

*Universidade Federal de São Carlos*  
*Centro de Ciências Biológicas e da Saúde*  
*Programa interinstitucional de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas*  
*UFSCAR/UNESP*

**EFEITOS DO EXERCÍCIO INTERVALADO NA EXPRESSÃO DE  
PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS E CATABÓLICAS NA MUSCULATURA  
ESQUELÉTICA DE RATOS TRATADOS COM DEXAMETASONA.**

Aluna: Aline Mio Martuscelli

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso

São Carlos  
Março – 2014

**Aline Mio Martuscelli**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO INTERVALADO NA EXPRESSÃO DE  
PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS E CATABÓLICAS NA MUSCULATURA  
ESQUELÉTICA DE RATOS TRATADOS COM DEXAMETASONA.**

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa Interinstitucional de Pós-  
Graduação em Ciências Fisiológicas  
PIPGCF, UFSCar/UNESP.

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

São Carlos  
Março – 2014

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

M387ee

Martuscelli, Aline Mio.

Efeitos do exercício intervalado na expressão de proteínas inflamatórias e catabólicas na musculatura esquelética de ratos tratados com dexametasona / Aline Mio Martuscelli. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
55 f.

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

1. Fisiologia. 2. Dexametasona. 3. Treinamento intervalado. 4. Atrofia muscular. 5. Proteínas. 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 Aline Mio Martuscelli

Dia 27/03/2014

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

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

Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro..... 

## Dedicatória

Dedico ao meu pai (*in memoriam*), que mesmo não presente encheu minha alma de esperança e força. A toda minha família, pelo amor, paciência e, sobretudo por acreditar comigo nos meus sonhos.

## Agradecimento

Agradeço a Deus por sempre conduzir meus passos, me fortalecer em todos os obstáculos e principalmente por ter me dado uma família abençoada e unida no amor. A minha mãe por se fazer presente em todas minhas decisões sempre respeitando minhas escolhas, me apoiando e me amando incondicionalmente, você sempre será minha base. Ao meu pai (eterna saudade) que com seu humor e esperança sempre me servirá de exemplo de coragem em momentos não muito felizes, e que junto com minha mãe foram responsáveis pela construção de uma família que sobretudo desejam a proximidade, carinho, união e amor. As minhas irmãs que, com muito amor, carregam dentro de mim as melhores lembranças de uma infância linda, de uma adolescência histórica e de uma juventude prazerosa. A minha pequena e linda sobrinha que nos devolveu a luz em um momento em que tudo estava escuro, obrigada por me fortalecer em cada sorriso. É pelo amor de vocês e por vocês que suportei e suportarei todas as dores, minha gratidão sempre será eterna. Amo vocês.

Ao meu namorado, que docemente me perdoava pela falta de atenção ao final de um dia extenuante no laboratório, pelo apoio, admiração e amor que tem por mim.

Aos meus cunhados que sem dúvida já os tenho como verdadeiros irmãos, obrigada pelo convívio agradável e por todo carinho.

Aos meus amigos de infância de Estreito, vocês fizeram parte desta minha trajetória acadêmica e sempre serão essenciais na minha vida. As minhas amigas de república, conviver com vocês foi delicioso e me recordarei com muito carinho todas as nossas histórias, palhaçadas, almoços, bares, filmes, enfim, obrigada por eu ter compartilhado minha vida com vocês. A todos os meus amigos de Bauru que fizeram que essa etapa fosse vivida com mais alegria, muito obrigada.

Aos companheiros de laboratório, que dividiram comigo horas e horas de experimentos, trabalhos, almoços, risos, choros, enfim tudo, vocês fizeram parte deste trabalho, muito obrigada. A minha orientadora, que pacientemente me conduziu em todo meu processo de aprendizado, sem você seria impossível a realização e conclusão deste trabalho, obrigada pelos conselhos e puxões de orelha levarei eles sempre comigo e serei grata por toda confiança que depositou em mim, muito obrigada.

Agradeço a CAPES e FAPESP pelas bolsas cedidas durante esses dois anos.

Deixo aqui minha gratidão por todas as pessoas que fizeram parte da minha vida durante essa etapa, a todos os meus professores, amigos e familiares, o sentimento é de missão cumprida, muito obrigada.

*Ele é meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.*

*Salmo 91.*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Sinalização proteica responsável pela hipertrofia ou atrofia muscular (Adaptado de CLASS, 2005).....16
- Figura 2:** Sinalização proteica do sistema ubiquitina-proteassoma (adaptado, MURTON 2008).....17
- Figura 3:** Linha do tempo do protocolo experimental.....25
- Figura 4:** Evolução do peso corporal durante as 8 semanas de treinamento físico (painel esquerdo) e no período de tratamento com dexametasona (10 dias, painel direito) nos grupos sedentário controle (SC, n=12), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=13), treinado controle (TC, n=13) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=14). Significância: **b-** interação entre tratamento e momento, (independente do treinamento); **c-** efeito do momento (independente do treinamento ou tratamento),  $p < 0,001$ .....29
- Figura 5:** Valores de peso corporal de todos os ratos no dia da eutanásia. Sedentário controle (SC, n=11), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=13), treinado controle (TC, n=13) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=9). Significância : \* vs controle,  $p < 0,05$ .....29
- Figura 6:** Capacidade física máxima avaliada em minutos na esteira ergométrica nos testes máximos realizados durante o protocolo experimental. Avaliações 1, 2 e 3 correspondem aos TEM-1, TEM-2, TEM-3. Nos grupos sedentário controle (SC, n=13), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=13), treinado controle (TC, n=13) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=16) do TEM-1 ao TEM-2 e TEM-3. Significância: **a-** interação entre treinamento e momento (independente do tratamento)  $p < 0,001$ .....30
- Figura 7:** Variação do tempo em minutos entre a realização do terceiro teste máximo (TEM-3) e o primeiro teste máximo (TEM-1) nos grupos avaliados: treinados (n=30) e sedentários (n=26). Significância: \*vs sedentário,  $p < 0,05$ .....31



**Figura 8:** Valores do peso muscular no músculo TA e as análises densitométricas da produção das proteínas FOXO3a, Atrogina-1, MuRF-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, nos animais dos grupos sedentário controle - SC, sedentário tratado com dexametasona-SD, treinado controle - TC e treinado tratado com dexametasona - TD. Significância: + vs sedentário ;\* vs controle,  $p < 0,05$ . **Painel Superior:** Gel representativo dos resultados de Western Blot para as proteínas nos diferentes grupos analisados.....33

**Figura 9:** Valores do peso muscular no músculo FHL e as análises densitométricas da produção das proteínas FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1, TNF $\alpha$  e IL-6, utilizando a técnica de Western Blotting, nos animais dos grupos sedentário controle-SC, sedentário tratado com dexametasona-SD, treinado controle-TC e treinado tratado com dexametasona-TD. Significância: + vs sedentário  $p < 0,05$ ; \* vs controle,  $\alpha < 0,05$ . **Painel Superior:** Gel representativo dos resultados de Western Blot para as proteínas.....34

**Figura 10:** Valores do peso muscular no músculo SOL e as análises densitométricas da produção das proteínas FOXO3a, Atrogina-1 , MuRF-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, nos animais dos grupos sedentário controle-SC, sedentário tratado com dexametasona-SD, treinado controle-TC e treinado tratado com dexametasona-TD. Significância: \* vs controle,  $p < 0,05$ . **Painel Superior :** Gel representativo dos resultados de Western Blot para as proteínas.....35

## TABELA

Tabela 1; Valores de peso corporal e musculares dos animais avaliados.....	32
--	----

## SIGLAS

- AKT:** Treonina\seronina tirosina quinase.
- MAFbx:** Muscle atrophic F-box.
- FOXO3a:** Forkead transcription factors.
- IGF-I:** Fator de crescimento semelhante à insulina 1.
- mTOR:** Rapamicina.
- MuRF-1:** Murfs muscle ringer finger1.
- P70S6K:** Fosfatidilinositol quinase dependente 1.
- PI3K:** Fosfatidilinositol quinase-3.
- TNF- $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral- alpha.
- IL-6:** Interleucina 6.
- SUP:** Sistema Ubiquitina Proteassoma.
- SC:** Ratos sedentários controle.
- SD:** Ratos sedentários tratados com dexametasona.
- TC:** Ratos treinados controles.
- TD:** Ratos treinados tratados com dexametasona.
- TEM:** Teste máximo.
- Kg:** kilogramas
- cm:** Centímetro.
- LPS:** Lipopolissacarídeo.
- SOL:** Sóleo.
- TA:** Tibial Anterior.
- FHL:** Flexor Longo do Hálux.
- PC:** Peso Corporal.
- TI:** Treinamento Intervalado.

## Resumo

A dexametasona é amplamente utilizada no uso clínico, devido ao seu potente efeito antialérgico e anti-inflamatório, entretanto o uso crônico pode induzir diversos efeitos deletérios, tais como hiperglicemia, hipertensão, hipercolesterolemia e atrofia muscular. A atrofia muscular se dá por um desbalanço entre proteínas catabólicas e anabólicas. Dentre as proteínas catabólicas, a FOXO3a, MuRF-1 e Atrogina-1 estão diretamente relacionadas com a atrofia muscular induzida pela dexametasona. Além disso, já se sabe que algumas proteínas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) também participam na redução de peso muscular. Demonstramos recentemente que o exercício físico aeróbio atenua alguns dos efeitos deletérios da dexametasona, mas nada se sabe sobre os benefícios do exercício físico intervalado (TI) realizado antes e concomitantemente ao tratamento com a dexametasona. Portanto o objetivo deste trabalho foi investigar se o treinamento intervalado seria efetivo em prevenir a atrofia muscular induzida pela dexametasona (0,5mg/kg por 10 dias) e se as proteínas FOXO3a, MuRF-1, Atrogina-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 estão envolvidas nesta resposta. Foram utilizados 56 ratos Wistar, separados em 4 grupos: sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexametasona (TD). Após adaptação na esteira, os animais foram submetidos ao protocolo de TI (50% e 80% da capacidade máxima, 2 e 1 minutos, respectivamente, 1h / dia, 8 semanas, 5 dias / semana) ou mantidos como sedentários. O peso corporal (PC) foi verificado semanalmente durante o treinamento e diariamente durante o tratamento. Os músculos tibial anterior (TA), sóleo (SOL) e flexor longo do hálux (FHL) foram coletados, pesados e armazenados para análises de produção proteica de TNF- $\alpha$ , IL-6, FOXO3a, MuRF-1 e Atrogina-1 utilizando o método de eletroforese. O TI aumentou a capacidade física máxima dos animais treinados. A administração da dexametasona determinou diminuição significativa de PC (-17%) acompanhado de redução do peso muscular do TA (-22%) e FHL (-19%). Esta redução de peso muscular envolveu a proteína MuRF-1, que aumentou no TA (+27%) e FHL (+18%), embora tenha ocorrido diminuição significativa da produção proteica de TNF- $\alpha$  (-37% FHL e -15% SOL) e IL-6 (-26% TA, -24% FHL e -18% SOL) no grupo SD. O TI foi efetivo em bloquear o aumento de MuRF-1 nos músculos TA e FHL, ademais diminuiu significativamente a produção proteica de FOXO3a no músculo TA, tanto para o grupo TC (-27%) como TD (-32%), resposta acompanhada de atenuação da redução de peso muscular no TA, mas não no FHL (TD, -15%). O tratamento crônico com dexametasona, assim como o TI, não determinou alteração na Atrogina-1. Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que a MuRF-1 parece estar envolvida na atrofia nos músculos TA e FHL induzida por 10 dias de tratamento com dexametasona, independentemente das alterações das proteínas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6). O TI prévio, por sua vez, determinou atenuação da atrofia no TA por promover diminuição significativa na produção proteica de MuRF-1e de FOXO3a, sem alterar a produção proteica de TNF- $\alpha$  e IL-6.

Palavras chave: treinamento intervalado, atrofia muscular, glicocorticoides, FOXO3a, MuRF-1, Atrogina-1, TNF- $\alpha$  e IL-6.

## ABSTRACT

Dexamethasone is widely used in clinical use due to its potent anti-allergic and anti-inflammatory effects, but it has been shown that its chronic use can induce several side effects such as hyperglycemia, hypertension, hypercholesterolemia and muscle atrophy. Muscle atrophy occurs by an imbalance between catabolic and anabolic protein levels. Among catabolic proteins, FOXO3a, MuRF-1 and Atrogin-1 are directly related to muscle atrophy induced by dexamethasone. Furthermore, it is known that some inflammatory proteins (TNF- $\alpha$  and IL-6) also participate in reduction of muscle weight. We have shown that aerobic exercise attenuates some of the side effects of dexamethasone, but nothing is known about interval training (IT) performed before and concomitant dexamethasone treatment. This study investigated if interval training is effective in attenuating muscle atrophy induced by dexamethasone and if the proteins FOXO3a, MuRF-1, Atrogin-1, TNF- $\alpha$  and IL-6 are involved in this response. Rats were distributed into 4 groups: sedentary control (SC), sedentary + Dexa (SD), trained control (TC), and trained + Dexa (TD), and underwent an interval training period (50% and 80% of maximal capacity, 2 and 1 min, respectively, 1h/day, 5 days / week, 70 days) or remained sedentary. Dexamethasone was administered during the last 10 days (0.5mg/kg per day *i.p.*). The rats were weighed weekly during training and daily during the treatment. The tibialis anterior (TA), soleus (SOL) and flexor hallucis longus (FHL) were collected, weighed and stored for analysis of TNF- $\alpha$ , IL-6, FOXO3a, MuRF-1 and Atrogin-1 protein levels using electrophoresis method, Western Blotting. Administration of dexamethasone resulted in a significant decrease in body weight (-17%) followed by reduction in TA (-22%) and FHL (-19%) muscles weight. This reduction in muscle weight involved a significant increase in MuRF-1 protein levels in TA (+27%) and FHL (+18%) muscles, although TNF- $\alpha$  (-37% FHL and -15% SOL) and IL-6 (-26% TA, -24% FHL and -18% SOL) protein levels were reduced. Interval training was effective in blocking the increase of MuRF-1 protein level in TA and FHL muscles, moreover interval training significantly reduced FOXO3a production level in TA muscle, in both groups, TC (-27%) and TD (-32%). This response was followed by an attenuation of TA muscle mass after training. Chronic treatment with dexamethasone, as well as training, did not change Atrogin-1 protein level. The results of the present study allow us to conclude that MuRF-1 seems to be involved in TA and FHL muscle atrophy induced by dexamethasone treatment, independent of inflammatory proteins signaling. On the other side, interval training determined TA muscle atrophy attenuation by decreasing MuRF-1 and FOXO3a without changes in TNF- $\alpha$  e IL-6 protein levels.

Key words: interval training, muscle atrophy, glucocorticoids, FOXO3a, MuRF-1 atrogina-1, TNF- $\alpha$  and IL-6.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>13</b>
	<b>1.1 Efeitos da dexametasona na musculatura esquelética.....</b>	<b>14</b>
	<b>1.2 Efeitos do Exercício Físico.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>Justificativa e Objetivo.....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>24</b>
	<b>3.1 Avaliação da capacidade física máxima dos animais.....</b>	<b>24</b>
	<b>3.2 Grupos experimentais.....</b>	<b>25</b>
	<b>3.3 Protocolo de treinamento físico.....</b>	<b>26</b>
	<b>3.4 Retirada dos músculos esqueléticos.....</b>	<b>26</b>
	<b>3.5 Protocolo de dosagem de proteína.....</b>	<b>26</b>
	<b>3.6 Procedimentos de Western Blotting.....</b>	<b>27</b>
	<b>3.7 Métodos estatísticos.....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Referências.....</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Anexo 1.....</b>	<b>55</b>

## 1 –Introdução

A dexametasona é um glicocorticóide sintético que pertence à classe dos corticosteróides que, em nosso organismo, mimetiza os efeitos do cortisol. Os glicocorticóides são produzidos e secretados pelo córtex adrenal, regulados pelo eixo hipotálamo-hipofisário e atuam em diversos órgãos e sistemas. Têm como principal papel mobilizar carboidratos, lipídios e proteínas em uma situação de estresse, como por exemplo, ao final de exercícios de longa duração e na reação de luta e fuga (FARIA e LONGUI, 2006).

Na clínica, a dexametasona é um importante fármaco que tem sido utilizado em processos inflamatórios e alérgicos oriundos de diversas doenças, tais como asma, artrite, febre reumática, entre outras, (NISHIOKA, 2000; MARCHIONNI et al., 2006). Os efeitos dos glicocorticóides estão associados à utilização de ácido graxos livres liberados (lipólise), aminoácidos e gliconeogênese hepática para a formação de energia, o que resulta em aumento da glicemia servindo de substrato energético para recuperar tecidos lesionados. Entretanto, o uso crônico deste componente pode induzir diversos efeitos deletérios que comprometem o organismo.

Vários estudos vêm sendo realizados para identificar os efeitos deletérios do uso crônico da dexametasona. Eles demonstram reduções de peso corporal, aumento na resistência periférica à insulina, acompanhados de hiperglicemia e hiperinsulinemia, lipólise, proteólise, (AHTIKOSKI et al., 2004; LUNDGREN et al., 2004; CRESPILO et al., 2006; GILSON et al., 2007; RAFACHO et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2008, BAREL et al., 2010).

Os resultados do laboratório demonstraram pela primeira vez que o exercício aeróbio, realizado previamente ao tratamento com dexametasona, atenua alguns dos efeitos deletérios, tais como a resistência periférica à insulina, que foi possível devido a alterações nos níveis de importantes proteínas relacionadas à via de captação de glicose, tanto dependente como independente da insulina (LOUZADA, 2009, DIONÍSIO et al., 2014). Além disso, demonstramos que o exercício atenuava a redução do conteúdo de glicogênio muscular e o aumento pressão arterial. (BAREL et a., 2010, AMARAL et al., 2010). No entanto, o exercício físico aeróbio contínuo não foi eficaz em reverter o quadro de atrofia muscular induzida pelo tratamento crônico com dexametasona. Neste sentido, faz-se importante investigar se outros tipos de exercício podem ser mais eficientes no controle da atrofia muscular induzida pela dexametasona.

### *1.1 Efeitos da dexametasona na musculatura esquelética.*

A degradação proteica pode ocorrer de forma natural, com o avanço da idade sendo denominada de sarcopenia, a qual é marcada por uma diminuição do número e tamanho das fibras musculares. Entretanto, a perda muscular também pode estar associada com síndromes metabólicas complexas, ocorridas por algumas doenças, tais como, câncer, doenças crônicas renais, pulmonares e cardíacas, neste caso a degradação proteica é denominada de caquexia. (LENK et al., 2010).

Vários autores vêm sugerindo que a redução de peso corporal, induzida pela dexametasona é, muitas vezes, acompanhada por diminuição significativa do peso muscular, comprometendo toda a função da musculatura esquelética (MA et al., 2003; AHTIKOSKI et al., 2004; SACHECH et al., 2004; GILSON et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2008; BAREL et al., 2010). Esta atrofia muscular tem sido apontada como um desbalanço entre fatores positivos (proteínas anabólicas) e negativos (proteínas catabólicas) que controlam o crescimento muscular. Resultados recentes do laboratório (LOUZADA 2009; BAREL et al., 2010; AMARAL et al., 2010; MARTUSCELLI, 2011; DIONÍSIO et al., 2014) têm demonstrado constantemente que existe uma redução significativa de peso corporal nos ratos tratados por 10 dias de dexametasona, independente da dosagem. (1,0 ou 0,5 mg/kg). Esta diminuição de peso corporal pode ser explicada por uma redução significativa na ingestão alimentar dos animais, uma vez que dados preliminares têm demonstrado que, tanto o tratamento por 5 dias (SOUZA et al., 2012) como 10 dias (dados ainda não publicados) diminuem cerca de 44% a ingestão alimentar nos animais tratados com dexametasona, dados estes que estão de acordo com a literatura (SANTOS et al., 2007).

Uma das primeiras hipóteses que se pensou em relação à atrofia muscular induzida pelo tratamento crônico com dexametasona envolvia a miostatina, uma vez que a deleção do gene desta proteína impedia completamente a perda significativa de peso corporal e a atrofia muscular induzida pela dexametasona (MA et al., 2003 e GILSON et al., 2007).

Tem sido demonstrado que a miostatina (diferenciação do fator-8 do crescimento, GDF-8) é uma das principais proteínas que limita o crescimento muscular no organismo e tem sido implicada na perda muscular provocada por diversas doenças, tais como câncer, HIV (Human Immunodeficiency Virus) e distrofia muscular (MCPHERRON et al., 1997; TAYLOR et al., 2001; CHELH et al., 2009). A miostatina



é considerada um membro da superfamília do TGF- $\beta$  entre os fatores das proteínas que regulam negativamente a massa do músculo esquelético. Esta proteína se liga ao receptor de activina tipo IIa, que fosforila o receptor de activina tipo I que por sua vez induz a traduções intracelulares pela fosforilação de Smad 2/3 que, quando ativados, se dirigem ao núcleo iniciando a transcrição de genes alvos. (MCPHERRON et al., 1997).

Os resultados de Gilson et al. (2007) estão em acordo com os achados de Salehian et al.(2006) que já haviam demonstrado um papel importante da miostatina na atrofia muscular, uma vez que os ratos tratados com glutamina reduziram em 50% a expressão da miostatina e conseqüentemente atenuaram em 50% da perda muscular induzida por dexametasona. Artaza et al. (2002) observaram, em células C2C12, que o aumento da miostatina induzida por glicocorticoides era encontrado principalmente no núcleo celular quando comparado ao citoplasma, sugerindo um papel de transcrição da miostatina.

Apesar de vários autores sugerirem o papel fundamental da miostatina na atrofia muscular induzido por dexametasona, seu papel no tratamento crônico ainda é controverso. Ma et al. (2003) demonstraram que a expressão gênica e proteica de miostatina tem um comportamento bifásico, ou seja, aumenta com 5 dias de tratamento, mas retorna aos valores basais com 10 dias de tratamento. De fato, resultados recentes do laboratório não encontraram aumento da expressão proteica de miostatina no músculo tibial anterior (TA) após 10 dias de tratamento com dexametasona (MARTUSCELLI, 2011), mesmo na presença de atrofia muscular.

Vários autores têm apontado que a atrofia muscular possa ser determinada por uma série de mecanismos, que são demonstrados na Figura 1 (vias de sinalização responsáveis pela hipertrofia muscular, em verde e atrofia muscular, em vermelho). A redução de peso muscular pode ocorrer tanto por alteração da expressão de proteínas envolvidas na via de anabolismo proteico (P13k, AKT, mTOR e p70S6k) ou daquelas envolvidas no catabolismo (MuRF-1 e Atrogina-1). A proteína AKT pode tanto ativar a via da mTOR (proteína responsável pelo aumento muscular) como inibir a via da FOXO (proteína inibidora da hipertrofia). Se a mTOR for ativada, ela ativará a p70S6k que, por sua vez, promoverá a síntese proteica. Observa-se também, na Figura 1, as proteínas responsáveis pelo catabolismo protéico, via TNF $\alpha$  e IL-6, as suas subsequentes ativações culminam na ativação de Atrogina-1 e MuRF-1, ligases da via do Sistema ubiquitina-proteasoma (BODINE et al., 2001; ROMMEL et al., 2001). Como observado

na Figura 1, a AKT é ativada a partir da fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) pelo IGF-1.

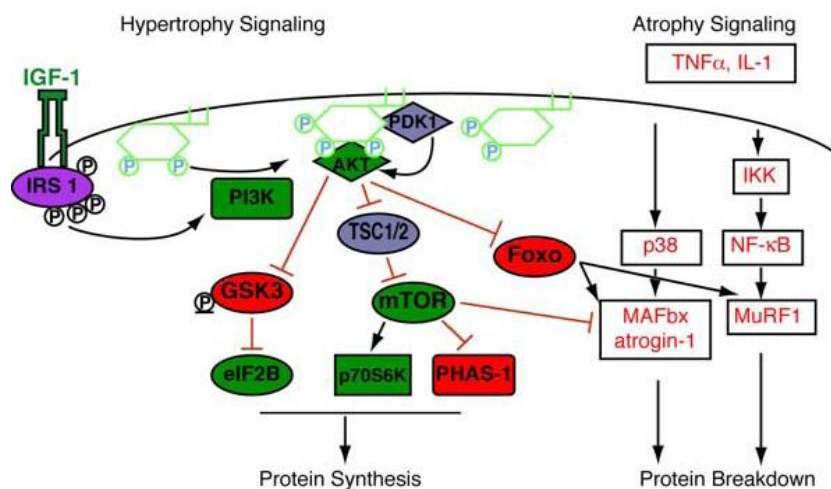


Figura 1: Sinalização proteica responsável pela hipertrofia (verde) ou atrofia (vermelho) muscular (Adaptado de CLASS., 2005).

O IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina-1) é sintetizado principalmente no fígado, além de ser produzido também em vários tecidos locais (ADAMS et al., 2002). Sua função é controlar o processo de sinalização intracelular miogênica. Desse modo, é responsável pelo processo de síntese proteica, participa do crescimento muscular e regula as vias metabólicas como a da insulina (BOFF., 2006). A hipertrofia induzida pelo IGF-1 ocorre por meio da ativação da PI3-kinase, que estimula a AKT, que por sua vez iniciará a sinalização na cascata de transdução necessária para diferenciação celular (BOFF., 2006). Pouco se sabe sobre os efeitos da dexametasona no conteúdo proteico do IGF-1. Yamamoto et al. (2008) demonstraram que o tratamento com dexametasona por 5 dias era capaz de reduzir significativamente a expressão gênica de IGF-1 no músculo sóleo de ratos. Concordando com estes resultados, Shakman et al. (2008) encontraram uma diminuição significativa da expressão de AKT, p70S6K e GSK-3 $\beta$  no músculo TA após sete dias de tratamento com dexametasona, associados a atrofia muscular, demonstrada pela diminuição da área transversal da fibra muscular. No entanto, dados recentes do Laboratório (LOUZADA, 2009) demonstraram que 10 dias de tratamento com a dexametasona, apesar de determinar atrofia muscular, não reduziram significativamente a expressão proteica de p70S6 na musculatura esquelética. Como mencionado anteriormente, a atrofia muscular

pode ser resultado de uma estimulação das vias catabólicas de controle muscular. Uma via importante de degradação proteica é o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP), que tem sido fortemente implicado em diferentes formas de caquexia. No entanto, os efeitos da dexametasona no SUP na musculatura esquelética ainda são pouco conhecidos.

Como pode ser observado na Figura 2, no sistema SUP, a proteína que será degradada recebe ligações de moléculas de ubiquitina e três enzimas ligases participam desse processo (E1, E2 e E3). As enzimas E3 são responsáveis de fato pela marcação da proteína a ser degradada. No processo, são necessários pelo menos 4 moléculas de ubiquitina ligadas à proteína alvo para que a mesma seja reconhecida e degradada pelo proteassoma 26S (MURTON et al., 2008). Várias são as representantes da E3 ligase, entretanto dois são específicos para a musculatura esquelética: a MuRF-1 (muscle ring finger protein) e Atroquina-1 (muscle atrophy F-box protein) (BODINE et al., 2001). Na Sarcopenia e caquexia, a transcrição de E3 ligase (MuRF-1 e Atroquina-1) se dá pela fosforilação da FOXO que está inativada pela P13k-AKT/PKB. (LENK et al., 2010). Sandri et al.(2006) mostraram a íntima ligação da FOXO com as ligases de ubiquitina, uma vez que a expressão gênica de Atroquina-1 e MuRF-1 se encontravam elevadas na presença de atrofia do músculo tibial anterior induzida pela desnervação e este aumento se dava pela ativação da FOXO. Auclair et al. (1997) encontraram após 7 dias de tratamento com corticosterona, aumento gênico de poliubiquitina e proteassoma C8 (subunidade da via ubiquitina-proteassoma) no sóleo e EDL que foram associados à diminuição do peso muscular, mostrando a ativação do sistema ubiquitina-proteassoma pelo glicocorticóide sintético em animais. Assim, estes resultados apontam a direta relação da ativação do SUP na perda de peso muscular em ratos tratados com dexametasona.

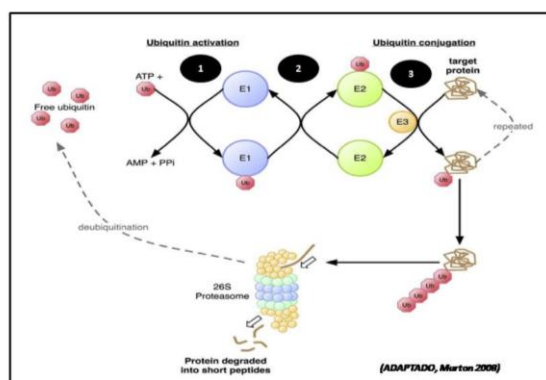


Figura 2: Sinalização proteica do sistema ubiquitina- proteassoma (adaptado, MURTON 2008).

Da mesma forma, Zheng et al. (2010) mostraram diminuição de PI3k/AKT e aumento de FOXO nos miotúbulos em células de cultura após aplicação de dexametasona, além de encontrarem aumento do mRNA de MuRF-1. Concordando com estes resultados, Stitt et al. (2004) já havia encontrado perda de miotúbulos em células C2C12 tratadas por 24 horas com dexametasona. Neste estudo, as expressões proteica de MuRF-1 e Atrogina-1 estavam significativamente aumentadas de forma dose-dependente de dexametasona e este aumento foi bloqueado quando IGF-1 foi administrado.

Nas diversas formas de modelos experimentais que provoquem perda muscular, a Atrogina-1 e MuRF-1, (ligases da via ubiquitina- proteasoma) parecem ser as principais responsáveis pela aceleração da catabolismo protéico. Tem sido demonstrado também que estas proteínas (MuRF-1 e Atrogina-1) podem ser resultantes da via dos sinalizadores inflamatórios. Assim, outra via de sinalização importante que promove a atrofia muscular é a dos mediadores inflamatórios (Figura 1). O aumento das expressões proteicas e gênicas de várias citocinas, entre elas, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), ativam para a p38 e NF-kB que culminam na subsequente ativação de Atrogina-1 e MuRF-1, no entanto, se esta via participa efetivamente da atrofia muscular induzida pela dexametasona ainda não se sabe. Li et al. (2004) demonstraram que células C2C12 estimuladas por TNF- $\alpha$  (500ug/ml) tiveram aumento significativo de mRNA para Atrogina-1, acompanhadas de aumento das formas fosforiladas de JNK e p38, proteínas subsequentes ativadas pelo TNF- $\alpha$ . Este trabalho confirma a relação direta do TNF- $\alpha$  com as proteínas JNK, p38 e Atrogina-1, sinalização observada da Figura 1. Yi e Reid (2000) mostraram pela primeira vez a ativação da transcrição específica que regula a perda de músculo esquelético e encontraram aumento de NF-kB induzido pelo TNF- $\alpha$  em células C2C12, que culminou na redução de miosina de cadeia pesada (MHC) nos miotúbulos.

Muitos trabalhos mostraram que o glicocorticoide e citocinas inflamatórias desempenham um papel importante na perda de proteína, particularmente a MHC (SEENE et al., 2003; ACHARYYA et al., 2004; DEKELBAD et al., 2007). Dekelbad et al. (2007) encontraram que a dexametasona atua em sincronia com o TNF- $\alpha$ , agravando a perda muscular, ou seja, aumentando a degradação de MHC nos miotúbulos e mioblastos. Além disso, encontraram diminuição de receptores de glicocorticoides quando administrada dexametasona em grandes concentrações em células L6. Contudo, Prelovsek et al. (2006) sugerem a participação do fator pro-inflamatório TNF- $\alpha$  na

estimulação da regeneração muscular. Estes autores observaram que, quando aplicado TNF- $\alpha$  em cultura de células havia aumento de IL-6 e esse aumento não promovia apoptose celular nos mioblastos, por outro lado, quando administrada dexametasona, ela agia suprimindo esse aumento de IL6 não possibilitando dessa forma, a proliferação dos mioblastos. Assim sendo, a IL6 é a principal citocina liberada no músculo esquelético e é considerado um potente estimulante para a proliferação de mioblastos e conseqüentemente, regeneração muscular (AUSTIN et al., 1992; BAEZA e MUNOZ., 2004). Frost et al. (2007), por sua vez, não encontraram em cultura de células (C2C12), aumento significativo de TNF- $\alpha$  e IL-6 quando aplicado a dexametasona, contudo, quando aplicado LPS (lipopolissacarídeo) e dexametasona, o glicocorticoide foi capaz de diminuir IL-6, comparado com apenas LPS (um indutor de várias citocinas). Os trabalhos acima sugerem uma participação das vias inflamatórias na atrofia muscular, mas a maioria dos resultados se fundamenta em trabalhos *in vitro*. Quase nada se sabe sobre os efeitos de um tratamento crônico com dexametasona na produção proteica destes fatores inflamatórios na musculatura esquelética.

## 1.2 Efeitos do Exercício Físico.

O exercício físico regular tem sido amplamente utilizado para tratamentos e prevenção de varias doenças, como asma, hipertensão, diabetes, obesidade (COIMBRA, et al., 2008; ELIAS et al., 2008; CLANS et al., 2009; AMARAL et al., 2011;). Dentre seus diversos efeitos, a prática regular de exercício físico atua melhorando a captação periférica de glicose, diminui a resistência vascular periférica, aumenta a sensibilidade à insulina e melhora o perfil lipídico (CLANS et al., 2009; CHRISTOS et al., 2009; LOIMAALA et al., 2009; NUNES e MELLO., 2009; PINHEIROS et al., 2009; BAREL et al., 2010; DIONÍSIO et al.2014). Além disso, tem sido demonstrado que o exercício físico regular atua diminuindo significativamente a atividade no nervo simpático na musculatura esquelética em pacientes cardiopatas (ROVEDA et al., 2003) e hipertensos (LATERZA et al., 2007) sugerindo a diminuição do sistema nervoso simpático.

Já na musculatura esquelética, o exercício físico promove a melhora tanto na estrutura como na funcionalidade muscular, promovendo hipertrofia muscular, aumentando o número de fibras, de mitocôndria e o número de vasos sanguíneo. (HUNTER et al., 2005; ADAMS et al., 2007; AMARAL et al., 2011).

Efeitos do exercício físico no controle do desenvolvimento muscular ainda são controversos, principalmente pelas diferenças encontradas na literatura em relação a tipo, intensidade e duração dos treinamentos. Enquanto alguns autores demonstram aumento de proteínas hipertrófica, outros afirmam que o exercício físico reduz as proteínas responsáveis pela atrofia.

Matsakas et al. (2006), utilizando a miostatina como proteína de modelo de atrofia muscular, demonstraram que o exercício crônico aeróbio foi capaz de diminuir significativamente a expressão de miostatina no músculo gastrocnêmico branco quando comparado com o exercício agudo, e esta diminuição foi maior no músculo com maior porcentagem de miostatina, ou seja, no branco (glicolítico) quando comparado ao vermelho (oxidativo). No entanto, dados recentes do laboratório (MARTUSCELLI, 2011), não demonstraram diminuição significativa na produção proteica de miostatina após o período de 8 semanas de treinamento aeróbio, nem no músculo tibial anterior nem no sóleo (músculos glicolítico e oxidativo, respectivamente). Achados similares foram encontrados por Bueno et al. (2011) e Leiter et al. (2010) que recentemente mostraram que não houve diminuição significativa na produção proteica da miostatina após 3 semanas de treinamento aeróbio e que não foi encontrada alteração da área de sessão transversa no músculo tibial (LEITER et al., 2010). Da mesma forma, Jensky et al. (2007), em uma única sessão de exercício excêntrico no músculo vasto lateral, não encontraram alteração gênica de miostatina.

Os resultados sobre a proteína p70S6k são ainda controversos na literatura. Baar e Esser (1999) demonstraram aumento na produção proteica de p70S6k no músculo TA e EDL em ratos machos após estimulação elétrica com intensidade semelhante ao exercício de alta intensidade. Por outro lado, Nader e Esser (2001) encontraram aumentos na fosforilação da proteína p70S6k no músculo TA em animais submetidos à estimulação elétrica de baixa frequência. Estes mesmos autores (NADER E ESSER, 2001) não observaram alteração na produção da proteína p70S6k, tanto no músculo TA quanto no músculo sóleo desses animais, quando os animais foram submetidos à estimulação elétrica de alta frequência ou treinamento aeróbio agudo de alta intensidade (83% do VO<sub>2</sub> máximo). Portanto, não está claro na literatura se a intensidade do exercício mais adequada para haver aumento de p70S6k é alta ou baixa. Recentes resultados do laboratório (MARTUSCELLI, 2011) demonstraram que o exercício físico aeróbio de baixa a moderada intensidade não foi capaz de aumentar a produção proteica de p70S6k no músculo TA nem no sóleo.

Para as E3 ligases (Atrogina-1 e MuRF-1), Mascher et al. (2008) encontraram que, após duas sessões de exercício resistido (80% 1RM), a expressão gênica de Atrogina-1 estava diminuída, embora a expressão de MuRF-1 estava aumentada. Da mesma forma, Harber et al. (2008) encontraram aumento gênico de MuRF-1 após uma única sessão de exercício aeróbio de 45 minutos (75%VO<sub>2</sub> máx), embora não encontraram diminuição da fração proteica no sóleo e vasto lateral. Por outro lado, Durigan et al. (2009), utilizando exercício físico aeróbio moderado crônico (três meses), evidenciaram diminuição significativa das expressões gênicas de Atrogina-1 e MuRF-1 (possíveis proteínas finais da via de sinalização pela TNF- $\alpha$  e IL-6) no músculo TA, em ratos com inflamação alérgica crônica do pulmão. Além de diminuir os marcadores inflamatórios (TNF- $\alpha$  e IL-6), o exercício realizado em ratos jovens durante 3 semanas mostrou aumento das células satélites musculares no gastrocnêmio, sugerindo, dessa forma, a possibilidade de síntese proteica.

Discordando destes resultados, Léger et al. (2006), utilizando 8 semanas de treinamento resistido e 8 semanas de destreino, encontraram aumento significativo da expressão gênica de Atrogina-1 e MuRF-1, acompanhados de aumento de 10% no tamanho do quadríceps. Já, no período de destreino, havia diminuição de suas expressões, voltando a valores basais, sugerindo portanto, que não necessariamente o aumento das expressões das ligases do SUP na musculatura esquelética (Atrogina-1 e MuRF-1) resulta em atrofia muscular.

Karagounis e Yaspilkis (2010) encontraram aumento de TNF- $\alpha$  em um e dois dias de exercício, no entanto 48 horas após o terceiro dia, sua expressão estava significativamente diminuída. Da mesma forma, Smits et al. (1997) mostraram que a prática de exercício vigoroso (uma sessão) promoveu diminuição significativa de TNF- $\alpha$  e IL6, entretanto o exercício diminuiu o efeito de inibição de TNF- $\alpha$  e IL6 pela dexametasona em células tratadas com LPS (dose terapêutica de dexametasona). Por outro lado, no treinamento resistido agudo, Steensberg et al. (2002), encontraram diminuição de glicogênio muscular e aumento da expressão gênica de IL-6 no músculo vasto lateral, entretanto não encontraram aumento na expressão de TNF- $\alpha$ .

Pelos estudos apresentados até o presente momento, pode-se observar que não existe um consenso em relação aos efeitos do treinamento físico na atrofia muscular e os mecanismos que envolvem as vias inflamatórias são inconclusivos, principalmente porque os poucos trabalhos que existem utilizam diferentes tipos e intensidade de exercícios. Dados recentes do laboratório (LOUZADA, 2009; BAREL et al., 2010;

MARTUSCELLI et al, 2011, MACEDO, 2013 e DIONÍSIO et al, 2014) mostraram que a atrofia muscular não foi prevenida pelo protocolo de treinamento aeróbio contínuo ou resistido. Portanto existe a necessidade de se pensar em outras estratégias, como mudar o tipo e intensidade de exercício físico, no sentido de para verificar seus efeitos preventivos na atrofia muscular induzida pela dexametasona.

Atualmente, a busca é imensa para encontrar um protocolo de treinamento que ofereça ganhos metabólicos, antropométricos e hemodinâmicos mais eficientes, principalmente variando modelos de diferentes tipos, intensidades, frequências e volumes de treino. Vários autores vêm utilizando o treinamento intervalado (TI) como modelo de protocolo que visa melhorias na pressão arterial, glicemia, capacidade física e metabolismo (BURGOMASTER et al., 2005; DAUSSIN et al., 2008; HARAM et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010; HAFSTAD et al., 2011).

Haram et al. (2009), analisando os efeitos do TI (4 e 3 minutos a 85-90%, e 70% do  $VO_2$  máximo, respectivamente) na síndrome metabólica, encontraram diminuições de gordura retroperitoneal, ácidos graxos livres, glicemia, pressão arterial e aumento de HDL (lipoproteínas de alta densidade). Da mesma forma, Kemi et al. (2007), utilizando um protocolo em esteira intervalado, na intensidade similar ao de Haram et al. (2009), ou seja, de 50-60% do  $VO_2$  máximo durante 2 minutos e 8 minutos a 85-90%, encontraram aumento do consumo de oxigênio, aumento da fração de encurtamento ventricular e diminuição da pressão sistólica.

Poucos estudos avaliaram o efeito do exercício intervalado nos níveis de proteínas que controlam o processo de atrofia muscular via citocinas inflamatórias e quase nada há sobre FOXO, MuRF-1 e Atrogina-1. Zanchi et al. (2010), utilizando protocolo de treinamento crônico de baixo volume, baixa frequência e alta porcentagem da capacidade máxima da força voluntária em ratos, encontraram aumento do peso muscular e da área transversa no plantar e no sóleo sem alterações na proteína quinase. Por sua vez, a expressão proteica de TNF- $\alpha$  estava significativamente diminuída após o treinamento, ou seja, estes autores encontraram hipertrofia sem a presença de marcadores inflamatórios.

Croft et al. (2009), utilizando treinamento intervalado de alta intensidade (70% do  $VO_2$  durante 10 minutos e 90%  $VO_2$  durante 3 minutos), encontraram aumento significativo nos níveis plasmáticos de IL-6 e IL-8 no músculo gastrocnêmio em uma sessão de exercício e no treinamento de 6 semanas, mostrando que a intensidade possa



ser um fator de indução dessas interleucinas; entretanto os valores plasmáticos de TNF- $\alpha$  não estavam aumentados nos dois protocolos de exercício.

Ainda não estão totalmente claros os efeitos do exercício físico intervalado nas proteínas negativas do crescimento muscular e, nada se sabe sobre a prevenção do exercício físico intervalado na atrofia muscular causada pela dexametasona.

## **2-Justificativa e Objetivo.**

Os glicocorticoides sintéticos são amplamente utilizados no uso clínico, devido ao seu potente efeito antialérgico e anti-inflamatório. Entretanto, seu uso crônico, dependente da dose e/ou tempo de administração, pode induzir diversos efeitos deletérios no organismo, entre eles, resistência periférica à insulina, hiperglicemia, lipólise, perda de peso e atrofia muscular.

A regulação miogênica é dada pelo balanço de proteínas positivas e negativas do crescimento muscular, ou seja, pelo controle de síntese e degradação de proteína. Tem sido demonstrado que o tratamento crônico com dexametasona promove atrofia muscular principalmente por aumentar a expressão de proteínas catabólicas, que podem ser aumentadas pela maior ativação do SUP ou da via inflamatória, estimulada pelo TNF- $\alpha$ . Por outro lado, o exercício físico tem sido utilizado como prevenção/tratamento de diversos processos patológicos, mas seus efeitos sobre a atrofia muscular ainda são controversos. Dados do laboratório (BAREL et al., 2010) mostraram que o tratamento de dexametasona (1mg/kg por dia) durante dez dias promovia atrofia muscular nos músculos com predominância de fibras brancas ou mistas, que não foi atenuada pelo treinamento físico aeróbio contínuo. Além disso, a produção de p70S6k estava aumentada no músculo TA tanto de animais treinados controles como de animais tratados com a droga (LOUZADA, 2009), o que parece não contribuir efetivamente para evitar a atrofia muscular nos animais tratados. Do mesmo modo, quando diminuída a dosagem de dexametasona em 50%, a atrofia continuava presente, mesmo após a prática de exercício aeróbio contínuo (MARTUSCELLI, 2011). Resultados mais recentes do laboratório, ainda não publicados, mostraram que a atrofia no FHL foi atenuada pelo treinamento resistido a 60% e 80% da capacidade máxima, o que indica que o tipo de exercício pode ser um fator importante para atenuação da atrofia muscular, no entanto

este efeito foi observado em apenas um músculo isolado e os mecanismos responsáveis por esta resposta ainda estão sendo investigados.

Quase nada se sabe sobre os efeitos preventivos do treinamento intervalado sobre a atrofia muscular induzida pela dexametasona. Além disso, os mecanismos envolvidos nesta resposta precisam ser esclarecidos.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se o exercício físico intervalado realizado anterior e concomitantemente ao tratamento com dexametasona, tem efeito preventivo na atrofia muscular induzida pela dexametasona e quais os mecanismos responsáveis por esta resposta.

### **3- Materiais e Métodos.**

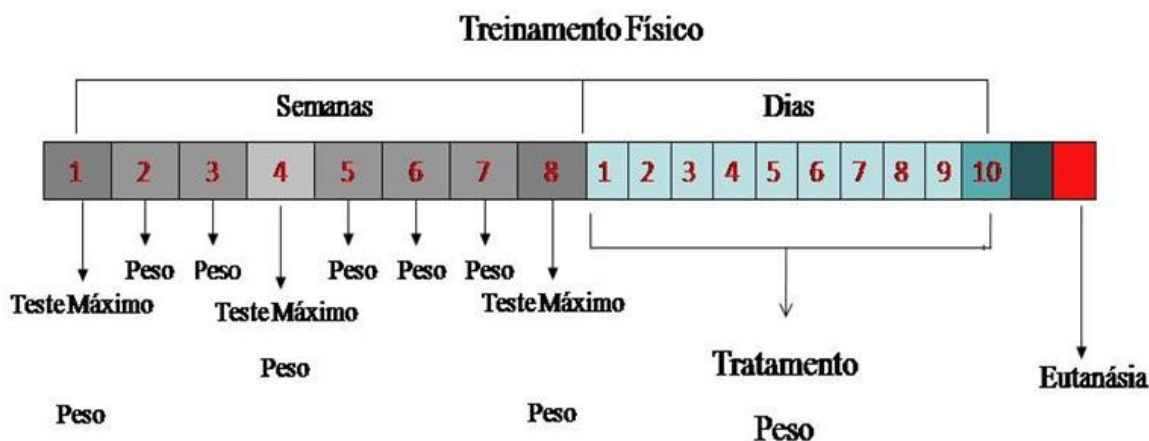
Foram utilizados ratos machos (Wistar) de 7-8 semanas de idade (200-250g, jovens), provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de animais da UNESP, Campus de Botucatu. Durante todo o protocolo, os animais foram mantidos em gaiolas com até cinco animais, no Biotério de Manutenção da Faculdade de Ciências da UNESP, campus de Bauru, com ciclo claro escuro de 12:12 horas e temperatura controlada (22°C). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Os ratos foram pesados semanalmente do início ao fim dos estudos (balança Fillizola).

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP (Protocolo n. 2012-02256) (Anexo 1).

#### *3.1 Avaliação da capacidade física máxima dos animais.*

A capacidade máxima foi avaliada de forma indireta por meio de teste de esforço máximo (TEM) em esteira ergométrica. Após um período inicial (10 dias), os ratos foram adaptados e selecionados segundo sua habilidade em andar/correr na esteira ergométrica adaptada para ratos (Inbramed, com 10 raias suspensas de ferro). Após esta pré-seleção, eles realizaram um teste de esforço máximo (TEM-1), utilizando um protocolo escalonado previamente validado e publicado por Silva et al. (1997), com incrementos de 3 m/min a cada 3 min. Depois de 4 semanas de treinamento, foi aplicado um novo TEM para readequação da carga de treino (TEM-2). Ao término dos 60 dias de protocolo experimental, foi aplicado um novo teste de esforço máximo (TEM-3). A

carga máxima foi determinada quando o animal não conseguia correr espontaneamente. Os ratos sedentários realizaram os testes de capacidade máxima no mesmo período que os treinados e permaneceram sedentários durante o período de treino. A Figura 3 representa a linha de tempo do protocolo experimental desta pesquisa.



**Figura 3:** Linha do tempo do protocolo experimental.

### 3.2 Grupos experimentais.

Após a avaliação da capacidade física, os ratos foram pesados e divididos em quatro grupos experimentais, seguindo protocolo de 70 dias.

Grupo 1: 11 animais que permaneceram sedentários durante todo o período e não receberam tratamento com dexametasona (SC).

Grupo 2: 13 animais que permaneceram sedentários por todo o período e receberam tratamento com dexametasona nos últimos 10 dias (0,5mg / kg de peso corporal, por dia, *i.p.*) – (SD).

Grupo 3: 13 animais que foram submetidos a um protocolo de treinamento físico por 8 semanas e não receberam tratamento com dexametasona (TC)

Grupo 4: 9 animais que foram submetidos a um protocolo de treinamento físico por 8 semanas seguido de tratamento com dexametasona por 10 dias (0,5 mg / kg de peso corporal por dia, *i.p.*) – (TD). Os animais treinados continuaram treinando durante o período de tratamento medicamentoso.

Os animais não tratados com dexametasona receberam placebo (solução salina, mesmo volume que os animais que receberam dexametasona) pelo mesmo período de treinamento.

### *3.3 Protocolo de treinamento físico.*

Para o treinamento físico intervalado foi utilizado protocolo adaptado de Guimarães et al., (2010), realizado em esteira ergométrica durante uma hora por dia, por 8 semanas, com intensidade de 50% e 80% (durante 2 e 1 minutos, respectivamente) da velocidade máxima atingida no teste de esforço. A velocidade e o tempo de treinamento foram aumentados gradativamente a cada dia, sendo que na segunda semana de treino os animais já realizavam o treino na intensidade e tempo desejados. A intensidade do treinamento foi readaptada após 4 semanas de treinamento. Os ratos sedentários permaneceram sedentários durante o período de treino.

### *3.4 Retirada dos músculos esqueléticos.*

Os animais foram eutanasiados por sobrecarga de anestésico ANASEDAN<sup>®</sup> (cloridrato de xilasina) e DOPALEN<sup>®</sup> (cloridrato de ketamina), CEVA e VETBRANDS do Brasil, respectivamente (1:1).

Após a eutanásia, os músculos esqueléticos tibial anterior (TA), sóleo e flexor longo do hálux (FLH) foram removidos e pesados imediatamente para a determinação da massa magra dos animais em estudo. A tíbia foi cuidadosamente dissecada e medida (cm) para normalização dos pesos dos músculos. Amostras dos músculos esqueléticos foram homogeneizadas imediatamente após a retirada com um homogeneizador Polytron em uma solução de RIPA (Cell Signaling) contendo vários inibidores de protease e adicionado 1% de PMSF e PIC (Coquetel com inibidores de protease, Sigma Aldrich) na hora de usar.

As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos na temperatura de 4 graus com aceleração e desaceleração igual a 7, em seguida o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, que foram armazenados em freezer a -80°C para futuras análises de produção proteica. Os tecidos não homogeneizados também foram armazenados em freezer -80°C.

### *3.5 Protocolo de dosagem de proteína.*

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando um kit comercial (Bio-Rad Kit, Protein Assay Standart II, Hercules, CA) com albumina como padrão, como previamente publicado (AMARAL et al., 2001). Os valores de

absorbância foram analisados no leitor de Elisa (BMG labtech, spectro star nano) utilizando uma placa de 96 poços.

Após a dosagem de proteínas as amostras foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas para os experimentos de Western Blotting.

### 3.6 Procedimentos de Western Blotting.

A proteína foi eletroforéticamente separada por tamanho, usando-se um sistema de gel de poli(acrilamida) conforme publicação prévia do laboratório (BAREL et al., 2010). Basicamente, foi utilizado um gel com duas camadas de poli(acrilamida), 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 (50  $\mu\text{g}$ ) foram colocadas para correr por 70 minutos a 200 V. Marcadores de peso molecular foram simultaneamente utilizados como tamanho padrão. As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose com aplicação de corrente de 120V por 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  $-\text{HCl}$ ; 0,50g de Trisma Base; 8,8g de NaCl e 1ml de Tween 20 para um litro de água destilada). As membranas foram bloqueadas com 1,5% albumina bovina (BSA) com TBS-T por 40 segundos. O Sistema de Detecção de Proteína (SNAP i.d.<sup>®</sup> 2.0 Protein Detection system -Millipore) foi usado para incubar as membranas por 10 minutos. As membranas foram incubadas com a diluição do anticorpo primário descrito a seguir: FOXO-3a (cell signalling #9464, 1:1,000 in 3% BSA), Atrogina-1 (Abcam #a74023, 1:500 in 3% BSA), MuRF-1 (Santa Cruz [C-20] sc-27642, 1:1000 em 3% BSA), TNF- $\alpha$  (R&D Systems #45418 1:1000) e IL-6 (Biorbyt #101926 1:500) As membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos secundários por 10 minutos descrito a seguir: FOXO3a (IgG anti-coelho 1:1,000), Atrogina-1 (IgG anti-coelho 1:10,000), MuRF-1 (anti-burro 1:10,000), TNF- $\alpha$  (anti-mouse 1:5000) e IL-6 (anti-mouse 1:5000). 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, Beta 4.02).

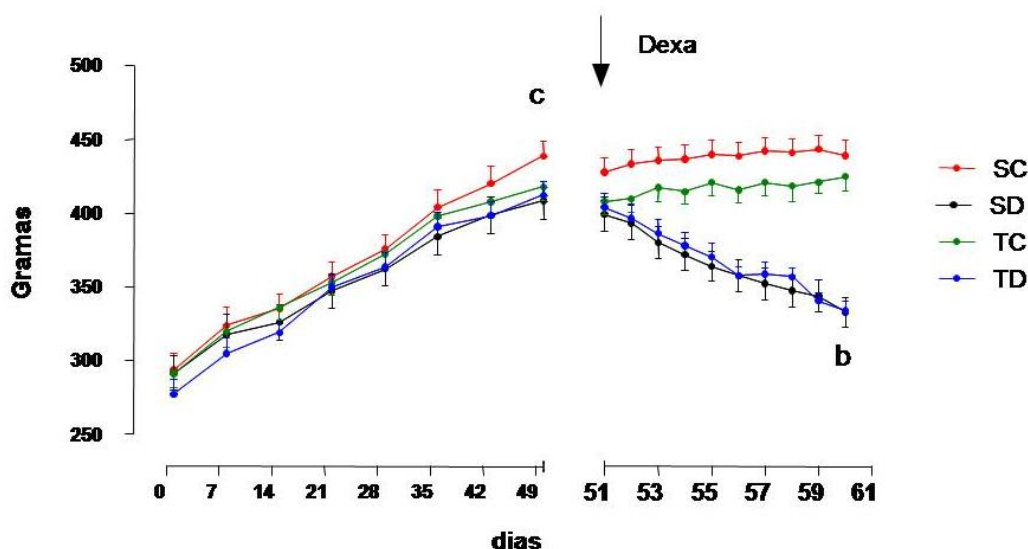
### 3.7 Métodos estatísticos.

Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM. Diferenças significativas foram detectadas utilizando ANOVA de três caminhos, sendo tratamento e treinamento como fatores e o tempo (antes e depois) como medidas repetidas (capacidade física, o peso corporal). Para as análises das proteínas foi utilizada ANOVA de dois caminhos. O post-hoc de Tukey foi utilizado quando necessário. Na análise de capacidade física, na qual houve dois grupos (sedentário e treinado) foi utilizado o teste T de student. O nível de significância considerado foi de  $\alpha < 0,05$ .

## 4-Resultados

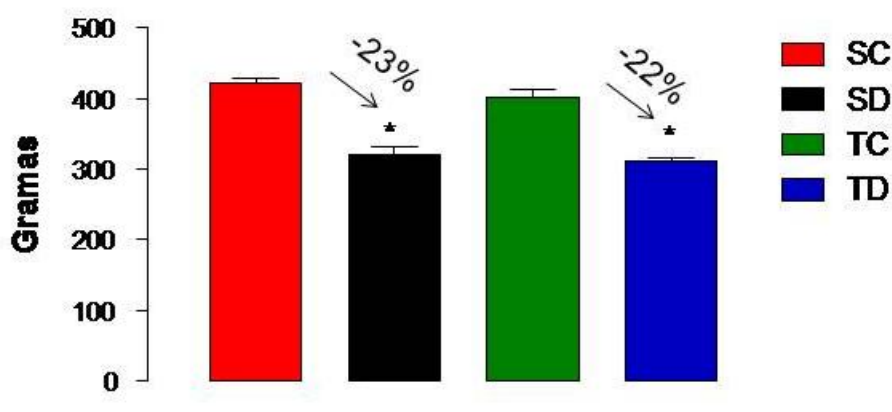
A Figura 4 demonstra a evolução do peso corporal durante as 8 semanas de treinamento e os 10 dias de tratamento com dexametasona. Pode-se observar que durante as primeiras 8 semanas, o aumento de peso corporal foi semelhante entre os grupos (SC: de  $293 \pm 10$ g para  $438 \pm 10$ g; SD: de  $291 \pm 11$ g para  $408 \pm 12$ g; TC: de  $291 \pm 10$  para  $417 \pm 9$ g; TD: de  $277 \pm 10$  para  $412 \pm 10$ g, respectivamente, da 1ª para a 8ª semana de treino,  $p < 0,05$  para todos os grupos). Importante ressaltar que os valores de peso corporal dos 4 grupos eram semelhantes no início do protocolo treinamento intervalado.

Observou-se diminuição significativa de peso corporal durante o tratamento com dexametasona (indicado pela seta preta na Figura 4), que foi independente do estado de treinamento dos animais (SD: de  $399 \pm 11$ g para  $332 \pm 10$ g e TD: de  $404 \pm 9$  para  $333 \pm 6$ g, entre o primeiro e último dia, respectivamente).



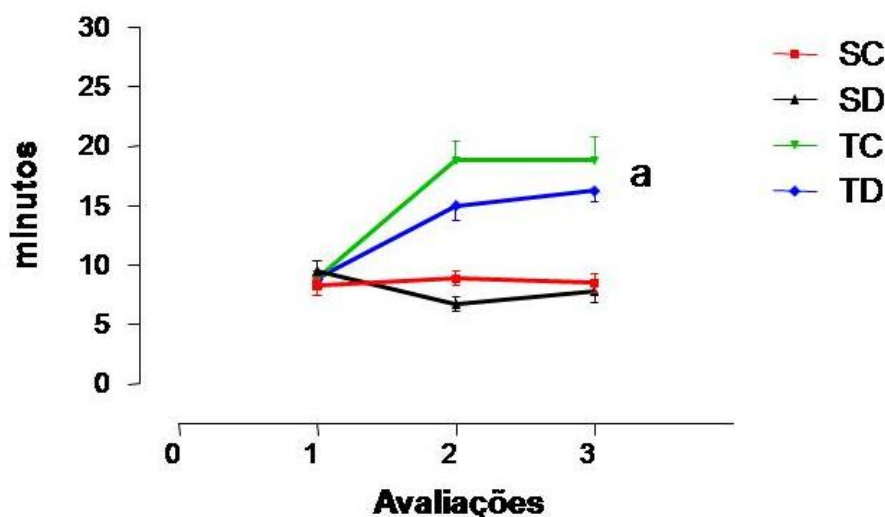
**Figura 4:** Evolução do peso corporal durante as 8 semanas de treinamento físico (painel esquerdo) e no período de tratamento com dexametasona (10 dias, painel direito) nos grupos sedentário controle (SC, n=12), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=13), treinado controle (TC, n=13) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=14). Significância: **b-** interação entre tratamento e momento, (independente do treinamento); **c-** efeito do momento (independente do treinamento ou tratamento),  $p < 0,001$ .

A redução do peso corporal entre o primeiro e último dia de tratamento foi de -17% para SD e para TD -18% quando comparados com o início do tratamento. O treinamento físico não atenuou a perda de peso corporal, uma vez que os animais SD e TD apresentaram reduções semelhantes de peso corporal. A Figura 5 confirma estes resultados e ilustra os valores de peso corporal no dia da eutanásia. Pode-se observar que houve perda significativa de 22% no peso corporal no grupo TD quando comparado com seu controle e de 23% para o grupo SD comparado com seu controle.



**Figura 5:** Valores de peso corporal de todos os ratos no dia da eutanásia. Sedentário controle (SC, n=11), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=13), treinado controle (TC, n=13) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=9). Significância: \* vs controle,  $p < 0,05$ .

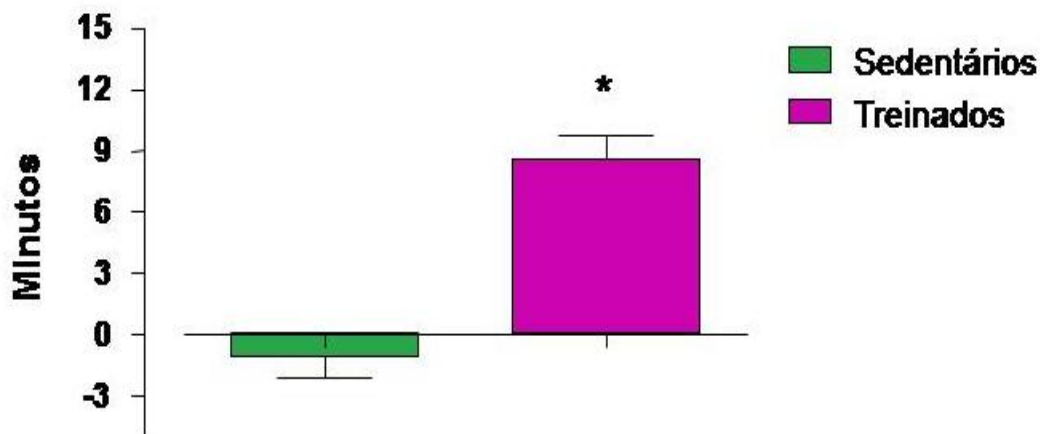
A figura 6 representa o resultado dos 3 testes máximos realizados na esteira durante o período de treinamento físico e os valores estão expressos em minutos. Observa-se aumento significativo do tempo de exercício físico nos grupos treinados, quando comparados com o início do treinamento (TC: de  $9 \pm 0,7$  min para  $19 \pm 2$  min e TD: de  $9 \pm 0,6$  min para  $16 \pm 0,9$  min, do TEM-1 para o TEM-3, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Para os grupos sedentários (SC e SD) não se observaram alterações significativas durante os testes. É importante destacar que todos os grupos partiram de valores semelhantes no início do treinamento, o que garante a homogeneidade dos grupos. Após o TEM-3, deu-se início ao período de tratamento com a dexametasona. Os animais treinados mantiveram seus treinamentos e os sedentários permaneceram neste estado até o final do tratamento (10 dias).



**Figura 6:** Capacidade física máxima avaliada em minutos na esteira ergométrica nos testes máximos realizados durante o protocolo experimental. Avaliações 1, 2 e 3 correspondem aos TEM-1, TEM-2, TEM-3. Nos grupos sedentário controle (SC, n=13), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=13), treinado controle (TC, n=13) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=16) do TEM-1 ao TEM-2 e TEM-3. Significância: **a**- interação entre treinamento e momento (independente do tratamento)  $p < 0,001$ .

A figura 7 mostra a variação (delta) do tempo em minutos entre o 3º e 1º TEM nos grupos treinados (de 8,87 min no TEM-1 para 17,45 min no TEM-3) e sedentários (de 8,90 min no TEM-1 para 8,18 min no TEM-3).





**Figura 7:** Variação do tempo em minutos entre a realização do terceiro teste máximo (TEM-3) e o primeiro teste máximo (TEM-1) nos grupos avaliados: treinados (n=30) e sedentários (n=26). Significância: \*vs sedentário,  $p < 0,05$ .

A perda de peso corporal induzida pela dexametasona durante o tratamento, relatada na figura 5, foi acompanhada por uma redução significativa de massa no músculo TA dos animais sedentários (-22%) como pode ser observada na Tabela 1. Por outro lado, o treinamento físico preveniu esta redução, como pode ser observado no grupo TD. Observa-se que nem o tratamento com dexametasona nem o treinamento físico não alteraram significativamente os valores de peso muscular no músculo sóleo.

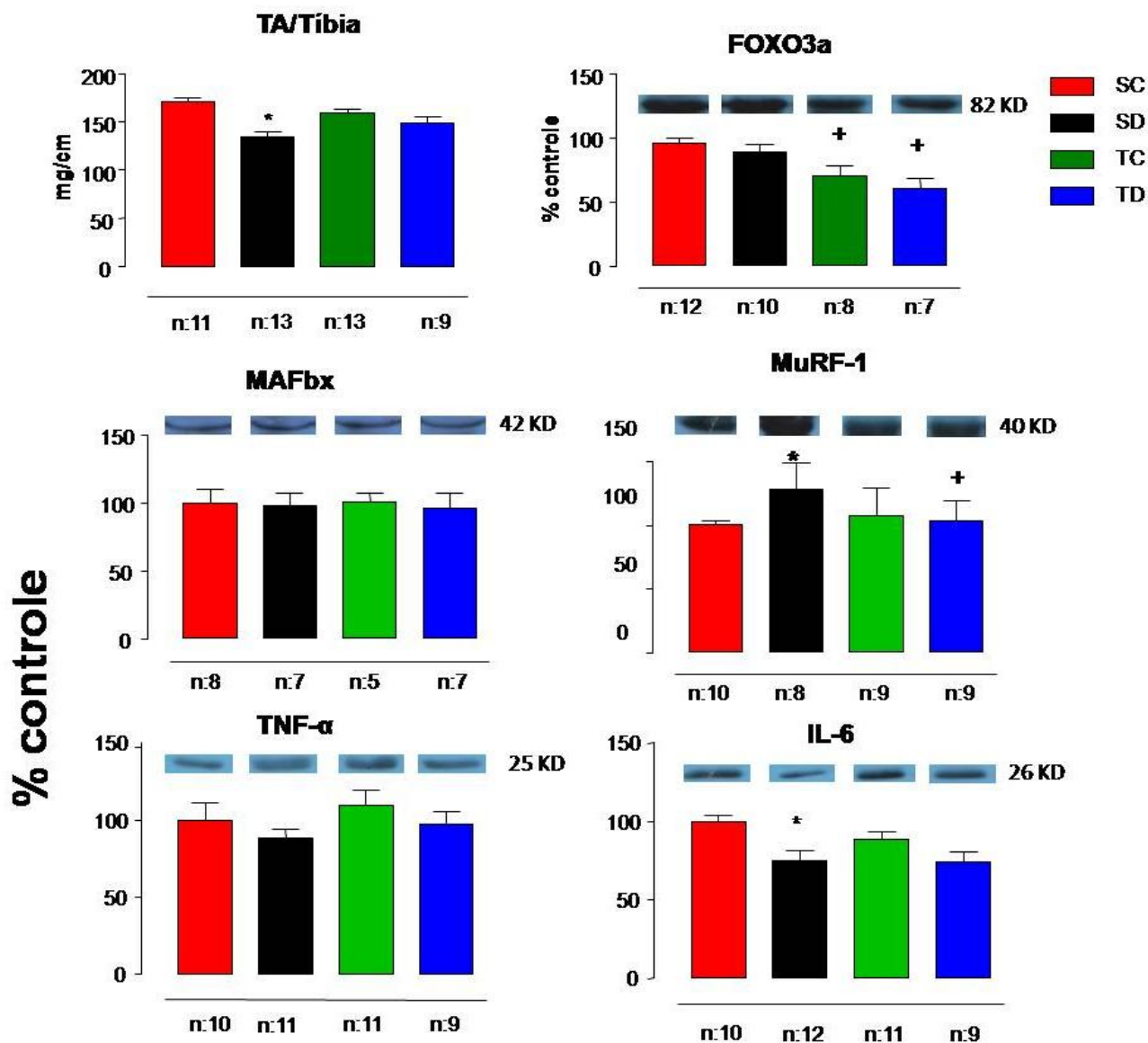
Observa-se também, na Tabela 1, que o tratamento com a dexametasona determinou redução significativa do peso do músculo FHL (-19%) nos animais sedentários, que não foi prevenido pelo treinamento físico (TD = -15%). Importante destacar que o tamanho em centímetros da tíbia não foi significativamente diferente entre os grupos.

Tabela 1: Valores de peso corporal e musculares dos animais avaliados.

	SC	SD	TC	TD
Peso Corporal (g)	421±8	320±10*	402±10	311±5*
TA (mg)	760±11	590±28*	703±13	633±30*
TA/tíbia (g/cm)	171±3	134±6*	159±3	148±7
TA/PC (mg/g)	1,79±2	1,84±2	1,74±1	2,03±5
SOL (mg)	192±5	201±14	203±11	214±18
SOL/tíbia (g/cm)	43±1	46±3	46±2	50±4
SOL/PC (mg/g)	0,46±0,008	0,63±0,04	0,50±0,02	0,69±0,05
FHL (mg)	517±13	414±16*	517±14	426±16*
FHL/tíbia (g/cm)	116±2	94±3*	117±4	99±4*
FHL/PC (mg/g)	1,22±0,01	1,30±0,04	1,28±0,04	1,39±0,05
Tíbia (cm)	4,42±0,05	4,39±0,03	4,41±0,05	4,27±0,04

Peso muscular (mg), peso corporal (gramas) e tamanho da tíbia(cm), no grupos analisados. SC: sedentário controle (n:11); SD: sedentário tratado com dexametasona (n=13); TC: treinado controle (n=14) e TD: treinado tratado com dexametasona (n=16), nos músculos TA: tibial anterior; SOL: sóleo e FHL: flexor longo do hálux. PC: peso corporal. Significância: \* vs controle, p< 0,05.

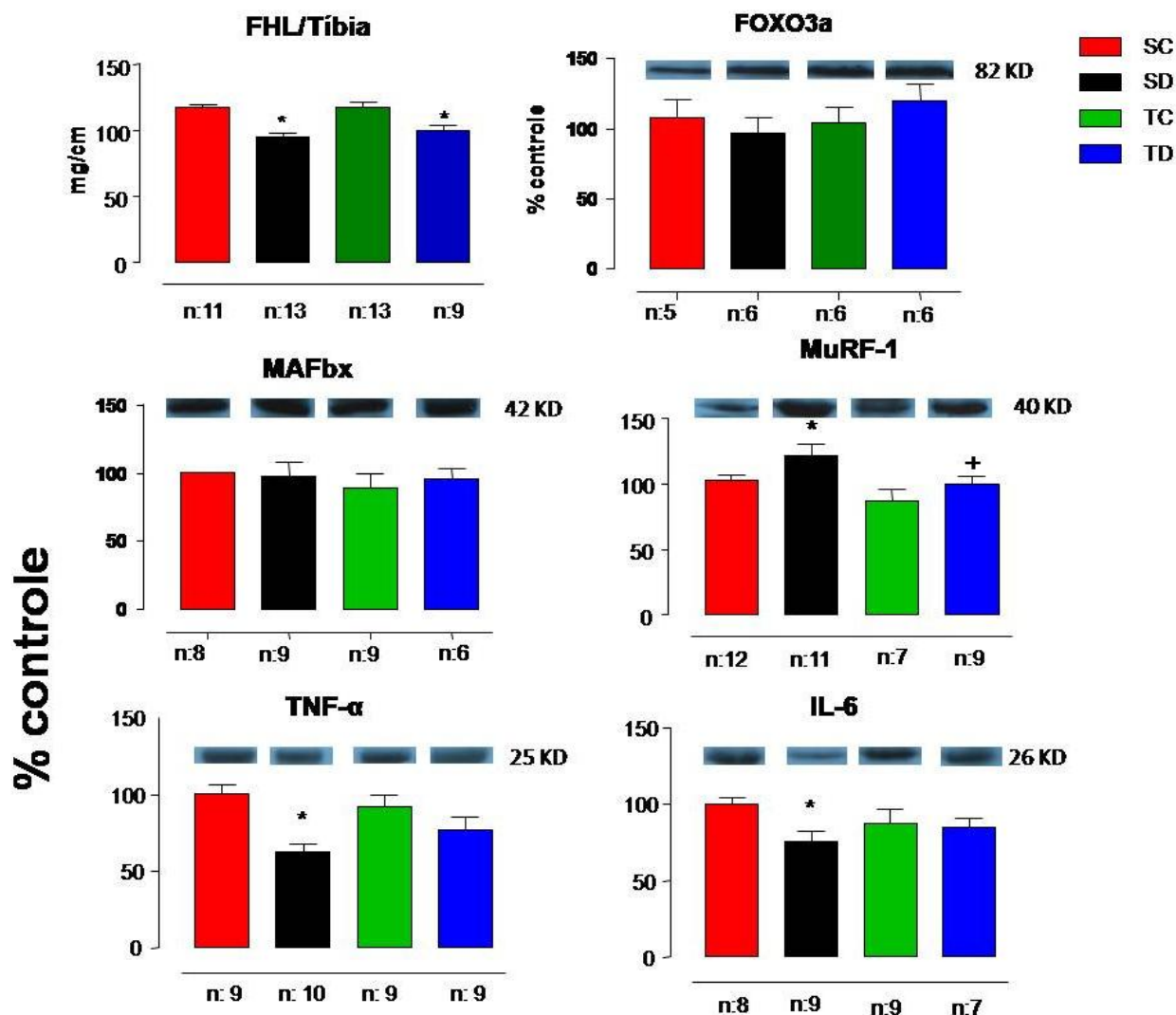
A figura 8 ilustra os resultados da quantificação da produção proteica da FOXO3a, Atrogina-1, MuRF-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 no músculo TA. Observa-se que a atrofia muscular no TA dos animais tratados com dexametasona (SD-22%) foi acompanhada de aumento significativo da produção proteica de MuRF-1 (+27%) no grupo sedentário (SD), sem qualquer alteração na produção de FOXO3a, Atrogina-1 e TNF- $\alpha$ . Por outro lado, observa-se uma diminuição significativa (-25%) da interleucina IL-6. O treinamento físico intervalado determinou diminuição significativa dos valores de FOXO3a nos grupos TC (-27%) e TD (-32%), comparado com seus controle sedentários, bem como bloqueou o aumento da produção de MuRF-1 no grupo TD comparado com seu grupo sedentário (SD). Estas alterações proteicas foram concomitantes com a atenuação da redução de massa no TA observada nos animais treinados e tratados com dexametasona.



**Figura 8:** Valores do peso muscular no músculo TA e as análises densitométricas da produção das proteínas FOXO3a, Atrogina-1, MuRF-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, nos animais dos grupos sedentário controle-SC, sedentário tratado com dexametasona-SD, treinado controle-TC e treinado tratado com dexametasona-TD. Significância: + vs sedentário; \* vs controle, p < 0,05. **Painel superior:** Gel representativo dos resultados de Western Blot para as proteínas nos diferentes grupos analisados.

A Figura 9 demonstra que o tratamento com dexametasona determinou diminuição significativa do peso do músculo FHL (-19%) nos animais sedentários (SD) e o treinamento intervalado não foi efetivo em prevenir essa atrofia. Esta redução de massa no FHL, induzida pelo tratamento com dexametasona, foi acompanhada de aumento significativo (+18%) na produção de MuRF-1 nos animais sedentários (SD) no músculo FHL, embora não tenha alterado a produção proteica de FOXO3a e Atrogina-1 e encontrado diminuição da produção proteica de TNF- $\alpha$  (-37%) e de IL-6 (-24%). O treinamento intervalado atuou bloqueando o aumento da produção de MuRF-1 (TD)

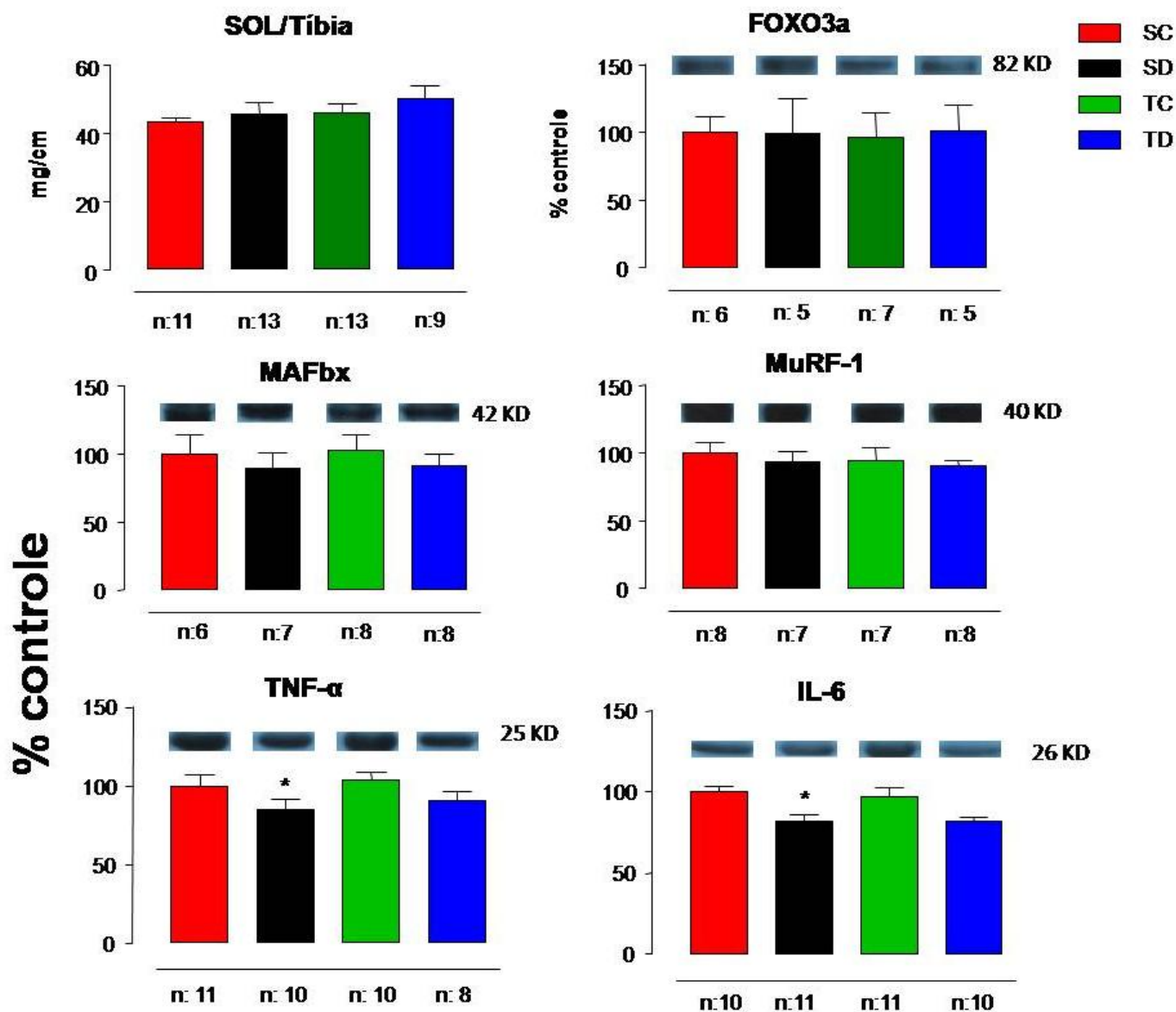
quando comparado com seu grupo sedentário (SD), entretanto, não foram observadas alterações na produção proteica de FOXO3a, Atrogina-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 após o treinamento intervalado nesta musculatura.



**Figura 9:** Valores do peso muscular no músculo FHL e as análises densitométricas da produção das proteínas FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1, TNF $\alpha$  e IL-6, utilizando a técnica de Western Blotting, nos animais dos grupos sedentário controle-SC, sedentário tratado com dexametasona-SD, treinado controle-TC e treinado tratado com dexametasona-TD. Significância: + vs sedentário  $p < 0,05$ ; \* vs controle,  $\alpha < 0,05$ . **Painel superior:** Gel representativo dos resultados de Western Blot para as proteínas.

Na figura 10 pode-se observar que o tratamento com dexametasona não promoveu atrofia muscular no músculo SOL, haja vista que não foi observado alteração na produção proteica de FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1 neste grupo e tampouco o treinamento físico determinou alterações da produção proteica dessas proteínas.

Importante destacar que os valores de  $\text{TNF-}\alpha$  (-15%) e de IL-6 (-18%) foram reduzidos no grupo sedentário tratado com dexametasona.



**Figura 10:** Valores do peso muscular no músculo SOL e as análises densitométricas da produção das proteínas FOXO3a, Atroquina-1, MuRF-1,  $\text{TNF-}\alpha$  e IL-6, nos animais dos grupos sedentário controle-SC, sedentário tratado com dexametasona-SD, treinado controle-TC e treinado tratado com dexametasona-TD. Significância: \* vs controle,  $p < 0,05$ . **Painel superior:** Gel representativo dos resultados de Western Blot para as proteínas.

## 5-Discussão

Os resultados do presente trabalho mostraram que o tratamento com dexametasona determinou atrofia muscular nos músculos TA e FHL e esta atrofia parece estar associada com o aumento dos níveis de MuRF-1. Por outro lado, o treinamento intervalado na esteira atenuou a atrofia muscular no TA e esta resposta envolveu uma atenuação dos níveis de MuRF-1 e redução de FOXO3a. Embora os níveis de MuRF-1 foram atenuados após treinamento no FHL, a atrofia muscular não foi suavizada. Estas respostas parecem não estar associadas com o comportamento das proteínas inflamatórias neste modelo de atrofia. Importante destacar que até o presente momento, este é o primeiro trabalho a investigar os efeitos de um treinamento intervalado na atrofia muscular induzida por dexametasona.

Os resultados anteriores de laboratório haviam demonstrado que 1mg/kg por dia de dexametasona eram capazes de reduzir significativamente o peso corporal e muscular (TA e EDL) e que o exercício aeróbio de baixa a moderada intensidade era efetivo em atenuar a atrofia muscular somente no músculo EDL (BAREL et al., 2010). No entanto, utilizando a metade da dose usada anteriormente do laboratório, observamos que 0,5mg/kg por dia de dexametasona também causava perda significativa de peso corporal (17%) e de peso muscular no TA, que não foi atenuada pelo exercício aeróbio contínuo de baixa a moderada intensidade (MARTUSCELLI, 2011). Esta resposta de redução de peso corporal após tratamento com dexametasona vem sendo observada por vários autores. Ma et al. (2003), utilizando uma dosagem de 0,6 mg/kg por dia de dexametasona, também encontraram perda significativa de peso corporal nos animais (-4%), assim como Santos et al. (2007), que encontraram diminuição significativa (-19%) de peso corporal após cinco dias de dexametasona (1mg/kg). Mais recentemente, Pielock, Sommer e Hauber (2013) observaram diminuição significativa de peso corporal a partir do terceiro dia de dexametasona (1,2 mg/kg por dia) em animais. Um dos possíveis mecanismos relacionados à redução de peso corporal é a diminuição de ingestão alimentar, uma vez que a dexametasona altera a produção de leptina (adipocina controladora da ingestão alimentar) e de grelina (adipocina que sinaliza a fome). Jhang et al. (2008) encontraram aumento de leptina acompanhado pela diminuição da ingestão alimentar em animais tratados com dexametasona (1mg/kg) por quatro dias. Da mesma forma, Tulipano et al. (2007) demonstraram que o tratamento com 40ug/kg durante 8

dias de dexametasona promoveu diminuição da ingestão alimentar acompanhado da diminuição do peso corporal e, quando o tratamento com a dexametasona foi associado a um agonista de grelina (BIM-28215), obtiveram os mesmos resultados, sugerindo que a diminuição da ingestão alimentar induzida pela dexametasona possa ser pela baixa atividade da grelina. Confirmando estes achados, MACEDO (2013) observou redução significativa de ingestão alimentar durante os 10 dias de tratamento com dexametasona (0,5mg/kg).

Outro possível mecanismo responsável pela redução de peso corporal seria a atrofia muscular generalizada, pois, segundo Gilson et al. (2007), animais que não apresentam atrofia (devido à deleção de um gene atrofico, miostatina), não apresentam redução de peso corporal induzida pela dexametasona.

A atrofia muscular tem sido apontada como um desbalanço entre fatores catabólicos e aqueles que promovem síntese de proteínas (MA et al., 2003; JACKMAN e KANDARIAN, 2004; AHTIKOSKI et al., 2004; SACHECK et al., 2004; GILSON et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2008), mas os mecanismos responsáveis pela atrofia muscular induzida por dexametasona ainda não são totalmente conclusivos. Sabe-se que os glicocorticoides atuam promovendo a atrofia muscular preferencialmente em músculos compostos por fibras rápidas, brancas, glicolíticas e em menores proporções em músculos oxidativos, de contração lenta (FALDUTO et al., 1990; NAVA et al., 1996). Estes resultados estão em acordo com os achados do presente estudo que observou atrofia muscular no TA e FHL, mas não no sóleo.

Um dos mecanismos mais descritos na literatura responsável pela perda muscular induzida pela dexametasona é a ativação do Sistema Ubiquitina Proteassoma (SUP) e, neste sistema, as duas enzimas E3 ligases (Atrogina-1 e MuRF-1) estão diretamente relacionadas com diminuição do tecido muscular (STITT et al., 2004; SACHECK et al., 2004; CLARKE et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2008). Neste sentido, tem sido demonstrado que o aumento da produção de Atrogina-1 e MuRF-1 são antagonizados (bloqueado) pelo tratamento de IGF-1 (SACHECK et al., 2004; SANDRI et al., 2004; STITT et al., 2004).

O aumento de MuRF-1, Atrogina-1 e FOXO induzidos pela dexametasona já vem sendo estudado no tecido muscular e em cultura celular. Alamdari et al. (2012), demonstraram aumento significativo da expressão gênica e produção proteica de MuRF-1, Atrogina-1 e FOXO-1, diminuição do diâmetro celular e aumento da degradação proteica em cultura de células de miotúbulos após o tratamento por 24 horas de

dexametasona (1 $\mu$ M), entretanto, esses efeitos foram prevenidos após tratamento com resveratrol nessas células. Estes resultados concordam com os achados de Zheng et al. (2010), que encontraram aumento significativo de ubiquitina C, FOXO3a e MuRF-1 nos miotúbulos após 48 horas de aplicação de dexametasona. Mais recentemente, Castellero et al. (2013) associaram a atrofia muscular induzida pela dexametasona com aumento da produção proteica e expressão gênica de MuRF-1 e Atrogina-1 e diminuição de 30% do diâmetro das células dos miotúbulos. Especificadamente na musculatura esquelética, Gilson et al., (2007), utilizando altas doses de dexametasona (5mg/kg) demonstraram aumento da expressão gênica de FOXO3a, Atrogina-1 e MuRF-1 no músculo gastrocnêmio. Nicastro et al. (2012) encontraram aumento da produção proteica de MuRF-1 após 7 dias de tratamento com dexametasona (5mg/kg) no músculo plantar, embora a produção proteica de FOXO3a e Atrogina-1 não estavam alteradas.

Em contraste com estes resultados, Baerhr, Furlow e Bodine (2011) sugeriram que provavelmente as enzimas E3ligases do sistema SUP possuem funções distintas ao promover a atrofia muscular induzida pela dexametasona, uma vez que a deleção do gene da MuRF-1 bloqueava a atrofia muscular induzida pela dexametasona, no entanto, quando o gene da Atrogina-1 era deletado, esta resposta era mantida. Assim, estes autores sugeriram que o principal controlador da atrofia muscular era a MuRF-1. Os resultados do presente estudo concordam com tais achados, pois a administração de 0,5mg/kg de dexametasona determinou aumento significativo de 27% de MuRF-1 no músculo TA e de 19% no músculo FHL, embora não aumentou FOXO3a nem Atrogina-1. Diferente ainda destes resultados, Crossland et al. (2010), não encontraram aumento da expressão gênica de Atrogina-1 e MuRF-1 no músculo extensor longo dos dedos após infundir 12,5 $\mu$ g/kg por dois dias de dexametasona com LPS em animais e, além disso, encontraram diminuição significativa da expressão gênica de FOXO1 na fração citosólica nos animais com endotoxaemia induzida pela LPS após utilização da dexametasona.

Alguns autores já haviam demonstrado que a produção proteica e expressão gênica nas suas subclasses dos fatores de transcrição da família forkhead (FOXO1, FOXO3a, FOXO4 e FOXO6) podem estar alteradas em alguns modelos de tratamento com dexametasona (PUTHANVEETIL et al., 2010; POULSEN, CARR e HULLEY, et al., 2011; BAERHR, FURLOW e BODINE, 2011), mas os resultados são conflitantes. Baerhr, Furlow e Bodine. (2011) demonstraram que o tratamento com 3 e 14 dias de dexametasona (3mg/kg) não alteraram a produção proteica e a expressão gênica da



FOXO3a no músculo tríceps sural, entretanto, a proteína FOXO1 estava aumentada nos dois períodos de tratamento. Da mesma forma, Puthanveetil et al. (2010) demonstraram que o tratamento com dexametasona em miócitos ventriculares durante 6 horas aumentava a produção proteica de FOXO1 na fração nuclear, embora não encontraram alterações em nenhuma fração (nuclear, citosólica e total) na produção de FOXO3a. Por outro lado, Poulsen, Carr e Hulley (2011) identificaram que, em células do tendão, havia um aumento da produção proteica de FOXO3a após 3 dias de tratamento com dexametasona, entretanto, após 7 dias de tratamento, seus valores estavam em níveis basais. Qui et al. (2010), mostraram a correlação direta entre a expressão gênica de FOXO1 e a perda de peso do músculo gastrocnêmio após infundir 0,7mg/kg durante 7 dias. No presente trabalho, analisando a proteína FOXO3a, o tratamento de dexametasona por 10 dias (0,5mg/kg) não foi capaz de alterar seus níveis em nenhum dos músculos analisados.

Existem várias formas de induzir o catabolismo celular, tais como a sepsia, endotoxina, excesso de citocinas inflamatórias, glicocorticoides, entre outras, por produzirem um desequilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas (FANG et al., 1998; HASSELGREN et al., 1993; LANG et al., 2000; LI et al., 2004). Spate e Schulze (2003), em sua revisão sugere o papel crucial das citocinas pró-inflamatórias na perda e função de peso muscular, da mesma forma, Delkelbad et al. (2007), mostraram a íntima relação da dexametasona e TNF- $\alpha$  na degradação de MHC nos miotúbulos e mioblasto. Utilizando altas doses de dexametasona (5, 10 e 20 mg/kg, *i.p*), Muhammad et al. (2012) encontraram aumento significativo do conteúdo proteico de TNF- $\alpha$  e IL-6 no hipocampo.

Por outro lado, a baixa dose de dexametasona pode atuar reduzindo a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias. Crossland et al. (2010), mimetizando uma situação de sepsis, aplicando LPS, encontraram aumento gênico de TNF- $\alpha$ , MuRF-1 e Atrogina-1 no músculo extensor longo dos dedos, e quando aplicado em conjunto com a dexametasona (12.5ug kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) por uma hora, esses valores foram reduzidos. Assim, a administração apenas de dexametasona não promoveu aumento da expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL-6 e tão pouco foi observada diminuição do conteúdo proteico neste músculo. Entretanto, Bruccoleri et al. (1999), aplicando duas doses de dexametasona, uma baixa e outra alta (0,2 e 10mg/kg, *i.p*, respectivamente) uma hora antes de causar inflamação e dano celular, não observaram aumento de TNF- $\alpha$  e IL-6 na região do hipocampo. Importante ressaltar que, aparentemente a dose do fármaco, a técnica

utilizada, bem como, o tecido analisado, são fatores determinantes na resposta desta proteína frente à administração da dexametasona. Neste presente estudo, utilizando uma dose relativamente alta, a produção proteica de TNF- $\alpha$  no músculo FHL (-37%) e SOL (-15%) foi diminuída significativamente após o tratamento com a dexametasona, embora não tenha sido observada alteração desta proteína no músculo TA.

Autores já relataram o aumento da taxa de proteólise com a administração da citocina IL-6 (GOODMAN 1994; TSUJINAKA et al., 1995). Janssen et al. (2005) utilizando duas doses de IL-6, uma baixa e outra alta (50ug.kg - 1 .dia - 1e 250 kg - 1 .dia-1, respectivamente) infundidas em ratos, encontraram que a baixa dose não causou uma redução significativa do tamanho e no peso da fibra muscular nem alteração das propriedades contráteis do músculo diafragma, embora a dose alta diminuiu significativamente o peso muscular (-15%), além de diminuir o tamanho da fibra muscular na musculatura de fibras rápidas e lentas, afetado mais o músculo gastrocnêmio. Considerando a interleucina IL-6 como possível mecanismo para a atrofia muscular, a proposta inédita do trabalho era identificar se a utilização da dexametasona em uma alta dose poderia ser responsável pela maior produção de IL-6, e esta atuaria como precursora da atrofia muscular.

Vários autores utilizando baixa dose de dexametasona não encontraram aumento na produção proteica de IL-6. Rezonja e Mars. (2013), utilizando células de mioblasto humana observaram diminuição da secreção de IL-6 após a aplicação de 1nM de dexametasona por 24 horas. Da mesma forma, Frost et al. (2002), utilizando células C2C12 não encontraram alteração de mRNA de IL-6 após aplicarem 1nM de dexametasona por 30 minutos. Em ratos Sprague–Dawley, Crossland et al. (2010) não demonstraram alteração na expressão gênica de IL-6 no músculo EDL após infundirem pela veia jugular 12.5ug kg -1 h - 1 de dexametasona durante uma hora. Embora utilizado um dose maior de dexametasona nos animais, este trabalho converge com os tais achados, pois a utilização de 0,5mg/kg *i.p* de dexametasona promoveu uma redução significativa da produção proteica de IL-6 em todos os músculos estudados (TA, FHL e SOL). Estes resultados sugerem a não participação desta interleucina, bem como a citocina TNF- $\alpha$ , na atrofia muscular induzida pela dexametasona.

O principal objetivo desse trabalho foi verificar se a realização de exercício físico intervalado na esteira, realizado antes e durante o tratamento com glicocorticoide, pudesse prevenir ou atenuar a atrofia muscular diminuindo a via catabólica muscular (FOXO3a, MuRF-1 e Atrogina-1) e a via inflamatória (TNF- $\alpha$  e IL-6). De acordo com

esta hipótese, o treinamento físico intervalado foi eficaz em prevenir o aumento de MuRF-1 e reduzir a produção proteica de FOXO3a nos grupos TC e TD no músculo TA, respostas estas que provavelmente estão envolvidas na atenuação do músculo TA após o tratamento com a dexametasona nos animais treinados. Infelizmente, esta resposta de atenuação da atrofia induzida pela dexametasona não foi observada no FHL, mesmo com a prevenção do aumento da MuRF-1, o que sugere que, para haver atenuação da atrofia, a redução da FOXO3a foi fundamental, neste modelo estudado.

Pesquisadores já encontraram benefícios na pressão arterial, glicemia, capacidade física e no metabolismo após a realização do exercício intervalado (HARAM et al., 2009; DAUSSIN et al., 2008; BURGOMASTER et al., 2005; HAFSTAD et al., 2011, GUIMARÃES et al., 2010) e o desafio deste trabalho foi identificar se o treinamento intervalado também preveniria a atrofia muscular induzida pela dexametasona, haja vista a ausência de trabalhos desta natureza na literatura. Os estudos que avaliam efeitos do exercício em proteínas catabólicas utilizam exercício aeróbio contínuo ou resistido. Mascher et al. (2008) encontram que após 48 horas de duas sessões de exercício de resistência foi suficiente para diminuir a expressão gênica de Atrogina-1 e MuRF-1. Da mesma forma, Zanchi et al. (2010) demonstraram que o treinamento resistido concêntrico durante 12 semanas foi capaz de atenuar a expressão gênica de Atrogina-1 e MuRF-1 no músculo plantar. Entretanto, Léger et al. (2006) utilizaram 8 semanas de treino resistido e encontraram diminuição da produção proteica de FOXO1 e aumento significativo da produção proteica de Atrogina-1 e da expressão gênica de MuRF-1, interessante mesmo com o aumento das proteínas ligases do sistema SUP, identificaram aumento da secção transversa do quadríceps.

Utilizando exercício aeróbio por 6 semanas, Nassan et al. (2012) não encontraram alteração na expressão gênica de Atrogina-1. Diferente deste estudo, no presente trabalho, o treinamento intervalado, independente do tratamento com a dexametasona, não foi capaz de alterar a produção de Atrogina-1 e MuRF-1, entretanto, diminuiu a produção proteica de FOXO3a no grupo TC (-27%), e TD (-32%) no músculo TA. Importante destacar que o treinamento intervalado, associado com o tratamento com a dexametasona no músculo TA, foi efetivo em reduzir a produção proteica de MuRF-1 no músculo TA e FHL no grupo TD comparado com seu grupo sedentário (SD).

Após a elaboração deste projeto, novos estudos foram publicados acerca da interleucina IL-6 e TNF- $\alpha$  em resposta ao exercício físico (ABEDELMALEK et

al.,2013; PEREIRA et al., 2013; ZWETSLOOT et al.,2014). Atualmente, existem várias discussões sobre o real papel do IL-6 na musculatura esquelética após o exercício, no entanto, seus efeitos ainda apresentam uma dualidade: hora é visto como uma das sinalizações associada com a estimulação do crescimento muscular por regular as células satélites, hora é visto como um precursor para a promoção da atrofia e perda de peso muscular, embora ainda não compreendido claramente qual mecanismo prevalece (CÁNOVES et al.,2013).

Ainda são poucos os estudos sobre a influência das interleucinas pró-inflamatórias na atrofia muscular em animais submetidos ao exercício. Zanchi et al. (2010) encontraram aumento do peso muscular e da área transversa no músculo plantar e sóleo sem alterações na proteína quinase, além de observarem diminuição significativa dos níveis de TNF- $\alpha$  após um protocolo de treinamento de alta porcentagem da capacidade máxima da força voluntária em ratos. Abedelmalek et al. (2013) observaram que em indivíduos que realizaram treinamento intervalado agudo (4x250m), tiveram os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-6 elevados durante até 60 minutos pós-exercício. Já Pereira et al. (2013) observaram que após 60 minutos de uma sessão de exercício resistido, a maioria das mulheres apresentavam aumento dos níveis circulantes de IL-6, dado não encontrado para TNF- $\alpha$ .

Mais recentemente, Zwetsloot et al. (2014), utilizando treinamento intervalado de alta intensidade, observaram que após uma e seis semanas de treino, os valores de TNF- $\alpha$  imediatamente após a última sessão em cada período estavam significativamente maiores no plasma comparado com o pré-treino, ao passo que, a IL-6 se manteve alta até 45 minutos após a última sessão. Por outro lado, Wang et al. (2013), também utilizando cicloergômetro, não encontrou aumento plasmático de IL-6 após 12 semanas de treinamento intervalado, dados que concordam com os achados de Steensberg et al. (2002), para a proteína TNF- $\alpha$ , que utilizando exercício resistido agudo não encontraram aumento gênico significativo de após 30, 90 e 180 minutos pós exercício no músculo vasto lateral. Pode-se observar que a maioria dos trabalhos citados avalia conteúdos plasmáticos desta citocina e quase que sempre em momentos imediatamente após o exercício, ou seja, verificam o efeito agudo.

Assim, este presente trabalho foi o primeiro a observar os efeitos crônicos do exercício intervalado nos níveis de TNF- $\alpha$  e de IL-6 na musculatura de animais tratados ou não com dexametasona e, como observado nos resultados, o treinamento intervalado

não promoveu alteração de IL-6 em nenhum dos músculos analisados (TA, FHL e SOL).

## **6-Conclusão**

Os dados do presente trabalho demonstram que o treinamento intervalado na esteira foi efetivo para atenuar a atrofia muscular no TA induzida pela dexametasona e esta resposta envolveu uma atenuação nos níveis musculares de MuRF-1 e FOXO3a. As alterações observadas de TNF- $\alpha$  e IL-6 na musculatura esquelética parecem não estar envolvidas neste modelo de atrofia muscular.

## 7-REFERÊNCIAS

ABEDELMALEK, S; SOUISSI, N; CHTOUROU, H; DENGUEZLI, M; AOUICHAOU, C; AJINA, M; ALOUI, A; DOGUI, M; HADDOUK, S; TABKA, Z. Effects of partial sleep deprivation on pro-inflammatory cytokines, growth hormone, and steroid hormone concentrations during repeated brief sprint interval exercise. **Chronobiol Int**, v.4, p.502-509, 2013.

ACHARYYA, S. LADNER, K.J; NELSEN, L.L; DAMRAUER, J; REISER, P.J; SWOAP, S. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. **J Clin Invest**, v.114, p.370-378, 2004.

ADAMS, G.R. Autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. **J Appl Physiol**, v. 93, p.1159–1167, 2002.

ADAMS, G.R; HADDAD, F; BODELL, P.W; TRAN, P.D; K. M. 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.

AHTIKOSKI, A.M; RISO, E.M; KOSKINEN, S.O.A; RISTELI, J; TAKALA, T.E.S. Regulation of type IV collagen gene expression and degradation in fast and slow muscles during dexamethasone treatment and exercise. **Eur J Physiol**, v. 448, n. 1 p. 123-130, 2004.

AMARAL, S. L., PEREZ, O.A. B., BAREL, M., BECHARA, L. R. G., TANAKA, L. Y., DIONISIO, T.J., LOUZADA, J. C.A., DIONISIO, E. J., VISCELLI, B. A., MARTUSCELLI, A. M., BOSQUEIRO, J.R., SANTOS, C. F., RAMIRES, P. R. Preventive effects of exercise training on dexamethasone-induced hypertension, oxidative stress and peripheral insulin resistance. **Faseb Journal**. v.24. p.982.7 2010.

AMARAL, S. L; Michelini, L. C. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. **Braz J Med Biol Res**, v.44, p. 814-826, 2011.

AMARAL, S.L., LINDERMAN, J.R., MORSE, M.M., GREENE, A.S. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. **Microcirculation**, v. 8, n.1, p. 57-67, 2001 (b).

AMARAL, S.L; SANCHEZ, L.S; CHANG, A.J.B.A; 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, n. 5, p. 424-431, 2008.

AMARAL, S.L; ZORN, T.M.T; MICHELINI, L.C. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduced pressure in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 18, n. 11, p. 1563-1572, 2000.

ARTAZA, J.N; BHASIN, S; MALLIDIS, C; TAYLOR, W; MA, K; CADAVID, N.F.G. Endogenous expression and localization of myostatin and its relation to myosin

heavy chain distribution in C2C12 skeletal muscle cells. **J Cell Physiol**, v.190, p.170-179, 2002.

AUCLAIR, D; GARREL, D.R; ZEROUALA, A.C; FERLAND, L.H. Activation of the ubiquitin pathway in rat skeletal muscle by catabolic doses of glucocorticoids. **American Physiological Society**, p. C1007-C1016, 1997.

AUSTIN,L; BOWER,J; KUREK, J; VAKAKIS, N. Effects of leukaemia inhibitory factor and other cytokines on murine and human myoblast proliferation. **J Neurol Sci**, v. 112, p. 185-191, 1992.

BAAR, K; ESSER,K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **Am. J. Physiol**, p. 120-127, 2009.

BAEHR, L.M; FURLOW. J.D; BODINE, S.C. Muscle sparing in muscle ring finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. **J Physiol**, p. 4759-4776, 2011.

BAEZA, B.B; MUÑOZ, C.P. p38 MAPK-induced Nuclear Factor- $\kappa$ B Activity Is Required for Skeletal Muscle differentiation: Role of Interleukin-6. **Mol Biol Cell**, v. 15, p. 2013-2026, 2004.

BAREL, M; PEREZ, O.A. B; GIOZZET, V.A; RAFACHO, A; BOSQUEIRO, J.R; AMARAL, S.L. Exercise Training Prevents Hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and atrophy induced by dexamethasone treatment. **Eur J Appl Physiol**, v.108, p.999 - 1007, 2010

BODINE, S.C; STITT, T.N; GONZALEZ, M; KLINE, W.O; STOVER, G.L; BAUERLEIN, R; ZLOTCHENKO, E; SCRIMGEOUR, A; LAWRENCE, J.C; GLASS, D. J; YANCOPOULOS, G.D. AKT/MTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat Cell Biol**, v. 3, p. 1014-1019, 2001.

BOFF, S.R. A influência do exercício de resistência associado ao esteróide anabólico sobre o perfil fenotípico da cadeia pesada de miosina do músculo de ratos. 2006 70f. Dissertação (mestrado em Educação Física). Universidade Metodista de Piracicaba, 2006.

BRUCCOLERI, A; PENNYPACKER, K.R; HARRY, G.J. Effect of dexamethasone on elevated cytokine mRNA levels in chemical- induced hippocampal injury. **J Neurosci Res**, v. 57, p.916-926, 1999.

BUENO, P.G;BASSID; CONTRERA, D.G; CARNIELLI, H.M; SILVA,R.N; NONAKA, K.O; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S; LEAL, A.M. Post-exercise changes in myostatin and actRIIB expression in obeso insulin-resistant rats. **Moll Cell Endocrinol**, v6, p.159-164, 2011.

BURGOMASTER, K.A; HUGHES, S.C; HEIGENHAUSER, G.J.F; BRADWELL, S.N; GIBALA, M.J. Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. **J Appl Physiol**, v. 98, p. 1985-1990, 2005.

CÁNOVES, P.M; SCHEELE, C; PEDERSEN, B.K; SERRANO, A.L. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle a double-edged sword? **FEBS Journal**, v.280, p.4131–4148, 2013.

CASTILLERO, E; ALAMDARI, N; LECKER, S.H; HASSELGREN, P.O. Suppression of atrogin-1 and MuRF-1 prevents dexamethasone-induced atrophy of cultured myotubes. **Metabolism**, p. 1495-1502, 2013.

CHELH, I; MEUNIER, B; PICARD, B; REECY, M.J; CHEVALIER, C; HOCQUETTE, J. F; MALEK, I. C. Molecular profiles of quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3k and apoptotic pathways as myostatin targets. **BMC genomics**, v. 10, p. 1-13, 2009.

CHRISTOS, Z.E; TOKMAKIDIS, S.P; VOLAKLIS, K.A; KOTSA, K; TOUVRA, A.M; DOUDA, E; YOVOS, I. G. Lipoprotein profile, glycemic control and physical fitness after strength and aerobic training in post-menopausal women with type 2 diabetes. **Eur J Appl Physiol**, p. 1078-1084, 2009.

CLANS, F; ERIKSSON, K.F; SEGERSTROM, A; THORSSON, O; WOLLMER, P; GROOP, L. Evaluation of the effects of exercise on insulin sensitivity in Arabian and Swedish women with type 2 diabetes. **DIAB**, v. 4506, p. 1-6, 2009.

CLARKE, B.A; DRUJAN, D; WILLIS, M.S; MURPHY, L.O; CORPINA, R.A; BUROVA, E; RAKHILIN, S; STITT, T.N; PATTERSON, C; LATRES, E; GLASS, D.J. The E3 ligase MuRF-1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. **Cell Metabolism**, v.6, p. 376-385, 2007.

COIMBRA, R; SANCHEZ, L. S; POTENZA, J.M; ROSSONI, L. V; AMARAL, S.L; MICHELINI, L.C. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? **Hypertension**, v. 52, p. 514-521, 2008.

CRESPILHO, D.M; PAULF, J.R; LEITE, J.A.C.A; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico sobre aspectos metabólicos e imunológicos em ratos administrados com dexametasona. **Biosci J**. v. 22, n. 2, p. 109-118, 2006.

CROFT, L; BARTLETT, J.D; MACLAREN, D.P.M; REILLY, T; EVANS, L; MATTEY, D.L; NIXON, N.B; DRUST, B; MORTON, J.P. High-intensity interval training attenuates the exercise-induced increase in plasma IL-6 in response to acute exercise. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, p. 1098-1107, 2009.

CROSSLAND, H; TEODOSIU, D.C; GREENHAFF, P.L; GARDINER, S.M. Low-dose dexamethasone prevents endotoxaemia-induced muscle protein loss and impairment of carbohydrate oxidation in rat skeletal muscle. **J Physiol**, p. 1333-1347, 2010.

DAUSSIN, F.N; ZOLL, J; DUFOUR, S.P; PONSOT, E; WOLF, E.L; DOUTRELEAU, S; METTAUER, B; PIQUARD, F; GENY, B; RICHARD, R. Effect of interval versus continuous training on cardiorespiratory and mitochondrial functions: relationship to



aerobic performance improvements in sedentary subjects. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 295, p. R264-R272, 2008.

DELKELBAB, B.H; WITCHEL, S.F; DEFRANCO, D.B. TNF- $\alpha$  and glucocorticoid receptor interaction in L6 muscle cells: A cooperative downregulation of myosin heavy chain. **Steroids**, v.72, p. 705-712, 2007.

DIONISIO, T.J.; DIONISIO, E. J.; MARTUSCELLI, A. M; BAREL, PEREZ, O.AB; BOSQUEIRO, J.R; BROZOSKI, D.T, SANTOS, C.F, AMARAL, S.L LOUZADA, J.C.A.; VISCELLI, B. A; AMARAL, S. L. Aerobic Training Prevents Dexamethasone-induced Peripheral Insulin Resistance. **Horm Metab Res**, v.46: 484-489, 2014.

DURIGAN, J.L.Q; PEVIANI, S.M; RUSSO, T.L; SILVA, A.C.D; VIEIRA, R.P; MARTINS, M.A; CARVALHO, C.R.F; SALVINI, T.F. Effects of exercise training on atrophy gene expression in skeletal muscle of mice with chronic allergic lung inflammation. **Braz J Med Biol Res**, v.42, p. 339-345, 2009.

ELIAS, R.G.M; FERNANDES, C.A.M; FONTES, C.E.R; CUMAN, R.K.N. Influência da atividade física sobre a prevalência de síndrome metabólica, em mulheres atendidas em uma unidade básica de saúde, Maringá, PR. **Cienc Cuid Saúde**, v. 7, p. 88-93, 2008.

FANG, C.H; LI, B.G; WANG, J.J; FISCHER, J.E; HASSELGREN, P.O. Treatment of burned rats with insulin-like growth factor I inhibits the catabolic response in skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.275, p.1091-1098, 1998.

FARIA,C.D.C; LONGUI, C.A. Aspectos moleculares da sensibilidade aos glicocorticóides. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**; São Paulo, v.50, nº.6, 2006.

FROST, R.A; NYSTROM, G.J; JEFFERSON, L.S; LANG, C.H. Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogen-1 and MuRF-1 in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, p. E501-E512, 2007.

FROST, R.A; NYSTROM, G.J; LANG, C.H. Lipopolysaccharide regulates pro-inflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.283, p.698-709, 2002.

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

GOODMAN, M.N. Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 205, p.182-185, 1994.

GUIMARÃES, G.V; CIOLAC, E.G; CARVALHO, V.O; D'AVILA, V.M; BORTOLOTTI, L.A; BOCCHI, E.A. Effects of continuous vs. interval exercise training on blood pressure and arterial stiffness in treated hypertension. **Hypertension Research**, v. 33, p. 627-632, 2010.

HAFSTAD, A.D; BOARDMAN, N.T; LUND, J; HAGVE, M; KHALID, A.M; WISLOFF, U; LARSEN, T.S; AASUM, E. High intensity interval training alters substrate utilization and reduces oxygen consumption in the heart. **J Appl Physiol**, v. 111, p. 1235-1241, 2011.

HARAM, P.M; KEMI, O.J; LEE, S.J; BENDHEIM, M. O; AL-SHARE, Q.Y; WALDUM, H.L; GILLIGAN, L.J; KOCH, L.G; BRITTON, S.L; NAJJAR, S.M; WISLOFF, U. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. **European Society of Cardiology**, v.81, p. 723-732, 2009.

HARBER, M.P; 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. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, p. R708-R714, 2009.

HASSELGREN, P.O. Protein Metabolism in Sepsis. Austin, TX: RG Landes, 1993.

HEINEMEIER, K.M; OLESEN, J.L; SCHJERLING, P; HADDAD, F; LANGBERG, H; BALDWIN, K.M; KJAER, M. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential affects of specific contraction types. **J Appl. Physiol**, v. 102, p. 573-581, 2007.

HUNTER, G.R; BAMMAN, M.M; LARSON-MEYER, D.E; JOANISSE, D.R; JACKMAN, R.W; KANDARIAN, S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.287, p. C834-843, 2004.

JANSSEN, S.P; GAYAN-RAMIREZ, G; VAN DEN BERGH, A, HERIJGERS, P; MAES, K; VERBEKEN, E; DECRAMER, M. Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats.**Circulation** v.111, p. 996–1005, 2005.

JENSKY, N.E; SIMS, J.K, CONWRIGTH, C.M.C; SATTLER, F.R; RICE, J.C; SCHROEDER, E.T. Exercise does not influence myostatin and follistatin mRNA expression in young women. **J Strength Cond Res**, v. 24, 2010.

JENSKY, N.E; SIMS, J.K; RICE, J.C; DREYER, H.C; SCHROEDER, E.T. The influence of eccentric exercise on mRNA expression of skeletal muscle regulators. **Eur J Appl Physiol**, v. 101, p. 473-480, 2007.

JHANG, J.W., KIM, N., RYU, V., YOO, S.B., KIM, T.K., HO-LEE, J. Dexamethasone KADI, F; JOHANSSON, F; JOHANSSON, R; SJOSTROM, M; HENRIKSSON, J. Effects of one bout of endurance exercise on the expression of myogenin in human quadriceps muscle. **Histochem Cell Biol**, v. 121, p. 329-334, 2004.

KARAGOUNIS, L.G; YASPELKIS III; REEDER, D.W; LANCASTER, G.I; HAWLEY, J.A; COFFEY, V.G. Contraction-induced changes in TNF $\alpha$  and AKT-mediated signaling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 109, p.839-848, 2010.

KEMI, O.J; ELLINGSEN, O; CECI, M; GRIMALDI, S; SMITH, G.L; CONDORELLI, G; WISLOFF, U. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca<sup>2+</sup> cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. **Journal of Molecular and a Cellular Cardiology**, v. 43, p. 354-361, 2007.

KOOPMAN, R; ZORENC, A. H. G; GRANSIER, R. J. J; SMITH, D. C; LOON, L. J. C. Increase in S6k1 phosphorylation in human skeletal muscle following resistance exercise occurs mainly in type II muscle fibers. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.290, p. 1245-1252, 2006.

LANG, C.H; FROST, R.A; JEFFERSON, L.S; KIMBALL, S.R, VARY, T.C. Endotoxin-induced decrease in muscle protein synthesis is associated with alterations in eIF2B, eIF4E, and IGF-I. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 278, p.1133–1143, 2000.

LÉGER, B; CARTONI, R; PRAZ, M; LAMON, S; DÉRIAZ, O; CRETENAND, A; GOBELET, C; ROHMER, P; KONZELMANN, M; LUTHI, F; RUSSELL, A.P. Akt signaling through GSK-3 $\beta$ , mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **J Physiol**, p. 923-933, 2006.

LEITER, J. R. S; PEELER, J; ANDERSON, J. Exercise-induced muscle growth is muscle-specific and age-dependent. **Wiley periodicals**, p. 828-838, 2011.

LENK, K; SCHULER, 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.

LI, B.G, HASSELGREN, P.O, FANG, C.H, WARDEN, G.D. Insulin-like growth factor-I blocks dexamethasone-induced protein degradation in cultured myotubes by inhibiting multiple proteolytic pathways. **J Burn Care Rehabil**, v.25, p. 112–118, 2004.

LI, H.H; KEDAR,V; ZHANG,C; MCDONOUGH, H; ARYA, R; WANG, D.Z; PATTERSON, C. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. **J Clin Invest**, v.114, p.1058-1071, 2004.

LI, M; LI, C; PARKHOUSE, W.S. Age-related differences in the IGF-I- mediated activation of Akt-1 and p70S6K in mouse skeletal muscle. **Mech Ageing Dev**, v. 124, p. 771-778, 2003.

LI, Y.P; REID, M.B. Effect of tumor necrosis factor-alpha on skeletal muscle metabolism. **Curr Opin Rheumatol**, v.13, p. 483-487, 2001.

LIU, Y; HEINICHEN, M; WIRTH, K; SCHMIDTBLEICHER, D; STEINACKER. Response of growth and myogenic factors in human skeletal muscle to strength training. **Br J Sports Med**, v. 42, p. 989-993, 2008.

LOIMAALA, A.; GROUNDSTROEM, K.; RINNE, M.; NENONEN, A.; HUNHTALA, H.; PARKKARI, J.; VUORI, I. Effect of long-term endurance and strength training on metabolic control and arterial elasticity in patients with type 2 diabetes mellitus. **The Am J Cardiol**, v. 103, p. 972-977, 2009.

LONG, W.; WEI, L.; BARRET, E.J. Dexamethasone inhibits the stimulation of muscle protein synthesis and PHAS-I and p70 S6-kinase phosphorylation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, n.280, p.E570–E575, 2001.

LOUZADA, J.C.A.; VISCELLI, B.A.; DIONISIO, T.J.; DIONISIO, E. J.; MARTUSCELLI, A. M.; AMARAL, S. L. Exercício Físico atenua redução da proteína CaMK II induzida pela Dexametasona. **In:17º Simpósio Internacional De Iniciação Científica SIICUSP (resumo)**, 2009.

LUNDGREN, M.; BUREN, J.; RUGE, T.; MYRNAS, T.; ERIKSSON, J.W. Glucocorticoids down-regulate glucose uptake capacity and insulin-signaling proteins in omental but not subcutaneous human adipocytes. **The J Clin Endocrinol e Metabol**, v.86, n. 6, p. 2989-2997, 2004.

MA, K.; MALLIDIS, C.; BHASIN, S.; MAHABADI, V.; ARTAZA, J.; GONZALEZCADAVID, N.; ARIAS, J.; SALEHIAN, B. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. **Am J Physiol Endocrinol. Metab**, v.285, n.2, p. E363-371, 2003.

MACEDO, A.G. Efeitos preventivos do exercício resistido na expressão de proteínas envolvidas na atrofia muscular em ratos tratados com dexametasona. Dissertação de Mestrado, 2012.

MACFARLANE, C.; PLUMMER, E.; THOMAS, M.; HENNERBRY, A.; ASHBY, M.; LING, N.; SMITH, H.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kB-independent, FoxO1-dependent mechanism. **J Cell Physiol**, v.209, p.501-514, 2006.

MARCHIONNI, A.M.T.; PAGNONCELLI, R.M.; REIS, S.R.A. Influência do meloxicam e da dexametasona no processo inflamatório e no reparo tecidual. **Revista Odonto Ciência**, v.21, n.51, 2006.

MARTUSCELLI, A.M., 2011. Efeitos preventivos do exercício físico na expressão da miostatina em ratos tratados com dexametasona. Trabalho de Conclusão de Curso, 2011.

MASCHER, H.; TANNERSTEDT, J.; ELFEGOUN, T.B.; EKBLUM, B.; GUSTAFSSON, T.; BLOMSTRAND, E. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, p.E43-E51, 2008.

MATSAKAS, A.; BOZZO, C.; CACCIANI, N.; CALIARO, F.; REGGIANI, C.; MASCARELLO, F.; PATRUNO, M. Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats. **Exp Physiol**, v. 91, n. 6, p. 983-994, 2006.

MCCARTHY, J.P; BLAUDEAU, T.E; NEWCOMER, B.R. Inverse relationship between exercise economy and oxidative capacity in muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 94, n. 5-6, p. 558-568, 2005.

MUHAMMAD, Y.A; BAHIA, M.E.S; DALAAL, M.A. Diverse effects of variant doses of dexamethasone in lithium-pilocarpine induced seizures in rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol**, v.90, p.13-21, 2012.

MURTON, A.J; CONSTANTIN, D; GREENHAFF, P.L. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodeling and atrophy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1782, p. 730-743, 2008.

NADER, G.A; ESSER, K.A. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. **J Appl Physiol**, v. 90, p. 1936-1942, 2001.

NASSAN, S.A; FUJITA, N; KONDO, H; MURAKAMI, S; FUJINO, H. Chronic exercise training down-regulates TNF- $\alpha$  and Atrogin-1/MAFbx in mouse gastrocnemius muscle atrophy induced by hindlimb unloading. **Acta Histochem. Cytochem**, v. 6, p. 343-349, 2012.

NAVA, S; Gayan-Ramirez, G; Rollier, H; Bisschop, A; Dom, R; de Bock, V; Decramer, M. Effects of acute steroid administration on ventilatory and peripheral muscles in rats. **Am j Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 6 pt 1, p. 1888-1896, 1996.

NEILL, D.S; ZHENG, D; ANDERSON, W.K; DOHM, G.L; HOUMARD, J.A. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle. **Am. J. Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, v. 276, p. 414-419, 1999.

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. 4; p.465-471, 2012.

NISHIOKA, S. A. Benzidazol na quimioprofilaxia primária da reativação de doença de Chagas em chagásicos crônicos em uso de corticosteróides em doses imunodepressoras: há evidência suficiente para a recomendação do seu uso? **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, p.83-85, 2000.

NUNES, W.M.S; MELLO, M.A.R. Metabolismo glicídico em ratos submetidos a desnervação do músculo esquelético e ao exercício de natação. **Rev Bras Med Esporte**, v. 15, n.1, p. 42-45, 2009.

PEREIRA, G.B; TIBANA, R.A; NAVALTA, J; SOUSA, N.M.F; CÓRDOVA, C; SOUZA, V.C; NÓBREGA, O.T; PRESTES, J; PEREZ, S.E.A. Acute effects of resistance training on cytokines and osteoprotegerin in women with metabolic syndrome. **Clin Physiol Imaging**, v.33, p.122-130, 2013.

PIELOCK, S.M; SOMMER, S; HAUBER, W. Post-training glucocorticoid receptor activation during Pavlovian conditioning reduces Pavlovian-instrumental transfer in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v.104, p.125-131, 2013.

POULSEN, R.C; CARR, A.J; HULLEY, P.A. Protection against glucocorticoid-induced damage in human tenocytes by modulation of ERK, Akt, and Forkhead Signaling. **Endocrinology**, v. 2, p. 503-514, 2011.

PRELOVSEK, O; MARS, T; JEVSEK, M; PODBREGAR, M; GRUBIC, Z. High dexamethasone concentration prevents stimulatory effects of TNF- $\alpha$  and LPS on IL-6 secretion from the precursors of human muscle regeneration. **Am J Regul Integr Comp Physiol**, v.291, p. R1651-R1656, 2006.

PUTHANVEETIL, P; WANG, Y; WANG, F; KIM, M.S; ABRAHANI, A; RODRIGUES, B. The increase in cardiac pyruvate dehydrogenase kinase-4 after short-term dexamethasone is controlled by an Akt-p38-Forkhead box other factor-1 signaling axis. **Endocrinology**, v. 5, p. 2306-2318, 2010.

QUI, W; PAN, J; WU, YONG; BAUMAN, W.A; CARDOZO, C. Protection against dexamethasone-induced muscle atrophy is related to modulation by testosterone of FOXO1 and PGC-1 $\alpha$ . **Biochem Biophys Res Commun**, v.403, p.473-478, 2010.

RAFACHO, A; ROMA, L.P; TABOGA, S.R, BOSCHERO, A.C, BOSQUEIRO, J.R. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 85, p. 536-45, 2007.

REZONJA, K e MARS, L. Opposing effects of dexamethasone, agrin and sugammadex on functional innervation and constitutive secretion of IL-6 in vitro innervated primary human muscle cells. **Neurosci Lett**, v. 549, p.186-190, 2013.

ROVEDA, F; MIDDLEKAUFF, H.R; RONDON, M.U.P.B; REIS, S.F; SOUZA, M; NASTARI, L; BARRETTO, A.C.P; KRIEGER, E.M; NEGRÃO, C.E. The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 42, n. 5, p. 854-860, 2003.

SACHECK, J.M; OHTSUKA, A; MCLARY, C; GOLDBERG, A.L. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligase, atrogin-1 and MuRF-1. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**, v. 287, 2004.

SALEHIAN, B; MAHABADI, V.; BILAS, J; TAYLOR, W.E; MA.K. The effect of glutamine on prevention of glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with myostatin suppression. **Metab Clin Expe**, v.9, p.1230-1247, 2006.

SANDRI, M; LIN, J; HANDSCHIN, C; YANG, W; ARANY, Z.P; LECKER, S.H; GOLDBERG, A.L; SPIEGELMAN, B.M. PGC  $\alpha$  protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **PNAS**, v.103, p.16260-16265, 2006.

SANTOS, C.L; RAFACHO, A. BOSQUEIRO, J.R. Effects of dexamethasone administration in vivo on glycaemia, insulinaemia and circulating substrates are dependents of time of treatment. **Biosci. J**, v. 23, n. 3, p. 101-110, 2007.

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

SEENE, T; KAASIK,P; PEHME, A; ALEV,K; RISO, EM. The effect of glucocorticoids on the myosin heavy chain isoforms turnover in skeletal muscle. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.86, p. 201-206, 2003.

SHAH, O.J; ANTHONY, J.C; KIMBALL, S.R; JEFFERSON, L.S. Glucocorticoids oppose translational control by leucine in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, p. 1185-1190, 2000.

SILVA, G.J. et al.. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.30, n.3 Pt 2, p. 714-9, 1997.

SMITS, H.H; GRUNBERG, K; DERIJK, R.H; STERK, P.J; HIEMSTRA, P.S. Cytokine release and its modulation by dexamethasone in whole blood following exercise. **Clin Exp Immunol**, v.111, p.463-468, 1998.

SPATE, U; SCHULZE, P.C. Pro-inflammatory cytokines and skeletal muscle. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.7, p.265-269, 2004.

STEENSBERG, A; KELLER, C; STARKIE, R.L; OSADA, T; FEBBRAIO, M.A; PEDERSEN, B.K. IL-6 and TNF- $\alpha$  expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, p. E1272-E1278, 2002.

STITT, T.N; DRUJAN,D; CLARKE, B.A; PANARO, F; TIMOFEYVA, Y; KLINE, W.O; GONZALEZ, M; YANCOPOULOS, G.D; GLASS, D.J. The IGF-1/PI3K/AKT Pathway Prevents Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligase by Inhibiting FOXO Transcription Factors. **Molecular Cell**, v.14, p. 395-403, 2004.

TANNERSTEDT, J; APRÓ, W; BLOMSTRAND, E. Maximal lengthening contractions induce different signaling responses in the type I and type II fibers of human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 106, p. 1412-1418, 2009.

TAYLOR, W.E; BHASIN, S; ARTAZA, J; BYHOWER, F; AZAM, M; WILLARD, D.H; KULL, F; CADAVID, N.G. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. **Am J Endocrinol Metab**, v. 280, p. 221-228, 2001.

TERZIS, J.et al.. Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. **Eur J Appl Physiol**, n.102, p.145-152, 2008.

TSUJINAKA, T, EBISUI, C, FUJITA, J, KISHIBUCHI, M; MORIMOTO, T; OGAWA, A; KATSUME, A; OHSUGI, Y; KOMINAMI, E; MONDEN, M. Muscle undergoes atrophy in association with increase of lysosomal cathepsin activity in interleukin-6 transgenic mouse. **Biochem Biophys Res Commun**, v.207, p.168-174, 1995.

TULIPANO, G; TAYLOR, J.E; HALEM, H.A; DATTA, R; DONG, J.Z; CULLER, M.D; BIANCHI, I; COCCHI, D; GIUSTINA, A. Glucocorticoid inhibition of growth in rats: partial reversal with the full-length ghrelin analog BIM-28125. **Pituitary**, v.10, p. 267-274, 2007.

WANG, J.S; FU, T.C; LIEN, H.Y; WANG, C.H; HSU, C.C; WU, W.C; CHIEN, Y.W; CHERNG, W.J. Effect of aerobic interval training on erythrocyte rheological and hemodynamic functions in heart failure patients with anemia. **Int J Cardiol**, v.168, p.1243-1250, 2013.

YAMAMOTO, D. IKESHITA, N; MATSUBARA, T; TASAKI, H; HERNINGTYAS, E.H; TODA, K; IIDA, K; TAKAHASHI, Y; KAJI, H; CHIHARA, K; OKIMURA, Y. GHRP-2, a GHS-R agonist, directly acts on myocytes to attenuate the dexamethasone-induced expressions of muscle-specific ubiquitin ligases, Atrogin-1 and MuRF-11. **Life Sciences**, v.82, p. 460-466, 2008.

YAMIN, C; DUARTE, J.A.R; OLIVEIRA, J.M.F; AMIR, O; SAGIV, M; EYNON, N; SAGIV, M; AMIR, R.E. IL (-174) and TNFA (-308) promoter polymorphisms are associated with systemic creatine kinase response to eccentric exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 104, p.574-586, 2008.

YANG, W; ZHANG, Y; LI, Y; WU, Z; ZHU, D. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3beta pathway and is antagonized by insulin – like growth factor 1. **J Biol Chem**, v. 282, p. 3799 – 3808, 2007.

ZANCHI, N.E; LIRA, F.S; SEELAENDER, M; LANCHAJR, A.H. Experimental chronic low-frequency resistance training produces skeletal muscle hypertrophy in the absence of muscle damage and metabolic stress markers. **Cell Biochem Funct**, v. 28, p. 232-238, 2010.

ZHENG, B; OHKAWA, S; LI, H; WILSON, T.K.R; PRICE, S.R. FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogin-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. **The FASEB Journal**, v.24, p.2660-2669, 2010.

ZWETSLOOT, K.A; JOHN, C.S; LAWRENCE, M.M; BATTISTA, R.A; SHANELY, R.A. High-intensity interval training induces a modest systemic inflammatory response in active young men. **J Inflamm Res**, v.7, p.9-17, 2014.



## 8- Anexo 1



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

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

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Efeitos do exercício intervalado na expressão de proteínas inflamatórias e catabólicas na musculatura esquelética de ratos tratados com dexametasona" sob responsabilidade do Pesquisador SANDRA LIA DO AMARAL CARDOSO e colaboração de Aline Mio Martuscelli está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o protocolo 2012-02256.

#### CERTIFICATE

We certify that the research "Effects of interval exercise in expression on the inflammatory and catabolic proteins in skeletal muscle in rats treated with dexamethasone", protocol number 2012-02256, under responsibility of SANDRA LIA DO AMARAL CARDOSO and with collaboration of Aline Mio Martuscelli agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

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

Comissão de Ética no Uso de Animais (Committee for Ethical Use of Animals)- CEUA  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: [ceua@foa.unesp.br](mailto:ceua@foa.unesp.br)