. Forty-eight rats were allocated into 4 groups: sedentary control (SC), sedentary and treated with Dexa (SD), trained control (TC) and trained and treated with Dexa (TD). After an adaptation period, the rats underwent to an resistance exercise protocol (ladder, 60% maximal loading, 5 days / week, 70 days) or kept sedentary. During the last 10 days, the rats were treated with Dexa (0.5 mg / kg of bodyweight per day, *i.p.*). Fasting glycemia was measured before and after exercise training and treatment periods. Bodyweight (BW) was measured weekly before treatment and daily during drug treatment. The tibialis anterior (TA), flexor hallucis longus (FHL) and soleus muscles were removed and homogenized. Protein production of AKT, mTOR, FOXO3a, atrogin-1 and Murf-1 was analyzed in the muscles. Two-way ANOVA with Tukey post-hoc were used ( $p < 0.05$ ). Dexa treatment increased glycemia by 46%, reduced BW by 19% and food intake by 45% in sedentary animals. The RT, that was effective to increase physical capacity of the rats (+118%) prevented the increase in glycemia, but did not avoid the BW reduction. Dexa provoked TA muscle atrophy (-21%), which was determined by reduction of AKT (-29%) and increase of Murf-1 (+25%). RT attenuated the increased the Murf-1 protein production (-37%), however it did not avoid TA muscle atrophy. In the FHL, it was observed muscle atrophy (-28%) determined by reduction of AKT (-27%) and increase of Murf-1 (+55%). RT increased mTOR in TC (+36%) and TD (+72%) groups and also reduced atrogin-1 protein production in TD, which contributed to attenuate FHL muscle atrophy. Soleus muscle was not altered neither by training nor treatment. These data together suggest that low intensity RT was effective in attenuating FHL muscle atrophy due to a combination of increase in hypertrophic and decrease in atrophic protein production.

**Keywords:** resistance training, atrophic protein, hypertrophic proteins, skeletal muscle and glucocorticoids

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração esquemática da sequência de eventos que controlam a homeostasia da musculatura esquelética. Proteínas responsáveis pela hipertrofia (vermelho) e proteínas atroficas (preto). .....11
- Figura 2 Sistema Ubiquitina Proteassoma: Ilustração do processo de ubiquitinação que “identifica” a proteína a ser degradada.....14
- Figura 3. Linha de tempo do protocolo experimental.....20
- Figura 4. Escada de madeira utilizada no protocolo de exercício resistido. Contém 110cm de altura, com degraus de ferro e inclinação de 80 graus. Vista frontal (painel à esquerda) e vista lateral (painel à direita).....21
- Figura 5: A- Resultados dos testes de carregamento máximo realizados na escada durante o protocolo experimental, nas 4 avaliações (TM-1, TM-2, TM-3 e TM-4) nos 4 grupos avaliados: Sedentário controle (SC,n=11).B Resultados dos testes de força relativa realizados na escada durante o protocolo experimental, nas 4 avaliações (TM-1, TM-2, TM-3 e TM-4) nos 4 grupos avaliados: Sedentário controle (SC,n=11), Sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=13), treinado controle (TC, n=11) e treinado e tratado com dexametasona (TD, n=13). Significância: # vs início, \* vs sedentário,  $p < 0,05$ ..... 28
- Figura 6: Valores de glicemia de jejum nas avaliações: 1-antes do treinamento; 2- após treinamento e antes do tratamento e 3- após tratamento com dexametasona, nos diferentes grupos analisados: sedentário controle (SC,n=11), sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=13), treinado controle (TC,n=11) e Treinado e tratado com dexametasona (n=13). Significância: # vs início do tratamento, \* vs controle, + vs sedentário,  $p < 0,05$ ..... 29
- Figura 7: Evolução do peso corporal durante as 8 semanas de treinamento resistido e no período de 10 dias do tratamento com Dexa (10 dias) nos grupos sedentário controle (SC, n=11) sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=11), treinado controle ( TC,n=11) e treinado e tratado com dexametasona (TD, n=13). Significância \* vs controle, # vs início,  $p < 0,05$ .....30
- Figura 8: Evolução da ingestão alimentar antes do tratamento e durante os 10 dias de tratamento em todos os grupos analisados: sedentário controle (SC,n=11), sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=13), treinado controle (TC,n=11), treinado e tratado com dexametasona (TD,n=13). \* vs controle  $p < 0,05$ .....31
- Figura 9: Valores de peso muscular dos músculos Tibial Anterior (TA), normalizado pelo tamanho da tíbia (cm) e análise densitométrica da produção protéica da AKT, mTOR, FOXO3a, atrogina-1 e Murf-1 em todos os grupos analisados: sedentário controle (SC,n=11), sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=13), treinado controle ( TC, n=11), treinado e tratado com dexametasona (TD,n=13). Significância: \* vs controle, + vs sedentário,  $p < 0,05$  .....32
- Figura 10: (A) Valores de peso muscular do Flexor longo do Halux (FHL), normalizado pelo tamanho da tíbia (cm) e análise densitométrica da produção protéica da AKT, mTOR, FOXO3a, atrogina-1 e Murf-1 em todos os grupos analisados: sedentário controle (SC,n=11), sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=13), treinado controle ( TC, n=11), treinado e tratado com dexametasona (TD,n=13). Significância: \* vs controle, + vs sedentário  $p < 0,05$ ..... 34
- Figura 11: Valores de peso muscular do Sóleo, normalizado pelo tamanho da tíbia (cm) e análise densitométrica da produção protéica da AKT, mTOR, FOXO3a, atrogina-1 e Murf-1 em todos os grupos analisados: sedentário controle (SC,n=11), sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=13), treinado controle ( TC, n=11), treinado e tratado com dexametasona (TD,n=13). Significância: \* vs controle, + vs sedentário  $p < 0,05$ .....36

## LISTA DE ABREVIATURAS

AKT: treonina\seronina tirosina quinase

Atrogina-1: muscle atrophic F-box

Dexa: dexametasona

FHL: Músculo Flexor longo do Halus

FOXO3a: Forkead transcription factors

IGF-I- fator de crescimento semelhante à insulina 1

GLUT-4: Transportador de glicose

g: gramas

Kg: kilogramas

mTOR: rapamicina

Murf-1: Murfs muscle ringer finger1

PC: Peso corporal

P70S6K: fosfatidilinositol quinase dependente 1

PI3K :Fosfatidilinositol quinase-3

SC: ratos sedentários controle

SD: ratos sedentários tratados com dexametasona

TA: Músculo Tibial anterior

TC: ratos treinados controles

TD: ratos treinados tratados com dexametasona

TEM: teste de carregamento máximo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO/ REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Efeitos da Dexametasona.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Efeitos do Exercício Físico.....</b>	<b>15</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>18</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>19</b>
<b>3. 1.Objetivos específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Adatações dos animais ao esforço físico .....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Avaliação da Capacidade física dos animais e Cronograma de Treinamento.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3. Grupos Experimentais.....</b>	<b>22</b>
<b>4.4. Avaliação da glicemia Jejum.....</b>	<b>23</b>
<b>4.5. Retirada dos músculo esqueléticos.....</b>	<b>23</b>
<b>4.6. Protocolo de dosagem proteínas.....</b>	<b>24</b>
<b>4.7. Procedimentos do Western Blotting.....</b>	<b>24</b>
<b>4.8. Métodos Estatísticos.....</b>	<b>25</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO/ REVISÃO DE LITERATURA

O cortisol, ou corticosterona em roedores, principal glicocorticóide no organismo de humanos, é liberado em situações de “luta ou fuga” e/ou exercício físico prolongado e atua no metabolismo das proteínas, carboidratos e gorduras. Sua liberação tem como principal finalidade mobilizar substratos energéticos para manter o metabolismo basal, ou seja, a homeostase (ANDREWS e WALKER, 1999; REYNOLDS e WALKER, 2003). Os glicocorticóides são produzidos pelo córtex adrenal sob o controle do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e regulado pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Os glicocorticóides atuam, por meio de seus receptores (GR) no citoplasma, controlando a velocidade de síntese de proteínas, ou seja, estimulando ou inibindo genes diretamente envolvidos na inflamação, gliconeogênese e diferenciação de adipócitos (WHORWOOD et al., 2002). Uma liberação muito elevada tem sido associada com a síndrome de Cushing (STORN et al., 2008).

Dentre vários glicocorticóides sintéticos comercializados atualmente, a dexametasona (Dexa) é amplamente utilizada em situações inflamatórias, imunossupressoras e alérgicas (BARNERS, 1999; ALMEIDA, 2001; DEFOJO et al., 2001).

### 1.1 Efeitos da Dexametasona

A Dexa é muito eficaz como anti-inflamatório porém, seu uso agudo e crônico pode acarretar uma série de efeitos colaterais. Já é sabido que uma simples dose de Dexa pode ser responsável por alterar significativamente o metabolismo cardíaco, bem como os ácidos graxos livres na circulação em animais (QI et al., 2004) e produzir reduzida tolerância à glicose em humanos (SCHENEITER e TAPP, 1998). O uso crônico deste glicocorticóide sintético determina quadros de hiperglicemia, resistência periférica à insulina e hiperinsulinemia (BROTMAN et al., 2005; PATEL et al., 2006; BAREL et al., 2010). Muitas vezes determinada também pela gliconeogênese aumentada, que pode ser ativada pelo aumento de liberação de glucagon (PITNEER e

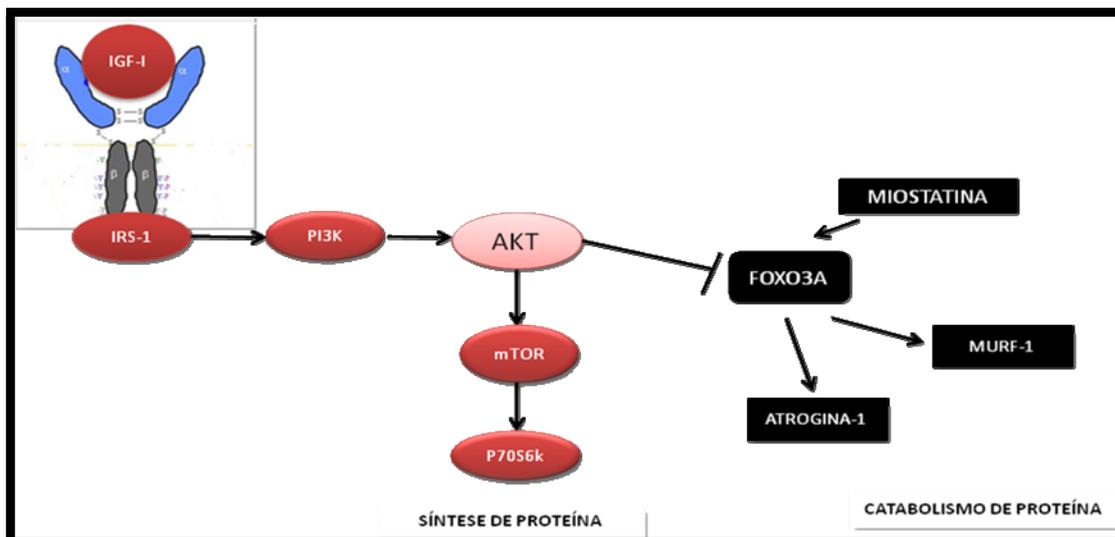
BRINDLEY,1985). Recentemente, dados do laboratório têm demonstrado que estes efeitos podem ser parcialmente explicados por alterações das proteínas responsáveis pela captação periférica de glicose na musculatura esquelética (LOUZADA, 2009; DIONÍSIO et al., 2009). Além disso, tem sido demonstrado que o uso crônico de dexametasona determina lipólise, proteólise (SACHECK et al., 2004; SULTAN et al., 2006; PINHEIRO et al., 2009) e hipertensão arterial (SEVERINO et al., 2002; DAGAN et al., 2006).

Especificamente na musculatura esquelética, vários trabalhos na literatura (AHTIKOSKI et al., 2003; MA et al. 2003; GILSON et al., 2007; CHO et al., 2009; BAREL et al., 2010) e alguns dados do laboratório ainda não publicados (LOUZADA, 2009; DIONISIO, 2010; MARTUCELLI 2011), têm demonstrado que o tratamento crônico com a Dexametasona promove perda significativa de peso corporal em animais, constantemente acompanhada por atrofia muscular. Esta redução de peso corporal parece ser independente da dosagem (0,5 mg/kg ou 1,0 mg/kg de peso corporal por dia) como demonstrado por Louzada et al. (2009); Barel et al. (2010); Dionísio (2010); Martucelli et al. (2011). Os mecanismos responsáveis pela perda de peso corporal, induzida por glicocorticóides sintéticos, ainda não são totalmente conhecidos. Uma das possíveis explicações é a redução da ingestão alimentar, como demonstrado por Lewis et al. (2003), uma vez que ocorre diminuição dos níveis de neuropeptídeo Y e do hormônio liberador de corticotrofina no núcleo paraventricular, os quais regulam o apetite e termogênese no hipotálamo (KARSSSEN et al., 2005). De acordo com esta afirmação, Santos et al. (2007) demonstraram que ratos tratados por 5 dias com Dexametasona (1,0 mg/kg de peso corporal por dia) diminuem significativamente seu consumo alimentar.

Outra possível causa da perda do peso corporal é o aumento do catabolismo protéico. Tem sido demonstrado que a suplementação com creatina (Menezes et al., 2007) ou glutamina (HICKSON, CZERWINSK, WEGRZYN, 1995) podem atenuar a perda de massa muscular e perda de peso corporal. Por outro lado, Nicastro et al. (2011) mostraram que ratos tratados com Dexametasona e suplementados com leucina não tiveram atenuação a perda de peso corporal. Alguns autores têm correlacionado diretamente a perda de peso corporal com a atrofia muscular (MA et al., 2003; GILSON et al., 2007; CHO et

al., 2009; BAEHR, FURLOW, BODINE, 2011). A musculatura é importante para a realização dos movimentos, força, locomoção, equilíbrio postural e regulação da temperatura corporal (CERLETTI et al., 2008; LENK et al., 2010). Os músculos são importantes para manter a homeostasia, uma vez que a perda de 30% à 40% da massa muscular esquelética pode determinar o óbito do indivíduo. (KOTLER et al., 1989; TISLADE, 2002).

A manutenção da homeostase do músculo esquelético depende de um rigoroso controle entre as proteínas hipertróficas e atroficas, que estão ilustradas na Figura 1. Destaca-se em vermelho as proteínas hipertróficas: fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), Fosfatidilinositol quinase-3 (PI3K), treonina\seronina tirosina quinase (AKT), rapemincina (mTOR) e fosfatidilinositol quinase dependente 1 (P70S6K). As proteínas atroficas são destacadas em preto: diferenciação do fator-8 do crescimento (miostatina), Forkhead transcription factors (FOXO) , muscle atrophic F-box (MAF-bx ou atrogina) e Murfs muscle ringer finger1(Murfs) , (LENK et al., 2010), (MCPHERRON e LEE, 2002) , (LEGER et al., 2006; SANDRI et al., 2007) e (GLASS, 2005).



**Figura 1.** Ilustração esquemática da sequência de eventos que controlam a homeostasia da musculatura esquelética. Proteínas responsáveis pela hipertrofia (vermelho) e proteínas atroficas (preto). (*Adaptado Glass 2005*)

Tem sido demonstrado que a presença de um desequilíbrio entre os agentes hipertróficos e atróficos pode desencadear uma hipertrofia (ganho de massa muscular) ou atrofia muscular (redução da massa muscular), no entanto, não está claro se a hipertrofia se dá pelo aumento da expressão gênica e produção de proteínas hipertróficas (ADAMS et al., 2007; HARBER et al., 2009; BAAR e ESSER, 2009; PSILANDER et al., 2010) ou diminuição da expressão gênica e produção de proteínas atróficas (MCHPERRON e LEE, 2002; LEGER et al., 2006; ADAMS et al., 2007). Da mesma forma, não se pode afirmar que a atrofia muscular se dá por meio da redução da expressão gênica e produção de proteínas hipertróficas (LALANI et al., 2000; SANDRI, 2007; LEWIS et al., 2003; LENK et al., 2010) ou aumento da expressão gênica e produção das proteínas atróficas ( SANDRI, 2007; SHACKMAN et al., 2009; SHACKMAN, 2008; LENK et al., 2010), ou ainda se a resposta observada seja uma combinação de todos os fatores.

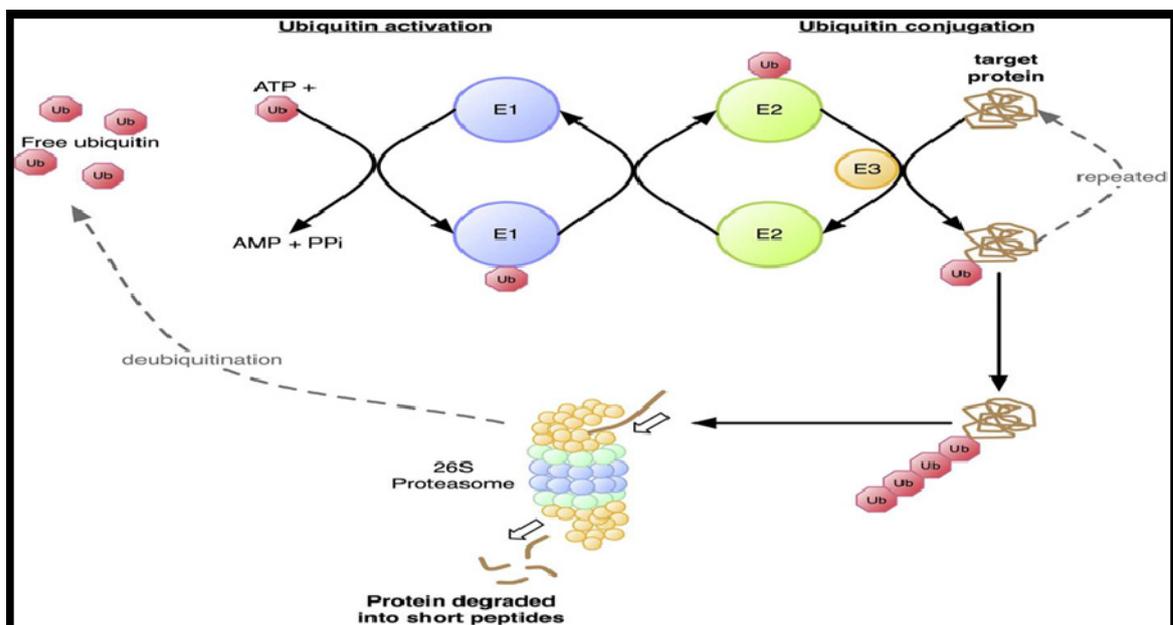
Alguns autores têm sugerido que a atrofia muscular induzida pela Dexa possa ser desencadeada por aumento de expressão gênica e produção de proteínas atróficas (MA et al., 2003; SACHECK et al., 2004, Nicastro et al., 2011; BAEHR, FURLOW, BODINE, 2011). No entanto, outros autores também demonstraram diminuição da expressão gênica e produção de proteínas hipertróficas (CHO et al., 2009; SHACKMAN et al., 2007). Além disso, Pellegrino et al. (2003) demonstraram que esse processo atrófico parece estar mais presente em fibras do tipo IIx (glicolíticas), quando comparado com fibras do tipo I (oxidativas), pois quando administrado Dexa em ratos houve uma redução muito maior das fibras glicolíticas quando comparado às oxidativas e esta redução foi atenuada quando administrado o antagonista de glicocorticóide. O mecanismo pelo qual a Dexa promove atrofia muscular ainda não é totalmente esclarecido.

Uma das proteínas catabólicas, a miostatina, mostrada na Figura 1 (preto) tem recebido ênfase em alguns estudos. A miostatina, que faz parte da família dos TGF $\beta$  descoberta em meados de 1990 (GDF-8), tem sido implicada como um dos principais responsáveis pela atrofia muscular induzida pela Dexa, uma vez que animais sem a expressão gênica de miostatina não reduziram

seus pesos corporais nem apresentaram atrofia muscular após tratamento com dexametasona (GILSON et al., 2007; CHO et al., 2009). Porém, apesar de alguns autores demonstrarem que sua expressão gênica é aumentada após tratamento com Dexametasona (MA et al., 2003; GILSON et al., 2006), seu efeito é bifásico. Ma et al. (2003) demonstraram que 5 dias de tratamento com Dexametasona promove aumento significativo na expressão gênica da miostatina, no entanto, seus valores retornam ao basal após 10 dias de tratamento. Estes achados foram confirmados recentemente por Martucelli (2011) dados do laboratório ainda não publicados. A produção da miostatina no músculo tibial anterior não estava alta após 10 dias de tratamento com Dexametasona, apesar da presença de atrofia muscular. Portanto, parece que a miostatina não está envolvida na atrofia muscular após o tratamento crônico com Dexametasona.

Conforme observado na Figura 1 (preto), outra proteína que tem sido relacionada com a atrofia muscular é a família de fatores de transcrição conhecida como FOXO, que incluem a FOXO1, FOXO3a e FOXO4. Estes fatores regulam vários processos metabólicos e estimulam várias proteínas catabólicas. O controle da FOXO parece ser regulado diretamente pela atividade da AKT. A família desta proteína é composta por três membros: Akt1, Akt2 e Akt3. Estas três isoformas compartilham mais de 80% de homologia e são expressas de maneira específica nos tecidos, assim, as isoformas Akt1 e Akt2 são predominantemente expressas no músculo-esquelético, cérebro, coração e pulmão e a isoforma Akt3 é predominante no cérebro e testículo (COFFER e WOODGETT, 1991; JONES et al., 1991). A Akt é uma proteína chave na sinalização dos processos de síntese e degradação proteica no músculo esquelético (GLASS, et al., 2003). Quando a AKT é fosforilada, ocorre uma fosforilação da FOXO, impedindo seu translocamento até o núcleo (BAYLEI, 2013). Em sua forma desfosforilada, a FOXO se transloca para o núcleo e ativa uma série de genes relacionados com a atrofia muscular. Além disso, a FOXO induz o aumento de enzimas ligases do sistema ubiquitina-proteassoma, tais como atrogina-1 e Murf-1, que promovem o metabolismo protéico.

Ubiquitina-proteassoma é um sistema complexo e importante no controle protéico, principalmente responsável pela degradação de proteínas danificadas ou que sofreram algum erro na fase de tradução, evitando-se assim uma intercorrência na função desta proteína (GLASS, 2003). O processo de ubiquitinação ocorre por etapas conforme demonstrado na Figura 2. Com a utilização de ATP, primeiro a ubiquitina é ativada por uma enzima de ativação (E1), posteriormente outra enzima E2 forma caudas de poliubiquitinas (E2) e finalmente a transferência da ubiquitina para a proteína alvo é mediada pela enzima ligase (E3), assim, a proteína danificada fica “marcada” para ser destruída. Recentemente, foram identificadas 3 formas de enzimas ligases: a E3- $\alpha$ , a Murf-1 e atrogina-1 (BODINE et al., 2001). Alguns estudos têm demonstrado que a perda de massa muscular é acompanhada com aumento gênico da atrogina-1 e Murf-1, o que sugere participação do sistema ubiquitina-proteassoma do processo de atrofia muscular (BDOLAH et al., 2006, GILSON et al., 2007; FOLETTA et al., 2011) porém, a maioria dos trabalhos demonstram expressão gênica e são escassos os estudos sobre produção proteica. A Dexa parece aumentar as expressões gênicas dessas E3 ligases, (CHO et al., 2009).



**Figura 2.** Sistema Ubiquitina Proteassoma: Ilustração do processo de ubiquitinação que a “identifica” a proteína a ser degradada (*Adaptada de Marton , 2008*)

Além do aumento dos agentes atrofícos, a Dexametasona parece inibir a expressão gênica e produção das proteínas hipertróficas, o que contribui para maior perda de massa muscular. Em particular, tem sido demonstrado uma diminuição do IGF-1, AKT, mTOR e P70S6K (SHAH et al., 2002; GILSON et al., 2007; CHO et al., 2009). O IGF-1 é um polipeptídeo formado por aproximadamente de 67 a 70 aminoácidos com peso molecular de 95 kDa, cuja sequência é muito parecida com a pró-insulina. O IGF-1 é sintetizado no fígado, além ser produzido em vários outros lugares. Sua função é controlar o processo de sinalização intracelular miogênica, resultante no processo de crescimento celular. Essa cascata de sinalização inicia-se com o IGF-1 que se liga a seu receptor assim ativa PI3K, que ativa a AKT, que ativa a mTOR, levando a ativação da P70S6K, que por sua vez promoverá a síntese proteica (LEE, 2003; LEGER, et al., 2007).

A mTOR é uma proteína quinase com peso molecular de 289 KD. Esta proteína atua como um regulador chave do crescimento celular que integra sinais de fatores de crescimento, regeneração e controle da síntese de proteínas (SANDRI, 2008). Recentes estudos têm demonstrado sua participação na hipertrofia muscular principalmente sua atividade sendo mediada através da AKT. (WAN et al., 2006). Achados na literatura em relação aos efeitos da Dexametasona sobre esta proteína ainda são controversos. Costa et al. (2012) mostraram uma redução da produção proteica da mTOR em função do tratamento crônico com a Dexametasona. Por outro lado, Nicastro et al. (2012) mostraram que a produção proteica da mTOR não se alterou no músculo flexor plantar em ratos tratados com Dexametasona.

## **1.2. Efeitos do Exercício Físico**

Tem sido demonstrado que o exercício físico, feito de forma regular, promove diversos efeitos que contribuem significativamente para a melhora da qualidade de vida. Estes são observados no coração (FERNANDES, SOCI, OLIVEIRA, 2006), nos vasos (AMARAL et al., 2011), na musculatura esquelética (DUMKE et al., 2009; LITTE et al., 2010), no sistema nervoso

central (BRUM, et al., 2000; MARTINS, et al., 2005; LATERZA et al., 2007) na regulação hormonal (WEST et al., 2009; VINGREN et al., 2010) e no controle do metabolismo (TUNSTALL et al., 2002; HARMER et al., 2008). Devido a seus efeitos benéficos, o exercício físico tem sido usado como um tratamento não farmacológico para várias patologias como diabetes, hipertensão, obesidade e dislipidemia. Uma vez que os efeitos colaterais do tratamento crônico com Dexametasona são opostos aos oriundos do exercício físico, tais como resistência periférica à insulina, hipertensão, perda de peso corporal e atrofia muscular, é plausível pensar que o exercício físico pode também ser usado como um tratamento não farmacológico aos pacientes que recebem o tratamento crônico com a Dexametasona, com o objetivo de atenuar os efeitos deletérios, proporcionando uma melhor qualidade de vida para essas pessoas. Temos demonstrado em nosso laboratório que o exercício físico aeróbio contínuo de baixa e moderada intensidade, realizado antes e concomitante ao tratamento, promove uma melhora na captação periférica da insulina, atenuando a hiperglicemia e hiperinsulinemia induzidas pela Dexametasona (BAREL et al., 2010). Esses efeitos foram determinados pelo melhor controle na produção de proteínas tanto dependente da cascata de insulina como IRS-1 e p-AKT (DIONÍSIO 2010), ou independente da cascata da insulina, tais como AMPK- $\alpha$  e CaMKK, proteínas que também são capazes de estimular o translocamento do GLUT-4 até a membrana, afim de permitir a entrada da glicose para dentro da célula muscular (LOUZADA, 2009). Além disso, o exercício físico atenuou o aumento da pressão arterial nos animais tratados com esta droga (AMARAL et al., 2010). No entanto, o exercício aeróbio contínuo de baixa intensidade não evitou a atrofia muscular nem a redução de peso corporal induzidos pela Dexametasona, mesmo com diferentes dosagens (LOUZADA, 2009; PINHEIRO et al., 2009; BAREL et al., 2010; DIONÍSIO, 2010; MARTUSCELLI et al., 2010).

Isso se deve provavelmente porque durante atividade aeróbia as fibras recrutadas são predominantemente do tipo I, contração lenta, sendo estas menos responsivas ao processo hipertrófico, quando comparadas às fibras do tipo IIb e IIx, de contração rápida (SHEFIANO e REGGIANI, 1994; CAMPOS et al., 2002; GERGLEY, 2009). Uma vez que o exercício aeróbio contínuo de

baixa intensidade na esteira não atenuava a atrofia muscular induzida pela Dexa, era necessário investigar o efeito de outra estratégia de exercício. Neste sentido, o exercício resistido tem sido evidenciado como bom auxiliar no tratamento de doenças que provocam redução de massa muscular (SHARIFI et al., 2010; HARAN et al., 2012)

O exercício resistido atualmente já é aceito como um componente importante dos programas de condicionamento físico que visam a melhora da qualidade de vida, principalmente porque a força muscular geral do indivíduo tem sido considerada um bom preditor de risco de mortalidade (LING et al., 2010). O exercício promove ajustes na musculatura esquelética que são importantes na manutenção da força e composição corporal. Neste sentido o Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM, 2004) há quase uma década, já recomenda a utilização de exercícios resistidos de baixa intensidade (40% de 1RM), associado ao exercício aeróbio para um melhor controle da hipertensão arterial. Da mesma forma, o exercício resistido de baixa intensidade tem sido indicado no controle e tratamento de pacientes diabéticos, uma vez que se têm mostrado ser eficaz no controle da glicemia, obesidade e composição corporal (ACSM, 2004) e Diretrizes Brasileiras de Diabetes (2007). Uma vez que a Dexa promove alterações metabólicas e hemodinâmicas, que podem acarretar em hiperglicemia e hipertensão arterial, o exercício resistido de baixa intensidade parece bastante adequado. Outra importante indicação do exercício resistido seria para manter um controle adequado de massa muscular. Neste sentido Sharifi et al. (2010) têm demonstrado que um programa de exercício resistido pode atenuar a atrofia muscular em pacientes com cachexia. No entanto ainda não existe um consenso sobre a intensidade mais adequada para obtenção deste efeito (SOUZA et al., 2011). O mecanismo pelo qual o exercício resistido controla a homeostase entre proteínas atroficas e hipertróficas ainda é controverso. Além disso, pouco se sabe sobre os efeitos preventivos do exercício resistido frente a um medicamento que promove a atrofia muscular. Tem sido demonstrado que o exercício resistido (sem tratamento farmacológico) promove diminuição da expressão gênica e produção protéica de agentes atroficos (ADAMS et al., 2007; LOUIS et al.,

2007, ZANCHI et al., 2008) ou aumento da expressão gênica e produção proteica de agentes hipertróficos (PSILANDER, DANSGAARD, PILEGAARD, 2003; LERGER et al., 2006; ZANCHI et al., 2008). São escassos os trabalhos de exercício resistido frente ao tratamento com a Dexa. Nicastro et al. (2012) demonstraram um aumento do conteúdo protéico de agentes hipertróficos e diminuição da produção de agentes atróficos quando aplicaram um treinamento de exercício resistido a 70% da máximo (agachamento) e trataram com Dexa simultaneamente. Nenhum trabalho até o presente momento verificou os efeitos do exercício resistido executado antes e concomitante ao tratamento farmacológico com a Dexa sobre as proteínas atróficas e hipertróficas que controlam a homeostase muscular.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Os glicocorticóides sintéticos são amplamente utilizados clinicamente, principalmente a Dexa, devido ao seu potente efeito anti-alérgico e anti-inflamatório. Entretanto, seu uso crônico, pode induzir diversos efeitos colaterais no organismo, como, resistência periférica à insulina, hiperglicemia, lipólise, perda de peso, atrofia muscular e rarefação, podendo levar a uma síndrome de Cushing.

A regulação da homeostase da musculatura esquelética é dada pelo balanço entre proteínas hipertróficas e atróficas. Tem sido demonstrado que o tratamento crônico com Dexa promove atrofia muscular principalmente por aumentar a expressão gênica da FOXO 3a, Atrogina-1 e Murf-1 (atróficas) como também diminuir a expressão das proteínas AKT e mTOR (hipertróficas). O exercício físico tem a capacidade de promover vários benefícios sobre a musculatura esquelética, em especial o fortalecimento muscular. No entanto, o exercício aeróbio contínuo de baixa intensidade na esteira não foi efetivo em prevenir a atrofia muscular induzida pela Dexa.

Portanto, a hipótese deste trabalho foi que o exercício resistido, de baixa intensidade, seria capaz de atenuar a atrofia muscular induzida pelo tratamento crônico com a Dexa, por alterar a produção proteica de fatores intracelulares que controlam a homeostasia muscular.



### **3. OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo geral verificar se o treinamento resistido de baixa intensidade, realizado antes e concomitante ao tratamento farmacológico com Dexa, poderia prevenir e/ou atenuar a atrofia muscular.

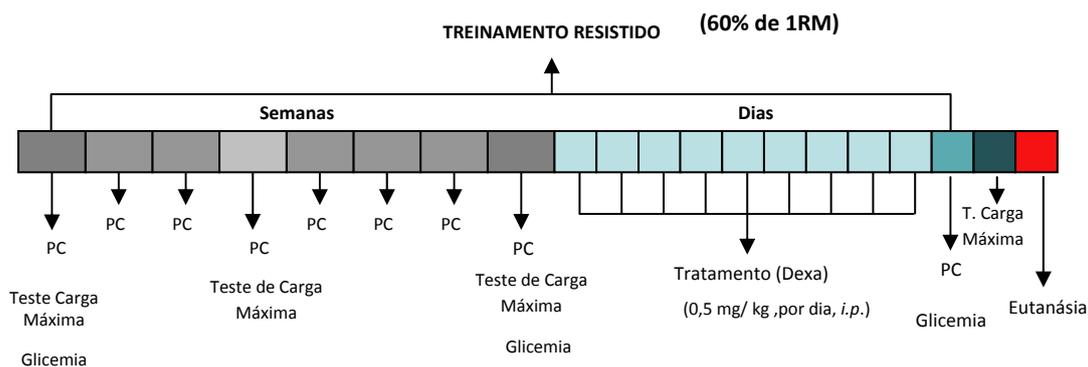
#### **3. 1. Objetivos específicos**

- Estudar o mecanismo pelo qual a Dexa promove a atrofia muscular. Para tanto foi avaliada a produção protéica de AKT, mTOR, FOXO3a, atrogina-1 e Murf-1 nos ratos sedentários e tratados com Dexa.
- Estudar o mecanismo pelo qual o exercício resistido de baixa intensidade promove a prevenção e/ou atenuação da atrofia muscular. Para tanto foi avaliada a produção proteica de AKT, mTOR, FOXO3a, atrogina-1 e Murf-1 nos animais treinados e tratados com Dexa.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP (Protocolo n. 2012-02253) (Anexo 1).

Foram utilizados 48 ratos (Wistar) de 7-8 semanas de idade (200-250g), provenientes do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu. Os animais foram mantidos em grupos de 5 por gaiolas, no Biotério da Faculdade de Ciências da Unesp, Campus de Bauru, com ciclo claro escuro de 12:12 horas e temperatura controlada (22° C). Ração e água foram fornecidas à vontade. Os ratos foram pesados semanalmente durante o protocolo de treinamento físico e diariamente durante o período de tratamento, como pode ser observado na Figura 3.



**Figura 3.** Linha de tempo do protocolo experimental. PC: Peso corporal

### 4.1. Adaptação dos animais ao esforço físico

O treinamento resistido foi executado em escada, conforme ilustrada na Figura 1, que foi validada para uso com animais por Hornebeguer e Farrar (2004). Tal equipamento consiste numa escada de madeira medindo 110cm de altura, com degraus de ferro e inclinação de 80 graus. A adaptação dos ratos deu-se em 5-10 dias. Durante o período de adaptação, os animais foram colocados nos degraus inferiores e adaptados ao ato de escalar.

Para tanto, nenhuma recompensa ou alimento foi oferecido, como também nenhuma espécie de incentivo foi utilizada, como, por exemplo, estimulação elétrica, o que diferencia o protocolo do presente projeto do proposto por Hornebeguer e Farrar (2004).



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

O único incentivo para a subida, quando necessário, foi um toque da mão na base da cauda do animal. Após terem executado a subida, os animais ficaram em uma gaiola, no topo da escada (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram por 120 segundos (local escuro), pois este foi o tempo de recuperação entre as subidas, adotado no protocolo de treinamento resistido. Este procedimento foi repetido até que os animais executaram três subidas consecutivamente na escada voluntariamente.

#### **4.2. Avaliação da Capacidade física máxima dos animais e Cronograma do Treinamento**

Os animais realizaram no máximo 8 escaladas com cargas progressivas. Na escalada inicial, foi adotada a carga de 75% do peso corporal do animal. Após descanso de 120 segundos por subida, a intensidade era incrementada com cargas progressivas, nas quais foram adicionados 30 gramas, a cada tentativa, como determinado por Sanches (2012). Foi considerada carga máxima quando os ratos não conseguiram completar a escalada. O teste de carga máxima foi realizado no início (TM-1), após 4 semanas (TM-2, para reajuste das intensidades), após 8 semanas (TM-3) e ao final dos 10 dias de tratamento com Dexa (TM-4). Os animais sedentários realizaram os testes nos mesmos momentos que os treinados, por isso foram adaptados à escada pelo menos a cada 15 dias.

O treinamento resistido foi realizado na escada (Fig.3), 5 dias por semana onde cada sessão de treinamento durava em média 45 minutos, durante 8 semanas. O protocolo de exercício resistido de baixa intensidade, com 60% da capacidade física máxima, foi utilizado previamente e padronizado de Sanches (2012). Foi realizado da seguinte forma: nas primeiras 4 semanas a intensidade foi 50% da carga máxima, baseado, no teste de carregamento máximo inicial TM-1. O número total de subidas foram de 9 subidas no primeiro dia de treinamento da primeira semana, sendo aumentado gradativamente até 19 subidas, no quinto dia da quarta semana. Da quinta semana em diante, após TM-2, a carga foi de 60% da carga máxima. Da quinta à oitava semana, o número de subidas variou de 14 a 20 subidas. Ao final das 8 semanas, foi realizado o TM-3. Na semana do tratamento, foi repetida a última semana de treinamento, com a carga relativa ao TM-3. Ao final do tratamento foi realizado o TM-4 para uma análise o efeito do tratamento com Dexa na capacidade de força dos animais.

### **4.3. Grupos Experimentais**

Após o período de adaptação na escada e de avaliação da capacidade física máxima dos animais, eles foram alocados em 4 grupos, levando-se em

consideração a capacidade física máxima, peso corporal e glicemia de jejum. Por meio destas variáveis os grupos foram separados de forma homogênea.

**Grupo 1** - Sedentário Controle (SC, n=11), que foi composto pelos animais que permaneceram sedentários durante todo o protocolo experimental (70 dias) e não receberam tratamento com Dexa.

**Grupo 2** - Sedentário Tratado com Dexa (SD, n=13), que foi composto pelos animais que permaneceram sedentários durante todo o protocolo experimental (70 dias) e receberam tratamento com Dexa nos últimos 10 dias (0,5 mg / kg de peso corporal por dia, *i.p.*, Decadron®)

**Grupo 3** – Treinado Controle (TC, n=11), que foi composto pelos animais que realizaram o treinamento resistido durante todo o protocolo experimental (70 dias) e não receberam tratamento com Dexa.

**Grupo 4** – Treinado Tratado com Dexa (TD, n=13), que foi composto pelos animais que realizaram o treinamento resistido durante todo o protocolo experimental (70 dias) e receberam o tratamento com Dexa nos últimos 10 dias com (0,5 mg / kg de peso corporal por dia, *i.p.*, Decadron®)

Aqueles animais os quais não foram submetidos ao tratamento com Dexa receberam injeção *i.p.* de solução salina com o mesmo volume referente aos tratados com Dexa. Os animais sedentários foram adaptados à escada a cada 15 dias para que não perdessem a capacidade de escalar.

#### **4.4. Avaliação da Glicemia de Jejum**

Após 24 horas da última sessão de exercício e após 10 horas de jejum, foi avaliada a glicemia de jejum dos ratos por meio de uma gota de sangue extraída da cauda de cada animal. A glicemia foi analisada por um glicosímetro (One Touch Ultra, Johnsons&Johnsons®). Esta avaliação foi realizada no início e final do período de treinamento físico e antes e após o tratamento farmacológico, como demonstrado na figura 3.

#### 4.5. Retirada dos músculos esqueléticos

Após 48 horas da última sessão de exercício, os animais foram eutanasiados, por excesso de anestésico DOPALEN® (cloridrato de cetamina, 160mg/kg) e ANASEDAN® (cloridrato de xilasina, 20mg/kg), VETBRANDS do Brasil. Os músculos esqueléticos sóleo, tibial anterior (TA) e flexor longo do hálux (FHL) foram cuidadosamente removidos, limpos em solução salina e imediatamente pesados.

#### 4.6. Protocolo de dosagem de Proteínas

Os tecidos coletados foram homogeneizados com um homogeneizador Polytron em uma solução RIPA concentrado 10x (Millipore) contendo: 0.5M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5M NaCl, 2.5% ácido deoxicólico, 10% NP-40, 10mM EDTA e imediatamente antes do uso foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases (Pic, Sigma) e 1% de PMSF.

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 5 minutos e em seguida o sobrenadante foi coletado e então transferido para um novo tubo, *ependorf*, nos quais foram armazenados em freezer -20°C para as análises de produção das proteínas. Os tecidos que não foram homogeneizados permaneceram armazenados em freezer -80°C.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando um kit comercial (Bio-Rad Kit, Protein Assay Standard II, Hercules, CA) com albumina como padrão, como previamente publicado (AMARAL; PAPANEK; GREENE, 2001). Os valores de absorvância foram analisados no leitor de Elisa (BMG labtech, spectro star nano) utilizando uma placa de 96 poços. Após a dosagem, as amostras foram estocadas a -20°C e utilizadas para os experimentos de Western Blotting.

#### 4.7. Procedimento do Western Blotting.

A proteína foi eletroforeticamente separada por tamanho, usando-se um sistema de gel de poliacrilamida conforme publicação prévia do laboratório (AMARAL; PAPANEK; GREENE, 2001). Basicamente, foi utilizado um gel com duas camadas de poliacrilamida, em diferentes concentrações: 5% na camada superior e 10% na camada inferior. A solução tampão de transferência consistiu de: 190 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,1% de SDS, pH 8,3. As amostras (80 µg para mTOR; 50 µg para Atrogina-1, Murf-1, FOXO3a e AKT), foram colocadas para correr por 50 minutos a 200 V. Marcadores de peso molecular foram simultaneamente utilizados como tamanho padrão. As proteínas foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose com aplicação de corrente de 120V por 1 hora e meia em um tampão que consistiu de: 190 mM de glicina, 25 mM de Tris, 20% de metanol, pH 8,3. Logo após a transferência, a equivalência da quantidade de proteína colocada em cada coluna foi conferida com a colocação com *Ponceau*. As membranas foram lavadas em solução TBS-T (0,95g de Trisma –HCl; 0,50g de Trisma Base; 8,8g de NaCl e 1ml de Tween 20 para um litro de água destilada), bloqueadas em solução a 5% de leite sem gordura em solução basal por 2 horas e incubadas por toda a noite, a 4°C, com agitação. Cada membrana foi incubada com diluição apropriada do anticorpo primário conforme descrito a seguir: A mTOR (cell signalling #2972s, 1:1000 em 3% de albumina), FOXO-3a (cell signalling #9464, 1:1000 em 3% de albumina); Atrogina-1 (Abcam #a74023, 1:1000 em 3% de albumina ); Murf-1(Abcam #abs77577, 1:1000 em 3% de albumina) e Akt (cell signalling #9271s, 1:1000 em 3% leite desnatado) .

As membranas foram lavadas e incubadas com um anticorpo secundário: para Akt (IgG anti-habbit 1:1000), mTOR(IgG anti-habbit 1:1000), FOXO3a (IgG anti-habbit 1:1000) e Atrogina-1 (IgG anti-habbit 1:10.000) e para Murf-1, ( anti-donkey 1:10000) por 2 horas. O anticorpo foi detectado por luminescência química aumentada (Super Signal Pico, Pierce) e as membranas foram expostas a um filme de radiografia. As bandas foram analisadas utilizando um programa de computador (Scion Image, Corporation)

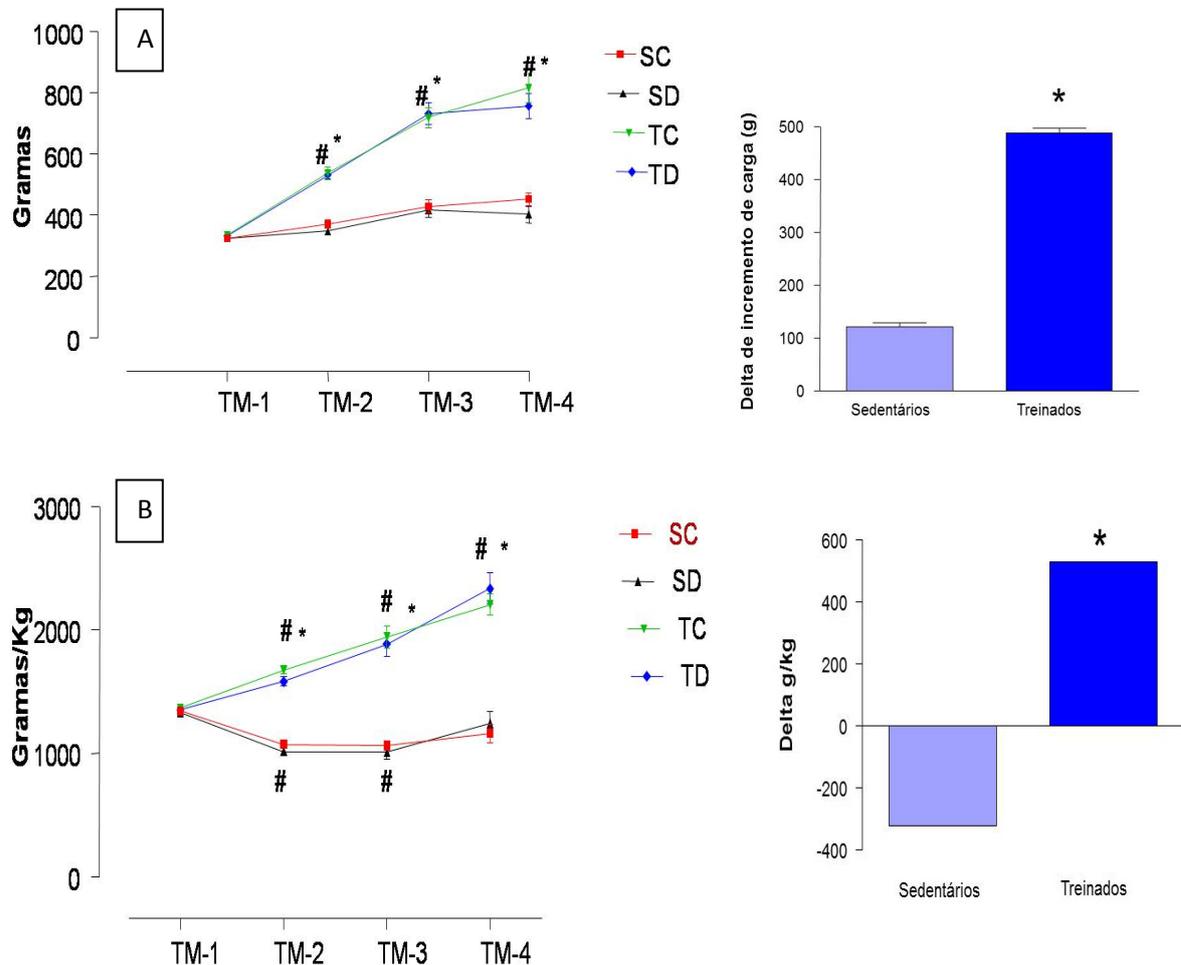
#### **4.8. Métodos Estatísticos**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM. Para todos os experimentos foi utilizada (ANOVA) de dois caminhos. Sendo 1 caminho o exercício e outro caminho ao tratamento. Nas análises de comportamento de peso, glicemia e capacidade máxima foi utilizada a análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com medidas repetidas. O post-hoc de Tukey foi utilizado nas amostras que apresentaram diferenças significativas. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

A Figura 5A representa os resultados dos testes de carregamento máximo durante o protocolo experimental nos 4 grupos avaliados. Pode-se observar que o treinamento físico resistido, na escada, a 60% da capacidade física máxima, aumentou significativamente em 115% a capacidade física dos animais controles (de  $334 \pm 12$ g no TM-1 para  $536 \pm 19$ g no TM-2 e  $719 \pm 33$ g no TM-3,  $p < 0,05$ ). Da mesma forma, o grupo TD aumentou significativamente em 119% seus resultados no teste de carregamento máximo na escada (de  $333 \pm 9$ g no TM-1 para  $531 \pm 13$ g no TM-2 e  $730 \pm 33$ g no TM-3,  $p < 0,05$ ). É válido ressaltar que todos os grupos partiram de valores próximos no início do treinamento ( $325 \pm 8$ g,  $325 \pm 7$ g,  $334 \pm 9$ g e  $333 \pm 8$ g, para SC, SD, TC e TD respectivamente no TM-1). Os grupos sedentários controle (+40%) e tratado (+28%) não tiveram aumento significativo da capacidade física. O destaque da Figura 5A mostra a variação (delta) do peso carregado entre o 3<sup>a</sup> e o 1<sup>a</sup> testes máximos nos grupos treinados (delta de 401g, 117%) e sedentários (delta de 97g, 29%). Durante o período experimental, os 10 dias de tratamento com Dexa não afetaram o carregamento máximo dos animais do grupo SD (de  $429 \pm 20$ g para  $412 \pm 26$ g no TM-4) e TD (de  $730 \pm 35$ g para  $757 \pm 41$ g, no TM-4). A Figura 4B representa as 4 avaliações do teste de força relativa (carregamento em gramas/peso do animal). Pode-se observar que o treinamento físico resistido na escada, a 60% da capacidade física máxima, aumentou significativamente de 89% da força relativa dos animais controles (de  $1369 \pm 18$ g no TM-1 para  $1635 \pm 33$ g no TM-2 e  $1994 \pm 87$ g no TM-3,  $p < 0,05$ ). O grupo TD aumentou significativamente seus resultados no teste de força relativa na escada (de  $1355 \pm 24$ g no TM-1 para  $1584 \pm 38$ g no TM-2 e  $1883 \pm 98$ g no TM-3,  $p < 0,05$ ) com um aumento de 88%. Os grupos sedentários tiveram uma redução significativa de 21% e 24% no teste de força relativa em relação ao inicial, para controle e tratado, respectivamente. Durante o período experimental, os 10 dias de tratamento com Dexa não afetaram a força relativa dos animais do grupo SD (de  $1010 \pm 58$ g para  $1241 \pm 98$ g no TM-4) e já os animais treinados apresentaram um aumento de 24% TD (de  $1883 \pm 98$ g para  $2335 \pm 98$ g no TM-4). No destaque da Figura 4B está representada a variação

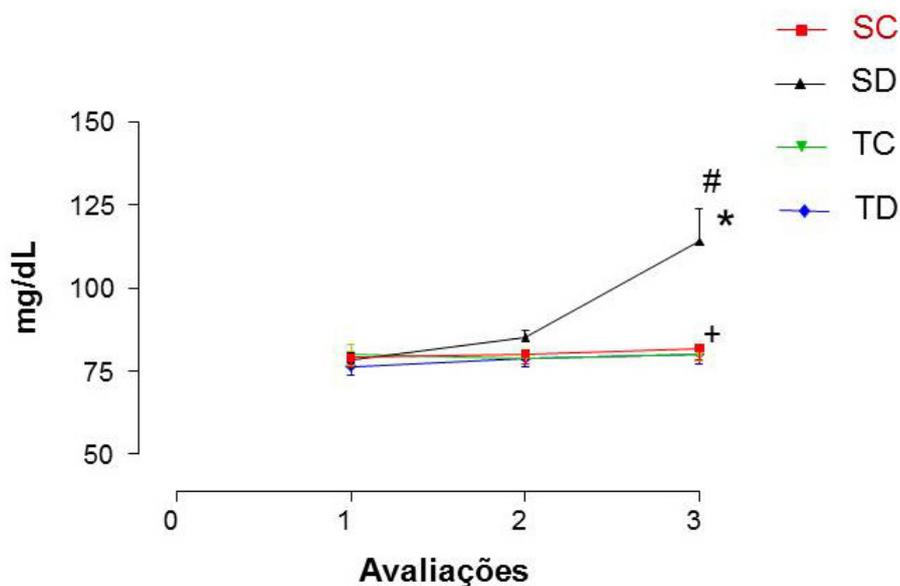
entre a 3ª e 1ª avaliações do teste de força relativa, nos grupos treinados (delta de 551g, ). Os animais sedentários tiveram uma redução significativa (delta de 300g).



**Figura 5:** A- Resultados dos testes de carregamento máximo realizados na escada durante o protocolo experimental, nas 4 avaliações (TM-1, TM-2, TM-3 e TM-4) nos 4 grupos avaliados: Sedentário controle ( SC,n=11), o destaque mostra somente a o efeito do treinamento resistido nos animais treinados (n= 24) e sedentário (n=24). B Resultados dos testes de força relativa realizados na escada durante o protocolo experimental, nas 4 avaliações (TM-1, TM-2, TM-3 e TM-4) nos 4 grupos avaliados: Sedentário controle ( SC, n=11), Sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=13), treinado controle (TC, n=11) e treinado e tratado com dexametasona(TD, n=13), o destaque mostra somente a o efeito do treinamento resistido nos animais treinados (n= 24) e sedentário (n=24). Significância: # vs início, \* vs sedentário,  $p < 0,05$ .

Como pode-se observar na Figura 6, os valores de glicemia de jejum, que eram semelhantes no início do treinamento físico ( $79 \pm 3$  mg/dL,  $78 \pm 2$  mg/dL,  $79 \pm 3$  mg/dL e  $76 \pm 2$  mg/dL, para SC, SD, TC e TD, respectivamente) não variaram significativamente durante o período de 8 semanas de

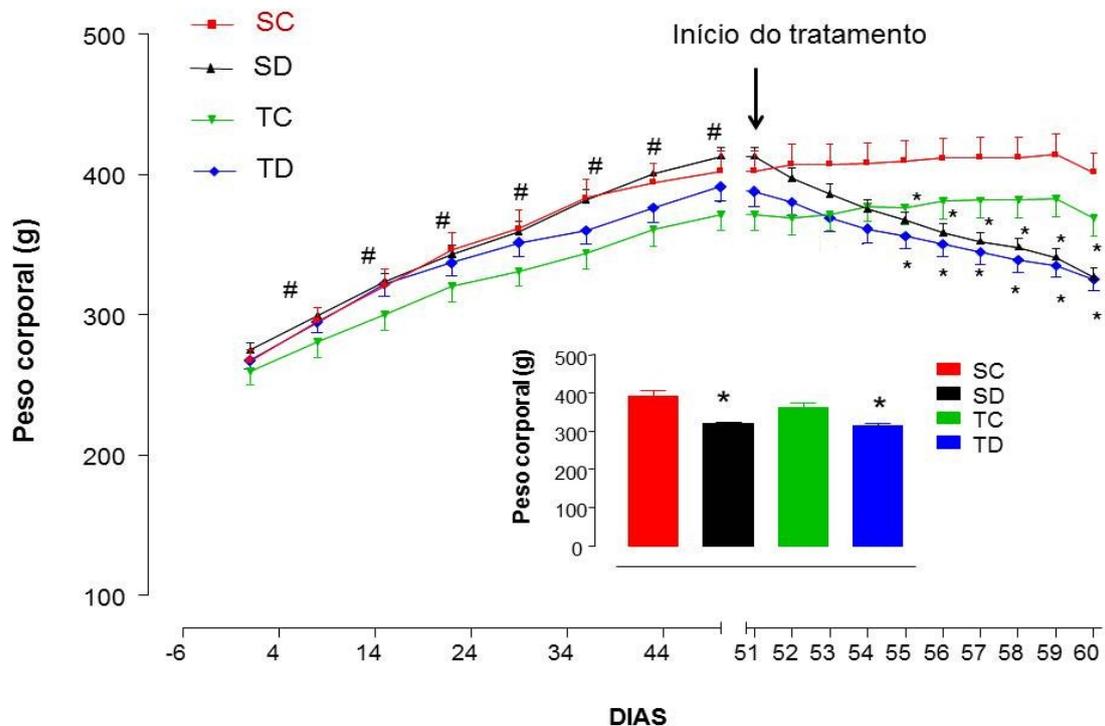
treinamento resistido (entre avaliações 1 e 2). Dez dias de tratamento com Dexa determinou aumento significativo da glicemia de jejum no grupo SD (de  $78 \pm 2$  mg/dL para  $114 \pm 9$  mg/dL,  $p < 0,05$ ). O exercício resistido, praticado antes e durante o tratamento farmacológico, preveniu completamente o aumento da glicemia de jejum no grupo TD ( $80 \pm 1$  mg/dL vs  $114 \pm 2$  mg/dL no SD,  $p < 0,05$ ).



**Figura 6:** Valores de glicemia de jejum nas avaliações: 1-antes do treinamento; 2- após treinamento e antes do tratamento e 3- após tratamento com dexametasona nos diferentes grupos analisados: sedentário controle (SC,n=11), sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=13), treinado controle (TC,n=11) e Treinado e tratado com dexametasona (n=13). Significância: # vs início do tratamento, \* vs controle, + vs sedentário,  $p < 0,05$ .

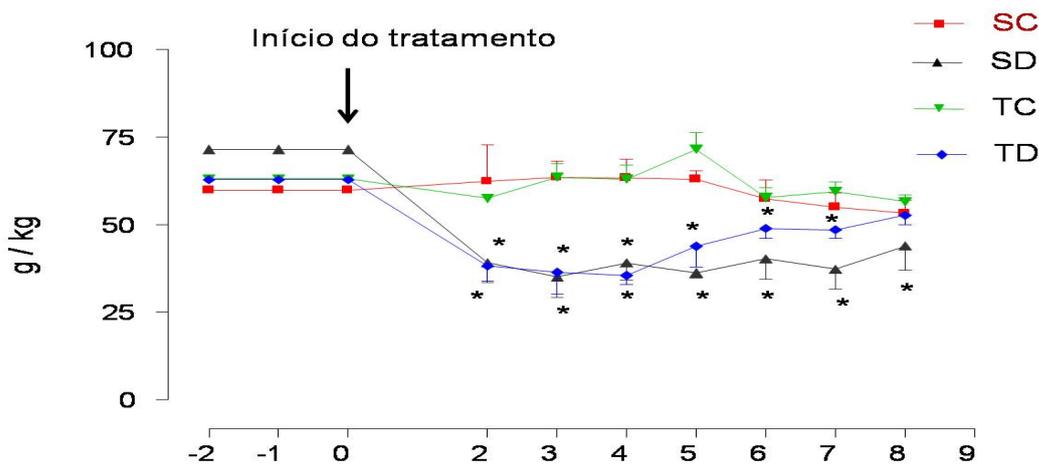
Todos os grupos apresentavam valores de peso corporal semelhantes no início do treinamento físico. Pode se observar na Figura 7 que o ganho de peso corporal durante as 8 semanas de treinamento foi semelhante e significativa (pré e pós) entre os grupos ( SC: de  $243 \pm 7$  para  $402 \pm 14$  g, SD: de  $245 \pm 6$  para  $413 \pm 6$ g; TC: de  $244 \pm 8$  para  $359 \pm 11$ g e TD: de  $246 \pm 6$  para  $391 \pm 10$ g). Durante os 10 dias de tratamento com Dexa, os animais tratados apresentaram uma redução significativa do peso corporal (SD: de  $403 \pm 6$  para  $326 \pm 7$  g e TD: de  $386 \pm 10$  para  $325 \pm 8$ g). Esta redução do peso

corporal foi significativa a partir do 5º dia de tratamento em relação ao 1º de tratamento.



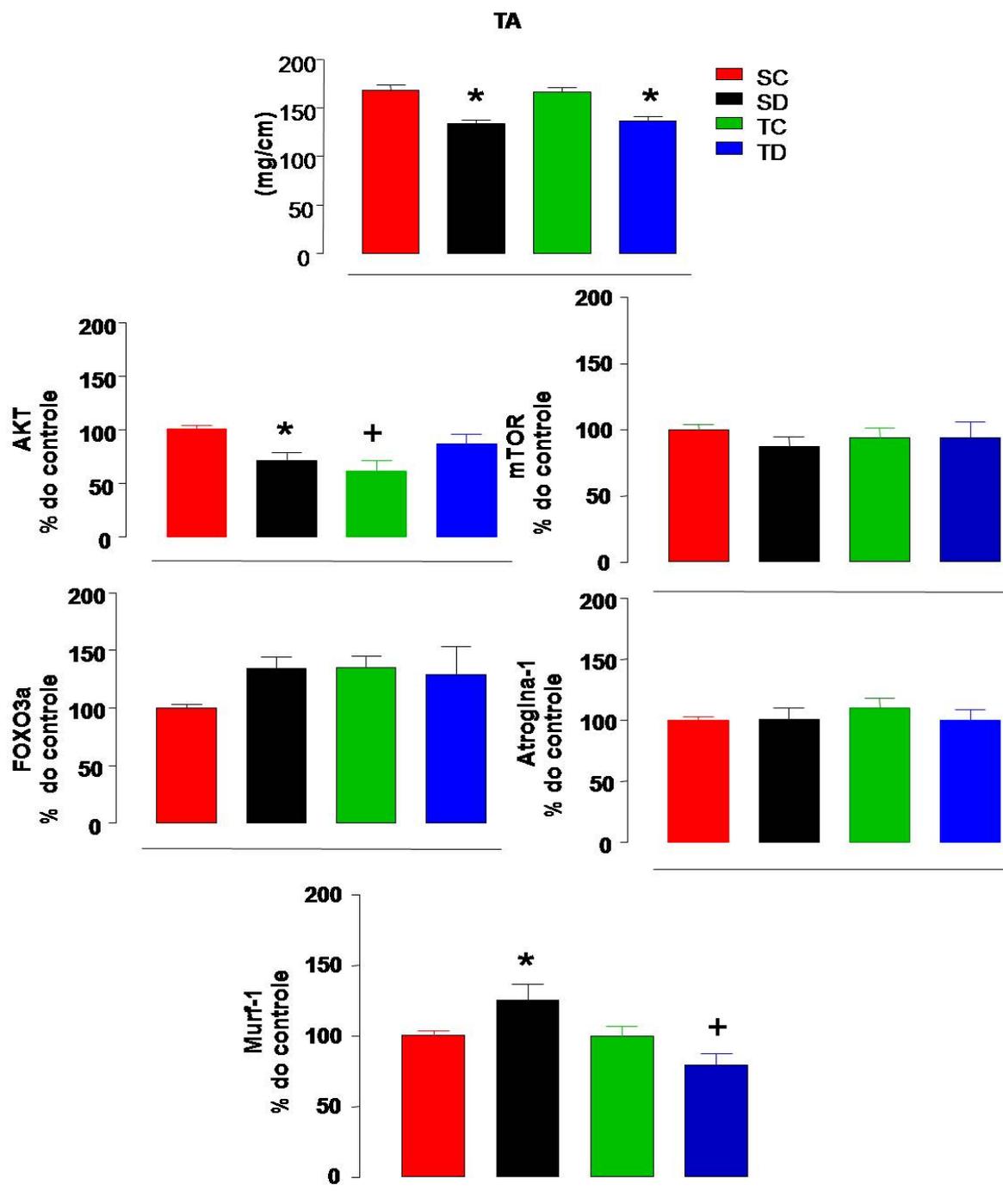
**Figura 7.** Evolução do peso corporal durante as 8 semanas de treinamento resistido e no período 10 dias do tratamento com Dexa (10 dias) nos grupos sedentário controle (SC, n=11) sedentário e tratado com dexametasona (SD, n=11), treinado controle (TC, n=11) e treinado e tratado com dexametasona (TD, n=13). Significância \* vs controle, # vs início,  $p < 0,05$ .

A Figura 8 ilustra a evolução da ingestão alimentar dos animais durante o tratamento farmacológico. Antes do tratamento os animais ingeriram cerca 65 g/kg. Os animais tratados apresentaram uma redução significativa de ingestão alimentar durante os 10 dias de tratamento (SD de 71 g / kg para 39 g / kg; TD de 63 g / kg para 43 g / kg). Já, os animais controle treinados e sedentários, tratados com salina, não apresentaram variações significativas na ingestão alimentar durante os 10 dias de tratamento. O treinamento resistido atenuou a redução da ingestão alimentar nos animais treinados tratados a partir do 8ª dia voltando a seus valores basais quando comparado aos animais treinados controle.



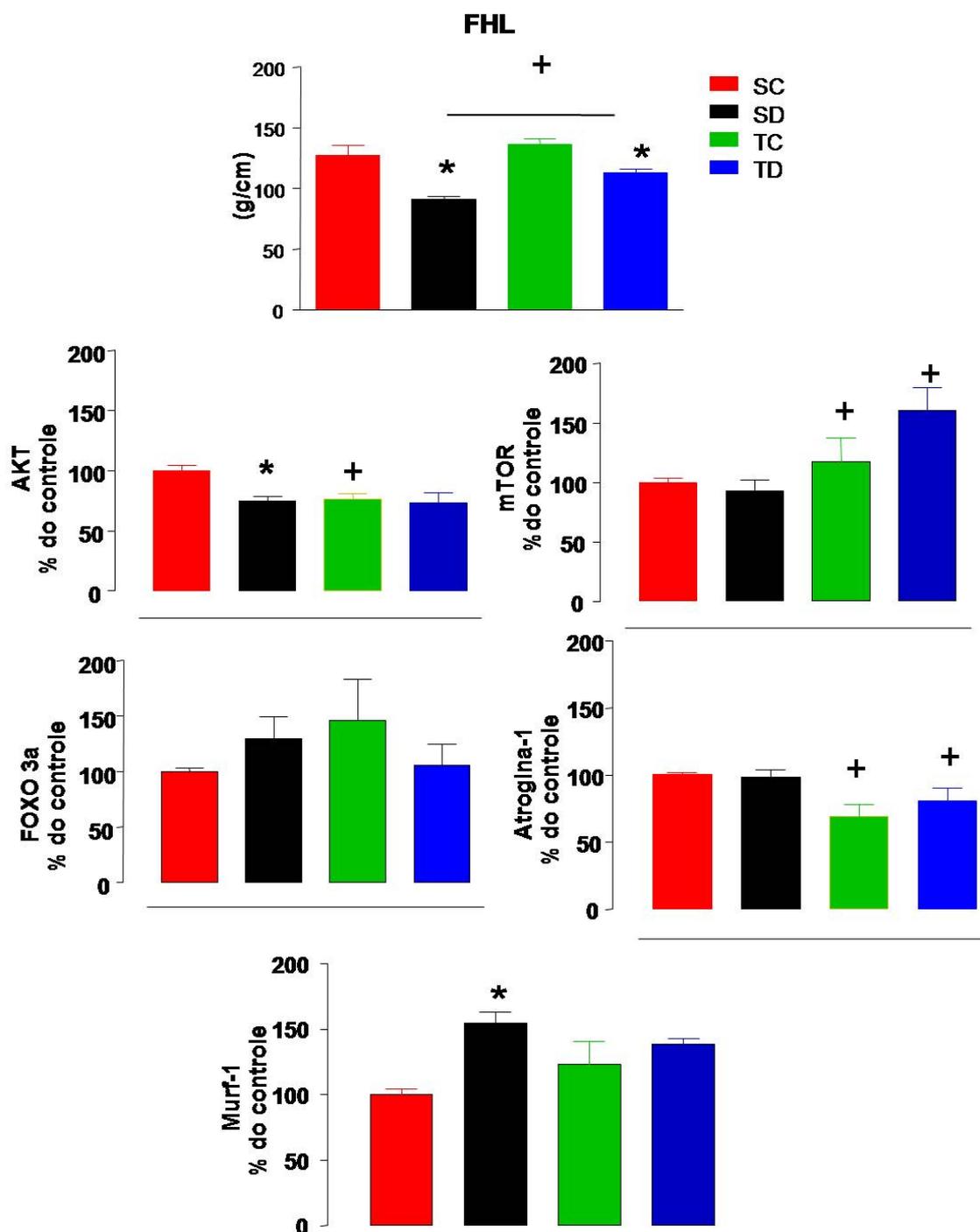
**Figura 8:** Evolução da ingestão alimentar antes do tratamento e durante os 10 dias de tratamento em todos os grupos analisados: sedentário controle (SC,n=11), sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=13), treinado controle (TC,n=11), treinado e tratado com dexametasona (TD,n=13). Significância: \* vs controle  $p < 0,05$ .

A Figura 9 ilustra os valores de peso muscular no músculo TA, bem como o comportamento das proteínas que controla a homeostase muscular AKT, mTOR, FOXO3a, Atrogina-1 e Murf-1 nos diferentes grupos analisados. Pode-se observar que o tratamento crônico com Dexametasona provocou uma redução significativa no peso muscular do TA, que não foi atenuada pelo treinamento físico (21% e 18% para os SD e TD, respectivamente). Em relação à produção da proteína AKT, observou-se que estava reduzida em todos os grupos em relação ao controle (-29% e -38% para SD e TC, respectivamente). A análise densitométrica da produção proteica da mTOR, FOXO3a e atrogina-1 no músculo TA não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. A análise densitométrica da produção proteica da Murf-1 demonstrou que houve aumento de 25% no grupo SD e uma redução de 37% no TD.



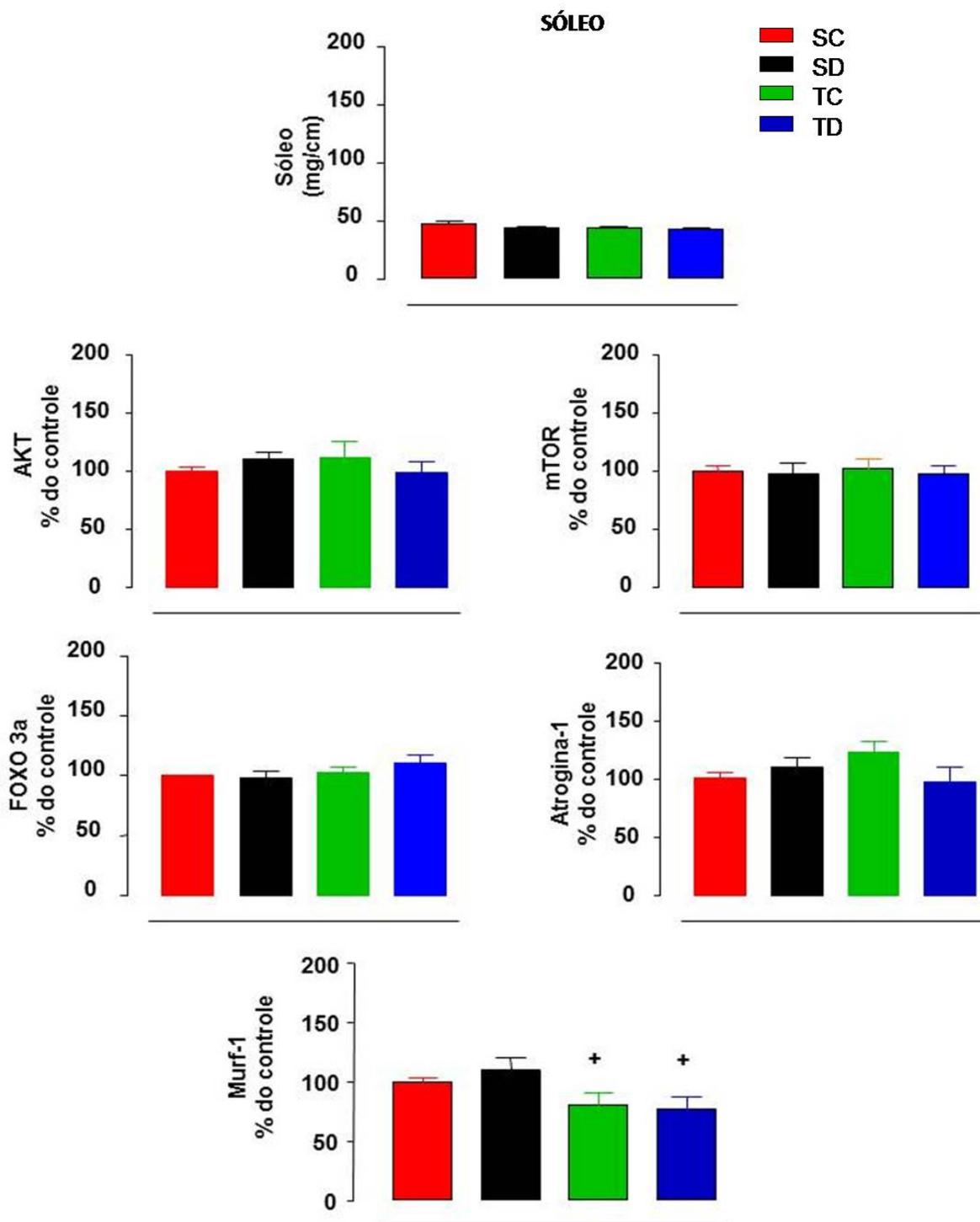
**Figura 9:** Valores de peso muscular do músculo Tibial Anterior (TA), normalizado pelo tamanho da tibia (cm) e análise densitométrica da produção proteica da AKT, mTOR, FOXO3a, atrogina-1 e Murf-1 em todos os grupos analisados: sedentário controle (SC, n=11), sedentário e tratado com dexametasona (SD, n=13), treinado controle (TC, n=11), treinado e tratado com dexametasona (TD, n=13). Significância: \* vs controle, + vs sedentário  $p < 0,05$ .

A Figura 10, representa o peso muscular do músculo FHL , bem como o comportamento das proteínas que controla a homeostase muscular (AKT, mTOR, FOXO3a, Atrogina-1 e Murf-1) nos diferentes grupos analisados. Pode-se observar que o tratamento com a Dexametasona promoveu uma redução do peso muscular de 28% no grupo SD e o exercício resistido de baixa intensidade atenuou significativamente esta diminuição (-24%). A análise densitométrica da produção proteica da AKT revela que houve uma redução de 27%, 24% desta proteína nos animais SD e TC respectivamente. O treinamento aumentou significativamente a produção proteica da mTOR (36%) no TC e (72%) no TD. A FOXO3a permaneceu inalterada. Embora a atrogina-1 não tenha se alterado após tratamento com a Dexametasona, o treinamento resistido, de baixa intensidade, promoveu uma redução na sua produção proteica (-31% e -29%, para TC e TD, respectivamente). A produção proteica da Murf-1 estava aumentada em 55 % no grupo SD. O treinamento resistido de baixa intensidade foi efetivo em prevenir este aumento nos animais tratados e treinados mantendo sua produção em níveis basais.



**Figura 10:** Valores de peso muscular do Flexor longo do Halux (FHL), normalizado pelo tamanho da tíbia (cm) e análise densitométrica da produção proteica da AKT, mTOR, FOXO3a, atrogina e Murf-1 em todos os grupos analisados: sedentário controle (SC,n=11), sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=13), treinado controle ( TC, n=11), treinado e tratado com dexametasona (TD,n=13). Significância: \* vs controle, + vs sedentário  $p < 0,05$ .

A Figura 11 demonstra o peso muscular do músculo sóleo, bem como o comportamento das proteínas que controla a homeostase muscular (AKT; mTOR, FOXO3a, Atrogina-1 e Murf-1) no vários grupos analisados. Pode-se observar que não houve alteração entre os grupos nas proteínas AKT, mTOR, FOXO3a e atrogina-1 . A produção proteica da Murf-1 estava reduzida nos animais treinados (-20% e -30%, para TC e TD, respectivamente).



**Figura 11:** Valores de peso muscular do sóleo, normalizado pelo tamanho da tíbia (cm) e análise densitométrica da produção proteica da AKT, mTOR, FOXO3a, atrogina e Murf-1 em todos os grupos analisados: sedentário controle (SC,n=11), sedentário e tratado com dexametasona (SD,n=13), treinado controle ( TC, n=11), treinado e tratado com dexametasona (TD,n=13). Significância: \* vs controle, + vs sedentário p < 0,05

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento crônico com Dexa numa dosagem de 0,5mg/kg de peso corporal promoveu o aumento da glicemia de jejum, perda de peso corporal e atrofia muscular dos músculos TA e FHL sendo que um dos mecanismos responsáveis pela atrofia induzida pela Dexa foi a diminuição da produção proteica da AKT e aumento da produção proteica da Murf-1. O treinamento resistido de baixa intensidade, realizado antes e durante o tratamento farmacológico, foi eficaz em prevenir completamente o aumento da glicemia de jejum dos ratos, o que sugere um papel preventivo deste tipo de exercício na alteração glicêmica induzida pela Dexa. Apesar do exercício resistido não evitar a redução do peso corporal, promoveu atenuação da atrofia muscular do músculo FHL. O provável mecanismo envolvido nessa resposta foi a redução da produção proteica da atrogina-1 e aumento da produção proteica da mTOR.

A Dexa vem sendo amplamente utilizada como um fármaco de escolha no tratamento de processos inflamatórios e alérgicos, no entanto, tem sido demonstrado que seu uso crônico acarreta vários efeitos colaterais, tais como redução de peso corporal, atrofia muscular, resistência periférica à insulina, hipercolesterolemia e hiperinsulinemia (AHTIKOSKI et al., 2004; LUNDGREN et al., 2004; CRESPILO et al., 2006; GILSON et al., 2007; RAFACHO et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2008; PINHEIRO et al., 2009; LOUZADA et al., 2009, DIONÍSIO et al., 2009; BAREL et al., 2010; NICASTRO et al., 2011).

O presente estudo confirmou que 10 dias de tratamento com Dexa promove aumento na glicemia jejum, uma vez que os animais tratados apresentaram uma glicemia de jejum 36% maior que os controles. Achados anteriores de nosso laboratório mostraram que o treinamento aeróbio contínuo era efetivo em atenuar o aumento de glicemia dos animais treinados e tratados e esta atenuação se dava pelo melhor controle das proteínas envolvidas na captação periférica de glicose, tanto dependente (DINISIO, 2010) como independente de insulina (LOUZADA, 2009). Já o exercício resistido preveniu completamente o aumento da glicemia. Embora este trabalho não tenha

avaliado estas proteínas, acredita-se que este seja o mecanismo responsável por esta resposta tão benéfica do exercício resistido. Esses achados são concordados com os resultados observados por Nicastro et al. (2011). Estes autores demonstraram que os animais que realizaram o treinamento resistido, concomitante ao tratamento com a Dexa, reduziram a glicemia quando comparo ao grupo tratado com Dexa.

Oito semanas de treinamento resistido a 60% do carregamento máximo promoveu aumento da capacidade física dos animais em torno de 117%, independente do tratamento. A efetividade deste tipo de treinamento, principalmente de alta intensidade, vem sendo confirmada em ratos (SMITH et al., 2007) e ratas ovariectomizadas (PRESTES et al., 2009; DOMINGOS et al., 2011). Recentemente, Sanches (2012) demonstrou aumento de capacidade física máxima em 84% após o treinamento com a mesma intensidade deste presente estudo (60% do carregamento máximo). Importante ressaltar que os animais tratados com Dexa não tiveram redução de sua capacidade física máxima. O treinamento físico também foi efetivo em aumentar a força relativa dos animais treinados. Concordando com estes resultados, Baerh, Furlow e Bodine (2012) demonstraram, num experimento in vitro, que em camundongos fêmeas tratados com Dexa a 3mg / kg por 14 dias, o músculo gastrocnêmio não diminuía a sua força contrátil quando comparado ao controle, mesmo na presença de redução de peso corporal, acompanha por uma redução de 36% em sua secção transversal.

A redução de peso corporal tem sido encontrada, frequentemente, em animais tratados com Dexa, tanto em baixas como em altas doses (AHTIKOSKI, et al., 2004; RAFACHO et al., 2007; GILSON et al., 2007; BAREL, et al., 2010; NICASTRO et al., 2011, BAERH, FURLOW e BODINE, 2012; WATSON et al., 2012). Neste presente estudo observou-se que, após o início do tratamento com Dexa, os animais sedentários tiveram uma redução do peso corporal de 17%. Os resultados deste trabalho confirmam os achados da literatura que mostraram que em diferentes dosagens sempre ocorre a redução de peso corporal significativa nos animais tratados (NICASTRO et al., 2011; AHTIKOSKI et al., 2004, BAREL et al., 2010;, DIONISIO, 2010 e MARTUSCELI et al.,2011) Achados anteriores da literatura (AHTIKOSKI et al., 2004) e do

nosso laboratório (BAREL et al., 2010; DIONISIO, 2010; MARTUSCELLI, et al., 2011) mostraram que o treinamento aeróbio contínuo, feito prévio e concomitante ao tratamento farmacológico, não atenuou a redução de peso corporal induzida pela Dexa. Uma estratégia para melhorar os efeitos do exercício foi mudar o tipo de exercício. No entanto os resultados do presente trabalho demonstraram que mesmo o treinamento resistido não foi capaz de impedir a redução de peso corporal dos animais tratados. Estes resultados concordam com os achados de Nicastro et al. (2011) que demonstraram que o treinamento resistido, feito concomitante ao tratamento com 5mg / kg por 7 dias com Dexa, não foi efetivo em atenuar a redução de peso corporal nos animais tratados com Dexa.

Uma das causas que pode contribuir para a redução do peso corporal nos animais tratados é redução da ingestão alimentar. Os animais que foram tratados com Dexa neste presente estudo tiveram sua ingestão alimentar reduzida em 45%. Estes resultados concordam com os achados de Santos et al. (2007) que trataram ratos por 5 dias com Dexa a 1mg / kg por dia e Tulipano et al. (2007), que trataram os ratos por 8 dias com 40mg / kg por dia de Dexa. Alguns achados na literatura têm atribuído esta redução da ingestão ao aumento dos níveis de leptina induzido pela Dexa. A leptina é uma adipocina, produzida pelo tecido adiposo que tem como função controlar a ingestão alimentar, regular o tecido adiposo, peso corporal e atua em células do núcleo arqueado do hipotálamo, no sistema nervoso central. Tem sido demonstrado que seus níveis plasmáticos aumentados podem levar a uma maior sinalização de saciedade, no sistema nervoso central, o que diminui a fome. Assim, Jhang et al. (2008) demonstram que os ratos tratados com 1mg / kg de Dexa por 4 dias, tiveram aumento dos níveis de leptina, acompanhados de redução da ingestão alimentar, concordando com os achados de KINOCHI et al. (2012) . Outra adipocina importante no controle da ingestão alimentar é a grelina, produzida principalmente no estômago e atua no sistema nervoso central com função antagônica à leptina, por sinalizar a fome. Tulipano et al. (2007) demonstraram que ratos tratados com Dexa tiveram um menor crescimento, ganho de peso corporal e menor ingestão alimentar, porém o

grupo que foi tratado com Dexa, associado com o BIM-28215 (agonista da grelina), teve o mesmo desenvolvimento, ganho de peso corporal e ingestão alimentar que o grupo controle, sugerindo assim que a Dexa diminui os níveis de grelina. Esses 2 fatores poderiam então contribuir para uma menor ingestão alimentar nos ratos tratados com Dexa e, conseqüentemente, redução de seu peso corporal, como observado neste estudo. O presente estudo demonstrou que o exercício resistido foi capaz de atenuar a redução da ingestão alimentar a partir do 8º dia de administração da Dexa no grupo TD. Apesar da ingestão alimentar parecer influenciar na redução de peso corporal, Nicastro et al. (2011) utilizaram a estratégia do “peer feeding” e mostraram que, mesmo com ingestão alimentar semelhantes entre tratados e não tratados, os animais tratados com Dexa perdiam mais peso que os controles. Portanto, existem outros mecanismos podem estar envolvidos na redução de peso corporal além da ingestão de alimentos, como a atrofia muscular e perda da densidade mineral óssea.

Sabe-se que a perda de peso corporal é acompanhada geralmente de atrofia muscular (MA et al., 2003; GILSON et al., 2007; BAREL et al., 2010; BAERH, FURLOW e BODINE, 2012). Inclusive, Gilson et al. (2007) sugeriram que a atrofia muscular seja uma das principais causas de redução do peso corporal pois quando utilizaram animais “knockout” para miostatina, uma proteína envolvida em atrofia muscular, os animais não apresentaram nem atrofia nem redução de peso corporal induzidos pela Dexa. Tem sido demonstrado que a atrofia muscular pode ocorrer por um desequilíbrio entre proteínas hipertróficas e atróficas, pois a homeostase da musculatura esquelética é mantida por um fino controle entre essas proteínas. Assim, a presença de um desequilíbrio entre os agentes hipertróficos e atróficos pode desencadear uma hipertrofia (ganho de massa muscular) ou atrofia muscular (redução da massa muscular). Sugere-se que a atrofia muscular ocorre por meio de diminuição da expressão de proteínas hipertróficas ou aumento da expressão de proteínas atróficas (LALANI et al., 2000; SANDRI, 2007; SHACKMAN et al., 2009; SHACKMAN, 2008; LENK et al., 2010) ou ainda se a resposta observada seja uma combinação de todos os fatores.

No presente estudo houve atrofia de 21% no músculo TA dos animais sedentários após os 10 dias de tratamento com a Dexa. Estes achados confirmam os dados da literatura de (AHTIKOSKI et al., 2004, SHACKMAN et al., 2008, BAREL et al., 2010). Um dos objetivos do presente estudo era compreender os mecanismos pelos quais a Dexa poderia provocar atrofia muscular. Neste sentido, o presente trabalho investigou o papel das proteínas envolvidas no controle da homeostase do músculo esquelético no músculo TA, FHL e sóleo.

A AKT é uma proteína chave na sinalização dos processos e síntese e degradação protéica na musculatura esquelética (GLASS, 2003) que, quando fosforilada por hormônios anabólicos como a insulina ou o IGF, torna-se ativa e pode controlar, em paralelo, o anabolismo, via mTOR, aumentando a síntese protéica ou o catabolismo, via FOXO3a, inibindo a transcrição dos atrogenes e a degradação protéica (GLASS, 2005). Os resultados do presente estudo demonstraram que ocorreu uma redução significativa da produção protéica da Akt no músculo TA (29%) nos animais sedentários e tratados. O trabalho de Shackman et al. (2008) demonstrou uma redução da razão da AKT fosforilada pela total no músculo TA em ratos tratados por 7 dias com Dexa (100µg / 100g). A mTOR, uma importante proteína hipertrofica não apresentou alteração em sua produção protéica com o tratamento com a Dexa. São escassos na literatura os estudos sobre mTOR com o tratamento com a Dexa. Kukreti et al. (2013) demonstraram em um ensaio de cultura celular, que células mioblastas expostas a glicocorticóides não apresentam alteração na sua produção protéica. A FOXO3a é um fator de transcrição que estimula a transcrição de vários genes envolvidos no sistema ubiquitina-proteassoma e lisossomal, tais como atrogina-1, Murf-1 e catepsina-1 (BIRKEKAMP e COOFER, 2003; DER HEIDE, KOEKMAN, SMIDT, 2004). O presente trabalho investigou os efeitos da Dexa sobre a produção protéica da isoforma FOXO 3a e demonstrou que esta proteína não apresentou nenhuma alteração entre animais tratados e controle. Este resultado vai de acordo com os achados de Baher, Furlow e Bodine (2011) os quais demonstraram que no músculo TA de camundongos tratado com Dexa por 3 e 14 dias, o conteúdo protéico da FOXO

3a se encontrava em níveis basais, embora a expressão gênica se encontrava aumentada. Uma vez que a AKT estava reduzida no músculo destes animais, esperávamos que a expressão protéica da FOXO3a também estivesse reduzida, no entanto Reynolds et.al. (2012) mais recentemente demonstraram que camundongos “knockout” para AKT não apresentavam nenhuma alteração na FOXO3a. Nicastro et al. (2012) demonstraram no músculo flexor plantar que a Dexa reduz a razão entre a forma fosforilada e total da FOXO3a. Portanto, pode ser que a Dexa tenha mais efeitos sobre a forma fosforilada do que total da proteína FOXO3a. O sistema ubiquitina-proteassoma é um sistema presente em situações de atrofia, sendo responsável por identificar proteínas que devem ser eliminadas. No entanto, neste presente estudo, a Dexa não alterou a produção protéica da atrogina-1 no músculo TA. Da mesma forma Watson et al. (2011) demonstraram que camundongos tratados com Dexa tinham um aumento da expressão gênica de atrogina-1 após 3 dias de tratamento com Dexa, no músculo TA, porém após 14 dias, sua expressão gênica voltava aos níveis basais, sugerindo um efeito bifásico desta proteína. A Murf-1, outra proteína E3 ligase, estava significativamente aumentada nos animais tratados com Dexa. Estudos na literatura têm mostrado que a expressão gênica da Murf-1 está aumentada após 6 horas de administração de Dexa (CHO et al., 2009; SHACKMAN et al., 2007) ou após 5 dias de tratamento (GILSON et al., 2007). No músculo plantar, Nicastro et al. (2012) mostraram aumento da Murf-1 em ratos tratados com Dexa (5mg / kg) durante 7 dias. Portanto, parece que a atrofia no músculo TA se dá pela redução da AKT e aumento da Murf-1 neste estudo. A estratégia do exercício resistido foi escolhida para verificar se este tipo de exercício seria mais eficaz que o aeróbio contínuo na esteira em atenuar a atrofia muscular no TA. No entanto os animais treinados tratados tiveram uma redução de 18% no TA, mostrando que o treinamento resistido não foi efetivo em atenuar a atrofia muscular neste músculo. O treinamento não atenuou a redução da produção da AKT. A mTOR não foi alterada pelo treinamento resistido de baixa intensidade. Uma possível causa para este ocorrido é que no protocolo de escada, utilizado neste estudo, o principal músculo solicitado no ato de escalar pelos animais é o FHL, sendo o TA pouco solicitado. O trabalho de Nicastro et al. (2012) utilizando um outro protocolo de

exercício resistido (agachamento) no qual o músculo plantar é o mais solicitado, verificou aumento da mTOR nos animais treinados e tratados, quando comparados ao sedentário tratados com Dexa. O treinamento resistido utilizado neste presente estudo também não foi capaz de alterar a produção protéica da FOXO3a nem no grupo TC nem no TD. Esses mesmos resultados foram demonstrados por Nicastro et al. (2012), pois os animais que realizaram o treinamento resistido concomitante ao tratamento com Dexa não apresentaram redução da FOXO3a total, mas somente da razão da sua forma fosforilada pela total. O treinamento resistido não alterou a produção protéica da atrogina-1 nos animais treinados e tratados. Porém, ele foi eficaz em reduzir a Murf-1 em 37% nos animais treinados e tratados. Estes resultados concordam com o demonstrado por Nicastro et al. (2012), no qual ratos treinados e tratados com Dexa apresentaram uma redução da Murf-1, porém no músculo plantar. Estes achados nos permitem sugerir que, no músculo TA, houve atrofia muscular induzida pela Dexa provavelmente pela redução da AKT e aumento da Murf-1. O treinamento resistido de baixa intensidade, executado antes e concomitante ao tratamento, não atenuou a atrofia muscular, apesar de reduzir a produção protéica da Murf-1.

O músculo FHL apresentou uma redução de 28% nos animais sedentários e tratados com Dexa. São inexistentes na literatura trabalhos investigando o efeito da Dexa sobre este músculo, sendo este o primeiro até o presente momento. No entanto, por se tratar de um músculo com predominância de fibras do tipo IIx (HORNEBERGUER e FARRAR, 2004), era esperada uma atrofia induzida pela Dexa, pois Pellegrino et al (2003) demonstraram que a Dexa age predominantemente em fibras do tipo (IIx) glicolíticas quando comparadas as fibras do tipo I (oxidativas). Os mecanismos responsáveis pelo controle da massa muscular esquelética no FHL foram analisados no presente estudo. A produção proteica da AKT foi reduzida em 27% após 10 dias de tratamento com Dexa, concordando com Costa et al. (2012), que mostraram uma redução da AKT total no músculo cremaster em ratos tratados com 1mg/kg durante 5 dias. O produção protéica da mTOR não foi alterada com a Dexa, concordando com os resultados em um ensaio de cultura celular, onde

também não houve alteração da mTOR (KUKRETI et al., 2013). Outra proteína analisada neste músculo foi a FOXO3a, que também não sofreu alteração após o tratamento com Dexametasona (Dexa), concordando com Nicastro et al. (2012) que não demonstraram alteração na produção proteica da FOXO3a total no músculo plantar (glicolítico). Da mesma forma a atrogina-1 não demonstrou alteração em sua produção proteica após o tratamento com a Dexa. Outra E3 ligase, Murf-1, foi aumentada em 54% após a administração por 10 dias de Dexa. Estes resultados são semelhantes aos de Nicastro et al. (2012), que demonstraram que ratos tratados por 7 dias com a dosagem de 5mg / kg de Dexa apresentaram um aumento da Murf-1 no plantar. Com estes resultados pode-se sugerir que a atrofia muscular no FHL foi determinada pela redução da AKT e aumento de Murf-1. A utilização do treinamento resistido de baixa intensidade, antes e concomitante ao tratamento com a Dexa foi efetiva em atenuar a atrofia muscular do FHL em 24 % nos animais treinados e tratados. Investigando os possíveis mecanismos responsáveis por esta resposta, observamos que a produção proteica da AKT ainda era 24% menor no grupo TC em relação ao controle. Os efeitos do treinamento resistido frente à AKT, na literatura ainda são controversos. Zanchi et al. (2009) demonstraram que ratos que passaram pelo treinamento crônico resistido de alta intensidade não apresentaram alteração na produção proteica de AKT na sua forma total no músculo plantar. Ao contrário, Deldique et al. (2008) mostraram que a AKT, na sua forma fosforilada, estava reduzida após o treinamento resistido baixa intensidade no músculo quadríceps femoral em humanos. Os resultados deste presente estudo mostraram que mesmo em baixa intensidade, este treinamento foi eficiente em aumentar a produção proteica de mTOR, uma proteína importante no processo de hipertrofia muscular. Da mesma forma, Zanchi et al. (2008) mostraram aumentos da mTOR após o treinamento resistido crônico de alta intensidade. Concordando com esse achados, Nicastro et al. (2012) demonstraram que animais que realizaram o treinamento resistido de baixa intensidade, tratados com Dexa, apresentaram uma elevação da mTOR na sua forma fosforilada pela total no músculo plantar. A FOXO3a não foi alterada pelo treinamento resistido. Ao contrário da mTOR, a atrogina-1 foi reduzida em 29% após o treinamento resistido de baixa intensidade. O

treinamento resistido parece diminuir a expressão gênica da atrogina1, tanto em exercício resistido de baixa intensidade ou alta intensidade (LOUIS et al., 2007; ZANCHI et al., 2008) . A Murf-1 não sofreu alteração significativa com o treinamento resistido. Na literatura, o trabalho de Nicastro et al. (2012) mostrou que a Murf-1 não se alterou com o treinamento resistido de baixa intensidade nos animais tratados com Dexa no músculo plantar. Assim, com os achados deste presente estudo, pode-se sugerir que a atrofia muscular no músculo FHL, após o tratamento com a Dexa, deu-se por redução da AKT e aumento da Murf-1, assim como observado no TA. O treinamento resistido de baixa intensidade, realizado antes e concomitante ao tratamento com a Dexa, foi efetivo em atenuar a atrofia neste músculo, provavelmente por ser o mais recrutado neste modelo de exercício em escada. Ao investigar os mecanismos responsáveis por esta resposta, observamos que houve um aumento da mTOR e redução da atrogina-1. Até o presente momento, este é o único trabalho a demonstrar os efeitos preventivos do exercício resistido de baixa intensidade no músculo FHL de ratos bem como os mecanismos responsáveis por esta resposta.

O tratamento crônico com a Dexa, como esperado, não determinou alterações significativas da massa do músculo sóleo, já que este grupo muscular é composto predominantemente por fibras oxidativas e que a Dexa age preferencialmente em fibras glicolíticas (PELLEGRINO et al., 2003). Estes achados concordam com Ahtikoski et al. (2004), Barel et al. (2010) e também dados não publicados do nosso laboratório de Martucelli (2011). Uma vez que esse músculo não apresentou atrofia muscular induzida pela Dexa, não foi surpresa o fato de que todas as proteínas não apresentaram alterações. O treinamento resistido de baixa intensidade não determinou mudança no peso do músculo. No entanto, quando investigadas as proteínas responsáveis pela homeostase da musculatura esquelética, observou-se que todas se mantiveram inalteradas com exceção da Murf-1, que foi reduzida pelo treinamento resistido, porém esta redução isolada parece não afetar a massa muscular.

## **CONCLUSÃO**

Estes dados nos permitem concluir que o treinamento resistido, de baixa intensidade, realizado antes e concomitante ao tratamento farmacológico com a Dexa, foi eficaz em atenuar a atrofia muscular no FHL. Importante ressaltar que esta resposta só foi possível mediante uma combinação entre redução de proteínas atroficas acompanhada de aumento de proteínas hipertróficas, pois o músculo TA, que teve somente a produção de proteínas atroficas reduzida após treinamento resistido, não teve sua atrofia atenuada.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, G.R.; HADDAD, F.; BODELL, P.W.; TRAN, P.D.; BALDWIN, K.M. Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. *J Appl Physiol*, v. 103, p.1644-1654, 2007

ADAMS, R.K.; TRAPPE, T.A.; JEMIOLO, B.; TRAPPE, S.W.; HARBER, M.P. *J Gerontol Biol Sci Med Sci*, v.66A, 835-841, 2009

ALAMDARI, N.; AVERSA, Z. CASTILEERO, E. GURAY, A. PETKOVA, V. TIZIO, S. Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle atrophy-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 in cultured myotubes through a SIRT1-dependent mechanism. *Res Bioch and Biophy*, v.417, p.528-533, 2012.

ALMEIDA, A.P. Inflamações e doença pulmonar obstrutiva crônica. *Rev Port Pneumol*, v.7, p.57-71, 2001

AMARAL, S.L.; SANCHEZ, L.S.; CHANG, A.J.; ROSSONI, L.V.; MICHELINI, L.C. Time course of training-induced microcirculatory changes and of vegf expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. *Braz J Med Biol Res*, v.41, p.424-31, 2008

AMARAL, S.L.; MICHELINI, L.C. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR, *Braz J of Med and Biol Research*, 2011.

ANDREWS, R.C.; WALKER, B.R. Glucocorticoid and insulin: old hormones, new targets. *Clin Sci*, v.96, p.513-523, 1999

ATHKOSKI, A.M.; RISO, E.M.; KOSKINEN, S.O.A.; RISTELI, J.; TAKALA, T.E.S. Regulation of tipo IV collagen gene expression and degradation in fast and muscle during dexamethasone treatment and exercise. *Eur J Physiol*, v.448, p.123-130, 2003

BAAR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70s6K correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *J. Physiol. Cell. Physiol.*, v. 276, p. C120-C127, 1999

BAREL, M.; PEREZ, O.A; GIOZZET, V.A.; RAFACHO, A.; BOSQUIERO, J.R.; DO AMARAL, S.L.; Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. *Eur J Appl Physiol*, v.108, p.999-1007, 2010

BARNERS, P.J. Anti- Inflammatory action of glucocorticoid: molecular mechanisms. *Clin Sciences*, v.94, p.557-572, 1999

BAEHR, L.M., FURLLOW, J.D., BODINE, S.C. Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *J. Physiol.*, v.19, p.4759-776, 2011.

- BIRKENIKAMP, K.U.; COOFER, P.J. Regulation of survival and proliferation by the Foxo(Forkhead box, class O) subfamily of forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans*, v.31, p. 292-297, 2003.
- BROTMAN, D.J.; JIROD, J.P.; GARCIA, M.J.; PAATEL, J.V.; GUPTA, M.; POSH, A.; SANDERS, S.; LIP, G.I.; WORLEY, S.; REDDY, S. Effects of short term glucocorticoids on cardiovascular biomarkers. *J Clin Endocrinol Metabol*, v.90, p.3202-3208, 2005
- BRUN, P.C.; SILVA, G.J.J.; MOREIRA, E.D.; IDA, F.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *J of American Heart Assoc*, v.36, p.1018-1022
- CAMPOS, G.E.; LUECKE, T.J.; WENDELN, H.K.; HAGERMAN, F.C.; MURRAY, T.F.; RAGG, T.K. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol*, v.88, p.55-60, 2002
- CERLETTI, M.; SHADRACH, J.L.; JURGA, S.; SHERWOOD, R.; WAGERS, A.J. Regulation and function of skeletal muscle stem cells. *Cold Spring Har Synpo Quant Biol*, v.73, p.317-322, 2008
- CHO, J.E.; FOURNIER, M.; DA, X.; LEWIS, M.I.; BRING E.D. Time course expression of Foxo transcription factors in skeletal muscle following corticosteroid administration. *J Appl Physiol*. v.108, p.137-145, 2009
- COSTA, M.M., VIOLATO, N. M., TABOGA, S.R., GOES, R.M., BOSQUEIRO, J.R. Reduction of insulin signalling pathway IRS-1/IRS-2/AKT/Mtor and decrease of epithelial cell proliferation in the prostate of glucocorticoid-treated rats. *Int. J. Exp. Pathol.*, v.93, p.188-195, 2012.
- COSTA, A.; DALLOUT, H.; HEGYESI, H.; APOR, P.; CSENDE, Z.; VACZI, M. Impact of repeated bouts of eccentric exercise on myogenic gene expression. *Eur. J. Appl. Physiol*. v. 101, p. 427-436, 2007
- CROSSLAND, H., TEDOSIU, D.C., GREENHALF, P.L., GARDINER M.S. Low-dose dexamethasone prevents endotoxaemia-induced muscle protein loss and impairment of carbohydrate oxidation in rat skeletal muscle. *J Physiol*, v.8, p. 1333-1347, 2010
- DER HEIDE, L.P.V., KOEKMAN, M.F., SMIDT, M.P. The ins and outs of Foxo shuttling: mechanism of Foxo translocation and transcriptional regulation. *J Biochem*, v.275, p.40325-46, 2000
- DEFOJO, D.; LIBERMAN, A.C.; HOLSBOER, F.; ARZT, E. Transcription factor-mediated molecular mechanisms involved in the functional cross-talk between cytokines and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol*, v.79, p.385-394, 2001

DELDIQUE, L.; AHTERNON, P.; THEISEN, D.; NIELENS, H.; RENNIE, M.J. Decrease in Akt/PKB signalling in human skeletal muscle by resistance exercise. *Eur J Appl Physiol*, v.104, p.57-104:57-65, 2008

DIONISIO, T.J. Papel preventivo do exercício físico nas alterações observadas na via de sinalização insulínica induzidas pela dexametasona. Dissertação de Mestrado, UFSCAR, 2010.

DOMINGOS, M.M., CURY, M.F., STOTZER, U.S., BERTUCCI, D.R., CAMPOS, M.K., ADORNA, D.A; Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. *J. of Appl. Physiol.*, v.4. p.563-581, 2011.

DUMKE, C.L.; DAVIS, J.M.; MURPHY, E.A.; NIEMAN, D.C.; CARMICHAEL, M.D.; QUINDRY, J.C.; UTTER, A.C. Successive bouts of cycling stimulates genes associated with mitochondrial biogenesis. *Eur J Appl Physiol*, v.107, p.419-427, 2009.

EDSTROM, E.; ALTUN, M.; HAGGLUND, M.; ULFHAKE, B. Atrogin-1/MAFbx and Murf-1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle. *J of Gerontology*, v.61A, p. 663-674, 2006.

FAINGENBUN, A.D.; WESTCOTT, W.L.; LOUD, R.J.; LONG, C. The effects of different resistance training protocols on muscular strength and endurance development in children. *Pediatrics*, v.104, p.1-5, 1999

FOLETTA, F.C.; WHITE, L.J.; LARSEN, A.E.; LEGER, B.; RUSSELL, A.P. The role and regulation of MAFbx/atrogin-1/Murf-1 in skeletal muscle atrophy. *Eur. J. Physiol.* v.461, p.325-335, 2011.

GATO, K.; NAGASAWA, M.; YANAGISAWA, O.; KIZUKA, T.; ISHII, N.; TAKAMATSU, K. Muscular adaptations to combinations of high- and low-intensity resistance exercises. *J Strength Cond Res*, v.18, p.730-737, 2004

GERGELY, J.C.; Comparison of two lower-body modes of endurance training on lower-body strength development while concurrently training. *J Strength Cond Res*, v.23, p.978-987, 2009

GILSON, H.; SHCAKMAN, O.; COMBARET, L.; LAUSE, P.; GROBET, L.; ATTAIX, D. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology*, v.148, p.452-460, 2007

GLASS, D.J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J biochem Cell Biol*, v.37, p.1974-1984, 2005.

GREEN, H.; GOREHAM, J.; OUYANG, M.; BURNETT, M.B.; RANNEY, D. Regulation of fiber size, oxidative potential, and capillarization in human muscle by resistance exercise; *J Physiol Regul. Integr Comp Physiol*, v.276, p.R591-R596, 1999

HAMER, A.R.; CHISHOLM, D.J.; HUNTER, S.K.; RUELL, P.A.; NAYLOR, J.M.; MAXWELL, L.J. Sprint training increased muscle oxidative metabolism during high-intensity exercise in patients with type 1 diabetes. *Diab Care*, v.32, p.2097-102, 2008

HARBER, P.H.; CRANE, J.D.; DICKINSON, J.M.; JEMIOLO, B.; RAUE, U.; TRAPPE, T.A.; TRAPPE, S.W. Protein synthesis and the expression of growth-related genes are altered by running in human vastus lateralis and soleus muscles. *J. Physiol. Regul. Comp. Physiol.*, v. 296, p. 708-714, 2009

HICKSON, R.C.; CZERWINSKI, S.M.; WEGRZYN, L.E. Glutamine prevents downregulation of myosin heavy chain synthesis and muscle atrophy from glucocorticoids. *Am J Physiol*, v.268, p.e730-734, 1995

HORTOBAGYI, D.; DEMPSEY, L.; FRAZER, D.; ZHENG, D.; HAMILTON, G.; LAMBERT, J.; DOHM, L. Changes muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J of Physiol*, v.524.1, p.293-304, 2000

HULMI, J.J.; TENNERSTEDT, J.; KAIMULAINEN, H. VUOKO, T. Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. *J Appl Physiol* v.106, p.1720-1729, 2009.

IDE, B.N.; LAZARIM, F.L.; MACEDO, D.V. Hipertrofia muscular esquelética humana induzida pelo exercício físico. *Rev Cien em Saúde*, v.2, p.1-9, 2011

JERSPERSEN, J.; KJAER, M.; SCHJERLING, P.; The possible role of myostatin in skeletal muscle atrophy and cachexia. *Scandinavian Journal of Medicine e Science in Sports*. v.16, p.74-82, 2005

JAHNG, J.W., KIM, N., RYU, V., YOO, S.B., KIM, T.K., HO-LEE, J. Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats. *Europ J of Pharmacolog.*, v.508, p.64-70, 2008

JOSEPH, A.M.; PILEGAARD, H.; LETVINSTSEV, S.; LECK, L.; HOOD, D.A. Control of gene expression and mitochondrial biogenesis in the muscular adaptation to endurance exercise. *Essa Biochem*, v.42, p.13-29.

KANDARIN, S.C.; JACKMAN, R.W.; Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle e Nerve.*, v.33, p. 155-165, 2006

KARSEN, A.M.; MEIJER, O.C.; BERRY, A.; SANJUAN PINÖL, R.; DE KLOET, E.R. Low doses dexamethasone can produce a hypocortisoid state in brain. *Endocrinology*, v.146, p.5587-5595, 2003

KOTLER, D.P.; TIERNEY, A.R.; WANG, J.; PIERSON JR, R.N. Magnitude of body-cell-mass depletion and the timing of death from wasting in AIDS. *Am J Clin Nutr* , v.50, p.444-447, 1989.

KOOPMAN, R.; GILLESON, B.G.; GIJEN, P.A.; GROEN, B.; SENDEN, J.M.G.; RENNIE, M.J. Post-exercise protein synthesis rates are only marginally higher in type I compared with type II muscle fibres following resistance-type exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* ,2011

KRAEMER, W.J.; RATAMES, N.A.; Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med*, v.35, p.339-61, 2005.

LALANI, R.; BHASIN, S.; BYOHOWER, F.; TAMUZZER, R.; GRANT, M.; SHEN, R. Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the Neurolab space shuttle flight. *J. of Endocrinol.*, v. 167, p. 417-428, 2000

LATERZA, M.C.; MATOS, L.D.N.; TROMBETTA, I.C.; BRAGA, A.M.W.; ROVEDA, F.; ALVES, M.J.N.N.; KRIEGER, E.D. Exercise training Restores Baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients, *J of American Heart Assoc*, v.49, p.1298-1306, 2007

LEE, S.J.; Regulation of muscle mass by myostatin. *Rev. Annu. Cell. Dev. Biol.*, v.20, p.965-971, 2003.

LEE, S. Insulin like growth factor induce hypertrophy muscle. *J of Exerc Scinec and Fit*, v.1, p. 47-53, 2003

LEGER, B.; CARTONI, R.; PRAZ, M.; LAMON, S.; DERIAS, O.; CRETENAND, A. Akt signalling through GSK-3B, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J. Physiol.*, v.576, p.923-933, 2006

LENK, K.; SHULER, G.; ADAMS V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*. v. 1, p. 9-21, 2010

LEWIS, M.I.; LI, H.; HUANG, Z.S.; BIRING, S.M.; CERCEK, B.; FOURNIER, M. Influence of varying degrees of malnutrition on IGF-1 expression in the rat diaphragm. *J. Appl. Physiol.*, v.95, p. 555-562, 2003.

LITTLE, J.P.; SAFDAR, A.; WILKIN, G.P.; TARNOPOLSKY, M.A.; GIBALA, M.J. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *J Physiol*, v.588, p.1011-1022, 2010

LOUIS, E.; RAUE, U.; YANG, Y.; JEMIOLO, B.; TRAPPE, S. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v. 103, p. 1744-1751, 2007

LUZADA, J.C; BAREL, M.; DIONISIO, E.J.; AMARAL, S.L. . Long-term exercise effects on blood pressure of hypertensive patients: role of frequency. Inter-American Society of Hypertension XVIIIth Scientific sessions e XVII Congresso da Sociedade Brasileira de Hipertensão. v. 12, p.6-6, 2009.

MA, K.; MALLIDIS, C.; BHASIN, S.; MAHABADI, V.; ARTAZA, J.; CAVID, N.G. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *J. Physiol. Encodrinol. Metab.*, v.285, p. 363-371, 2003

MAMUCARI, C.; SHIAFFINO, S.; SANDRI, M. Downstream of Akt, Foxo3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy*, v.4, p. 524-526, 2008

MARTINS, A.S.; CRESCENZI, A.; STERN, J.E.; BORDIN, S.; MICHELINI, L.C. Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. *J of American Heart Assoc*, v.46, p.1004-1009, 2005

MARTUSCELLI, A.M.; DIONISIO, E.J.; LOURENÇO, T.T.; VISCELLI, B.A., AMARAL, S.L. Effects of exercise training on myostatin expression in dexamethasone induced muscle atrophy. II International Meeting in Exercise Physiology IX Workshop em Fisiologia do exercício da UFSCAR, São Pedro. *International Journal of Exercise Science*, v. 7. p. S2-S2, 2011.

MCPHERRON, A.C.; LEE, S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci*, v.94, p.12457-12461, 1997

MCPHERRON, A.C.; LEE, S.J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest*, v.109, p.595-101, 2002

MENEZES, L.G.; SOBREIRA, C.; NEDER, L.; RODRIGUES, A.L.; MARTINEZ, J.A.B. *J Appl Physiol*, v.102, p.698-703, 2007

NEDGARD, A.; VISSING, K.; OVEGAARD, M.; KJAER, M.; SHCEJERLING, P. Expression patterns of atrogenic and ubiquitin proteasome component genes with exercise: effect of different loading patterns and repeated exercise bouts. *J Appl Physiol*, v. 103, p. 1513-1522, 2007

NICASTRO, H., ZANCHI, N.E., LUZ, C.R., MORAES, W.M., RAMONA, P.M., FILHO, M.S. Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats. *Nutrition* v. (xx), p.1-7, 2011. Disponível: [www.nutritionjrn.com](http://www.nutritionjrn.com)

NIKLAS, B.J.; RYAN, A.; TRETHER, M., BLACKMAN, M.; HUERLEY, B. Testosterone, growth hormone and IGF-1 response to acute and chronic resistive exercise in men aged 55-70 years. *Int J Sport Med*, v.16, p.445-450, 1995

PATEL, J.V.; CUMMINGS, D.E.; GIROD, J.P.; MASCARENAS, A.V.; HUGUES, E.A.; GUPTA, M.; LIP, G.Y.H.; REDDY, S.; BROOTMAN, D.J.; Role of metabolically active hormones in the insulin resistance associated with short-term glucocorticoid treatment. *J Negat Results Biomed*, v.5, p. 1-5, 2006

PITNER, R.A.; BRINDLEY, J.E. Interactions of insulin, glucagon and dexamethasone in controlling the activity of glycerol phosphate acyltransferase and the activity and subcellular distribution of phosphatidate phosphohydrolase cultured rat hepatocytes. *J Biochem*, v.230, p. 525-34, 1985.

PRESTES, J., SHIGUEMOTO, G.E., BOTERO, J.P., FORLLINU, B.A., DIAS, R., LEITE, R.D. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. *J. of Appl. Physiol.*, v.34., p.700-706, 2009

PSILANDER, N.; DAMSGAARD, R.; PILEGAARD, H. Resistance exercise alters MRF and IGF-1 mRNA content in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, v.95, p. 1038-1044, 2003

QI, D.; PULIKUNNIL, T.; AN, D.; GOSH, S.; ABRAHANI, A.; POSPSILIK, J.A.; BROWSEY, R.; WAMBOLT, R.; ALLARD, M.; RODRIGUES, B. Single dose dexamethasone induces whole-body insulin resistance and alters both cardiac fatty and carbohydrate metabolism. *Diabetes*, v.53, p.1790-1797, 2004

REYNOLDS, R.M., WALKER, B.R.; Human insulin resistance: the role of glucocorticoids. *Diab Obes Met*, v.5, p.5-12, 2003

SANCHES, I.C. Controle cardiovascular em fêmeas ooforectomizadas diabéticas: efeitos do treinamento físico dinâmico aeróbio, resistido ou combinado, USP, 2012.

SACHECK, J.M.; OHTSUKA, A.; MCLARY, S.C.; GOLDBERG, A.F. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *J. Physiol. Endocrinol Metabol.*, v. 287, p. 591-601, 2004

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

SEVERINO, C.; BRIZZI, P.; SOLINAS, A.; SECCHI, Z.; MAIOLI, M.; TONOLO, G. Low dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance. *Am J Physiol Metab*, v.283, p.E 367-73, 2002

SHACKMAN, O.; GILSON, H.; THISSEN, J.P. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J. of Endocrinol.*, v.197, p.1-10, 2008

SHACKMAN, O., KALISTA, S., LAUSE, P., VEMIER, J., KETELSLEGERS, J.M., THISSEN, J.P. Role of Akt/GSK-3 $\beta$ -Catenin Transduction Pathway in the Muscle Anti-Atrophy Action of Insulin-Like Growth Factor in Glucocorticoid-Treated Rats. *Endocrinol.*, v.149, p. 3.900-3908, 2009.

SHARIFI, S.; DONELEY, D.A.; BONNER, D.D., MCCORY, J.L.; ZHAO, H., LIVELY, M.W. Resistance exercise reduces skeletal muscular cachexia and improves muscle function in rheumatoid arthritis. *Cas Rep Med*, 205691, 2011.

LINDA, D.P.; FRANKLIN, P.A.; FARKAR, W.B. Exercise and Hypertension. *J American College of Sports Medicine*, p. 535-539, 2004.

SHEFFIANO, S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.77. p.493-501, 1994.

SMITH, I.J., ALAMDARI, N., NEAL, P., GONNELA, P., AVERSA, Z. HASSELGREN P. Sepsis increases the expression and activity of the transcription factor forkhead box 1 (FOXO1) in skeletal muscle by glucocorticoid-dependent. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 42, p.701-711, 2010

- SMITH, M.Z., GOETTSCH, B.M., RAMSHORTS, R.D., BRIEN, J.A., VAQUE, S.V. Resistance training and bone mineral density during growth. *J. Int. Sports Med.*, v.29, p. 316-321, 2008
- SAH, O.J., KIMBAIL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Glucocorticoid abate p70S6K and eIF4 E function IL6 skeletal mioblastos. *Am J endocrinal Metab*, v.279, p.E74-E82, 2000.
- SCHNEITER, P.; TAPPY, L. Kinetics of dexamethasone induced alterations of glucose metabolism in healthy humans. *Am J Physiol*, v.275, p.470-475, 1981
- TULIPANO, G., TAYLOR, J.E., HALEM, H.A., DATTA, R., DONG, J.Z., CULLER, M.D., *Pituitary*, v.10, p. 267-274, 2007.
- TISLADE, M.J. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, v.2, p.862-871, 2002.
- TUNSTALL, R.J.; MECHAN, K.A.; WADLEY, G.E.; COLLIER, G.R.; BONEN, A.; HARGREAVES. *J Physiol Endocrinol Metab*, v.283, p.E66-E72, 2002
- WATSON, M.L., BAEHR, M.L., REICHARDT, H.M., TUCHERMAN, J.P., BODINE, S.C., FURLOW, D. A cell-autonomous role for the glucocorticoid receptor in skeletal muscle atrophy induced by systemic glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.302, p. E-1210-1220, 2012.
- WATSS, L.M.; MANCHEM, V.P.; LEEDON, T.A.; RIVARD, A.L.; MICHAY, R.A.; BAO, D. Reduction of hepatic and adipose tissue glucocorticoid receptor expression with antisense oligonucleotides improve hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic rodents without causing systemic glucocorticoid antagonism. *Diabetes*, v.54, p. 1843-56, 2005
- WEST, D.W.; KUJBIDA, G.W.; MOORE, D.R.; ATHERTON, P.; BURD, N.A.; PADZIK, J.P. Resistance exercise induced increased in putative hormones anabolic do not enhance anabolic muscle protein synthesis or intracellular signaling in young men. *J Physiol*, v.587, p.5239-5247, 2009
- WILLIAMSON, D., RAUE, U.; SILVKA, D.; TAPPES, S. Resistance Exercise, Skeletal Muscle FOXO3A, and 85-Year-Old Women. *Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v.65, p.335-343, 2010.
- WHORWOOD, C.B.; DONOVAN, S.J.; FLANAGAN, D.; PHILIPS, D.I.; BYRNE, C.D.; Increased glucocorticoid receptor expression in human skeletal muscle cells may contribute to the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Diabetes*, v.56, p.1403-1409, 2003
- VINGREN, J.L.; KRAEMER, W.J.; RATAMESS, N.A.; ANDERSON, J.M.; VOLEK, J.S.; MARESH, C.M. Testosterone physiology in resistance exercise and training: the upstream regulatory elements. *Sport Med*, v.40, p.1037-1053. 2010
- ZANCHI, N.E.; SIQUEIRA, M.A.; LIRA, F.S.; ROSA, J.C.; YAMASHITA, A.S.; CARVALHO, C.R. Chronic resistance training decreases MuRF-1 and Atrogin-1 gene expression but does not modify Akt, GSK-3 $\alpha$  and p70S6K levels in rats. *Eur J Appl Physiol* v.106, p.415-423, 2009.

ZANG, D.; LIU, M.; DING,L.; GU,X.; Expression of myostatin Rna transcript and protein in gastrocnemius muscle of rats after sciatic nerve resection. *J. Of Muscle Research and Cell*, vol.27, p.37-44, 2007.