

Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Ciências

Departamento de Educação Física

**EFEITOS PREVENTIVOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA EXPRESSÃO DA
MIOSTATINA EM RATOS TRATADOS COM DEXAMETASONA**

Aline Mio Martuscelli

BAURU

2011

Aline Mio Martuscelli

**EFEITOS PREVENTIVOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA EXPRESSÃO DA
MIOSTATINA EM RATOS TRATADOS COM DEXAMETASONA**

Monografia apresentada ao Departamento de Educação Física da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista, como requisito parcial para conclusão do curso de Licenciatura em Educação Física

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Lia do Amaral

BAURU

2011

Dedicatória

*Dedico a Deus que com
toda sua generosidade possibilitou
da melhor forma a realização deste trabalho.
A toda minha família pelo amor, paciência e
por acreditar juntos comigo nos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que se faz presente comigo a todo instante, me concede força a cada momento que encontro um desafio, me fortalece e me encoraja para a vida. Agradeço também ao meu pai Humberto (eterna saudade), que mesmo não estando mais presente me ofereceu ter a honra de ser uma das suas filhas e que junto com minha mãe Iolanda e irmãs Alethea, Alessandra e Alik, compomos uma família maravilhosa, unidos no amor. Vocês são meus verdadeiros inspiradores na vida.

Mãe serei imensamente grata por você, por estar presente comigo em cada passo da vida, por ter me dado o amor mais puro do mundo, por oferecer os melhores meios para que eu concluísse minha graduação, incentivando e acreditando em mim. Minha força vem do seu amor, desejo do fundo do meu coração te oferecer muitos e muitos dias felizes, Te amo!!

A vocês Lik e Lê, que junto comigo tivemos todos os cuidados do pai, mãe e theia, por compartilhar comigo momentos felizes e tristes, meu conforto é saber que isso nunca mudará e que estaremos juntas pra sempre, peço desculpa a vocês que privaram tantos momentos das suas vidas para que eu pudesse continuar no caminho da graduação, muito obrigada!! Amo vocês.

A minha mãe –irmã, Theia, meu maior anseio é retribuir o que fez por mim, minha admiração e amor por você é sem tamanho. Desde pequena possui tantas responsabilidades e por esse motivo, também peço desculpas por ter tirado (junto com a Lê e Lik) a atenção do pai e da mãe no momento que você deveria ter atenção, por ter pulado tantas etapas da sua vida para que nós pudéssemos te-las, obrigada por ter nos dado junto com meu cunhado Marco nossa esperança de vida, Manuela.

Marquinho, agradeço a você, por acreditar em mim desde quando era apenas uma criança na beira do rio, rs. Obrigada pelas conversas, experiências compartilhadas, risadas, piadas, por todo o apoio e por amar minha irmã. Te amo.

Ao meu também cunhado Stefan, que nos últimos anos se faz presente não apenas na vida da Lê, mas de todos nós, obrigada pelas infinitas caronas, rs, viagens, risadas, etc. Amo você!

Ao meu namorado Renato que me trouxe mais ânimo, alegria e amor nestes últimos momentos da faculdade, que de forma natural me apoiou e escutou minhas dúvidas e aflições. Te amo!

Aos meus tios, Edson, Lice, Vone, Lúcia, Maria, Mirço e Beth e todos os primos, por acompanharem meu progresso e fazer junto comigo parte da família Mio. Ao meu tio estimado Cláudio, por me fazer se sentir tão querida. Amo todos vocês.

Aos meus primos Willian e Lena, que me adotaram literalmente como filha, que com muito amor me acolheram diversas vezes na casa de vocês, por terem se preocupado e cuidado de mim, tenham minha maior gratidão. Amo vocês.

Aos meus queridos amigos de Estreito, que no real sentido da amizade que dura á mais de 12 anos compartilham comigo desejos, sentimentos, pensamentos, momentos, sonhos, vitórias, alegrias, choros, etc. De modo muito especial a você Danilo, pelas nossas infinitas histórias, a você que se fez tão presente nessa etapa da minha vida morando comigo em Bauru, que foi e é meu maior parceiro na vida, obrigada por tamanha afinidade. Amo todos vocês.

A vocês meninas da república, Bruna, Mari e Sofis que neste último ano me alegraram com as palhaçadas, os churrascos, os almoços, vídeos engraçados (homem cobra, rs), foi um prazer morar com todas vocês e sei que nossa amizade não ficará restrita apenas no período da faculdade e sim para toda vida. De modo muito especial a você Bruna (Tata), que me proporcionou muitas e muitas risadas, obrigada por saber que posso contar com você, meu sentimento por você é mais que fraternal.

A turma Integral do curso de Educação Física, Unesp- Bauru, 2007-2010. Por terem feito parte comigo de uma das melhores fases da vida, a Faculdade. Na e Cá, obrigada pela amizade que construímos nesses anos, sentirei saudades dos vários almoços no restaurante universitário, das festas, trabalhos, viagens, conversas, academia (Na), corridas (Cá), falta de grana, rs, enfim, da nossa história. Aos meninos China, Anderson e Macau, por todo o respeito, por me tratarem como irmã. China, meu querido, que pude contar com você por muitas vezes, que passamos pelos primeiros perreques de morar longe de casa. Fábio, pela nossa amizade, por passarmos várias noites estudando e conversando, desculpa pelas vezes que meu sono deixava você falar sozinho, rs. Fer, por estar perto de mim não apenas nos bons momentos, mas nos ruins também, foi você que me cedeu o ombro amigo em um dos meus dias mais tristes, muito obrigada! Amanda, que sem esforço possuímos uma sintonia que é difícil explicar. Amo todos.

Ao meu maior companheiro durante esses quadro anos, Evandro (Vando, Xonado), não esquecerei nossa parceria nos laboratórios, nas risadas e dificuldades neles (LEFEx e LAPE), nas cervejas tomadas juntos, nas provas, seminários, trabalhos, nos congressos,

festas, caronas, nas diversas ligações que um acordava o outro, rs, etc. Realmente o período da faculdade não teria sido o mesmo sem você. Te amo.

A toda equipe “família” LAPE e LEFEEx, que com certeza tiveram comigo os momentos de maior dedicação, esforço e estudos. Aos meus queridos veteranos, Jú, Ma e Chiquetto, que muito mais que veteranos se tornaram grandes amigos, obrigada por toda aprendizagem e momentos compartilhados.

Agradeço muito a minha orientadora, Dr^a Sandra Lia do Amaral, sem você seria impossível concluir com satisfação este trabalho, que por muitas vezes me fez perder o sono com tantas tarefas dadas, mas que com muita sabedoria me mostrou o lado fascinante da ciência e da pesquisa, foi graças as suas oportunidades que hoje minha vida tomou uma outra direção, obrigada pelos conselhos durante as milhares viagens Bauru-SP, rs, pelas broncas, pelos ensinamentos que ultrapassaram o conhecimento profissional, por ter acreditado em mim. Muito obrigada San.

Agradeço também a FAPESP e a PROEX pelas bolsas cedidas, sem elas teria vivido com mais dificuldade na graduação e possivelmente não teria aproveitado realmente todos os conteúdos e estágios na faculdade.

Deixo aqui meu sentimento de missão cumprida, minha gratidão por todas as pessoas que em algum momento se fizeram extremamente importante nesta etapa da minha vida, a todos meus professores, familiares e amigos que ao longo dos anos construíram minha identidade.

“A busca apenas é válida quando o que se busca é a sabedoria, ela nos trás felicidade e nos encaminha para Deus.”

Pedro Paulo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Sinalização protéica responsável pela hipertrofia ou atrofia muscular (Adaptado de CLASS., 2005).....14
- Figura 2:** Linha do tempo do protocolo experimental.....21
- Figura 3:** Capacidade física avaliada em minutos na esteira ergométrica nos testes máximos realizados durante o protocolo experimental. Avaliações 1,2,3 e 4 correspondem aos TEM-1, TEM-2, TEM-3 e TEM-4. Nos grupos sedentário controle (SC, n=20), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=20), treinado controle (TC, n=20) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=20) do TEM-1 ao TEM-3. Apenas 10 ratos de cada grupo realizaram o TEM-4. Significância: # vs início $p < 0,05$ * vs controle $p < 0,05$25
- Figura 4:** Variação da distância percorrida em metros entre a realização do terceiro teste máximo (TEM-3) e o primeiro teste máximo (TEM-1) nos grupos avaliados: treinados (n=40) e sedentários (n=40). Significância: * $p < 0,05$26
- Figura 5:** Comportamento 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=20), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=20), treinado controle (TC, n=20) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=20). Significância: # vs início,* vs controle, $p < 0,05$27
- Figura 6:** Valores de peso corporal de todos os ratos no dia do experimento. Sedentário controle (SC, n=20), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=18), treinado controle (TC, n=19) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=16). Significância :* vs controle, $p < 0,05$27
- Figura 7:** Valores de glicemia de jejum nas avaliações: 1-antes do treinamento; 2- antes tratamento e 3- após tratamento, nos diferentes grupos analisados: SC (n=20), SD (n=20), TC (n=20) e TD (n=20). Significância: # vs início do tratamento, * vs controle, + vs sedentário, $p < 0,05$28

Figura 8: Valores de peso muscular: A- músculo Sóleo (SOL) e B-Tibial Anterior (TA) normalizados pelo tamanho da tibia (cm) em todos os grupos analisados: SC (n=20), SD (n=20), TC (n=20), TD (n=20). Significância: * vs controle, $p < 0,05$28

Figura 9: Painel superior. Gel representativo dos resultados de Western Blot para a proteína Miostatina (PM 12kDa) no músculo tibial anterior (A) e sóleo (B). Painel inferior: Análise quantitativa da expressão da proteína Miostatina dos animais dos grupos sedentário controle (SC, n=20, 20), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=14 e 10), treinado controle (TC, n=15 e 12) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=14 e 8) no músculo tibial anterior (TA) =A e sóleo (SOL)=B, respectivamente. Significância: + vs sedentário, $p < 0,05$29

Figura 10: Painel superior. Gel representativo dos resultados de Western Blot para a proteína p70S6 (PM 70-85 kDa) no músculo tibial anterior (A) e sóleo (B). Painel inferior: Análise quantitativa da expressão da proteína p70S6 no músculo tibial anterior (TA) =A e sóleo (SOL)=B, respectivamente, nos animais dos grupos sedentário controle (SC, n=20, n=20), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=17 e n=11), treinado controle (TC, n=15 e n= 12) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=13 e n=10).....30

RESUMO

A dexametasona (Dexa) é amplamente utilizada no uso clínico, devido ao seu potente efeito antialérgico e anti-inflamatório, entretanto o uso crônico pode induzir diversos efeitos colaterais, tais como hiperglicemia, hipertensão, hipercolesterolemia e atrofia muscular. Demonstramos recentemente que o exercício físico parece atenuar alguns dos efeitos colaterais da Dexa, mas pouco tem sido estudado sobre a atrofia muscular. Foram utilizados 80 ratos wistar, separados em 4 grupos: sedentário controle (SC), sedentário tratado com dexa (SD: 0,5mg/kg por dia), treinado controle (TC) e treinado tratado com dexa (TD). Após adaptação na esteira, os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento (T, 60% capacidade máxima, 5 dias por semanas/ 8 semanas) ou mantidos como sedentários. Os ratos foram pesados semanalmente durante o T e diariamente durante o tratamento. O músculo tibial anterior (TA) e sóleo (SOL) foram coletados para avaliar a expressão protéica de miostatina e p70S6K. O treinamento aumentou o tempo de exercício nos grupos treinados (97% vs -35% , para treinados e sedentários, respectivamente). Dez dias de tratamento determinou aumento da glicemia de jejum no grupo SD (62%), no entanto o treinamento prévio atenuou este aumento (TD =20%, $p < 0,05$), mostrando o papel preventivo do exercício físico no aumento na glicemia. O aumento de peso corporal (PC) foi semelhante durante o treinamento, entretanto, a administração da Dexa determinou diminuição significativa de PC no grupo TD (-22%) e SD (-25%) acompanhado de redução de peso muscular no TA, para TD (-20) e SD (-23%). A expressão da miostatina não foi alterada nem pelo tratamento com dexa nem pelo treinamento no músculo TA, no entanto, no músculo sóleo, a miostatina aumentou significativamente nos grupos treinados, independente do tratamento (TC=23% e TD=25%), comparado com seus grupos controles. Já a expressão protéica de p70S6K não sofreu alterações em nenhum músculo e em nenhuma condição. Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que o treinamento prévio atenua o aumento de glicemia induzida pela Dexa, no entanto não previne a redução de peso corporal ou muscular. Mesmo na presença de atrofia muscular, a expressão de miostatina e p70S6k não justificam os mecanismos da perda muscular induzida pela Dexa, o que sugere que outras proteínas catabólicas e anabólicas devem estar envolvidas no processo de atrofia muscular após 10 dias de tratamento com Dexa.

Palavras-chaves: treinamento físico, dexametasona, atrofia muscular, miostatina e p70S6k.

ABSTRACT

Muscle atrophy is always associated with Dexamethasone (Dexa) treatment, however the mechanisms are not completely understood. This study investigated the effects of Dexa on myostatin and p70S6K protein expression and if previous exercise training (T) can attenuate these effects. Eighty rats were distributed into 4 groups: sedentary control (SC), sedentary treated with Dexa (SD; 0,5 mg/kg per day, *i.p.*, 10 days), trained control (TC) and trained treated with Dexa (TD) and underwent a training period where they were either submitted to a running protocol (60% of physical capacity, 5 days/week for 8 weeks) or kept sedentary. After T period, animals underwent Dexa treatment concomitant with training. Western Blot was performed to identify myostatin and p70S6k protein expression in the tibialis anterior (TA) and soleus (SOL) muscle. Ten days of Dexa treatment increased fasting glucose (SD=+62%), however previous T attenuated this increase (TD=+20%, $p<0.05$). Dexa determined significant decrease in body weight in TD (-22%) and SD (-25%), followed by TA weight reduction in SD (-23%) and TD (-20%). Previous training could not avoid these decreases. Myostatin protein expression was not altered by dexa treatment or training in TA muscle but in SOL muscle it was significantly modified after T, regardless of treatment (TC= +23 and TD=+25) compared with their respective controls. The protein p70S6K was not modified neither by dexa nor training in any of the analyzed muscle or condition. The results of this study allowed us to conclude that previous training attenuates the hyperglycemia induced by Dexa, however it did not prevent the body or muscle weight reductions. Even in the presence of muscle atrophy, the expression of myostatin and p70S6K do not justify the mechanisms of muscle loss induced by Dexa, which suggests that other catabolic or anabolic proteins could be involved in the process of muscle atrophy after 10 days of treatment with Dexa.

Key words: exercise, dexamethasone, muscle atrophy, myostatin and p706Sk

SUMÁRIO

1	Introdução.....	11
	1.1 Efeitos da dexametasona na musculatura esquelética.....	12
	1.2 Efeitos do Exercício Físico.....	15
2	Justificativa e Objetivo.....	19
3	Materiais e Métodos.....	20
	3.1 Avaliação da capacidade física máxima dos animais.....	20
	3.2 Grupos experimentais.....	21
	3.3 Protocolo de treinamento físico.....	22
	3.4 Determinação da Glicemia de Jejum.....	22
	3.5 Retirada dos músculos esqueléticos.....	22
	3.6 Protocolo de dosagem de proteína.....	23
	3.7 Procedimentos de Western Blotting.....	23
	3.8 Métodos estatísticos.....	24
4	Resultados.....	25
5	Discussão dos Resultados	31
6	Conclusão.....	37
7	Referências.....	38

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).

A dexametasona é um importante fármaco utilizado em processo inflamatório e alérgico para diversas doenças tais como asma, artrite, febre reumática, entre outras, (NISHIOKA, 2000; MARCHIONNI et al., 2006). Entretanto, o uso crônico deste componente pode induzir diversos efeitos colaterais que comprometem o organismo.

Os efeitos colaterais dos glicocorticóides estão associados às altas taxas de ácido graxos livres liberados (lipólise) para a formação de energia, assim como a quebra de aminoácidos e aumento da gliconeogênese hepática. O acúmulo desses componentes promove um aumento da glicemia e um estresse, por esse motivo os glicocorticóides atuam de maneira antagônica à insulina.

Vários estudos vêm sendo realizados para identificar os efeitos colaterais do uso crônico da dexametasona. Eles demonstram reduções de peso corporal, aumentos 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 colaterais, tais como a resistência periférica à insulina. Esta melhora foi devido a aumentos na expressão de importantes proteínas relacionadas à via de captação de glicose, tanto dependente como independente da insulina. Além disso, demonstramos que o exercício atenuava a redução do conteúdo de glicogênio muscular e o aumento da pressão arterial. (LOUZADA et al, 2009, DIONÍSIO et al, 2009; BAREL et al., 2010, AMARAL

et al., 2010). No entanto, o exercício físico não foi eficaz em reverter o quadro de atrofia muscular induzida pelo tratamento crônico com dexametasona. Portanto maiores estudos são necessários para se compreender os mecanismos responsáveis pela atrofia muscular.

1.1 Efeitos da dexametasona na musculatura esquelética.

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

Resultados recentes do laboratório (LOUZADA et al, 2009, DIONÍSIO et al, 2009; BAREL et al., 2010, AMARAL et al., 2010) têm demonstrado constantemente que existe uma redução significativa de peso corporal nos ratos tratados por 10 dias com 1mg/kg por dia de dexametasona. Esta diminuição de peso corporal pode ser explicada por uma redução significativa na ingestão alimentar dos animais, uma vez que dados preliminares de nossos colaboradores têm demonstrado que ratos tratados por 5 dias com dexametasona (1mg/kg/dia) diminuem significativamente sua ingestão alimentar (SANTOS et al, 2007).

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 (AHTIKOSKI et al., 2004; SACHECH et al., 2004; GILSON et al., 2007; MA et al., 2003; YAMAMOTO et al., 2008; BAREL et al., 2010). Esta atrofia muscular tem sido apontada como um desbalanço entre fatores positivos e negativos que controlam o crescimento muscular. Existem várias proteínas envolvidas no processo de atrofia (Miostatina, Atrogina-1 e Murf-1, Foxo, entre outras) ou hipertrofia muscular (IGF-1, p70S6K, AKT, mTOR, entre outras). Neste balanço entre proteínas anabólicas e catabólicas, encontramos a via das ubiquitina-proteasoma (UPS) como a principal responsável pelo processo de sarcopenia e caquexia, nela a Foxo está fosforilada e inativada pela P13k-AKT/PKB e induz a transcrição de E3 um ligante específico de Murf-1 e Atrogina do músculo esquelético (LENK et al., 2010), no entanto o papel da dexametasona no controle deste balanço ainda não está totalmente estabelecido.

Ma et al (2003) e Gilson et al (2007) demonstraram que o uso crônico de dexametasona, na mesma dosagem utilizada por Barel et al (2010), ou seja, 1 mg/kg por peso muscular, promovia uma perda significativa de peso corporal, acompanhada de atrofia muscular, a qual era implicado o papel fundamental da proteína miostatina, uma vez que a deleção deste gene impedia completamente estes efeitos. Tem sido demonstrado que 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 (TAYLOR et al., 2001; MCPHERRON et al., 1997; CHELH et al., 2009). Há evidências mostrando que a miostatina pode reduzir a massa muscular por reduzir a síntese de proteína e por estimular a via dependente de ubiquitina-proteosoma (MCFARLANE et al., 2006). A miostatina é considerada um membro da superfamília do TGF- β 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 é encontrado principalmente no núcleo celular quando comparado ao citoplasma, sugerindo um papel de transcrição da miostatina. Yang et al, (2007) demonstraram que a miostatina pode inibir a fosforilação de PI3K ou AKT, reduzindo desse modo a síntese de proteínas que são dependentes deste processo de sinalização e, deste modo, reduz o processo de hipertrofia muscular.

Da mesma forma que a miostatina, outros fatores de degradação de proteína, tais como a Atrogina-1 e Murf-1, também têm sido implicados na atrofia muscular induzida por dexametasona (SACHECH et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2008). No entanto, pouco se sabe sobre qual destas proteínas é a principal responsável pela atrofia induzida pela dexametasona e, neste sentido, mais estudos são necessários para compreender o papel das

proteínas catabólicas no controle da atrofia muscular em animais tratados com dexametasona.

Por outro lado existem proteínas que estão diretamente envolvidas no processo de crescimento muscular, ou seja, no desenvolvimento de hipertrofia muscular. Dentre estas proteínas pode-se citar o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), proteína quinase B (igualmente chamado de Akt) e a p70 S6K (PETLEY et al., 1999; ZHENG et al., 2000).

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., 2002). Sua função é controlar o processo de sinalização intracelular miogênica. Desse modo, principalmente durante o exercício, é responsável pelo processo de síntese protéica, participa do crescimento muscular, além de regular as vias metabólicas como a da insulina. (BOFF., 2006). A hipertrofia induzida pelo IGF-1- ocorre por meio da via PI3-quinase, que estimula a Akt que por sua vez, iniciará a sinalização na cascata de transdução necessária para diferenciação celular (BOFF., 2006). 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 protéica (BODINE et al., 2001; ROMMEL et al., 2001).

Abaixo, a figura 1 mostra as vias de sinalização responsáveis pela hipertrofia muscular (verde) e atrofia muscular (vermelha).

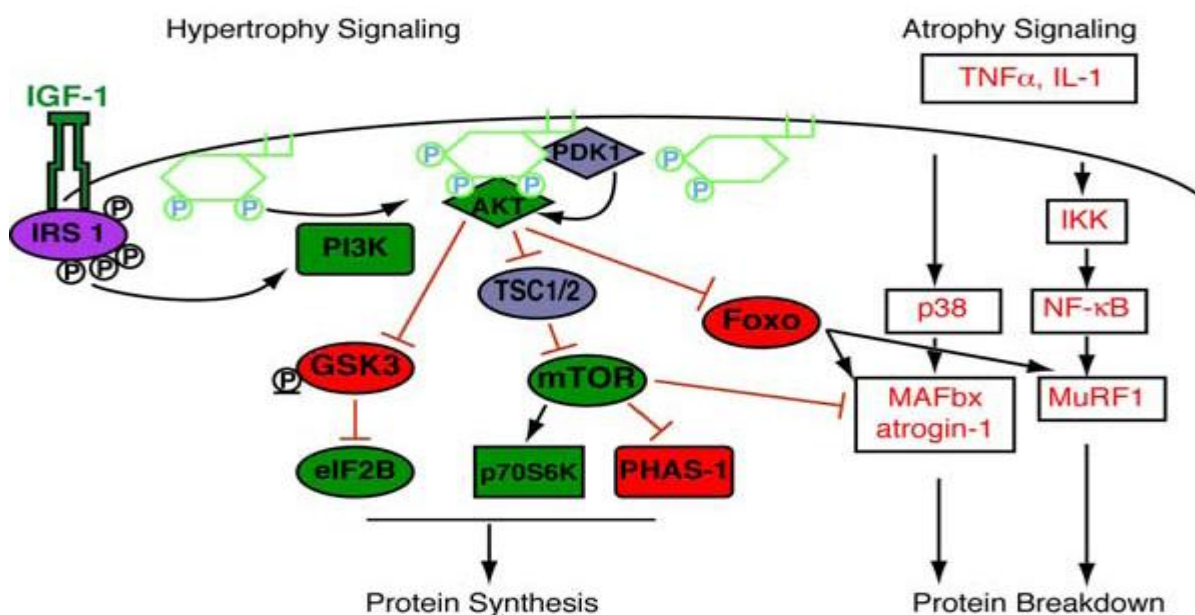


Figura 1: Sinalização protéica responsável pela hipertrofia ou atrofia muscular (Adaptado de CLASS., 2005)

Pouco se sabe sobre os efeitos do tratamento com dexametasona na expressão das proteínas envolvidas no processo de hipertrofia muscular. 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. Da mesma forma, Shakman et al (2008) encontraram recentemente uma diminuição significativa da expressão de Akt, p70S6K e GSK-3 β no músculo tibial anterior após sete dias de tratamento com dexametasona. Dados recentes do Laboratório (Louzada, proc. n^o 2008/00821-6) 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. Long, Wei e Barret (2001) demonstraram que o tratamento com dexametasona (0.3g/kg/dia) durante 5 dias diminuía a síntese proteica e bloquejava o aumento na fosforilação da proteína p70S6 induzida pela insulina, embora o tratamento não tenha alterado a expressão dessa proteína no músculo esquelético. Do mesmo modo, Shah, Kimbal e Jefferson et al (2000) observaram redução na fração de síntese proteica e na fosforilação da proteína p70S6 no músculo íliopsoas de ratos tratados por 4 horas com dexametasona (1g/kg). Portanto, mais estudos são necessários para a compreensão dos efeitos da dexametasona nas proteínas responsáveis pelo crescimento muscular, uma vez que na maioria dos trabalhos ocorre atrofia induzida pela droga, mas nem todos encontram redução na expressão proteica.

1.2 Efeitos do Exercício Físico.

O exercício físico regular tem sido amplamente utilizado para tratamentos e prevenção de várias doenças, como asma, hipertensão, diabetes, obesidade (AMARAL et al., 2000; MONTEIRO et al., 2004; ROLIN et al., 2007; COIMBRA, et al., 2008; ELIAS et al., 2008; CLANS et al., 2009). 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).

Mediano et al (2007) observaram uma importante correlação entre perda de peso e melhora na aptidão física em mulheres obesas, o que reforça o efeito do exercício físico na

perda de peso e conseqüentemente nos diversos distúrbios associado à obesidade, como a hipertensão, intolerância a glicose, resistência à insulina, diabetes tipo II e a dislipidemias.

No sistema nervoso simpático o exercício atua diminuindo significativamente a atividade no nervo simpático na musculatura esquelética em pacientes cardiopatas (ROVEDA et al., 2003). Já na musculatura esquelética, o exercício promove a hipertrofia muscular, aumentando o número de fibras, de vasos sanguíneos e da quantidade de mitocôndrias. (HUNTER et al., 2005; ADAMS et al., 2007; AMARAL et al., 2008;).

Poucos estudos avaliaram o efeito do exercício aeróbio na expressão de proteínas que controlam o processo de crescimento/atrofia muscular. Leiter et al. (2010) demonstraram recentemente aumento das células sátelites musculares no gastrocnêmio em ratos jovens treinados durante 3 semanas, mostrando dessa forma a possibilidade de síntese proteica. Por outro lado, Durigan et al., (2009) evidenciaram que o exercício físico aeróbio moderado, durante três meses, foi capaz de diminuir significativamente a expressão de gene da Atrogina-1 e Murf-1 no músculo tibial anterior, em ratos com inflamação alérgica crônica do pulmão. Da mesma forma, Matsakas et al (2006) demonstraram que o exercício crônico aeróbio diminuiu 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 quando comparado ao vermelho.

Adams et al, (2007) e Heinemeier et al., (2007) demonstraram aumentos significativo de IGF-1, MGF e MyoD, acompanhados de diminuições na expressão gênica da miostatina, após a realização de estímulos elétricos concêntricos, excêntricos e isométricos por 4 a 5 dias. Sabe-se que uma única sessão de exercício excêntrico não é suficiente para diminuir a expressão de RNAm da miostatina e da MyoD no músculo vasto lateral (JENSKY et al., 2007). Nos indivíduos com insuficiência cardíaca o exercício físico compensa os mecanismo envolvidos na perda muscular, no entanto não estão totalmente claros os mecanismo envolvidos, os possíveis são: sinalização intracelular de IGF-1/PI3k/AKT, estimuladores de síntese protéica promovido pelo exercício físico, e a diminuição dos níveis de RNAm de Murf-1 e Atrogina (BRUM et al, 2011).

Nos fatores positivos do crescimento muscular em exercício aeróbio, Neill et al (1999) encontram que em 7 dias de treinamento em ciclo ergômetro a 75% do VO₂ máximo, os níveis de MHC estavam significativamente maiores, três horas após a última

sessão de treino. Já em exercício de resistência com intensidade moderada, realizada em humanos, foi encontrado que o fator de formação muscular (miogenina) nas células satélites, estavam alto no músculo quadríceps (KADI et al, 2004). Do mesmo modo, Liu et al (2008) mostraram que os fatores de crescimento muscular como os MGF, IGF-1, e MyoD, ativados pela células satélites, estavam significativamente maiores após a realização de exercícios de contração máxima durante seis semanas.

Recentes resultados do laboratório (Louzada, proc. nº 2008/00821-6) demonstraram que o exercício físico aeróbio foi capaz de aumentar a expressão protéica de p70S6 somente no músculo tibial anterior, mas não no sóleo, no entanto, não observou hipertrofia nestes músculos.

Os resultados de expressão protéica de p70S6 são ainda controversos na literatura. Baar e Esser (1999) demonstraram o aumento da expressão de p70S6 no músculo tibial anterior e extensor digital longo de ratos machos após estimulação elétrica com intensidade semelhante ao exercício de alta intensidade. Nader e Esser (2001) encontraram aumento na fosforilação da proteína p70S6 no músculo tibial anterior em animais submetidos a estimulação elétrica de baixa frequência. Por outro lado, quando submetidos à estimulação elétrica de alta frequência ou treinamento aeróbio agudo de alta intensidade (~83% do VO₂ máximo) não foi possível observar alteração na expressão da proteína p70S6, tanto no músculo tibial anterior quanto no músculo sóleo desses animais. Concordando com este resultados, Li et al (2003) mostraram que os receptores de IGF-1, Akt e p70 estavam significativamente diminuídos com o envelhecimento e o exercício agudo não foi capaz de aumentar significativamente as espessões de tais proteínas. Tem sido observado que a maioria dos trabalhos que envolvem a expressão da proteína p70S6 e da proteína p70S6 na sua forma fosforilada realiza o treinamento resistido e não o aeróbio. Assim Terzis et al (2008) observaram aumento na expressão de p70S6 após uma sessão de 30 minutos de exercício resistido. Tannerstedt et al (2009) mostraram aumento significativo da expressão de P70S6 nas fibras do tipo II após uma e duas horas de uma única sessão de exercício resistido. Da mesma forma, Parkington et al. (2003) mostraram aumento significativo na expressão protéica de mTOR e p70S6 nos músculos tibial anterior e plantar, após estímulos elétricos. A p70S6, assim denominada quando encontrada no citoplasma, está significativamente elevada após realização de exercício resistido agudo na fibra tipo II quando comparado à fibra tipo I (KOOPMAN et al., 2006), sugerindo que

essa proteína é fator que contribui para elevar a síntese de proteínas neste tipo de fibra muscular.

Ainda não estão totalmente claros os efeitos do exercício físico nas proteínas positivas e negativas ao crescimento muscular e, quase nada se sabe sobre a prevenção do exercício físico na atrofia muscular causada pelos glicocorticóides.

Dados do laboratório (BAREL et al.,2010) mostraram que o tratamento de dexametasona (1mg/kg por dia) durante dez dias promoveu atrofia muscular nos músculos com predominância de fibras brancas ou mistas, que não foi atenuada pelo treinamento físico. Além disso, a expressão protéica de p70S6 estava aumentada no músculo TA tanto de animais controles como de animais tratados com a droga (LOUZADA processo FAPESP. nº 2008/00821-6), o que parece não contribuir efetivamente para evitar a atrofia muscular nos animais tratados. Estes resultados conflitantes necessitam de mais estudos, principalmente que verifiquem o balanço entre as proteínas que promovem hipertrofia e as que promovem atrofia muscular.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO.

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

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 da Miostatina. Pouco se sabe sobre os efeitos da dexametasona na expressão de p70S6K. Por outro lado, o exercício físico pode aumentar significativamente a expressão da p70S6K ou diminuir a expressão de miostatina. Porém nada se sabe sobre os efeitos preventivos do exercício físico nas vias que controlam a homeostase muscular em ratos tratados com dexametasona.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se o exercício físico realizado anteriormente e concomitantemente ao tratamento com dexametasona, tem efeito preventivo nas alterações de expressão proteica de miostatina e p70S6K induzidas pela dexametasona. A hipótese deste trabalho foi que o tratamento crônico com dexametasona aumenta as expressões de Miostatina e reduz a de p70S6K na musculatura esquelética. Espera-se que o exercício físico atenuie estes efeitos colaterais na musculatura esquelética.

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

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

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) para se avaliar o efeito do treinamento físico antes do início do tratamento com a droga. 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 2 representa a linha de tempo do protocolo experimental desta pesquisa:

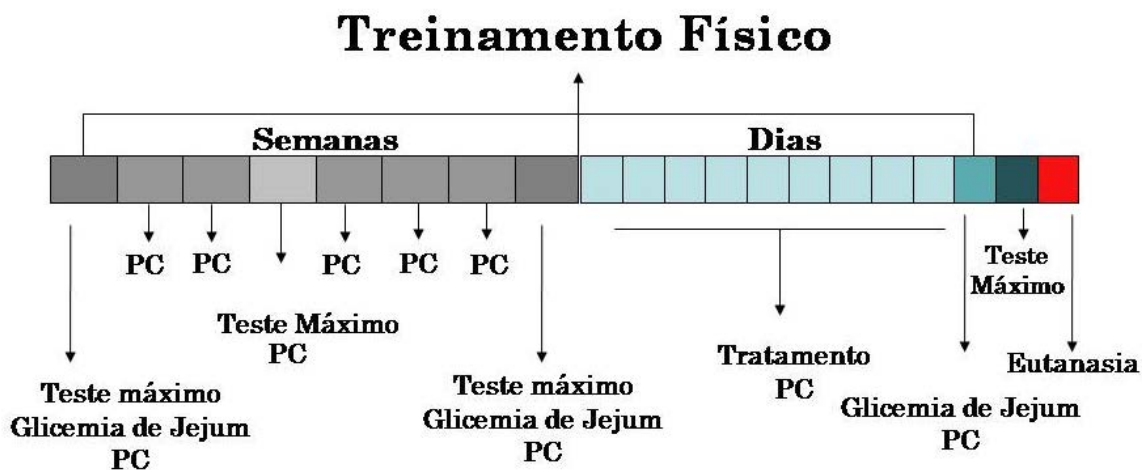


Figura 2. Linha do tempo do protocolo experimental.

3.2 Grupos experimentais.

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

Grupo 1: 20 animais que permaneceram sedentários durante todo o período e não receberam tratamento com dexametasona (SC).

Grupo 2: 20 animais que ficaram sedentários por todo o período e receberam tratamento com dexametasona nos últimos 10 dias (0,5mg / kg por dia, via-intraperitoneal) – (SD).

Grupo 3: 20 animais que foram submetidos a um protocolo de treinamento físico por 8 semanas e não receberam tratamento com dexametasona (TC)

Grupo 4: 20 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 por dia, via-intraperitoneal) – (TD). Os animais treinados continuaram treinando durante o período de tratamento medicamentoso.

Os animais não tratados com dexametasona receberam placebo pelo mesmo período de treinamento.

OBS. A dose escolhida foi a metade da dose utilizada em trabalhos anteriores do nosso laboratório com o intuito de verificar se os efeitos promovidos por esta dose menor poderia ser revertida pelo exercício.

3.3 Protocolo de treinamento físico.

O treinamento físico foi realizado em esteira ergométrica durante uma hora por dia, por 8 semanas, com intensidade de 60 % 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 estavam realizando 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 Determinação da Glicemia de Jejum

Após 12 horas de jejum os animais foram submetidos à avaliação da glicemia de jejum. Foi realizado um pequeno furo com uma agulha na cauda de cada animal para que pudesse ser colhida uma única gota de sangue. A glicemia dos animais foi aferida com glicosímetro “One-Touch” Ultra (Johnson & Johnson).

A avaliação da glicemia foi realizada antes e após 8 semanas do treinamento físico e antes e após do tratamento com dexametasona).

3.5 Retirada dos músculos esqueléticos.

Os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico ANASEDAN® (cloridrato de xilasina) e DOPALEN® (cloridrato de quetamina), VETBRANDS do Brasil (1:1, 1mg/kg de peso corporal).

Após a eutanásia, os músculos esqueléticos tibial anterior e sóleo 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 tibial anterior (TA) e sóleo (SOL) foram

homogeneizadas imediatamente após a retirada com um homogeneizador Polytron em uma solução RIPA concentrado 10x contendo: 0.5M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5M NaCl, 2.5% ácido deoxicólico, 10% NP-40, 10mM EDTA e adicionado 1% de PMSF na hora de usar.

As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 5 minutos e em seguida o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, que foi armazenado em freezer a -20°C para futuras análises de expressão proteica. Os tecidos não homogeneizados foram armazenados em freezer -80°C.

3.6 Protocolo de dosagem de proteína.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando um kit comercial (Bio-Rad Kit, Hercules, CA) com albumina como padrão, como previamente publicado (AMARAL et al., 2001). Este procedimento foi realizado em colaboração com o Laboratório do Prof. Livre Docente Carlos Ferreira dos Santos, na FOB/USP. Após a dosagem as amostras foram estocadas a -20°C até serem utilizadas para os experimentos de Western Blotting.

3.7 Procedimentos de Western Blotting.

A proteína foi eletroforéticamente separada por tamanho, usando-se um sistema de gel de poliacrilamida conforme publicação prévia do laboratório (AMARAL et al, 2001b). Basicamente, foi utilizado um gel com duas camadas de poliacrilamida, em diferentes concentrações: 5% na camada superior e 12% (Miostatina) e 10% (p70S6) 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 (30 µg para Miostatina e 30 µg para p70S6) foram colocadas para correr por 50 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 basal (Tris 1M, NaCl 5M, Tween 20), bloqueadas em solução a 5% de leite sem gordura em solução basal por 2 horas e incubadas por toda a noite, a 4°C, com diluição apropriada do anticorpo anti-miostatina (1:500, em leite desnatado) e anticorpo monoclonal para sequências de p70S6 humano (1:700, em albumina). As membranas foram então lavadas e incubadas com um anticorpo secundário, IgG anti-mouse e anti habbit (Miostina e p70S6, respectivamente), por 2 horas. O anticorpo foi detectado por luminescência química aumentada (Super signal Pico) e as membranas foram expostas a filme de radiografia. As bandas foram analisadas utilizando um programa de computador (Scion Image, Corporation)

3.8 Métodos estatísticos.

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

4. RESULTADOS.

A figura 3 representa o resultado dos 4 testes máximos realizados na esteira durante o período de treinamento físico, expresso em minutos. Pode-se observar um aumento significativo dos valores de tempo de exercício nos grupos TC, quando comparados ao início do treinamento (de 10 ± 1 min para $13,2 \pm 0,6$ min, no TEM-2, $18,6 \pm 0,6$ min, no TEM-3 e para $19,7 \pm 0,8$ min no TEM-4, $p < 0,05$). Da mesma forma, o grupo TD também aumentou seu desempenho na esteira (de $9,5 \pm 0,8$ min para $14,6 \pm 0,5$ min, no TEM-2, $18 \pm 0,8$ min no TEM-3 para $20,4 \pm 1,6$ no TEM-4, $P < 0,05$). Para o grupo sedentário controle (SC) observa-se diminuição significativa, quando comparado com o início do treinamento (de $10,6 \pm 0,6$ min para $7,5 \pm 0,5$ no TEM-2, $7,4 \pm 0,6$ min no TEM-3 para $6,8 \pm 0,5$ min no TEM-4), assim como para o grupo tratado (SD: $10 \pm 0,5$ min para $7,2 \pm 0,5$ min para o TEM-2, $8,4 \pm 0,5$ min do TEM-3 para $5,8 \pm 0,7$ min no TEM-4) é importante ressaltar que todos os grupos partiram de valores semelhantes no início do treinamento, o que garante a homogeneidade dos grupos. Os grupos sedentários não alteraram significativamente sua capacidade física como pode ser observados (SC e SD). Vale ressaltar que o tratamento com dexametasona não alterou a capacidade física dos animais, como observado na Figura 3 (SD e TD)

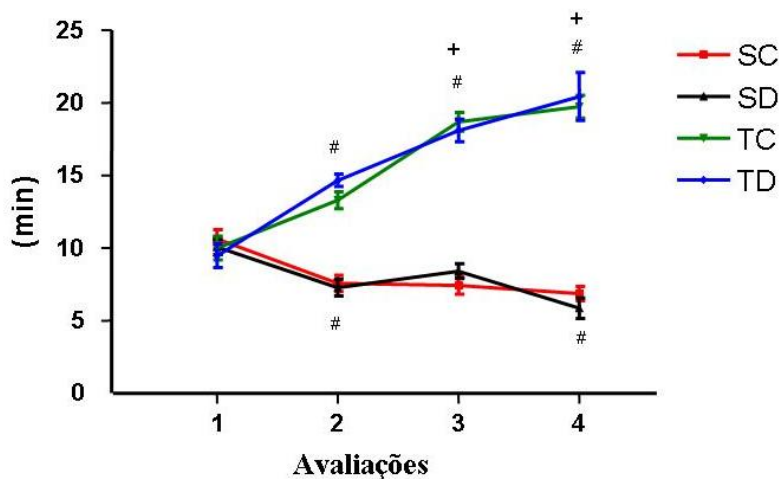


Figura 3: Capacidade física avaliada em minutos na esteira ergométrica nos testes máximos realizados durante o protocolo experimental. Avaliações 1,2,3 e 4 correspondem aos TEM-1, TEM-2, TEM-3 e TEM-4. Nos grupos sedentário controle (SC, n=20), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=20), treinado controle (TC, n=20) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=20) do TEM-1 ao TEM-3. Apenas 10 ratos de cada grupo realizaram o TEM-4. Significância: # vs início $p < 0,05$, * vs controle $p < 0,05$, + vs sedentário $p < 0,05$.

A figura 4 mostra a variação (delta) da distância percorrida entre o 3º e 1º TEM nos grupos treinados (de 115 ± 16 m no TEM-1 para 336 ± 22 m no TEM-3) e sedentários (de 121 ± 11 m no TEM-1 para 78 ± 9 m no TEM-3).

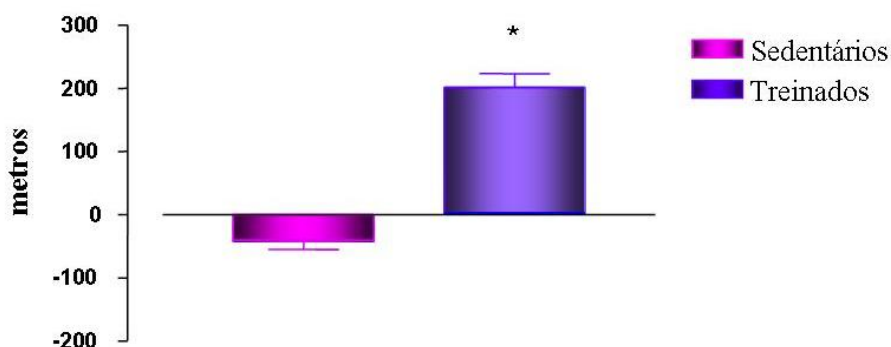


Figura 4: Variação da distância percorrida em metros entre a realização do terceiro teste máximo (TEM-3) e o primeiro teste máximo (TEM-1) nos grupos avaliados: treinados (n=40) e sedentários (n=40). Significância: *p < 0,05.

O comportamento do aumento de peso corporal durante as 8 semanas de treinamento foi semelhante entre os grupos, como pode ser observado na Figura 5 (SC: 292 ± 13 para 401 ± 20 g; SD: 301 ± 11 para 412 ± 15 g; TC: 279 ± 16 para 419 ± 24 g; TD: 305 ± 9 para 383 ± 18 g, respectivamente para 1ª e 8ª semana de treino). Importante ressaltar que os pesos corporais dos 4 grupos eram semelhantes no início do treinamento.

O tratamento com dexametasona determinou redução significativa do peso corporal nos animais sedentários (de 417 ± 10 para 342 ± 8 g) e treinados (de 396 ± 10 para 334 ± 8 g), respectivamente entre o primeiro e último dia de tratamento, como observado na figura 5. Pode-se observar que a redução de peso corporal, no grupo SD e TD foi significativa a partir do 4º dia de tratamento, (SD: 417 ± 10 para 399 ± 9 g; TD: 396 ± 10 para 376 ± 9 , primeiro e quarto dia, respectivamente).

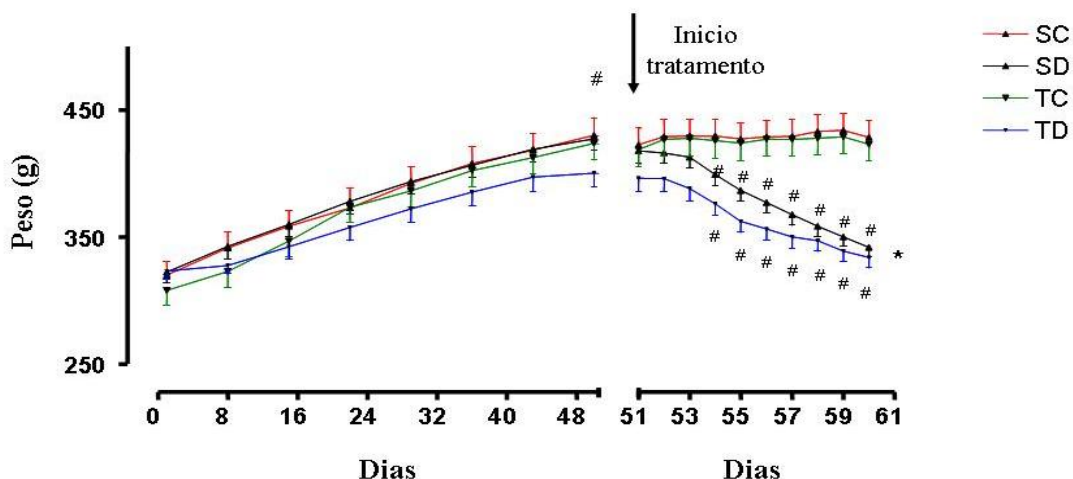


Figura 5: Comportamento do peso corporal durante as 8 semanas de treinamento físico (painel esquerdo) e no período de tratamento com dexametasona (10 dias, painel direito) nos grupos sedentário controle (SC, n=20), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=20), treinado controle (TC, n=20) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=20). Significância: # vs início,* vs controle, $p < 0,05$.

O treinamento físico não atenuou a perda de peso corporal, uma vez que os animais SD e TD apresentaram valores de PC menores que seus respectivos controles no final do tratamento. A Figura 6 ilustra os valores de PC no dia do sacrifício. Pode-se observar que houve perda significativa de 21% no PC no grupo TD quando comparado com seu controle, já para o grupo SD a perda significativa foi de 25% quando comparado com seu controle.

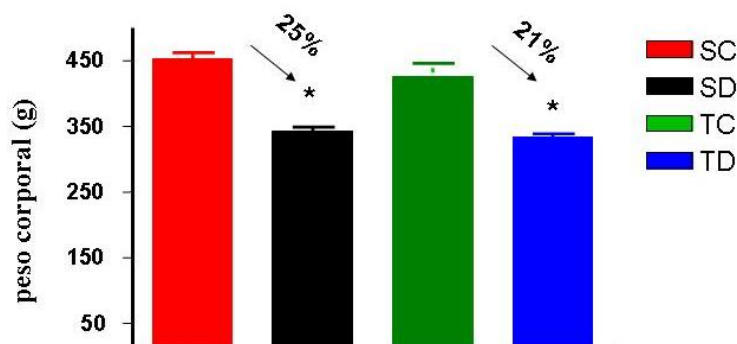


Figura 6: Valores de peso corporal de todos os ratos no dia do experimento. Sedentário controle (SC, n=20), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=18), treinado controle (TC, n=19) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=16). Significância : * vs controle, $p < 0,05$.

A Figura 7 mostra os valores de glicemia analisados durante o protocolo experimental. Durante as primeiras 8 semanas de treinamento físico, pode-se observar que não houve variação significativa nos valores de glicemia basal. Por outro lado, a dexametasona determinou aumento significativo da glicemia de jejum nos grupos SD (de 83 ± 2 mg/dL para 135 ± 9 mg/dL, $p < 0,05$) e TD (de 86 ± 2 mg/dL para 104 ± 8 mg/dL, $p < 0,05$). No entanto, o aumento observado no grupo TD foi significativamente menor que o observado no grupo SD, demonstrando uma atenuação do aumento da glicemia nos grupos treinados (104 ± 8 mg/dL vs 135 ± 9 mg/dL, para TD vs SD, $p < 0,05$).

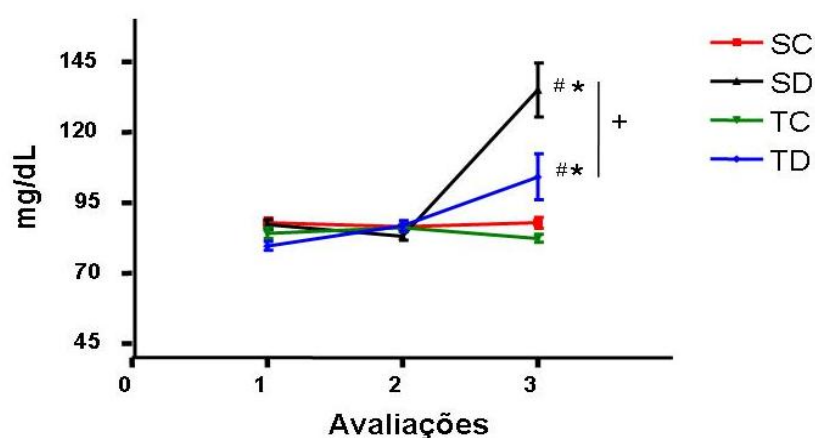


Figura 7 Valores de glicemia de jejum nas avaliações: 1-antes do treinamento; 2- antes tratamento e 3- após tratamento, nos diferentes grupos analisados: SC (n=20), SD (n=20), TC (n=20) e TD (n=20). Significância: # vs início do tratamento, * vs controle, + vs sedentário, $p < 0,05$.

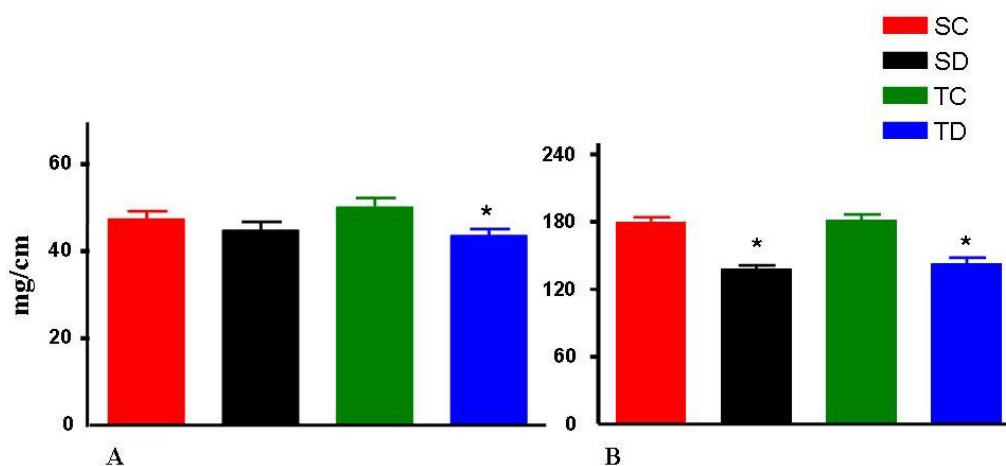


Figura 8: Valores de peso muscular: A- músculo Sóleo (SOL) e B-Tibial Anterior (TA) normalizados pelo tamanho da tíbia (cm) em todos os grupos analisados: SC (n=20), SD (n=20), TC (n=20), TD (n=20). Significância: * vs controle, $p < 0,05$.

Da mesma forma que o observado no peso corporal, o tratamento com dexametasona determinou redução significativa do peso muscular, como pode ser observado na Figura 8 para o músculo TA. O efeito da dexametasona no peso do TA foi de 23% nos sedentários e de 20% para os treinados, o que demonstra que o treinamento físico não foi efetivo para evitar a perda do peso do TA.

Resultados relativos à expressão protéica:

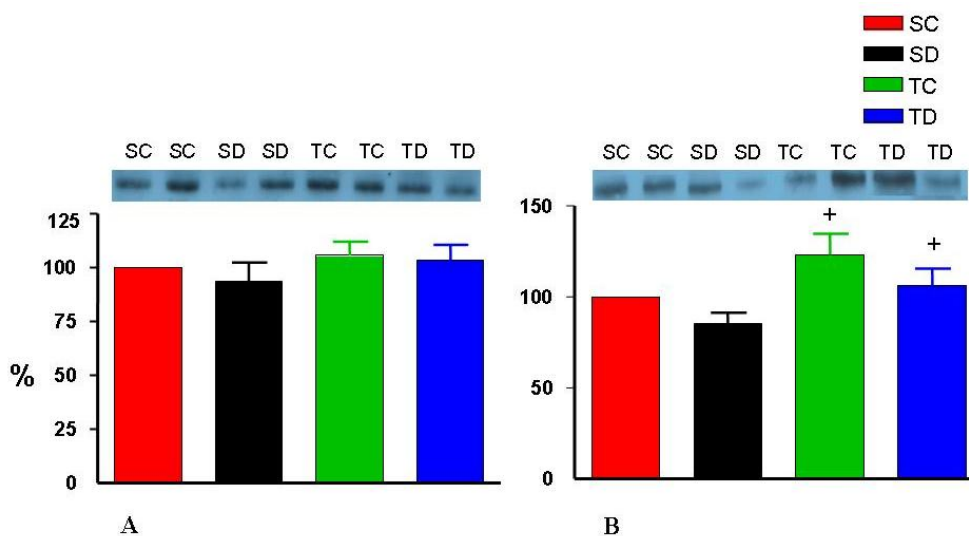


Figura 9: Painel superior. Gel representativo dos resultados de Western Blot para a proteína Miostatina (PM 12kDa) no músculo tibial anterior (A) e sóleo (B). Painel inferior: Análise quantitativa da expressão da proteína Miostatina dos animais dos grupos sedentário controle (SC, n=20, 20), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=14 e 10), treinado controle (TC, n=15 e 12) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=14 e 8) no músculo tibial anterior (TA) =A e sóleo (SOL)=B, respectivamente. Significância: + vs sedentário, $p < 0,05$.

Durante início das análises, foi necessária a realização da padronização do método de análise de proteína para Miostatina pelo procedimento de Western Blot. Como não era uma proteína analisada corriqueiramente no laboratório, foi utilizado um período inicial para algumas padronizações, tais como: a % de gel de poli-acrilamida mais adequada para o peso molecular da proteína (12%, 30kD), a melhor quantidade de proteína para correr no gel (30 μ g), o melhor tempo de corrida de eletroforese (40 min, a 200V) e a diluição mais adequada dos anticorpos (1:500 Ab primário e 1:10.000, Ab secundário, anti-mouse). Assim como para a proteína miostatina, houve um período de padronização para a proteína p70S6, principalmente para identificar a melhor concentração de anticorpo primário

(1:700) e secundário (1:5000), uma vez que dá mesma forma que a miostatina, a p70S6 não era uma proteína analisada com frequência.

A Figura 9 ilustra os resultados da quantificação da expressão protéica da Miostatina no músculo tibial anterior e sóleo (TA e SOL), com um número de ratos analisado maior ($n = \pm 15$ ratos por grupo) quando comparado com os dados do relatório parcial ($n=3$ ratos por grupo). Pode-se observar que não houve diferença significativa da expressão protéica da Miostatina no músculo TA nos grupos estudados. Por outro lado, no músculo SOL a expressão protéica está significativamente maior no grupo treinado (TC e TD).

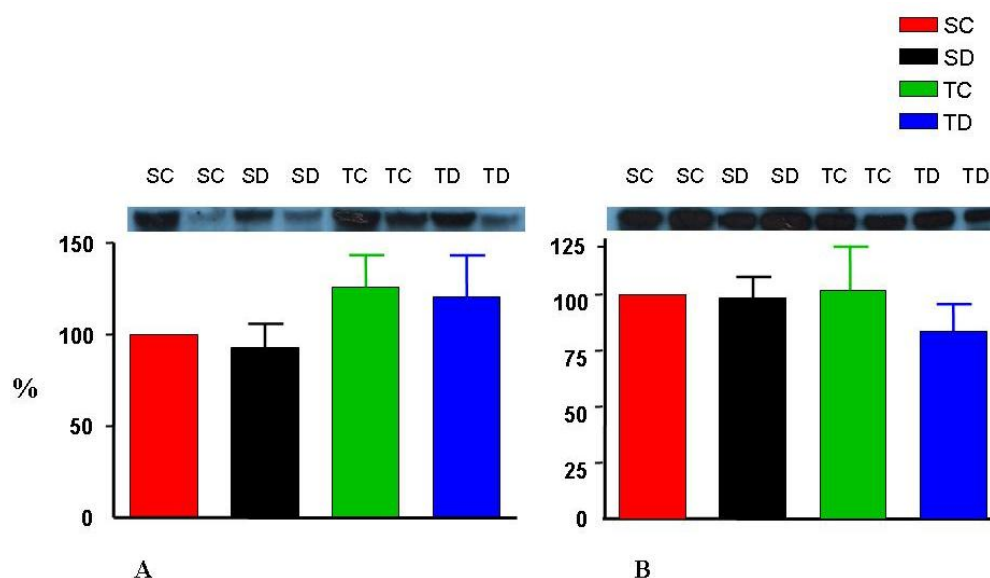


Figura 10: Pannel superior. Gel representativo dos resultados de Western Blot para a proteína p70S6 (PM 70-85 kDa) no músculo tibial anterior (A) e sóleo (B). Pannel inferior: Análise quantitativa da expressão da proteína p70S6 no músculo tibial anterior (TA)=A e sóleo (SOL)=B, respectivamente, nos animais dos grupos sedentário controle (SC, $n=20$, $n=20$), sedentário tratado com dexametasona (SD, $n=17$ e $n=11$), treinado controle (TC, $n=15$ e $n=12$) e treinado tratado com dexametasona (TD, $n=13$ e $n=10$)

A figura 10 ilustra que o tratamento com dexametasona não modificou significativamente a expressão da proteína p70S6 em nenhum dos músculos avaliados.

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente projeto mostraram que o tratamento com 0,5mg/kg por dia de dexametasona promoveu aumento da glicemia de jejum, redução de peso corporal e atrofia muscular no TA. O treinamento físico aeróbio, realizado anterior e concomitante ao tratamento farmacológico, foi eficiente em atenuar o aumento da glicemia nos ratos tratados, mostrando o papel preventivo do exercício no aumento dos valores glicêmicos. Por outro lado, o exercício crônico não foi efetivo em evitar a redução do peso corporal nem tampouco a atrofia muscular. Com o intuito de investigar um dos mecanismos da atrofia muscular, a análise da expressão protéica de miostatina e P70S6 foi realizada e pode-se observar que o tratamento com dexametasona não determinou aumento de miostatina nem redução de P70S6. Da mesma forma, o exercício físico não alterou a expressão destas proteínas nos animais tratados. Estes resultados sugerem que a atrofia muscular, presente nos animais após 10 dias de tratamento com dexametasona, deve ser resultado de uma combinação de outros mecanismos diferentes de miostatina e P70S6.

O uso crônico da dexametasona como terapia farmacêutica para processos inflamatórios e alérgicos vem sendo amplamente utilizada. Vários são os efeitos colaterais do seu uso crônico, como aumento da resistência periférica à insulina, hiperinsulimemia, diminuição de peso corporal, atrofia muscular, entre outros. (AHTIKOSKI et al., 2004; LUNDGREN et al., 2004; CRESPILO et al., 2006; GILSON et al., 2007; RAFACHO et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2008; LOUZADA et al, 2009, DIONÍSIO et al, 2009; BAREL et al., 2010).

Um dos principais efeitos da dexametasona observados na literatura e no nosso laboratório é o aumento significativo da glicemia de jejum dos animais (BAREL et al., 2010; LOUZADA et al, 2009; DIONÍSIO et al, 2010; SANTOS et al, 2007; GIOZZET et al, 2008). Resultados recentes do laboratório (BAREL et al., 2010) demonstraram que 1mg/kg por dia de dexametasona era capaz de aumentar em 136% a glicemia de jejum dos animais. Os resultados do presente trabalho confirmam estes resultados e demonstram de forma coerente que, em doses menores, a droga produz menores efeitos. Neste presente estudo, 0,5 mg/kg por dia determinou aumento significativo na glicemia dos animais sedentários de +62%. Os animais que foram treinados previamente ao tratamento também aumentaram seus valores de glicemia de jejum, mas em porcentagens bem menores

(+20%), como observado anteriormente no estudo de Barel et al (2010), onde os treinados aumentaram somente 97% vs 136% nos sedentários. Portanto, estes resultados demonstram um efeito protetor promovido pelo exercício físico.

Os resultados anteriores de nosso laboratório haviam demonstrado que 1mg/kg por dia de dexametasona eram capazes de reduzir significativamente o peso corporal e muscular e que o exercício não era efetivo em atenuar estes efeitos (BAREL et al, 2010). Uma de nossas hipóteses era que em doses menores o exercício pudesse ter um efeito mais expressivo sobre estas variáveis. No entanto, as análises estudadas, mostraram que o uso de dexametasona durante 10 dias (0,5mg/kg) causou perda significativa de peso corporal nos dias de tratamento (18%) e de peso muscular, que não foi evitada pelo exercício. Concordando com estes resultados, 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%). Uma das diferenças observadas entre os resultados do presente estudo e os encontrados anteriormente pelo laboratório em dosagens maiores é que o efeito da droga acontece mais tardiamente, ou seja, com 1 mg/kg os efeitos surgem a partir do primeiro dia de tratamento (BAREL et al, 2010) ou a partir do terceiro dia (GILSON et al 2007) e, com dose 50% menor, a redução de PC somente é observada a partir do quarto dia de tratamento, como observado no presente trabalho.

Uma das possíveis causas de perda do peso corporal após tratamento com a dexametasona é a redução da ingesta alimentar, uma vez que a dexametasona pode diminuir os níveis do neuropeptídeoY (NPY) e do hormônio corticotropina (CRH) no núcleo paraventricular (PVN) (MCKIBBIN, COTTON, MCCARTHY et al. 1992; MICHEL e CABANAC, 1999; GINSBERG, CAMPEAU, DAY et al. 2003; KARSSSEN, MEIJER, BERRY et al. 2005). O NPY e o hormônio liberador de corticotropina (CRH) regulam o apetite e a termogênese no hipotálamo, mais especificamente no núcleo paraventricular (PVN).

A atrofia muscular tem sido apontada como um desbalanço entre fatores positivos e negativos que controlam o crescimento muscular. Existem várias proteínas envolvidas no processo de atrofia (Miostatina, Atrogina-1 e Murf-1, entre outras) ou hipertrofia muscular (IGF-1, p70S6K, AKT, mTOR, entre outras), no entanto, o papel da dexametasona no controle deste balanço ainda não está totalmente estabelecido. Resultados recentes do laboratório (LOUZADA et al, 2009, DIONÍSIO et al, 2009; BAREL et al., 2010) têm

demonstrado constantemente que existe uma redução significativa de peso muscular dos ratos tratados por 10 dias com 1mg/kg por dia de dexametasona, que não é atenuada pelo exercício físico, entretanto, o papel da dexametasona ou do exercício no controle deste balanço ainda não está totalmente estabelecido.

A miostatina tem sido apontada como uma importante proteína no controle da atrofia muscular, uma vez que animais “knockout” para este gene não apresentam atrofia muscular induzida pela dexametasona (GILSON et al, 2007). Alguns estudos apontam o aumento da expressão da proteína miostatina promovida pelo uso de glicocorticóides após 5 dias de tratamento (SALEHIAN et al, 2006 e MA et al., 2003). Por outro lado, Smith et al, (2010), recentemente não encontraram alteração significativa na expressão protéica da miostatina no músculo EDL, após duas horas de tratamento com dexametasona (10mg/kg). Os resultados do presente estudo concordam com os achados de Smith et al. (2010) e demonstram que a expressão da miostatina não estava aumentada no grupo sedentário (SD) no TA e Sol após 10 dias de tratamento. De acordo com os estudos de Ma et al. (2003), a miostatina apresenta uma resposta bifásica após tratamento com dexametasona, ou seja, 5 dias de tratamento aumenta a expressão gênica e protéica de miostatina, no entanto, estes valores retornavam aos basais após 10 dias. Portanto, acredita-se que a miostatina tenha um papel no início do processo da atrofia muscular, mas cronicamente não parece ter mais relevância. Nada se sabe sobre os efeitos preventivos do exercício aeróbio na expressão desta proteína após tratamento com dexametasona.

Sabe-se que uma única sessão de exercício excêntrico não é suficiente para diminuir a expressão gênica da miostatina no músculo vasto lateral (JENSKY et al., 2007). Por outro lado, Heinermeier et al. (2009) mostraram diminuição da expressão gênica da miostatina no músculo gastrocnêmico após 4 dias consecutivos de estímulos elétricos concêntricos, excêntricos e isométricos. Matsakas et al (2006) demonstraram diminuição significativa de RNAm de miostatina nos músculos gastrocnêmico e vasto lateral, após 5 dias de treinamento aeróbio. Mais recentemente, Konopta et al, (2010) mostraram diminuição significativa da expressão de miostatina em mulheres idosas após realização de exercício físico aeróbio durante 12 semanas.

No presente trabalho não houve diminuição significativa na expressão protéica da miostatina após o período de treinamento no músculo TA. Achados similares foram encontrados por Bueno et al. (2011) e Leiter et al. (2010) que recentemente mostraram que

não houve diminuição significativa na expressão protéica da miostatina no músculo tibial (Leiter et al., 2010) e no gastrocnêmico branco (Bueno et al., 2011) após 3 semanas de treinamento aeróbio. Por outro lado, Bueno et al. (2011) evidenciaram que a miostatina é também expressa no tecido adiposo. Neste sentido, estes autores confirmaram que a miostatina estava aumentada no tecido adiposo em ratos obesos e diminuída quando estes animais realizaram exercício aeróbio. Lenk et al. (2009) encontraram diminuição da miostatina no coração e no músculo gastrocnêmico em ratos com insuficiência cardíaca treinados durante quatro semanas, entretanto, não houve diferença significativa em ratos treinados e sedentários controles. Desta forma pode-se evidenciar que os efeitos do exercício na expressão protéica de miostatina ainda é controverso. Tem sido encontrado redução da miostatina após a prática de exercício físico (HEINERMEIER et al., 2009; MATSAKAS et al.; 2006; KONOPTA et al., 2010), não alteração (BUENO et al., 2011; LEITER et al., 2011) ou ainda aumento da expressão da miostatina após a prática de exercício físico (WILLOUGHBY et al., 2004; PETERS et al., 2003).

Willoughby (2004) encontraram aumento significativo do RNAm e no conteúdo da miostatina, tanto no músculo como no plasma, após 12 semanas de treinamento resistido de alta intensidade (85-90% 1RM). Além disso, este autor (WILLOUGHBY, 2004) encontrou aumento significativo de cortisol e receptores de cortisol após treinamento físico, sugerindo que a prática regular de exercícios de alta intensidade possui relação direta com o aumento do cortisol e da miostatina. Por outro lado, Jency et al. (2010) recentemente mostraram que após realização de exercício excêntrico e concêntrico em mulheres a expressão gênica da miostatina não estava modificada em nenhum dos protocolos de treinamento. Já Wilborn et al. (2009) encontraram, após 6 horas da sessão de exercício de resistência (60-85%), diminuição significativa do gene da miostatina (RNAm). O presente estudo e os resultados dos estudos acima citados sugerem que a expressão de miostatina responde diferentemente ao tipo, duração e intensidade de exercício físico.

O principal objetivo desse trabalho foi verificar se a realização de exercício físico aeróbio, realizado antes e durante o tratamento com glicocorticóide, pudesse prevenir ou atenuar a atrofia muscular diminuindo a via catabólica (miostatina) ou aumentando a via anabólica (p70S6). Entretanto, o presente estudo demonstrou que houve aumento significativo na expressão de miostatina no músculo SOL dos animais treinados,

independente do tratamento. Interessante notar que neste músculo (SOL) não houve atrofia. Por outro lado, no TA, houve atrofia muscular sem alteração nos níveis de miostatina, nem nos animais sedentários nem nos treinados. Estes resultados, em conjunto com os achados de Ma et al. (2003), sugerem que a miostatina pode ser importante no início do processo de atrofia muscular, mas após 10 dias outros fatores devem estar atuando para manter a redução significativa de peso muscular observada nos animais tratados.

Estudos na literatura demonstram que o exercício físico aumenta a expressão de proteínas positiva (p70S6K) e diminui a negativa (Miostatina) do crescimento (TANNERSTEDT et al, 2009; NADER e ESSER, 2001; MATSAKAS et al, 2006), mas seus resultados ainda são limitados e controversos. A atividade da sinalização na cascata que controla síntese de proteína é altamente determinada pela fosforilação da mTOR e subsequente ativação da p70S6 (ROSCHEL et al., 2011; PARKINGTON et al., 2003, dessa forma a proteína p70S6 parece desempenhar um papel importante na regulação da hipertrofia muscular induzida pela contração. A p70S6 é assim denominada quando encontrada no citoplasma e sua precursora é a proteína S6K1 (LASER et al., 1998). Koopman et al. (2006), usando técnicas de imuno-histoquímica, encontraram aumento significativo de p70S6 após 2 horas de exercício resistido moderado (menor que 75% de 1RM) no músculo vasto lateral (tipo de fibra II). Este resultado não foi confirmado por Roschel et al., (2011), os quais não encontraram aumento protéico de p70S6 total, mTOR e pAKT no músculo vasto lateral. Estes autores encontraram somente aumento nas proteínas fosforiladas. Por outro lado, Parkington et al. (2003) haviam encontrado aumento significativo da p70S6 em músculos de predominância de fibras brancas (TA e plantar) após estímulo elétricos. Tem sido especulado que a resposta por exercício de resistência é específico para a fibra muscular tipo II (PARKINGTON et al., 2003; BAAR e ESSER., 1999; TANNERSTEDT., et al 2009) sugerindo que os músculos de fibras II podem ser mais responsivos à hipertrofia neste modelo de treinamento que os músculos de fibra tipo I, porém quase nada se sabe sobre efeitos do exercício aeróbio. O presente estudo mostrou que, diferentemente do treinamento resistido, o aeróbio não aumentou significativamente a expressão protéica total de p70S6 no músculo de fibra do tipo II (TA) nem no músculo de fibra tipo I (SOL).

Tem sido demonstrado que a resposta celular da insulina envolve interação com hormônios, receptores e subseqüentes ativações intracelulares, entre essas ativações encontra-se a p70S6 (WU et al., 2004; DARDEVET et al., 1999, RICHTER et al., 2001; JESSEN et al., 2003; ROSCHEL et al, 2010). Long, Wei e Barret (2001) encontraram diminuição da síntese protéica após tratamento com dexametasona durante 5 dias. O tratamento bloqueava o aumento na fosforilação da proteína p70S6 induzida pela insulina, embora o tratamento por si mesmo não tenha alterado a expressão dessa proteína no músculo esquelético. Wu et al. (2004) encontraram diminuição significativa na expressão de p70S6 fosforilada no miocárdio de ratos adrenalectomizados, valores estes que foram aumentados quando estimulados pela insulina. Da mesma forma, Dardevet et al. (1999) já haviam encontrado aumento significativo na p70S6 no músculo epitroclear quando estimulado por insulina, entretanto esse aumento foi significativamente menor quando dexametasona foi administrada por 4 dias. Estes estudos nos permitem sugerir que a dexametasona parece atuar na ação da insulina e não na expressão da proteína, e que a dexametasona possui modulações diferentes que os efeitos da insulina.

6. CONCLUSÃO

Os dados do presente trabalho nos permitem sugerir que nem a miostatina nem a P70S6 parecem estar envolvidas na atrofia no músculo tibial anterior (TA) induzida por 10 dias de tratamento. O treinamento físico, por sua vez, também não determinou alteração significativa na expressão protéica destas proteínas e não atenuou a atrofia muscular presente no TA. Mais estudos serão necessários para identificar e elucidar os mecanismos responsáveis pela atrofia muscular induzida pela dexametasona e o possível papel do exercício neste efeito colateral. Estudos com exercício resistido estão sendo iniciados em nosso laboratório para verificar se o tipo de exercício pode ter um papel mais significativo na atenuação da atrofia muscular nestes animais.

7 REFERÊNCIAS

- 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; 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. **Jornal of Hypertension**, v. 18, n. 11, p. 1563-1572, 2000.
- AMARAL, S.L. et al. 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., 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 InExperimental Biology, Anaheim, CA, USA. **Faseb Journal**. v.24. p.982.7 2010.
- 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. **Jornal of cellular physiology**, v.190, p.170-179, 2002.
- 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. **European Journal of Applied Physiology**, epub ahead of print, 2010.

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

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.

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. **Nature Cell. Biology**, v. 3, p. 1014-1019, 2001.

BUENO, P.G; BASSI, D; 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 obese insulin-resistant rats. **Mol Cell Endocrinol**, v6, p.159-164, 2011.

BRUM, P.C; BACURAU, A.V.N; MEDEIROS, A; FERREIRA, J.C.B; VANZELLI, A.S; NEGRAO, C.E. Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. **Braz J Med Biol Res**, v,44, p. 827-835, 2011.

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; YOYOS, 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.

CLASS, D.J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v.37, p. 1974-1984.

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.

DALLMAN, M.F; AKANA, S.F; LEVIN, N, WALKER, C.D; BRADBURY, M.J; SUEMARU, S; SCRIBNER, K.S. Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Brain Corticosteroid Receptors**, v. 746, p. 22–32, 1994.

DARDEVET, D; SORNET, C; GRIZARD, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance of protein synthesis is independent of the rapamycin-sensitive pathways in rat skeletal muscle. **Journal of Endocrinology**, v. 162, p.77-85, 1999.

DIONISIO, T.J.; DIONISIO, E. J.; LOUZADA, J.C.A.; VISCELLI, B. A.; MARTUSCELLI, A. M.; AMARAL, S. L. Treinamento Físico Atenua A Resistência Periférica À Insulina Em Ratos Tratados Com Dexametasona. **In: Congresso ANAD**, p.40 (resumo), 2009.

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.

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

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

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

HANKIN, M.E; THEILE, H.M; STEINBECK, A.W. An evaluation of laboratory tests for the detection and differential diagnosis of Cushing's syndrome. **Clin Endocrinol**, v. 6, n. 3, p.185-96, 1977.

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 musclu 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; 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- JESSEN, N.; POLD, R.; BUHL, E.S.; JENSEN, L.S.; SCHMITZ, O.; LUND, S. Effects of AICAR and exercise on insulin-stimulated glucose uptake, signaling, and GLUT-4 content in rat muscles. **J Appl Physiol**, v.94, p.1373-1379, 2003
- LANG, C.H; SILVIS, C; NYSTROM, G; FROST, R.A. Regulation of myostatin by glucocorticoids after thermal injury. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 10, p. 1807-1809, 2001.
- LASER, M; KASI, V.S; HAMAWAKI, M; COOPER, G.T; KERR, C.M, KUPPUSWAMY, D. Differential activation of p70 and p85 S6 kinase isoforms during cardiac hypertrophy in the adult mammal. **J Biol Chem**, v. 273, p. 24610–24619, 1998.
- 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; SCHUR, R; LINKE, T; ERBS, S; MATSUMOTO, Y; ADAMS, V; SCHULER, G. Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. **European Journal of Heart Failure**, v. 11, p. 342-348, 2009.
- 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, M; LI, C; PARKHOUSE, W.S. Age-related differences in the des IGF-I- mediated activation of Akt-1 and p70S6K in mouse skeletal muscle. **Mechanisms of ageing and development**, v. 124, p. 771-778, 2003.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. **Journal of Cellular Physiology**,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.
- MCPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-b_ superfamily member. **Nature**, v. 387, p.83–90, 1997.
- MARINUS, F.W.P; PIETER, R.J; FRANS, J.V. Glucocorticoid inhibition of C2C12 proliferation rate and differentiation capacity in relation to mRNA levels of the MRF gene family. **Molecular Biology Reports**, v. 27, p. 87-98, 2000.

- MASSON, G.S; CRUZ, L.C; SANCHES, E; GOMES, F.D; MEIRELLES, L.R; TURA, B.R; SALGADO, A.A; ALBURQUERQUE, C; ROCHA, R.M. Influência da terapia com exercícios supervisionados na pressão arterial de pacientes com doenças cardiovasculares. **Rev SOCERJ**, v. 19, n. 4, p. 302-307, 2006.
- MATSAKAS, A; BOZZO, C; CACCIANI, N; CALIARO, F; REGGIANI, C; MASCARELLO, F; PATRUNO, M. Effecto of swimimng 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.
- MEDIANO, M.F.F; BARBOSA, J.S.O; SICHIERI, R; PEREIRA, R.A. Efeito do exercício físico na sensibilidade á insulina em mulheres obesas submetidas a programa de perda de peso: um ensaio clinico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n. 6, p. 993-999, 2007.
- MCKIBBIN, P.E.; COTTON, S.J.; MCCARTHY, H.D.; WILLIAMS, G. The effect of dexamethasone on neuropeptide y concentrations in specific hypothalamic regions. **Life Sciences**, v.51, p.1301-1307, 1992.
- MICHEL, C.; CABANAC, M. Effects of dexamethasone on the body weight set point of rats. **Physiology & Behavior**, v.68, p.145-150, 1999
- MONTEIRO, M. F; SOBRAL, D. C. F. Exercício físico e o controle da pressão arterial. **Rev Bras Med Esporte**; Niterói, v. 10, n. 6, 2004.
- MORTON, N.M. Obesity and corticosteroides: 11 β -hydroxysteroid type 1 as a cause and therapeutic target in metabolic disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, p. 154-164, 2010.
- MUNCK, A; GUYRE, P.M; HOLBROOK, N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions, **Endocr. Rev**, v. 5, p. 25–44, 1984.
- NADER, G.A; ESSER, K.A. Intracellular signaling specificity in sketetal muscle in response to different modes of exercise. **J Appl Physiol**, v. 90, p. 1936-1942, 2001.
- 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.
- NISHIOKA, S. A. Benznidazol 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? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 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.

PARKINGTON, J. D; SIEBERT, A. P; LEBRASSEUR, N.K; FIELDING, R. A. Differential activation of mTOR signaling by contractile activity in skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.285, p.1086-1090, 2003.

PELLEGRINO, M.A; ANTONA, G; BORTOLOTTI, S; BOSCHI, F; PASTORIS, O; BOTTINELLI, R; POLLA, B; REGGIANI, C. Clenbuterol antagonizes glucocorticoid-induced atrophy and fibre type transformation in mice. **Exp Physiol**, v. 899, p. 89-100, 2004.

PETLEY, T; GRAFF, K; JIANG, W; YANG, H; FLORINI, J. Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses. **Horm. Metab. Res**, v. 31, p. 70 – 76, 1999.

PETERS, D; BARASH, I.A, BURDI, M; YUAN, P.S; MATHEW, L; FRIDÉN, J; LIEBER, R.L. Asynchronous functional, cellular and transcriptional changes after a bout of eccentric exercise in the rat. **J Physiol**, v 533.3, p. 947-957, 2003.

PREZANT, D.J; KARWA, M.L; RICHNER, B; MAGGIORE, D; GENTRY, E.I; CHUNG, V; CAHILL, J. Short term vs long term dexamethasone treatment: Effects on rat diaphragm structure and function. **Lung**, v. 176, p. 267-280, 1998.

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.

RICHTER, E.A.; DERAIVE, W.; WOJTASZEWSKI, J.F.P. Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. **J Physiol**, v.535, p.313-322, 2001

ROLIM, L.M.C; AMARAL, S.L; MONTEIRO, H.L. Hipertensão e exercício: custos do tratamento ambulatorial, antes e após a adoção da prática regular e orientada de condicionamento físico. **Hipertensão**, v. 10, n. 2, p. 55-62, 2007.

ROMMEL, C; BODINE, S. C; CLARKE, B. A; ROSSMAN, R; NUNEZ, L; STITT, T. N; YANCOPOULOS, G.D; CLASS, D.J. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. **Nat. Cell. Biol.**, v. 3, p. 109–113, 2001.

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.

- ROSCHEL, H; UGRINOWISTCH, C; BARROSO, R; BATISTA, M. A. B; SOUZA, E. O; AOKI, M. S; FILHO, M. A. S; ZANUTO, R; CARVALHO, C. R. O; JUNIOR, M. N; MELLO, M. T; TRICOLI, V. Effect of eccentric exercise velocity on akt/mtor/p70S6 signaling in human skeletal muscle. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** v. 36, p. 283-290, 2011.
- 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, atrogen-1 and MuRF1. **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.55, p. 1239-1247, 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.
- SMITH, I.J; AVERSA, Z; ALAMDARI, N; PETKOVA, V; HASSELGREN, P. Sepsis downregulates myostatin mRNA levels without altering myostatin protein levels in skeletal muscle. *Jornal of cellular biochemistry*, v.111, p.1059-1073, 2010.
- SCHAKMAN, O; GILSON,H; THISSEN,J.P. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. **Jornal of Endocrinology**, v.197,p.1-10, 2008.
- SHAH, O.J; ANTHONY, J.C; KIMBALL, S.R; JEFFERSON, L.S. Glucocorticoids oppose translational control by leucine in sketetal 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 MuRF1. **Life Sciences**, v.82, p. 460-466, 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-3 β pathway and is antagonized by insulin – like growth factor 1. **Journal of biological chemistry**, v. 282, p. 3799 – 3808, 2007.

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

KONOPKA, A.R; DOUGLASS, M.D; KAMINSKY, L.A; JEMIOLO, B; TRAPPE, T.A; TRAPPE, S; HARBER, M.P. Molecular Adaptations to Aerobic Exercise Training in Skeletal Muscle of Older Women. **Journal of Gerontology: MEDICAL SCIENCES**, v.11, p.1201-1207, 2010.

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.

WEBER, T.E; SMALL, B.C; BOSWORTH, B.G. Lipopolysaccharide regulates myostatin and MyoD independently of an increase in plasma cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, p. 64-73, 2004.

WILBORN, C.D; TAYLOR, L.W; GREENWOOD, M; KREIDER, R.B; WILLOUGHBY, D.S. Effects of different intensities of resistance exercise on regulators of myogenesis, **J Strength Cond Res**, v.23, p.2179-2187.

WILLOUGHBY, D.S. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. **Med Sci Sports Exerc**, v.36, p. 574–582, 2004.

WU, Y; BARRETT, E. J; LONG, W; LIU, Z. Glucocorticoids differentially modulate insulin-mediated protein and glycogen synthetic signaling downstream of protein kinase B in rat myocardium. **Endocrinology**, v. 145, p. 1161-1166, 2004.

ZHENG, W; KAR, S; QUIRION, R. Insulin-like growth factor-1- induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FOXO1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. **J. Biol.Chem**, v. 275, p. 39152-/39158, 20

Orientadora: Dra^a Sandra Lia do Amaral Cardoso

Aluna: Aline Mio Martuscelli