



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas
à Farmácia**

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO DO TORNOZELO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS, A EXPRESSÃO
GÊNICA E NÍVEIS DA CREATINA CINASE NOS
MÚSCULOS SÓLEO E TIBIAL ANTERIOR DE RATOS
DIABÉTICOS**

CLARA MARIA PINHEIRO

ARARAQUARA – SP
2011

CLARA MARIA PINHEIRO

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO DO TORNOZELO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS, A EXPRESSÃO GÊNICA E NÍVEIS
DA CREATINA CINASE NOS MÚSCULOS SÓLEO E TIBIAL ANTERIOR DE
RATOS DIABÉTICOS**

Equipe de trabalho:

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti¹
Co-Orientadora: Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini²
Apoio Financeiro: CNPq e FAPESP.

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” campus Araraquara como parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

ARARAQUARA – SP
2011

¹ Prof. Dr., Departamento de Análises Clínicas, UNESP – Araraquara.

² Profa. Titular, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos.

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P654e Pinheiro, Clara Maria
Efeito da inflamação do tornozelo sobre as características histológicas, a expressão gênica e níveis da creatina cinase nos músculos sóleo e tibial anterior de ratos diabéticos / Clara Maria Pinheiro. – Araraquara, 2011
88 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências em Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti

Co-orientador: Tânia de Fátima Salvani

1. Diabetes. 2. Inflamação. 3. Atrogenes. 4. Atrofia muscular. 5. Creatina. Cinase. I. Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient. II. Salvani, Tânia de Fátima, co-orient. III. Título.

CAPES: 40300005

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO DO TORNOZELO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS, A EXPRESSÃO GÊNICA E NÍVEIS
DA CREATINA CINASE NOS MÚSCULOS SÓLEO E TIBIAL ANTERIOR DE
RATOS DIABÉTICOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora - UNESP

Profa. Dra. Amanda Martins Baviera
Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT

Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

“ Os teus sonhos foram muito mais além do que os teus pés pisaram.
Os teus sonhos irão muito mais além de onde já chegaram.”

(Trecho da música Dom Bosco dos Sonhos de Dalcides Biscalquin)

Dedico este trabalho à minha família que sempre me incentivou e apoiou na realização de mais um sonho.

AGRADECIMENTOS

A experiência vivenciada durante o período do mestrado, sempre esteve acompanhada por muitas pessoas que me ajudaram e ofereceram sua colaboração, apoio e conselho nos momentos mais difíceis. Agradeço pela ajuda de todos, pessoas que foram e continuam sendo muito importantes em minha vida, pois me ajudaram a realizar mais um sonho. Nos momentos mais difíceis é que conhecemos a verdadeira amizade. Fico muito lisonjeada em saber que sou rodeada de pessoas queridas e que me ajudaram prontamente quando eu mais precisei.

Primeiramente agradeço a Deus, sempre presente em minha vida, dando-me coragem e força para seguir em frente na realização dos meus sonhos. Sinto que estou sempre em suas mãos.

Agradeço imensamente a minha família, em especial meus pais, Noel e Beth, meu irmão Guilherme, minha cunhada Karina, meu sobrinho Henrique (que me chama carinhosamente de Tatinha) e minha madrinha Teresinha. A todos vocês obrigada de coração por andarem comigo, pelo apoio e confiança em mim, por estarem sempre na torcida e por me ensinarem o verdadeiro sentido do AMOR e de FAMÍLIA.

Ao meu orientador e professor Iguatemy Lourenço Brunetti, por me aceitar em seu laboratório. Obrigada pela atenção, paciência e calma, dignas de uma pessoa séria, mas extrovertida. Obrigada pelo incentivo e apoio para a apresentação do meu trabalho em um congresso internacional, que me acrescentou muitas experiências e permitiu conhecer o estado da arte em músculos esqueléticos. Momentos que guardarei para o resto de minha vida, com a principal lição: nunca estamos sozinhos!

À minha co-orientadora e professora Tania de Fátima Salvini pela parceria com o Laboratório de Plasticidade Muscular que contribuiu para a realização dessa pesquisa, sempre abrindo portas, pela atenção e aprendizado compartilhados.

À amiga Sabrina Peviani Messa, que desde a minha iniciação científica sempre me incentivou no caminho da ciência e me ajudou com tanto carinho, paciência e dedicação. Quanto deu devo a você! Nunca me esquecerei que sempre acreditou em mim. Obrigada pelas conversas e pelos momentos de descontração durante a nossa convivência e principalmente na fase final desse trabalho e durante a decisão de viajar ou não para o congresso. Que Deus continue te abençoando!

Ao Guilherme e ao Hugo por tantas caronas para Araraquara.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica Vânia Ortega (Cabedal), Renata, Juliana, Vanessa, Marciano, Ricardo, André e Tânia pela convivência diária, compreensão e auxílio, troca de experiências, aprendizado e amizade.

Vânia (Cabedal) obrigada por estar sempre disposta a me ajudar, pelas risadas, conselhos e principalmente por me ajudar na realização desse trabalho, com tantos detalhes... Continue sendo essa pessoa animada e divertida! Obrigada por sempre me acompanhar nos sorvetes do Chiquinho nas tardes quentes em Araraquara.

Ao pessoal do Laboratório de Plasticidade Muscular Sabrina, João, Gabriel, Thiago, Davilene, Fernanda, Rubia, Paula, Catarina, Marê, Marcela, Cris. Obrigada pela paciência e pela convivência.

Ao João, Gabriel e Sabrina. Descobri em vocês verdadeiros amigos, sei que posso confiar em vocês de olhos fechados, nos momentos fáceis e principalmente nos difíceis. Obrigada pela paciência e dedicação. Gostaria que soubessem que sem o apoio de vocês, talvez eu não teria participado do congresso na Alemanha. Todas as vezes que falava do meu medo, vocês sempre me lembravam que eu seria capaz. Obrigada pelo incentivo e pelos pensamentos positivos para que tudo fosse maravilhoso, como realmente aconteceu.

Aos técnicos Marcos (Laboratório de Bioquímica - UNESP e também Cabedal) e Teresa (Laboratório de Plasticidade Muscular), muito obrigada pela ajuda, conversas e risadas.

As minhas amigas Maria Luiza e Kamilla, também companheiras de pós-graduação em outras instituições, mas que sempre se mostraram preocupadas, atenciosas e compreensivas durante essa etapa da minha vida. Obrigada pela amizade verdadeira durante todos esses anos. Vocês são muito especiais.

Aos meu primos, primas e familiares que me acompanharam nas fases e conquistas da minha vida, sintam-se carinhosamente lembrados.

À Rosemira pelas conversas e risadas, com um alto astral, contagiando todos ao seu redor. Quantas histórias de tomates!!

Às Professoras Maria Teresa Pepato e Regina Vendramini pelo apoio durante a realização desse estudo.

À todos que direta ou indiretamente participaram para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - pelo financiamento dessa pesquisa.

RESUMO

O Diabetes Mellitus é um dos mais importantes problemas de saúde pública, ocasionando complicações crônicas como a atrofia muscular e perda da qualidade de vida do paciente. Quando ocorre uma lesão articular, o músculo responde com um processo de atrofia onde é gerada uma modificação no tecido muscular funcionalmente relacionado com essa articulação. Contudo, estudos experimentais que contribuam ao esclarecimento da relação entre inflamação articular e as modificações histológicas e da expressão gênica do músculo de animais diabéticos não têm sido desenvolvidos. Outro parâmetro importante que deve ser estudado é a atividade da enzima creatina cinase (CK) uma vez que sua atividade pode ser alterada em função de várias causas como na injúria, distrofia, inflamação ou necrose da musculatura esquelética ou cardíaca. O presente projeto teve por objetivo estudar o efeito da inflamação aguda do tornozelo sobre os músculos Sóleo (SO) e Tibial Anterior (TA), investigando a presença de alterações histológicas, alterações na expressão gênica dos atrogenes atrogina-1e MuRF-1 e na atividade da creatina cinase em músculos de ratos não-diabéticos e diabéticos com e sem tratamento insulínico. Foram estudados 54 ratos Wistar (150g). A indução do diabetes foi por via intraperitoneal com 50mg de estreptozotocina (STZ) por Kg de peso corporal, dissolvida em tampão citrato pH 4,5. Para a inflamação a articulação do tornozelo foi mantida em 90° localizando a fossa distal e posterior ao maléolo lateral, introduzindo nesta zona uma agulha de diâmetro 26 com 0.03ml carragenina a 3%. Os grupos de animais diabéticos com terapia insulínica foram tratados duas vezes ao dia (as 8h e 17h) com 2,5 U de insulina NPH durante 13 dias, totalizando 5U/dia A insulina foi administrada por via subcutânea. Os animais foram divididos em 9 grupos com 6 ratos/grupo: i) animais não diabéticos: Controle (C); Citrato (Ci); Salina (S); Inflamado (Ca); ii) animais diabéticos: Diabético (D); Diabético tratado com Insulina (DI); Diabético Salina (DS); Diabético e Inflamado (DCa); Diabético e Inflamado, tratado com insulina (DCaI). Os músculos TA e SO destes animais foram avaliados após 13 dias de diabetes e 3 dias de inflamação da articulação tíbio-társica direita. O diabetes juntamente com a articulação inflamada promove uma maior expressão de genes relacionados à atrofia, com diminuição de massa nos dois músculos estudados, sendo que a insulina não foi capaz de reverter essa situação no músculo TA. Demonstrando que a regulação é diferente entre músculos de contração lenta (SO) e músculos de contração rápida (TA). Houve menor atividade da CK somente no SO do grupo DCa ($p < 0.05$), não sendo encontrada diferença entre os grupos no TA. Tanto a inflamação como a efusão da articulação tíbio-társica regulam a expressão de genes relacionados à atrofia nos músculos TA e SO, em ratos não-diabéticos e diabéticos, demonstrando maior intensidade à atrofia ratos diabéticos com a articulação inflamada.

Palavras-chave: diabetes, inflamação, atrogenes, atrofia muscular, creatina cinase.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is one of the most serious public health problems, which diminishes the quality of life of the patient and leads to many chronic complications, one of which is muscle atrophy. When a joint is injured, the muscle responds with a process of atrophy in which a change occurs in the muscle tissue functionally related to the joint. However, no experimental studies have been carried out to clarify the relationship between joint inflammation and changes in the histology and gene expression of muscles in diabetic animals. Another important variable that should be studied is the activity of the enzyme creatine kinase (CK), since it can be altered under various conditions, such as injury, muscular dystrophy, inflammation or necrosis of skeletal or heart muscle. The aim of this project was to study the effect of acute inflammation of the ankle on the soleus (SO) and tibialis anterior (TA) muscles, by noting the histological changes, changes in the expression of the atrophy-related genes (atrogenes) atrogen-1 and MuRF-1 and activity of CK in muscles of non-diabetic and diabetic rats, treated and untreated with insulin. We studied 54 Wistar rats (150g). Diabetes was induced by intraperitoneal injection of 50mg streptozotocin (STZ) per kg body weight, dissolved in citrate buffer (pH 4.5). To induce inflammation, the ankle joint was held at 90°, with the fossa located distal and posterior to the lateral malleolus, and inserting a 26-gauge needle into this region, with 0.03mL of 3% carrageenan. The groups of insulin-treated diabetic animals were treated twice a day (at 8 am and 5 pm) by subcutaneous injection with 2.5 IU of NPH insulin, totaling 5 IU/day, for 13 days. The animals were divided into 9 groups of 6 rats per group: i) non-diabetic animals: control (C), citrate (Ci), saline (S), inflamed (Ca); ii) diabetic animals: diabetic (D), diabetic treated with insulin (DI), diabetic saline (DS), diabetic inflamed (DCa) and inflamed diabetic treated with insulin (DCaI). The TA and SO muscles of these animals were assessed after 13 days of diabetes and 3 days of inflammation of the right tibio-tarsal (ankle) joint. Diabetes combined with an inflamed joint promoted an increased expression of genes related to atrophy, leading to a reduction in the mass of both muscles. Insulin was unable to reverse this situation in the TA muscle, demonstrating that the regulation is different between slow-twitch muscles (SO) and fast-twitch muscles (TA). CK activity was lower only in the SO muscle of the DCa group ($p < 0.05$), no difference being found between groups in CK activity in the TA. Both inflammation and effusion of the ankle joint regulated the expression of atrogenes in TA and SO muscles in non-diabetic and diabetic rats, the diabetic rats with an inflamed joint showing atrophy of greater intensity.

Keywords: diabetes, inflammation, atrogenes, muscular atrophy, creatine kinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Homeostase da glicose	21
Figura 2. Reação da enzima creatina cinase	33
Figura 3. Fluxograma para divisão dos grupos de estudo.....	40
Figura 4. Fluxograma do experimento	41
Figura 5. Mecanismos propostos de toxicidade induzida pela STZ	43
Figura 6. Recipiente de vidro utilizado para medição do volume.....	45
Figura 7. Medida de volume do tornozelo	45
Figura 8. Divisão do músculo TA após sua retirada	46
Figura 9. Variação da Massa Corporal	54
Figura 10. Glicemia dos ratos nos diferentes grupos experimentais 1 dia após aplicação de STZ	56
Figura 11. Massa do músculo TA dos diferentes grupos experimentais 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito e 10 dias da injeção de STZ	58
Figura 12. Massa do músculo SO dos diferentes grupos experimentais 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ.....	59
Figura 13. Cortes transversais das fibras musculares dos músculos TA corados com azul de toluidina	60
Figura 14. Área de Secção Transversa das fibras do músculo TA dos diferentes grupos experimentais, 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ.....	61
Figura 15. Expressão Gênica da atrogina-1 no músculo TA dos diferentes grupos experimentais 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ	62

- Figura 16.** Expressão Gênica do MuRF-1 no músculo TA dos diferentes grupos experimentais 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ 63
- Figura 17.** Expressão Gênica da atrogina-1 no músculo SO dos diferentes grupos experimentais 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ 64
- Figura 18.** Expressão Gênica do MuRF-1 no músculo SO dos diferentes grupos experimentais 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ 65
- Figura 19.** Níveis musculares da atividade de CK do músculo TA dos diferentes grupos experimentais 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ 67
- Figura 20.** Níveis musculares da atividade de CK do músculo SO dos diferentes grupos experimentais 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ 68

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Primers construídos com senso e antisenso para atrogina-1 , MuRF-1 e GAPDH	49
Tabela II. Comparação do volume (média±desvio padrão) (ml) dos grupos	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: trifosfato de adenosina

AST: área de secção transversa

CK: creatina cinase

cDNA: fita de DNA complementar

DM: diabetes mellitus

DO: densitometria óptica

EDL: músculo extensor digital longo

E1: enzima de ativação

E2: enzima de conjugação – transporte

E3: enzima de ligação – ligases

GOD: glicose oxidase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IMA: inibição muscular artrogênica

LCA: ligamento cruzado anterior

MN α : motoneurônio alfa.

MuRF-1: muscle Ring Finger-1

NO: óxido nítrico

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: amplificação por reação em cadeia de polimerase

POD: peroxidase

PT: proteínas totais

RT: transcrição reversa

RMA: resposta muscular artrogênica

SO: músculo sóleo

STZ: estreptozotocina

SOD: superóxido dismutase

TA: músculo tibial anterior

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Diabetes.....	20
1.2 Diabetes e Músculo Esquelético.....	23
1.3 Vias Proteolíticas envolvidas na atrofia muscular.....	25
1.4 Processo Inflamatório.....	28
1.5 Modelo Inflamatório com carragenin.....	29
1.6 Resposta Muscular frente às modificações articulares.....	29
1.7 Atrofia Muscular por desuso.....	31
1.8 Creatina Cinase.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Animais	39
3.2 Grupos Experimentais.....	39
3.3 Modelo de indução do diabetes por STZ.....	41
3.4 Terapia insulínica.....	43
3.5 Modelo inflamatório.....	43
3.6 Glicemia.....	44
3.7 Volume.....	44
3.8 Retirada dos Músculos.....	45
3.9 Análise Histológica.....	46
3.10 Extração de RNA total.....	47
3.11 Transcrição Reversa.....	47
3.12 Real Time – PCR.....	48
3.13 Oligonucleotídeos primers.....	49

3.14	Determinação de Proteínas Totais.....	49
3.15	Determinação dos níveis de creatina cinase.....	50
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	52
5.	RESULTADOS	54
5.1	Massa Corporal.....	54
5.2	Glicemia.....	55
5.3	Massa dos Músculos TA e SO.....	57
5.4	Área de secção Transversa.....	59
5.5	Expressão Gênica no músculo TA.....	61
5.6	Expressão Gênica no músculo SO.....	63
5.7	Volume.....	65
5.8	Creatina Cinase.....	67
6.	DISCUSSÃO.....	70
7.	CONCLUSÃO.....	78
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

I ntrodução

1.0 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é um dos tecidos que apresentam grande plasticidade no corpo humano, sendo sua composição fundamental para a sua função de prover mobilidade ao sistema ósseo, gerar calor em resposta ao frio, além de captar parte da glicose circulante no organismo. Sua função pode ser modificada em resposta a mudanças na carga, atividade ou condições patológicas. Por isso períodos prolongados de desuso, desnervação e imobilização resultam em significativa atrofia muscular (LIEBER, 2002; BRUTON, 2002; ZHANG et al., 2006; FERREIRA et al., 2006). Assim os músculos esqueléticos são tecidos dinâmicos que podem alterar suas características fenotípicas proporcionando uma melhor adaptação funcional frente a estímulos variados.

O músculo esquelético apresenta uma organização anatômica muito bem definida. Ele é constituído por fibras recobertas por uma bainha de tecido conjuntivo fibroso, o endomísio. Essas fibras individuais são agrupadas por um segundo tecido conjuntivo, o perimísio, para formar fascículos de fibras. Finalmente todos os fascículos são agrupados para formar o músculo que é rodeado por um denso tecido conjuntivo, o epimísio. Diferente dos aspectos histológicos e morfológicos que são iguais para todas as fibras do músculo esquelético, as respostas fisiológicas e bioquímicas podem ser diferentes de acordo com o estímulo na qual as fibras são expostas (FLUCK; HOPPELER, 2003).

A composição do músculo em relação aos diferentes tipos de fibras depende da função. As fibras musculares podem ser classificadas em dois tipos principais: I e II. Isso se dá por meio de características fisiológicas e bioquímicas. As fibras tipo I são de contração lenta gerando energia através de processos aeróbicos, com menor velocidade de propagação do cálcio, e apresentam grande número de mitocôndrias, sendo muito resistente à fadiga; recebe maior vascularização e contém altos níveis de mioglobina, tem baixa velocidade de contração, relaxamento e baixa capacidade de gerar força. As fibras do tipo II são de contração rápida com maior velocidade de contração e obtêm energia através de processos anaeróbicos. Tem alta capacidade de condução do potencial de ação, rápida propagação de cálcio, com alta velocidade de contração e relaxamento, grande capacidade de gerar força, pouca resistência e capilarização, baixo número de mitocôndrias e reduzida quantidade de mioglobina. As fibras de contração

rápida são classificadas em vários subtipos, com base na imunohistoquímica com anticorpos específicos para a cadeia pesada de miosina (MHC), podendo ser dos tipos IIa, IIb, IIc e IId (BOFF, 2008). A fibra IIa é uma fibra rápida intermediária, possuindo potencial moderadamente desenvolvido para geração de força tanto por processos aeróbicos e anaeróbicos, sendo portanto de contração rápida porém com certa resistência a fadiga. A fibra IIb possui maior potencial anaeróbico, sendo portanto de contração mais rápida porém mais fatigável que a IIa. Existem também as fibras híbridas, tipos IC, IIC, IIAC, IIAD, IIDA, IIBD e IIDB, formadas pela expressão de duas ou mais isoformas da MHC. Elas resultam da coexpressão de pares específicos de isoformas da MHC. Músculos posturais possuem uma maior proporção de fibras de contração lenta (tipo I) e resistente à fadiga, enquanto que os músculos envolvidos na locomoção são compostos predominantemente por fibras de contração rápida (tipo II) e menos fatigáveis (LIEBER, 2002).

O principal tecido que mais utiliza a glicose é o cérebro, e de forma independente da insulina; segue em importância o músculo esquelético que difere do primeiro, uma vez que necessita da insulina para captação da glicose sanguínea. Indivíduos diabéticos apresentam ausência ou deficiência na produção de insulina e/ou resistência ao hormônio, o que leva a alterações no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídeos, e a desordens musculares como a atrofia muscular e a neuropatia periférica. O hormônio anabólico insulina sintetizado pelo pâncreas é mantido em níveis plasmáticos adequados devido a rigorosos mecanismos de regulação (CHONKAR et al., 2006). Há também mecanismos contra-reguladores, como a secreção dos hormônios: adrenalina, nor-adrenalina, cortisol e hormônio do crescimento, cuja ação é contrária à insulina para que ocorra a gliconeogênese.

As fibras musculares têm capacidade de alterar suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com os estímulos a que são submetidas, com o resultado refletindo na quantidade ou tipo das proteínas musculares. Esta capacidade adaptativa envolvendo diferentes componentes da fibra reflete a plasticidade muscular (BALDWIN; HADDAD, 2001; PILEGAARD et al., 2000; PETTE, 2002).

Alterações nas articulações também podem levar a atrofia muscular devido a diminuição do uso da articulação afetada pelo edema e/ou por dor, sendo assim, torna-se importante conhecer a resposta muscular esquelética frente às diversas situações como as alterações da fisiologia e biomecânica articular em músculo de ratos diabéticos.

1.1 Diabetes

O Diabetes Mellitus (DM) é um dos mais sérios problemas de saúde pública, devido ao aumento de sua prevalência e de suas complicações; afeta a população de países em todos os estágios de desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o Brasil é o sexto país com maior número de pessoas com diabetes (SACCO et al., 2007), sendo que no mundo 285 milhões de pessoas adultas (entre 20 e 79 anos) são diabéticas e em 2030 é previsto um aumento de 7,7% com 439 milhões de adultos diabéticos. Os fatores que levarão a esse aumento no número de pessoas diabéticas são o crescimento e envelhecimento populacional, assim como a urbanização, associados a mudanças no estilo de vida. Esse aumento será maior em países em desenvolvimento, 69% de aumento de adultos diabéticos, enquanto países desenvolvidos sofrerão um aumento de 20% (SHAW et al., 2010).

O DM faz parte de um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção, produção e/ou resistência tecidual a insulina. A hiperglicemia crônica no diabetes está associada a danos de longo prazo referente à disfunção e falência de vários órgãos e tecidos especialmente olhos, rins, nervos, vasos sanguíneos, músculos cardíaco e esquelético. Essas complicações crônicas contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade, ocasionando perda da qualidade de vida do diabético (FERNANDES et al., 2001; COMMITTEE REPORT , 2003; SACCO et al., 2007).

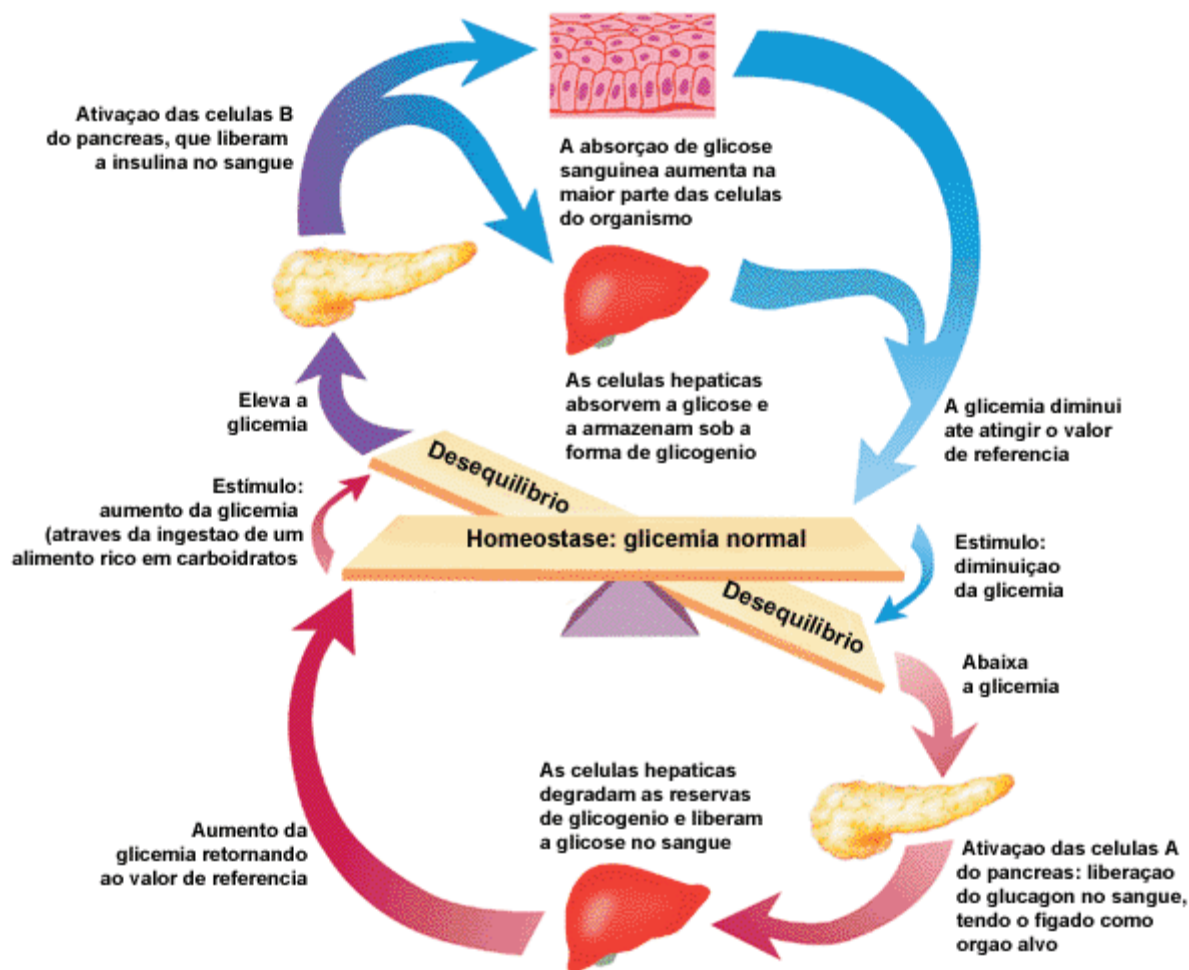


Figura 1. Homeostase da Glicose

(retirada de <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/diabetes/diabetes-mellitus-6.php>)

Os processos de captação e liberação da glicose são regulados por hormônios. A insulina é o mais importante desses hormônios, uma vez que é o único hormônio capaz de diminuir os níveis de glicose no sangue mantendo sua homeostasia, como apresentado na Figura 1. A insulina é sintetizada e secretada pelas células beta (células β) das ilhotas de Langerhans do pâncreas de acordo com a demanda do organismo, e consegue diminuir os níveis de glicose no sangue promovendo a sua captação por vários tipos de células, entre elas miócitos, adipócitos e hepatócitos. No tecido adiposo, a insulina facilita a conversão de glicose em ácidos graxos (lipogênese) e inibe a quebra de lipídeos (lipólise). No fígado, a insulina estimula a conversão de glicose em glicogênio e ácidos graxos, além de diminuir a formação de glicose a partir de outras fontes como a conversão de aminoácidos em glicose pela neoglicogênese. Outros hormônios, entre eles o glucagon, tem efeito contrário a insulina e aumentam os níveis

de glicose no sangue através da estimulação da quebra do glicogênio para liberação de glicose (glicogenólise) e aumento da velocidade da gliconeogênese (CARVALHEIRA et al., 2002).

Com base em sua etiologia o DM é classificado em dois tipos principais, a diabetes do tipo 1 (insulino-dependente), uma condição em que as células beta do pâncreas não produzem ou produzem muito pouco insulina; e a diabetes tipo 2 (não insulino-dependente), considerada como uma condição na qual existe uma deficiência das células β e/ou resistência à insulina nos tecidos periféricos (SATO et al., 2006). Indivíduos com maior risco de desenvolver o diabetes tipo 1 podem, muitas vezes, ser identificados através de prova sorológica para auto-imunidade, devido ao processo patológico que ocorre nas ilhotas pancreáticas.

O diabetes tipo 1 é uma forma mais frequente entre crianças e adolescentes, e resulta da incapacidade progressiva do pâncreas em produzir insulina. A velocidade de destruição das células β é bastante variável, sendo rápida em algumas pessoas (principalmente crianças) e lenta em outras (principalmente adultos). No diabetes tipo 1 os pacientes, especialmente crianças e adolescentes, podem apresentar cetoacidose como a primeira manifestação da doença, que é um quadro grave de descompensação diabética com risco de vida iminente. O DM tipo 2, com a hiperglicemia moderada, pode rapidamente evoluir para hiperglicemia grave e/ou cetoacidose na presença de infecção ou outra condição de estresse. Muitos desses indivíduos com este último tipo de diabetes podem eventualmente se tornarem dependentes de insulina para a sobrevivência, a fim de promover redução da glicemia e prevenção da cetoacidose, podendo a insulina exógena ser instituída assim que o diagnóstico estiver estabelecido (COMMITTEE REPORT, 2003; MANNA, 2007).

Para o diabetes tipo 2 o grau de hiperglicemia pode causar danos patológicos e mudanças funcionais em vários tecidos-alvo, sem apresentar sintomas clínicos, podendo o diabético não detectar a doença por um longo período de tempo. Durante esse período é possível demonstrar anormalidade no metabolismo de carboidratos, sendo detectado pelos níveis de glicose no plasma, estando o indivíduo em jejum e também após uma carga oral de glicose (COMMITTEE REPORT, 2003).

O diabetes tipo 2 é de aparecimento lento, e frequentemente passa despercebido. Possui fator hereditário e relação bem estabelecida com a obesidade e o sedentarismo. Neste tipo de diabetes há uma alteração no metabolismo de glicose e lipídios caracterizada por hiperglicemia crônica, resistência à insulina em músculo

esquelético, fígado e tecido adiposo. O organismo inicialmente compensa a resistência à insulina com uma hipersecreção do hormônio, mas com o tempo ocorre exaustão das células β levando a deficiência insulínica, e aumento da glicemia. Assim, ao menos inicialmente, e muitas vezes durante toda a sua vida, esses diabéticos não necessitarão de insulina para sobreviver (VIOLLET et al., 2009; SURAMPUDI et al., 2009; COMMITTEE REPORT, 2003).

Os sintomas característicos do diabetes devido à hiperglicemia são: poliúria (micção freqüente), polidipsia (ingestão de grandes volumes de água) e glicosúria (excreção de glicose na urina); além de poliastenia (perda de peso), polifagia (fome excessiva) e visão desfocada. Com a progressão da doença iniciam as complicações como retinopatia com perda potencial da visão; nefropatia levando à insuficiência renal; desenvolvimento da neuropatia periférica; úlceras nos pés, amputações, e neuropatia autonômica que causa sintomas gastrintestinais, geniturinário, cardiovasculares e disfunção sexual. Pacientes com diabetes tem maior incidência de aterosclerose cardiovascular, vascular periférica e doença cerebrovascular, assim como hipertensão e atrofia muscular esquelética (COMMITTEE REPORT, 2003; CHONKAR et al., 2006).

1.2 Diabetes e Músculo esquelético

As desordens metabólicas que ocorrem no DM afetam vários sistemas, o que inclui os músculos esqueléticos. Estas mudanças compreendem defeitos estruturais e metabólicos (PELIT et al., 2008). Os músculos esqueléticos convertem energia química em movimento e força, variando de atividades rápidas e intensas a atividades de trabalho contínuo e de baixa intensidade (BERCHTOLD et al. 2000; HOOD, 2001; PETTE, 2002). Músculos como o sóleo (SO) realizam atividades lentas, mas estáveis, como a tensão postural. Já músculos como o tibial anterior (TA) realizam atividades mais intensas e rápidas. A maioria dos músculos contém uma mistura de tipos de fibras, mas alguns músculos possuem maior quantidade de um tipo em relação a outro. O músculo SO, por exemplo, possui maior quantidade de fibras de miosina de cadeia leve I e IIa, que confere a ele características ideais para a manutenção da tensão postural (ARANY et al., 2007). A insulina é um potente estimulador do transporte de glicose no músculo (HIGAKI et al., 2001), sendo que as ações da insulina no músculo esquelético são influenciados pelo tipo de fibra (HICKEY et al., 1995). Os músculos diabéticos com predominância de fibras lentas (tipo I) exibem maior sensibilidade a insulina e maior

captação de glicose do que músculos com predomínio de fibras rápidas (tipo II) (SNOW; THOMPSON, 2009).

A captação da glicose mediada pela insulina difere nos grupos musculares, pois é dependente dos transportadores de glicose muscular conhecidos como GLUT-4. As fibras musculares do tipo I expressam mais transportadores de glicose da membrana (GLUT-4) (HARDIN, et al., 1993) uma vez que estas fibras utilizam preferencialmente a glicose captada, do que aquela estocada na forma de glicogênio dentro do músculo.

Tanto a insulina quanto o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) são determinantes importantes de massa muscular, por promoverem o crescimento por consequência de estimulação da síntese protéica e também a supressão da degradação protéica. IGF-1 promove o crescimento muscular por estímulo e diferenciação das células satélites e mionúcleos (HESZELE; PRICE, 2004). É importante salientar que a manutenção da massa muscular ocorre pelo equilíbrio da síntese e degradação das proteínas musculares (GOLDSPINK, 1999). Portanto, qualquer estímulo que provoque mudança na síntese e/ou degradação das proteínas musculares pode levar a um significativo impacto sobre a massa muscular. Desse modo, quando ocorre diminuição da síntese e/ou aumento da degradação protéica, ocorre a atrofia muscular. Esta pode ser definida como a perda involuntária de 10% da massa muscular, como consequência de condições catabólicas como é o caso do DM e da sarcopenia, está associada à redução da qualidade de vida e aumento da morbidade e mortalidade (HESZELE; PRICE, 2004). Nessas condições catabólicas a perda de massa muscular é notável, seja ela pela proteólise muscular elevada ou pela apoptose dos mionúcleos estar acelerada em idosos.

No DM a ausência de insulina gera profundas alterações metabólicas no músculo esquelético, como redução da captação de glicose e aminoácidos, redução da síntese de proteínas e aumento na proteólise (COTTER et al., 1989). O processo de atrofia é caracterizado pela ativação de diferentes processos proteolíticos, em particular um sistema de degradação de proteínas dependente de trifosfato de adenosina (ATP) conhecido como a via ubiquitina-proteassoma. (PEPATO et al., 1996). Entre os marcadores genéticos da atrofia muscular dois genes se destacam: a atrogina-1/MAFbx e MuRF-1, havendo aumento em suas expressões quando há perda da massa muscular.

Chonkar e colaboradores (2006) demonstraram que em ratos diabéticos tipo 1, induzidos por estreptozotocina (STZ), após 6 a 8 semanas, ocorreu uma perda significativa de peso e de massa muscular nos músculos extensor digital longo (EDL) e SO. Além disso, foi verificada a redução da força de contração muscular nos mesmos

músculos de ratos diabéticos, quando comparados ao grupo controle. Os autores concluíram que o diabetes induzida por STZ provoca atrofia muscular associada à redução na força de contração dos músculos SO (fibras lentas) e EDL (fibras rápidas).

A atrofia muscular e a neuropatia são complicações muito importantes do DM. A neuropatia diabética é uma complicação preocupante e responsável por graves incapacidades (CHONKAR et al., 2006), atingindo o sistema nervoso periférico o que pode levar a transtornos tróficos da pele e da estrutura osteoarticular do pé, com propensão a acarretar o chamado “pé diabético”. Os movimentos mais afetados são flexão, inversão e eversão do tornozelo e movimentos da primeira articulação metatarsofalangeana. A atrofia muscular observada nos pacientes com neuropatia diabética pode causar deformidades, diminuição da amplitude de movimento do pé e tornozelo (SACCO et al., 2007).

Os nervos sural e o fibular são os primeiros a serem acometidos no decorrer da progressão da neuropatia diabética, sendo este o responsável pela inervação do músculo TA, motor primário da flexão do tornozelo. Desse modo o TA é um dos primeiros músculos a serem comprometidos na neuropatia diabética (SACCO et al., 2007).

Diabéticos com mais de 50 anos podem apresentar a neuropatia proximal de membros inferiores caracterizada por um grau variável de dor e perda sensorial com fraqueza muscular proximal e atrofia. O aparecimento da neuropatia é agudo ou subagudo. Os pacientes queixam-se de dormência ou dores da face anterior da coxa, muitas vezes do tipo queimação, havendo piora à noite e por contato. Dificuldade em andar e subir escadas são comuns, devido à fraqueza dos músculos quadríceps e iliopsoas (SAID, 2007).

1.3 Vias proteolíticas envolvidas na atrofia muscular

Existem quatro vias proteolíticas conhecidas que quando tem suas atividades aumentadas podem contribuir para a atrofia muscular: a via das catepsinas ou lisossomais, via das calpaínas dependentes de cálcio, via das caspases e via da ubiquitina proteassoma ATP-dependente.

Na via proteolítica lisossomal, existem as proteases catepsinas B, D, H e L e outras hidrolases ácidas, presentes nos lisossomos. Essa via apresenta uma pequena influência sobre a proteólise total, assim como ocorre com as vias dependentes de

cálcio. As catepsinas não degradam proteínas citosólicas, como as proteínas miofibrilares, seu papel maior está na degradação de proteínas de membrana como receptores, canais de íons e transportadores, proteínas endocitadas e organelas. (JACKMAN & KANDARIAN, 2004, MACHADO, 2009, POWERS et al., 2007).

Outra via de proteólise é a via das calpaínas, que são proteases dependentes de Ca^{2+} envolvidas na organização do citoesqueleto, ciclo celular e apoptose. As fibras músculo-esqueléticas contêm as calpaínas-1, -2 e -3. O aumento das concentrações de Ca^{2+} intracelulares pode ativar as calpaínas presentes no disco Z do sarcômero capazes de degradarem proteínas importantes da arquitetura do sarcômero como a nebulina, titina, proteína-C, vinculina. Com a clivagem da titina ocorre a liberação das miofibrilas para serem ubiquitinadas e degradadas pelo proteassoma (JACKMAN & KANDARIAN, 2004, POWERS et al., 2007, ZHANG et al., 2007).

Outra via proteolítica importante é a via das caspases, responsável pela apoptose ou morte celular programada, de modo que as caspases tornam as proteínas miofibrilares disponíveis para a ubiquitinação, uma vez que o sistema proteolítico ubiquitina proteassoma não é capaz de degradar proteínas intactas. (MACHADO, 2009, POWERS et al., 2007).

Finalmente, a via ubiquitina-proteassoma, mediadora da degradação protéica no músculo esquelético, e tem atividade especialmente aumentada em condições de atrofia muscular. É importante observar que para a atuação dessa via é necessária a ação primária da via das calpaínas e/ou caspases. A via ubiquitina-proteassoma, principal via de proteólise muscular, promove a degradação de proteínas miofibrilares através da atividade do proteassoma, por meio da adição de uma cadeia de poliubiquitina na proteína a ser degradada (substrato), sendo esse processo altamente modulado. Isso se dá por meio da ação de três enzimas, E1 (enzima de ativação), E2 (enzima de conjugação-transporte) e E3 (enzima de ligação - *ligases*), sendo exemplo dessa enzima a atrogina-1 e o MuRF-1. A ativação da ubiquitina pela E1 é transferida a E2, que formando um complexo ativado, se ligam a E3, que sua vez reconhece o substrato (ubiquitinação), devido ao domínio FBox das moléculas. Assim as ligases E3 ubiquitinam tipos específicos de proteínas determinando quais são alvos para a degradação pelo proteossoma (GOMES et al., 2001, JACKMAN & KANDARIAN, 2004, ZHANG et al., 2006).

Duas ligases de ubiquitina (E3) específicas do músculo aumentam significativamente em presença de atrofia: *Muscle Ring Finger-1* (MuRF-1) e *Muscle Atrophy Fbx* (MAFbx) ou atrogina-1. Os níveis de RNA mensageiro (RNAm) para atrogina-1 aumentam rapidamente antes que a diminuição do peso seja detectada e mantêm sua elevação quando a proteólise é acelerada, sugerindo assim que os níveis de RNAm da atrogina-1 são importantes na manutenção da proteólise de diferentes etiologias como desnervação, imobilização e suspensão (SACHECK et al., 2007).

A atrogina-1 é constituída por um domínio *F-box*, o qual caracteriza uma classe de proteínas ubiquitina-ligases (E3), chamadas de complexo *SCF* (proteína *Skp1*, proteína *Cal*, proteína *Ring Fingers* e proteína *F-Box*) (GOMES et al., 2001). A atrogina-1 é um exemplo de proteína *F-box*, e desempenha um papel primordial na ligação da proteína que será ubiquitinada e degradada (LECKER et al., 2004).

Além da via de degradação de mioproteínas pela atrogina-1, outra proteína ubiquitina-ligase E3 chamada MuRF-1 (*Muscle RING Finger 1*) também exerce papel de destaque na quebra de proteínas (BODINE et al., 2001; CAO et al., 2005). Os membros da família MuRF-1 foram encontrados associados a componentes miofibrilares, como a titina na linha M do sarcômero, sendo estes componentes possíveis alvos da degradação pela MuRF-1 no músculo atrofico.

Outro fato interessante é a resistência à atrofia muscular demonstrada em animais knockout para os genes da atrogina-1 e MuRF-1. Ratos normais apresentaram atrofia nos músculos gastrocnêmios, em 7 e 14 dias após desnervação. Já animais geneticamente modificados, apresentam fenótipo idêntico aos normais, como morfologia e peso normal dos músculos, quando submetidos à desnervação demonstrando uma significativa atenuação do processo de atrofia muscular, durante os mesmos 7 e 14 dias dos animais normais (BODINE, 2001). Sendo esses resultados demonstrativos da importância da via de ubiquitinação como mediadora da atrofia muscular, é possível também utilizar ambos MuRF-1 e a atrogina-1 como marcadores precoces da atrofia muscular.

Um fator de transcrição nuclear envolvidos em processos de atrofia durante processos inflamatórios é o NF- κ B (Nuclear Fator kappa B - dependente). Este fator está associado à perda de massa muscular na inflamação crônica, pela atividade de citocinas como o TNF- α ou a IL-1, e na ausência dessas citocinas, é ativado por

espécies reativas de oxigênio (GUTTRIDGE, 2004; LADNER, 2003). Sua ativação se dá por meio da ubiquitinação e degradação de sua proteína inibitória I κ B, que em estado normal encontra-se ligada ao NF- κ B mantendo-o no citoplasma (GLASS, 2005, SANDRI, 2008,

1.4 Processo Inflamatório

A inflamação é um processo que acompanha a maior parte das doenças articulares e as complicações em sua resolução são uma limitação para o rápido retorno do sujeito às atividades de vida diária.

Quando um estímulo endógeno ou exógeno causa uma alteração na fisiologia normal de um tecido (COTRAN et al., 2000), inicia-se uma inflamação local. Esta constitui uma resposta de proteção para livrar o organismo da causa inicial da agressão tecidual e de suas consequências (COTRAN et al., 2000). A inflamação se manifesta clinicamente através de cinco sinais e sintomas dor, rubor, calor, tumor e alteração na função.

A resposta inicial ao agente agressor é chamada de inflamação aguda ocorrendo nesta fase alterações no calibre vascular, com constrição arteriolar e posterior dilatação das arteríolas pré-capilares, abertura dos esfíncteres capilares e dilatação das vênulas, sendo esta seqüência responsável pela hiperemia, o que leva a exsudação. Nesta etapa também ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios como a histamina, serotonina e prostaglandinas. Devido a um aumento do fluxo sanguíneo há calor e rubor. Já a resposta tardia é chamada de inflamação crônica caracterizada por infiltração de células mononucleares, refletindo uma reação à agressão persistente. Como a pressão osmótica intravascular diminui e aumenta a pressão osmótica intersticial, juntamente com o aumento da pressão hidrostática dos vasos, causa um desequilíbrio das forças, levando à saída de células, macromoléculas e fluidos do sistema vascular, para o tecido intersticial, gerando o edema (COTRAN et al., 2000).

Esse acúmulo de líquido piora o processo inflamatório, resultando em um ambiente tóxico, que leva a morte celular e necrose tecidual (MICHOLOVITZ, 1996), isso pode dificultar ou interromper a troca de nutrientes, atrasando o processo de cicatrização e recuperação do tecido. Devido ao acúmulo de líquido no interior do interstício celular, há o aparecimento da dor, levando a imobilização da zona lesada.

Pode ocorrer fibrose, aderências e rigidez da estrutura, trazendo sequelas e aumento do período de recuperação do local inflamado (GRIFFIN et al.,1990; COTRAN et al., 2000).

1.5 Modelo inflamatório com carragenina

Neste estudo o modelo inflamatório utilizado no experimento, foi o modelo da carragenina. As carrageninas são conhecidas desde o século XIX, e eram extraídas de algas vermelhas e utilizadas como agente emulsificante em alimentos caseiros. Carrageninas são classes de galactoses sulfatadas, biomoléculas constituintes da parede celular de diferentes espécies de algas marinhas vermelhas (FERREIRA, 2005).

As carrageninas são utilizadas em modelos de inflamação local aguda desde 1962. Há três tipos principais de carragenina: κ (kappa), λ (lambda) e ι (iota). Elas ativam um grande número de mediadores inflamatórios tais como produtos do metabolismo do ácido araquidônico, principalmente prostaglandina I₂, as bradicininas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), substância P, neurocininas, citocinas, óxido nítrico, entre outros (FERREIRA, 2005).

Inicialmente na inflamação causada pela carragenina ocorre infiltração de neutrófilos no espaço perivascular, acompanhado da liberação local de compostos como o glutamato, aspartato, substância P, histamina e serotonina. (SLUKA; WESTLUND, 1993, NANTEL et al., 1999; HONG, 2002; LAWANDA et al., 2000; TAN-NO et al., 2006). Estas substâncias geram edema e sensibilizam os aferentes primários resultando em hiperalgesia primária (HARGREAVES et al., 1988). Após produção elevada de óxido nítrico, prostaglandinas, ERON e ciclo-oxigenases, os neurônios do corno dorsal da medula são ativados gerando sensibilização central, espinhal ou supra-espinhal, o que junto com o aumento dos nociceptores periféricos, manifesta-se como hiperalgesia secundária (SLUKA; WESTLUND, 1993; TAN-NO K. et al., 2006; SALVEMINI, 1996). Essa resposta pode ser encontrada nas áreas adjacentes à lesão e algumas vezes em localizações distantes.

1.6 Resposta Muscular frente às modificações articulares

Os resultados obtidos a partir de diversos estudos clínicos permitem associar a presença de alterações da estrutura e fisiologia articular, com modificações nas propriedades dos músculos funcionalmente relacionados à articulação (PALMIERI et al,

2003 e 2004; HOPKINS et al., 2004; WILLIAMS et al., 2004; SUETTA et al., 2007; PAP et al., 2004; FITZGERALD et al., 2004).

Em condições como a osteoartrite (OA), caracterizada pela degeneração crônica da cartilagem articular, diversos trabalhos têm mostrado que alterações na força muscular não estão relacionadas à dor nem à atrofia, o que sugere a presença de um mecanismo muscular específico causador da perda de força (GÜR et al., 2003). Neste tipo de pacientes não tem sido esclarecido se as mudanças musculares são produtos do desuso gerado pela OA, ou se na realidade ocorrem por mecanismos musculares específicos (HERZOG et al., 2003, PAP et al., 2004; SUETTA et al., 2007). Ainda em indivíduos com artrite reumatóide têm sido observado mudanças musculares como infiltrados de células mono-nucleares sem necrose, presença de células plasmáticas perto dos capilares, anormalidades mitocondriais (possivelmente por estresse oxidativo secundário à inflamação) e expressão de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) tipo II. No entanto, nestes pacientes as mudanças musculares estão associadas à miopatia inflamatória secundária à patologia ou miopatia inflamatória crônica em função do consumo crônico de corticoesteroides (MIRÓ et al., 1996; LINDEHAMMAR et al., 2004).

Outras condições articulares como meniscopatias e procedimentos como a artroscopia de joelho, mostraram diminuição na área de secção transversa do quadríceps, enquanto as lesões do ligamento cruzado anterior (LCA) evidenciaram modificações no padrão de recrutamento do quadríceps em atividades estáticas e dinâmicas (AKIMA; FURUKAWA, 2005; WILLIAMS et al., 2004; STOCKMAR et al., 2006).

Uma das possíveis explicações para a diminuição de força nas condições acima mencionadas é o mecanismo de Inibição Muscular Artrogênica (IMA), embora segundo a opinião de Palmieri e colaboradores (2004), um termo mais adequado deveria seria “Resposta Muscular Artrogênica”, levando em conta que alguns estudos têm mostrado facilitação (aumento reflexo H) da musculatura analisada. A IMA pode ser definida como “inibição reflexa contínua da musculatura que rodeia uma articulação depois de lesão das estruturas dessa articulação” (PALMIERI et al., 2004).

Outros autores têm mostrado também a relação entre a lesão articular e a alteração muscular. Stockmar e colaboradores (2006) analisaram as mudanças no

músculo vasto medial do quadríceps em indivíduos que sofreram ruptura do LCA e observaram que as fibras desse músculo sofreram mudanças estruturais e metabólicas importantes, mostrando atrofia, diminuição na atividade glicolítica, mudando para uma atividade mais oxidativa com aumento da resistência de modo a compensar a instabilidade do joelho. Akima e Furukawa (2005) registraram que 5,2 meses (em média) depois da artroscopia de joelho ou menisectomia, ocorre atrofia no quadríceps femoral em geral, sem modificações significativas nos músculos isquiotibiais e adutor maior.

Considerando estes estudos fica evidente que as mudanças articulares podem gerar alterações na estrutura e função dos músculos, sobressaindo a presença de atrofia, porém, os fatores subjacentes de tais modificações em ratos diabéticos não têm sido até hoje, suficientemente exploradas. Portanto, torna-se importante entender os mecanismos e vias de sinalização envolvida na atrofia muscular de ratos diabéticos expostos à inflamação do tornozelo, uma vez que não é conhecido se os animais diabéticos, tratados ou não com insulina, sofrem uma adaptação muscular diferente de animais normais nas mesmas condições de estudo.

1.7 Atrofia Muscular por desuso

Conforme os resultados de modelos animais de suspensão da pata traseira em ratos em imobilização, a atrofia por desuso tem sido atribuída a alterações na regulação do metabolismo protéico envolvendo diminuição na síntese e aumento na proteólise no músculo esquelético (SIU et al., 2005; FERREIRA et al., 2006; GUILLOT et al., 2006; ELEY et al., 2007); sendo iniciada pela redução na tensão e na atividade contrátil do músculo, e não por citocinas inflamatórias (ZHANG et al., 2006).

Entre os estudos que analisaram o efeito precoce do desuso sobre o músculo está o trabalho de Ferreira e colaboradores (2006), onde estes autores investigaram o efeito da suspensão da pata traseira de ratos sobre a resposta de seus miócitos e outras células não musculares como as endoteliais e fibroblastos, e a resposta apoptótica. Os resultados mostraram que a relação da expressão DNA/proteínas mudou na primeira semana, refletindo-se assim uma diminuição no conteúdo de proteínas e do peso muscular neste período. Também houve um aumento notável (200%) na atividade mitótica de células não musculares nas primeiras 6 horas de suspensão. Este último dado foi relacionado com o aumento do tecido conjuntivo muscular que gera atrofia

adicional pela diminuição no fluxo sanguíneo sobre a fibra muscular. Este trabalho mostrou também aumento na quantidade de mono e oligonucleossomos do citosol 6 horas depois, sendo assim evidente a presença de apoptose celular.

O efeito agudo do desuso foi também estudado por Sacheck e colaboradores (2007). Neste trabalho foram comparados os efeitos de dois modelos de desuso, a desnervação e a isolamento da coluna vertebral (laminectomia parcial das raízes T7 a S1, com secção bilateral dessas raízes), sobre a expressão de genes relacionados à atrofia, analisando também se os efeitos foram similares com os observados em modelos de doenças sistêmicas (como câncer e diabetes). Os resultados obtidos mostraram que no terceiro dia do desuso ocorreu perda do peso muscular, refletindo assim a habilidade do músculo para reagir de forma aguda ao estímulo. Um resultado notável deste estudo foi o aumento no RNAm de genes essenciais na atrofia rápida, atrogina-1 e MuRF-1, no terceiro dia; este aumento na expressão ocorreu concomitantemente a maior perda no peso muscular. Foi evidente também que 78% dos genes expressos nas doenças sistêmicas foram também expressos no modelo experimental de desuso, dando suporte à hipótese da existência de um programa comum final para mediar a atrofia, sem importar a origem ou a natureza dela.

Vários estudos mostram que o aumento na expressão da atrogina-1 e MuRF-1 em grupos de ratos com articulação inflamada, pode ser explicado através da ação da citocina TNF α . Estudos anteriores mostraram que a injeção de carragenina em uma articulação causa um processo inflamatório complexo, que envolve um grande número de mediadores, dentre eles o TNF α , uma citocina inflamatória envolvida no estímulo de processos proteolíticos na musculatura esquelética (REID; LI, 2001; RALL; ROUBENOFF, 2004 e DOGRA et al., 2007). Estas explicações derivam da observação que os níveis séricos de TNF α encontram-se bem elevados após administração de carragenina na pata de ratos (NISHIKORI et al., 2002).

Estudos para analisar o efeito do desuso sobre o músculo têm sido realizados em modelos de suspensão (imobilização) por períodos de 2 – 4 semanas, existindo só alguns trabalhos que analisaram o efeito precoce do desuso sobre o tecido muscular.

Siu e colaboradores (2005) encontraram que depois de 14 dias de suspensão, o músculo gastrocnêmio (GM) de ratos perdeu aproximadamente 30% do seu peso, aumentando em 119% a fragmentação de DNA e em 73% o conteúdo de Bx (proteína apoptótica). Os autores concluem que estes resultados sugerem que a apoptose pode ter

uma participação importante na atrofia nos músculos Tipo I e Tipo II, provavelmente mediante a eliminação de mionúcleos na fibra atrofiada.

Guillot e colaboradores (2006) mostraram que após três semanas de suspensão da pata de ratos o músculo SO sofreu 50% de perda no seu peso enquanto que o Extensor Digital Longo dos dedos (EDL) perdeu só 12% do peso; além disso no SO foi observada uma diminuição significativa ($p < 0.0001$) das fibras Tipo I e aumento das Tipo IIa. Foi também observada a presença de estresse oxidativo principalmente no SO, e segundo os autores, a produção de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ERON) oxidam a membrana lipídica da fibra muscular, produzindo lesão estrutural no músculo, contribuindo provavelmente com a atrofia.

Tem sido postulado também que o estresse oxidativo acelera a quebra de *Heat Shock Proteins* (HSP72), as quais têm uma função preventiva na atrofia muscular em períodos de atividade contrátil reduzida, além de diminuir a produção de radicais livres e/ou ERON (KU et al., 1995).

1.8 Creatina cinase (CK)

A Creatina Cinase catalisa a fosforilação reversível da creatina a partir de fosfato da adenosina trifosfato (ATP) formando ADP e fosfocreatina. A fosfocreatina é o principal composto fosforilado no músculo e sua concentração é cerca de oito vezes maior do que a do ATP. Quando o músculo contrai, o ATP é consumido formando ADP e essa enzima catalisa a refosforilação do ADP para formar o ATP, utilizando a fosfocreatina. Altos níveis de CK são encontrados no músculo estriado, cérebro e tecido cardíaco.

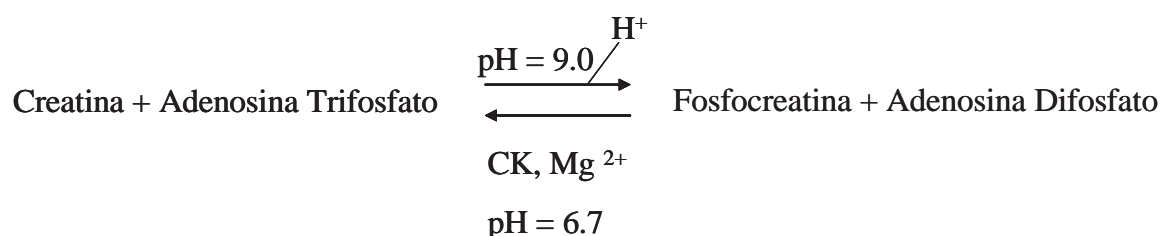


Figura 2. Reação da enzima Creatina Cinase.

A CK é um dímero composto por duas subunidades, a B (brain) e M (muscle). Elas são produtos de dois genes estruturais diferentes, podendo existir três pares de diferentes dímeros: BB, MB e MM. As isoenzimas são encontradas no citosol da célula ou associadas às estruturas miofibrilares. Existe uma quarta isoenzima que difere das outras imunologicamente e na mobilidade eletroforética, conhecida como CK – Mt, esta localiza-se entre as membranas mitocondriais. Tanto a CK – B, quanto a CK – M existem como homo e heterodímeros no citosol, sendo sua função evitar flutuações dos níveis de ATP durante os períodos de alta demanda energética, como na contração cardíaca e contração do músculo esquelético, atividade da bomba de Cálcio e, excitação neuronal. A forma mitocondrial (CK - Mt) é geralmente encontrada como octamero, com a função de formar fosfocreatina, esta vai para o citosol onde o fosfato de alta energia é transferido de volta para ATP pela CK - M para o consumo energético celular. (LIN et al., 2008; BESSMAN; CARPENTER, 1985).

Níveis elevados da CK são utilizados no auxílio-diagnóstico e no monitoramento terapêutico de várias doenças como Distrofia Muscular de Duchenne, Infarto do Miocárdio, Doenças musculares inflamatórias e degenerativas, Doenças do Sistema Nervoso Central como Isquemia Cerebral (LIN et al., 2008; BESSMAN; CARPENTER, 1985; BURTIS et al., 2006).

Considerando as alterações que ocorrem no tecido muscular de ratos diabéticos e com inflamação articular, a hipótese deste trabalho é que a inflamação do tornozelo em ratos diabéticos acarreta aumento na expressão gênica de genes relacionados à atrofia muscular, reduzindo também a área de secção transversa das fibras e alterando os níveis da CK muscular sendo este aumento mais acentuado que em animais normais. Para testar esta hipótese os músculos SO e TA de ratos diabéticos foram examinados após 3 dias de indução de inflamação articular (fase aguda).

Considerando as alterações da musculatura esquelética no DM e a resposta muscular devido à inflamação articular, torna-se importante conhecer os mecanismos envolvidos no início da atrofia muscular nessa condição de diabetes agudo (13 dias da injeção de STZ) sem e com tratamento insulínico. Além de que, até o presente momento não conhecemos estudos abordando a expressão de genes relacionados à atrofia dos músculos SO e TA concomitante à inflamação aguda do tornozelo em ratos diabéticos agudos.

Os resultados deste estudo podem ser relevantes para a clínica e ciência da reabilitação no sentido de que novas formas de tratamento ou aprimoramento das já existentes possam ser elucidadas e contribuir com a minimização das consequências da inflamação e com redução do período de recuperação, acelerando o retorno do indivíduo às suas atividades funcionais e melhora da qualidade de vida de pessoas com diabetes.

Objetivos

2.0 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da inflamação articular aguda (3 dias) sobre a expressão de genes de atrofia, a morfologia das fibras musculares e os níveis musculares da creatina cinase em ratos diabéticos tratados ou não com insulina.

Materiais e Métodos

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para o desenvolvimento do projeto foram utilizados 54 ratos Wistar com peso médio de 150 gramas, os quais permaneceram em caixas (4 animais por caixa), com livre acesso à água e a ração peletizada (Purina). Os animais foram provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP e foram mantidos em biotério do Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas, UNESP - Araraquara, com controle da luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h), temperatura (22-25°C) e umidade de 50-55%.

O experimento foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (*National Research Council*, 1996) e após a aprovação do Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp, Campus Araraquara (Protocolo CEP/FCF/CAr nº 31/2009).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados com os animais anestesiados usando injeção intraperitoneal de solução de xilazina 12 mg/Kg/peso corporal e quetamina 95 mg/Kg/peso por via intraperitoneal.

3.2 Grupos Experimentais

Os 54 animais foram distribuídos em um dos nove grupos, após pareamento, utilizando como critério a glicemia de cada animal (seis animais por grupo):

- 1) **Controle - C:** Animais normais (não-diabéticos), não receberam qualquer tipo de intervenção.
- 2) **Citrato - Ci:** Animais normais (não-diabéticos), receberam injeção intraperitoneal de tampão citrato.
- 3) **Salina - S:** Animais normais (não-diabéticos), receberam somente administração de salina na articulação do tornozelo direito.

- 4) **Inflamado - Ca**: Animais normais (não-diabéticos), receberam a administração de τ -carragenina na articulação do tornozelo direito.
- 5) **Diabético - D**: Animais que receberam injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ), e não receberam qualquer tipo de intervenção no tornozelo.
- 6) **Diabético Insulina - DI**: Animais que receberam injeção intraperitoneal de STZ e foram tratados com insulina e não receberam qualquer tipo de intervenção no tornozelo.
- 7) **Diabético Salina - DS**: Animais que receberam injeção intraperitoneal de STZ e receberam a administração de salina na articulação do tornozelo direito.
- 8) **Diabético e Inflamado - DCa**: Animais que receberam injeção intraperitoneal de STZ e foram submetidos à administração de τ -carragenina na articulação do tornozelo direito.
- 9) **Diabético e Inflamado, tratado com insulina - DCaI**: Animais que receberam injeção intraperitoneal de STZ, foram tratados com insulina e submetidos à administração de τ -carragenina na articulação do tornozelo direito.

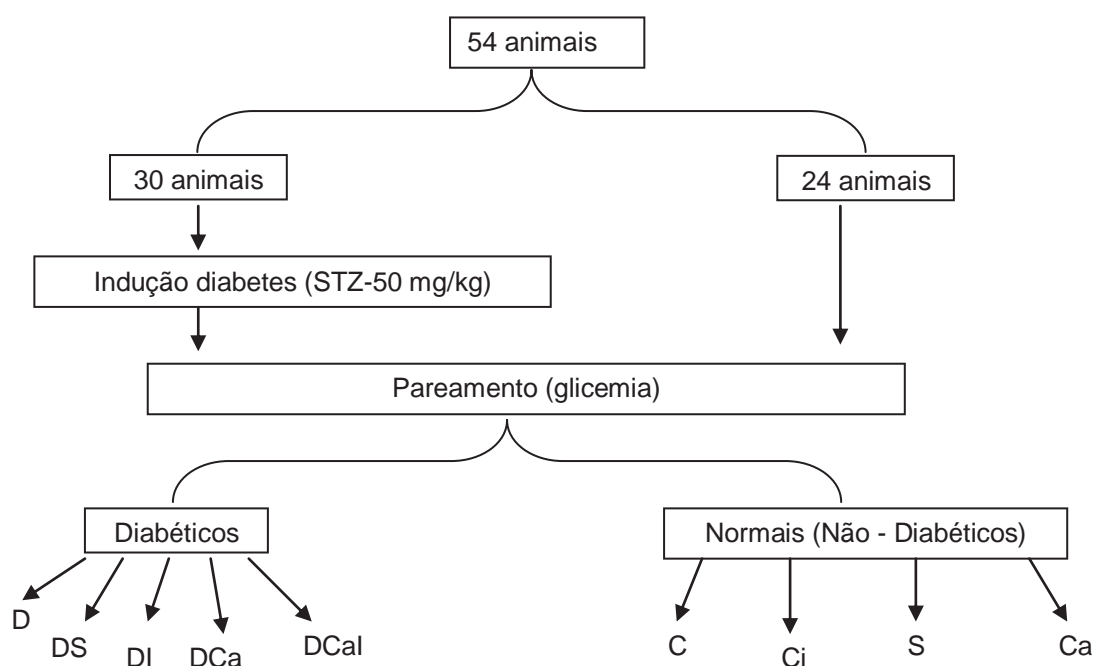
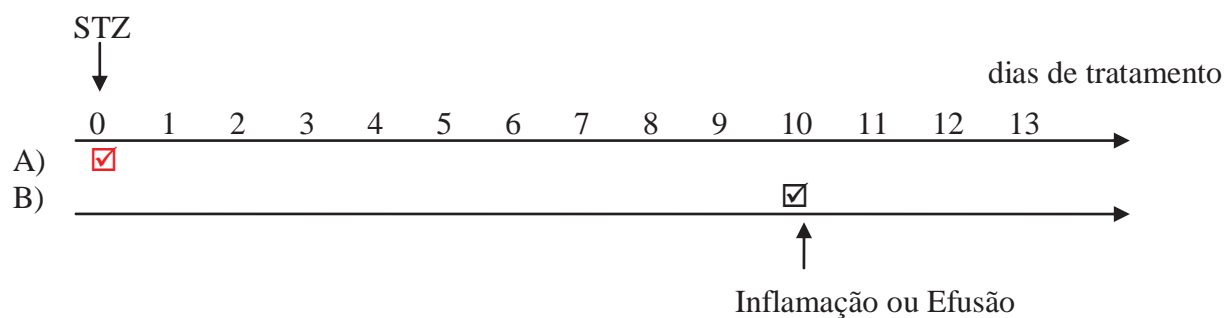


Figura 3. Fluxograma para divisão dos grupos de estudo.



- A) Administração de STZ
 B) Inflamação ou efusão

Figura 4. Fluxograma do experimento

3.3 Modelo de indução do diabetes por STZ

Para a indução do diabetes os animais foram submetidos a jejum prévio de 14-16 horas para administração por via intraperitoneal de 50mg de STZ por Kg de peso corporal, dissolvida em tampão citrato pH 4,5 (DELFINO et al., 2002).

A STZ é um antibiótico e agente alquilante que é capaz de inibir a secreção de insulina e causar um estado de Diabetes Mellitus (tipo I) cerca de uma hora após sua administração por via endovenosa em ratos. Isso acontece devido a sua estrutura, que destrói seletivamente as células β -pancreáticas, promovendo sua degranulação (GOODNER, 1973; ANDERSON et al., 1974).

A STZ possui, em sua estrutura (Figura 3), um grupo glicídico derivado da 2-deoxi-D-glicose que é reconhecido pelos transportadores de glicose das células β , permitindo sua entrada destas células (HERR et al., 1967; SCHEIN; LOFTUS, 1968 ANDERSON et al., 1974; GOODNER, 1973) e um grupo N-metil-N-nitrosouréia ligado ao carbono 2 da hexose, sendo este citotóxico para as células β -pancreáticas; a hexose é reconhecida pelos transportadores de glicose (GLUT-2), e faz com que a STZ se acumule nas células β pancreáticas. Células produtoras de insulina que não expressam GLUT2 em sua membrana plasmática são resistentes à STZ (ANDERSON et al., 1974; SCHEIN; LOFTUS, 1968).

O grupo N-metil-N-nitrosouréia inibe a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), permitindo o acúmulo de ERON, espécies tóxicas às células β (FISCHER; HAMBURGUER, 1979; GRANKVIST et al., 1981; PAPACCIO et al., 1986). O acúmulo dessas espécies reativas promove a degradação do DNA nuclear (SANDLER et al., 1983), havendo conseqüentemente a ativação de uma enzima reparadora de DNA, a poli (ADP-ribose) sintetase (PARP) (YAMAMOTO et al., 1981), que utiliza como substrato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). A elevação da atividade desta enzima provoca a depleção de NAD⁺ intracelular (SCHEIN & LOFTUS, 1968), levando à inibição da respiração celular, da produção de ATP e da síntese protéica (conseqüentemente queda na síntese de pró-insulina) (YAMAMOTO et al., 1981; UCHIGATA et al., 1982), havendo perda do balanço iônico celular com posterior apoptose (SANDLER et al., 1983).

Existem outros mecanismos pelos quais a STZ causa danos em células β -pancreáticas, por exemplo, a STZ, como sendo um potente alquilante, promove a alquilação direta do DNA através de radicais metil ou cátions metil, via sua decomposição (BENNET; PEGG, 1981; JOHANSSON; TJALVA, 1978). Essa metilação ocorre mais especificamente nas guaninas, induzindo a apoptose nas células β (MURATA et al., 1999). Outra hipótese é a geração de ERON (KWON et al., 1994; BEDOYA et al., 1996; KANETO et al., 1995; KRONCKE et al., 1995; LENZEN, 2008), que podem participar da toxicidade da molécula na promoção para a diabetogênese.

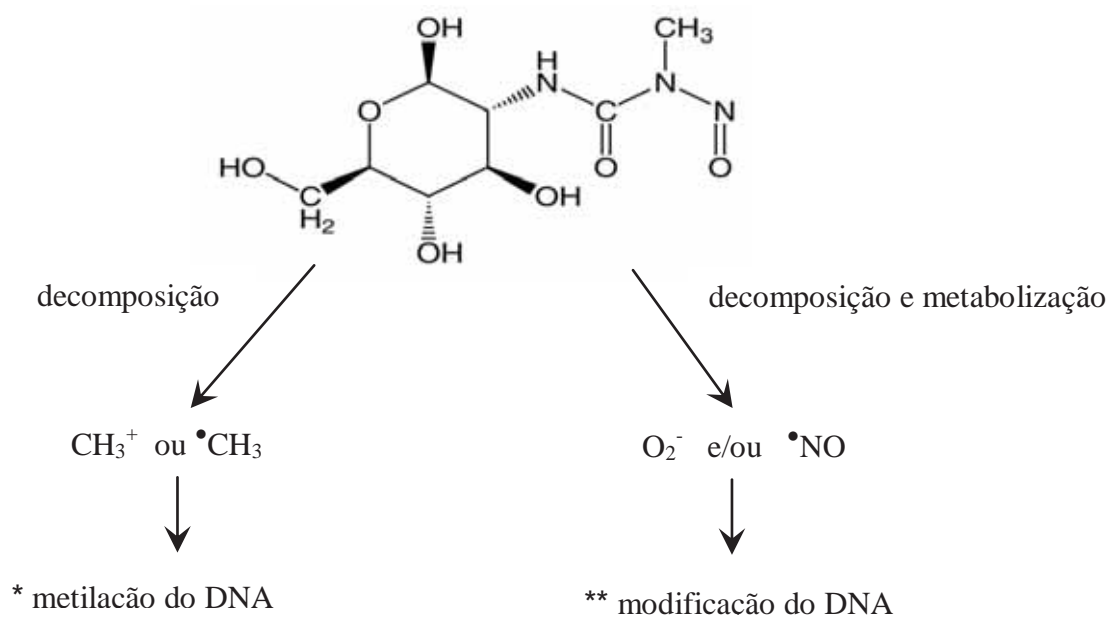


Figura 5. Mecanismos propostos de toxicidade induzida pela STZ.

* Metilacão do DNA induzida por CH_3^+ ou $\bullet\text{CH}_3$.

** Modificacão do DNA induzida por espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio.

3.4 Terapia insulínica

Os grupos de animais diabéticos com terapia insulínica foram tratados duas vezes ao dia (as 8h e 17h) com 2,5 U de insulina NPH (Humulin NPH U-100 – Lilly) por 13 dias, totalizando 5U/dia. A insulina foi administrada por via subcutânea.

3.5 Modelo inflamatório

Após serem pesados e anestesiados, os animais dos grupos Ca, DCa, DCaI e receberam 0.03ml de carragenina a 3% (Sigma Chemical Company - St. Louis, USA) na articulação tÍbio-tarsica direita, dissolvida em soluçao salina, seguindo o método descrito por Omote e colaboradores (2002), e Wang e colaboradores (2000). O procedimento consistiu em manter a articulação do tornozelo em 90°, localizando a fossa distal e posterior ao maléolo lateral, introduzindo nesta zona uma agulha (diâmetro 26), a qual foi dirigida distalmente para a cápsula articular até a percepção da perda de resistência, injetando nesse momento a carragenina. Os animais dos grupos S e DS receberam mediante o mesmo procedimento a injeção de 0.03ml de salina. Após tais procedimentos da injeção os animais permaneceram nas caixas sob condições já

descritas sem restrições na sua atividade e foram eutanaziados ao término do experimento.

3.6 Glicemia

Para determinar a glicemia dos animais utilizamos o método da glicose-oxidase. Foi retirado da cauda aproximadamente 1ml de sangue é obtido o plasma para a análise. A glicose-oxidase (GOD), presente no reagente catalisa a oxidação da glicose da amostra, em presença de H₂O, originando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio.



Numa segunda etapa da reação o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina e fenol, em reação catalizada por peroxidase (POD). Esta reação oxidativa de acoplamento forma a antipirilquinonimina (com absorção máxima entre 490 e 520 nm) proporcional à concentração de glicose na amostra.



3.7 Volume

Os volumes dos tornozelos direitos foram avaliados por um método baseado no princípio de Arquimedes. Este método é considerado o padrão-ouro e demonstrou alta reprodutibilidade (CCI = 0,99) com um erro inferior a 1%. Um recipiente de vidro foi especialmente produzido, com orifício e ducto para dar vazamento ao excesso de água e para conter a pata e o tornozelo do animal (5 centímetros de altura e 4 centímetros de diâmetro). O recipiente foi previamente calibrado para garantir a reprodutibilidade das medidas de volume (ICC = 0,93). Para padronizar a medida, uma marca foi feita no tornozelo dos ratos, 1 centímetro a partir da base do calcanhar. O animal foi suspenso por um dispositivo semelhante ao utilizado por Dolan e colaboradores (2003). O frasco foi preenchido com água até exceder um volume pré-estabelecido pelo orifício com o excesso de água vertido até a estabilização do fluxo. Em seguida, a pata direita do

animal foi colocada no recipiente até a marca no tornozelo. A água deslocada foi coletada e pesada, seu volume foi calculado considerando sua densidade como igual a 1g/ml. Esta medida foi realizada antes e 3 dias após a indução da inflamação nos grupos S, Ca, DS, DCa e DCaI (Figuras 5 e 6).



Figura 6. Recipiente de vidro utilizado para medição do volume.

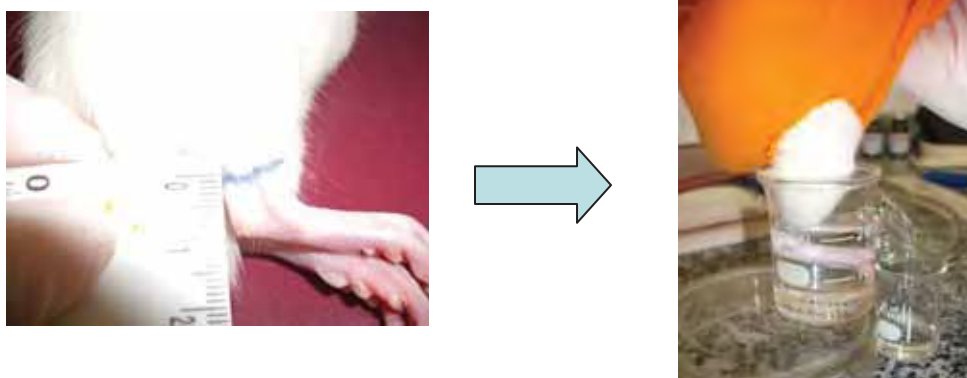


Figura 7. Medida do volume do tornozelo.

3.8 Retirada dos músculos

Foram retirados os músculos SO e TA direitos com os animais vivos e anestesiados, após 13 dias da injeção de STZ e 3 dias após a injeção de carragenina. Após a retirada, cada músculo foi pesado e dividido com um corte horizontal no seu ventre deixando uma porção para a extração de RNA total e determinação da atividade da CK e outra parte foi utilizada para análise histológica da área de secção transversa (AST).

Parte dos músculos TAs utilizados para análise histológica, foram congelados em isopentano com nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C . A parte

destinada à extração do RNA total foi armazenada em microtubo (eppendorfe) autoclavado e congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer a -80°C até sua análise. Não foi realizada a análise histologia no músculo SO devido a falta de massa muscular para as outras análises, que foram priorizadas. Para análise da CK o sobrenadante dos músculos triturados (0.040 gramas em 1 ml de tampão fosfato pH 7.4) foram aliqotados em microtubos (eppendorf), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C para quantificação de proteínas totais e da enzima. Após a retirada dos músculos, os animais foram eutanaziados com overdose de anestesia.

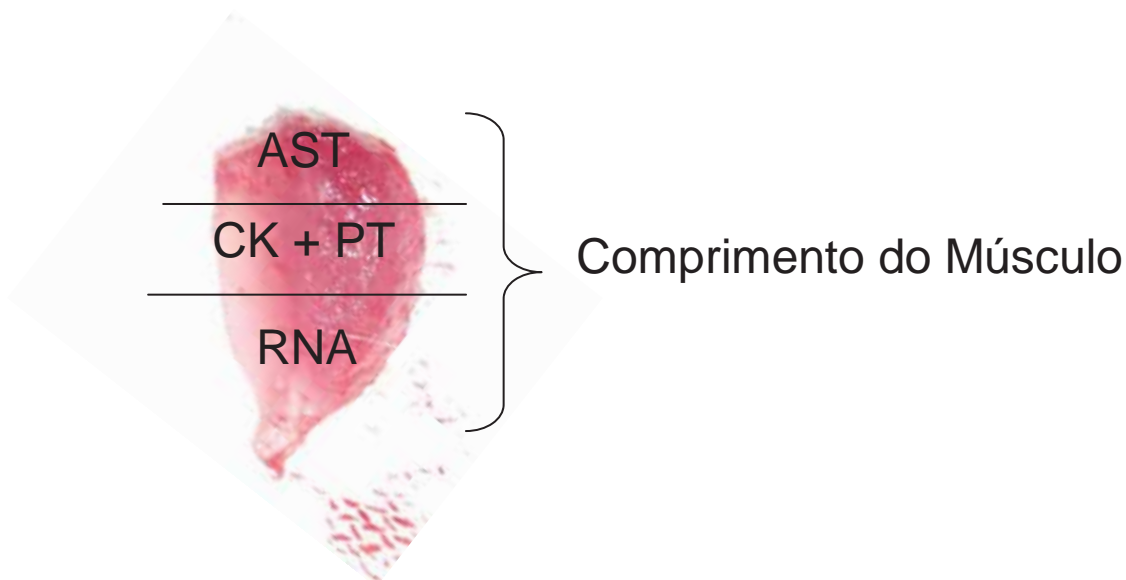


Figura 8. Divisão do músculo TA após sua retirada. Sendo AST – área de secção transversa; CK – creatina cinase; PT – proteínas totais e RNA – extração de RNA para expressão gênica.

3.9 Análise Histológica

A partir de músculos TA de todos os ratos, foram obtidos cortes histológicos transversais e seriados ($10\ \mu\text{m}$), em micrótomo criostato, mantidos à 25°C . As lâminas

com os cortes histológicos foram coradas com azul de toluidina (TB) para avaliação morfológica e morfométrica.

Uma vez os cortes corados com TB, foi realizada uma análise morfológica geral sobre a estrutura muscular, comparando entre os diferentes grupos, através do corte histológico transversal da região central do ventre de cada músculo TA. Para a obtenção das fotos dos cortes, um microscópio (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com uma câmera digital (Sony DSC S75, Tóquio, Japão) foi usado. A área de secção transversal de cem fibras musculares, escolhidas aleatoriamente, de cada músculo foram mensuradas a partir da imagem obtida da região central do ventre muscular usando o software ImageJ.

3.10 Extração de RNA total

A extração de RNA total de cada animal foi obtida a partir de 100 mg de músculo, utilizando-se o reagente Trizol (Gibco) pelo método descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). O trizol mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares. Em seguida foi adicionado o clorofórmio, seguido de centrifugação, separando a solução em fases aquosa – onde o RNA permanece exclusivamente – e fase orgânica. Após o isolamento da fase aquosa, o RNA foi precipitado com isopropanol. O *pellet* foi lavado com etanol e subsequentemente dissolvido em 30ul de água livre de RNAses. A absorbância das amostras foi determinada em 260nm; para avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (razão ≥ 1.8). Os estoques de RNA foram mantidos a -80°C . Também foi avaliada a qualidade do material por eletroforese das amostras (2 μg de RNA total) em gel denaturante de agarose-formamida (1%), em tampão MOPS (40mM de ácido morfolinopropanosulfônico). Posteriormente, os géis foram observados com brometo de etídeo.

3.11 Transcrição Reversa (RT)

Após o isolamento do RNA total, foram realizadas as transcrições reversas (RT) utilizando 1 μg de RNA total. A reação de RT foi realizada da seguinte forma:

Quantidades variadas de RNA total: 200 u de Transcriptase Reversa; 0,8 mM dNTPs; 1 mM MgCl₂; 0,02 ug/ul primer oligo dT; 4 mM DTT. A reação foi realizada em um termociclador (Eppendorf Hamburgo, Alemanha) (10 minutos a 70°C, 60 minutos a 42°C e 10 minutos a 94°C). A integridade do produto da RT (cDNAs) foi conferida através da realização de gel de agarose (1%) não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

3.12 Real Time-PCR

Em seguida, diferentes frações das RTs foram utilizadas na amplificação em cadeia por Polimerase (PCR) com monitoramento da geração de amplicons em tempo real (PCR *real-time*, Rotor Gene 3000, Cobert Research).

As amplificações por PCR foram efetuadas utilizando-se 10-80ng/μl de cDNA adicionado a uma reação contendo 25μl de SYBR Green PCR master mix, 50-900nM dos primers (senso e antisenso) em uma solução com volume final de 55μl, dividido em duplicata. As condições de ciclagem ocorreram conforme a padronização de cada primer.

Após a reação de PCR, foi possível determinar o início da fase de amplificação exponencial (Ct, *cycle threshold*), sendo que os valores de cada amostra foram utilizados como dados para a análise da expressão gênica do GAPDH, atrogina-1 e MuRF-1. Os dados foram analisados usando o método de comparação absoluta por meio da curva padrão que possibilitou determinar a diferença entre os valores de Cts das amostras.

A normalização dos dados foi feita pelo gene constitutivo GAPDH, usado como controle interno. Outro gene constitutivo, o RPLPO também foi mensurado para confirmação dos resultados, no entanto, não houve diferença entre as razões: RPLPO/GAPDH ou GAPDH/RPLPO. Por este motivo o GAPDH foi escolhido como o gene constitutivo deste estudo.

3.13 Oligonucleotídeos primers

Os oligonucleotídeos, que foram utilizados como primers, para as reações de polimerase em cadeia para atrogina-1 foram construídos utilizando-se o *Primer Express Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA), como mostrado na tabela. Os Primers para MuRF-1 foram retirados de Granado e colaboradores (2005).

Tabela I: Primers construídos com senso e antisenso para atrogina-1, MuRF-1 e GAPDH.

Primer	Senso	Antisenso
atrogina-1	TACTAAGGAGCGCCATGGATACT	GTTGAATCTTCTGGATCCAGGAT
MuRF-1	TGTCTGGAGGTCGTTTCCG	ATGCCGGTCCATGATCACTT
GAPDH	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG	GTGGTG-CAGGATGCATTGCTGA

Primers construídos com dados do *GeneBank*: atrogina-1 (AF441120) (J Physiol, 549(2), 409–418, 2003); MuRF-1 Granado *et al.*, 2005 (Am J Physiol Endocrinol Metab. 289: 1007–1014); GAPDH (AF106860).

3.14 Determinação de Proteínas Totais

Para determinação das proteínas totais, foi utilizada uma alíquota do sobrenadante do extrato muscular, sendo o conteúdo proteico das amostras determinado pelo método descrito por Hartree (1972), usando soro de albumina bovina para construção da curva analítica. Foram preparadas três soluções com os seguintes reagentes:

- i) Solução A: a 2g de Tartarato de Sódio e potássio, foram misturados a 100g de Na₂CO₃, dissolvidos em 500 mL de NaOH 1 mol/L e diluídos com água Milli-Q para 1 litro;
- ii) Solução B: a 2g de Tartarato de sódio e potássio, foi adicionado 1g de CuSO₄.5 H₂O, dissolvidos em 90 mL de água e 10 mL de NAOH 1mol/L;
- iii) Solução C: 1 volume do Folin-Ciocalteau diluídos em 15 volumes de água Milli-Q. Esta solução (preparada diariamente) esta entre 0,15 mol/L e 0,18 mol/L quando titulada para pH 10 com NaOH 1 mol/L.

Em tubos de ensaio adicionou-se 200 μ l de amostra diluída adequadamente em tampão fosfato de sódio pH 7,4 e 180 μ l da solução A, os tubos foram levados ao banho em 50°C durante 10 minutos. Após estabilização em temperatura ambiente, foi adicionado aos tubos 20 μ l da solução B e deixados em temperatura ambiente por 10 minutos. Para finalizar, foi adicionado 600 μ l da solução C e levados ao banho de 50°C por 10 minutos. Resfriados a temperatura ambiente, foram retirados 300 μ l da reação final para a leitura no espectrofotômetro de placa a 650 nm.

A determinação de proteínas totais foi realizada para normalização dos dados da CK muscular.

3.15 Determinação de níveis de Creatina Cinase (CK)

Para a determinação da atividade da CK foram obtidas amostras dos músculos TA e SO coletadas após 3 dias de inflamação do tornozelo.

Uma amostra de 0,040g de músculo foi retirada e colocada em um microtubo com 1ml de tampão fosfato (0,01M e pH 7,4), triturada em homogenizador (modelo Metabo), em banho de gelo, com velocidade de 27 mil rpm, durante 1 minuto e meio. Após a homogenização o tubo foi centrifugado por trinta minutos a 4°C e a 12.000 g. Uma alíquota do sobrenadante foi diluída adequadamente para a determinação enzimática (PEREIRA et al., 1998).

Foi utilizado o método cinético CK_{NAC} (COMMITTEE ENZYMES, 1976; OLIVER, 1955). Este método acopla à reação da CK as reações enzimáticas sequenciais, hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase, que levam a formação de NADPH, o qual é quantificado por espectrofotometria no UV.

Análise Estatística

4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Inicialmente foram aplicados os testes Shapiro Wilk's e Levene para avaliar a normalidade e homogeneidade dos dados, respectivamente. O ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de *Tukey* foi então usado para detectar possíveis diferenças entre os grupos. O t de Student pareado foi utilizado para a comparação entre os volumes inicial e final do tornozelo. O nível de significância mínimo estabelecido foi de 0,05. Para isto utilizou-se o software GraphPad InStat (Versão 3.00, 32 bit para Windows 95).

Resultados

5.0 RESULTADOS

5.1 Massa Corporal

Houve variação no ganho de massa corporal entre os grupos experimentais (Figura 9). Nos grupos de ratos diabéticos D, DS, DCa o ganho de massa foi significativamente menor, em relação aos grupos C, Ci, S e Ca, para o grupo DCa foi observado o menor ganho de massa em relação aos demais grupos. Por outro lado, os grupos diabéticos tratados com insulina tiveram o ganho de massa igual aos grupos não-diabéticos (C, Ci, S e Ca), indicando eficiência do tratamento insulínico na variação da massa corporal.

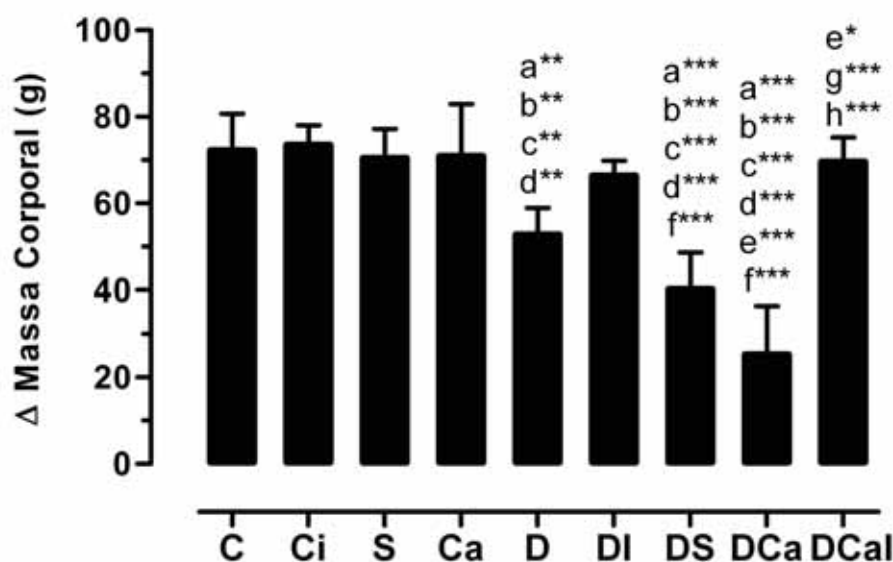


Figura 9. Variação da massa corporal. Valores apresentados em médias \pm DP, onde **a** representa diferença estatística com o grupo C; **b**: diferença estatística com Ci; **c**: diferença estatística com S; **d**: diferença estatística com Ca; **e**: diferença estatística com D; **f**: diferença estatística com DI; **g**: diferença estatística com DS e **h**: diferença estatística com DCa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intraperitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de ι -carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de ι -carragenina; DCaI: grupo diabético com administração de ι -carragenina e tratado com insulina.

5.2 Glicemia

Observa-se que os níveis glicêmicos dos grupos não-diabéticos (C, Ci, S e Ca) não apresentaram diferença estatística entre os níveis glicêmicos iniciais e finais. Por outro lado, houve um aumento da glicemia nos grupos diabéticos (DCa, DCaI, DI e DS) comparado com os grupos não-diabéticos (C, Ci, S e Ca) ($p < 0.001$) logo após 3 dias da administração da STZ (Figura 10). Uma vez que o pareamento dos animais foi realizado com base na glicemia, não foi observada diferença entre os grupos não-diabéticos, como também não foi observada diferença na hiperglicemia entre os grupos diabéticos.

Os níveis glicêmicos dos grupos D, DS e DCa permaneceram elevados no final do experimento quando comparados com os grupos não-diabéticos (C, Ci, S e Ca). Contudo, nos grupos diabéticos tratados com insulina (DCaI e DI), os níveis glicêmicos foram mantidos semelhantes aos níveis dos grupos não-diabéticos, demonstrando a eficiência do tratamento insulínico na manutenção da glicemia.

É importante observar que a inflamação da articulação pela administração de carragenina não influenciou os níveis glicêmicos dos animais, diabéticos ou não.

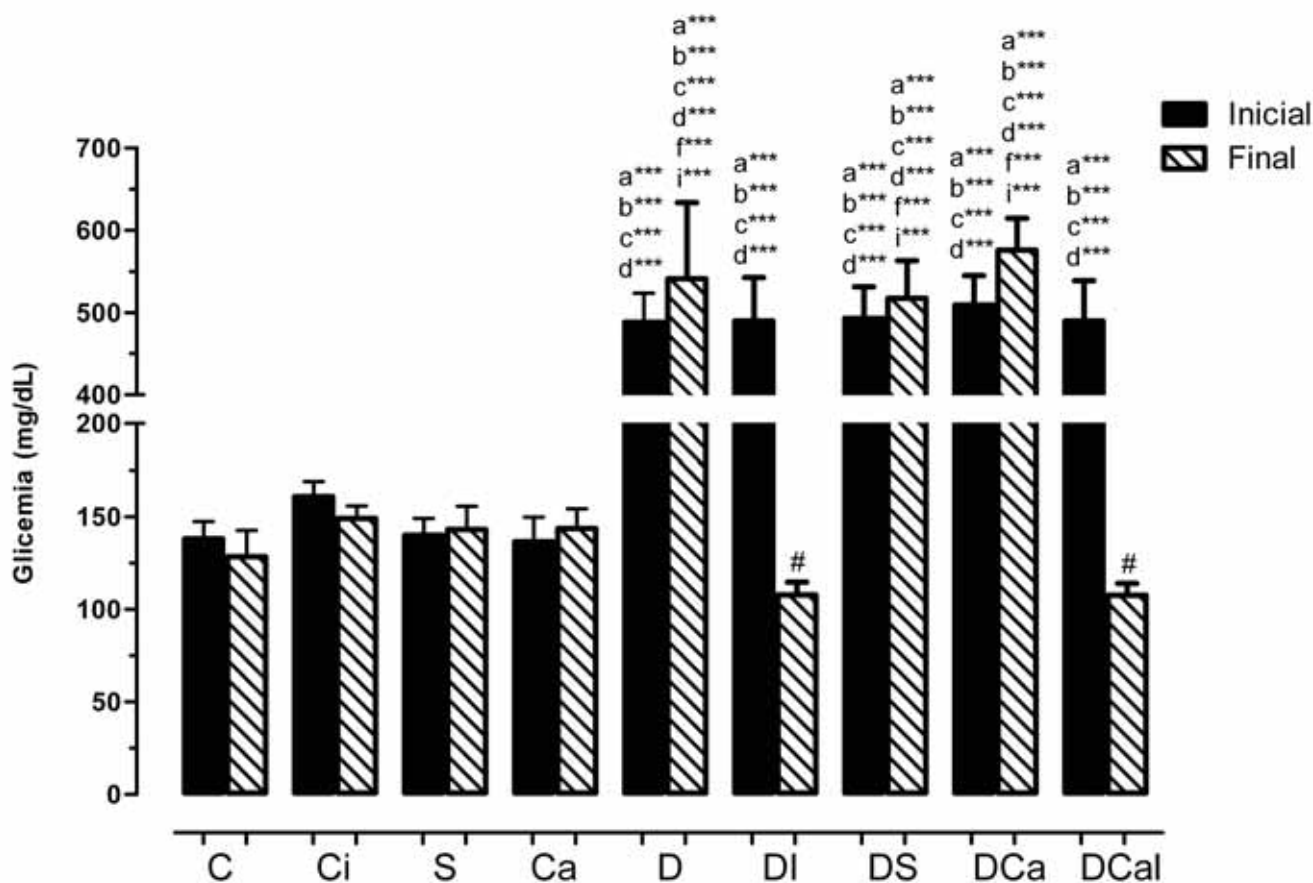


Figura 10. Glicemia dos ratos nos diferentes grupos experimentais 1 dia após a administração de STZ (glicemia inicial) e após 13 dias após a administração de STZ (glicemia final). Valores apresentados em médias \pm DP, onde **a** representa diferença estatística com o grupo C; **b**: diferença estatística com Ci; **c**: diferença estatística com S; **d**: diferença estatística com Ca; **e**: diferença estatística com D; **f**: diferença estatística com DI; **g**: diferença estatística com DS e **h**: diferença estatística com DCa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e # representa a diferença inicial e final significativa – $p < 0,05$ entre o mesmo grupo). Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intraperitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de ι -carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de ι -carragenina; DCaI: grupo diabético com administração de ι -carragenina e tratado com insulina.

5.3 Massa dos músculos TA e SO

Em relação ao músculo TA, somente no grupo Ca houve perda de massa quando comparado aos outros grupos não-diabéticos (Figura 11). Todos os grupos diabéticos apresentaram perda de massa com exceção do grupo DI que manteve sua massa igual as massas dos grupos C, Ci, S, mostrando que a insulina reverteu a perda de massa muscular quando comparada ao grupo D. Os grupos diabéticos que tiveram intervenção no tornozelo (DS, DCa, DCaI) mostraram perda de massa em relação aos dos grupos C e Ci. Apenas o grupo DCa apresentou diminuição de massa em relação aos grupos C, Ci, S e aos demais grupos diabéticos (D, DI, DS, DCaI). Nesse caso, o tratamento com insulina no grupo diabético e inflamado (DCaI) amenizou a perda de massa quando comparado ao grupo DCa, sugerindo que o tratamento com insulina apesar de não ser capaz de manter a massa igual aos grupos C, Ci, S, é capaz de minimizar a sua perda em relação a inflamação na diabetes.

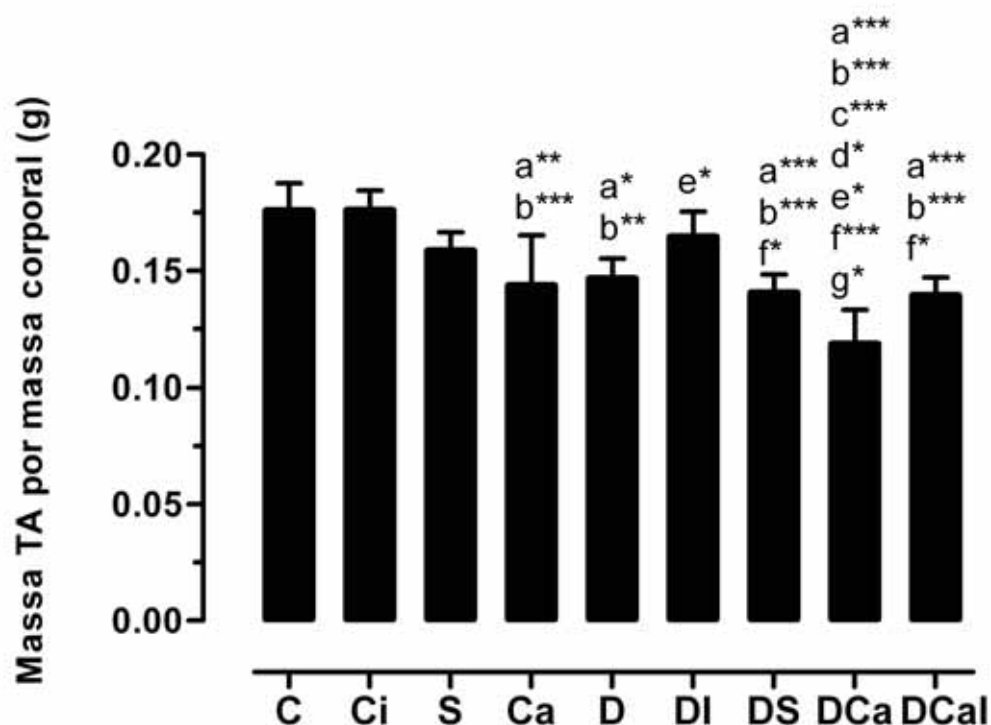


Figura 11. Massa do músculo Tibial Anterior dos diferentes grupos experimentais 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ. Resultados normalizados pela massa corporal final de cada animal. Valores apresentados em médias \pm DP, onde **a** representa diferença estatística com o grupo C; **b**: diferença estatística com Ci; **c**: diferença estatística com S; **d**: diferença estatística com Ca; **e**: diferença estatística com D; **f**: diferença estatística com DI, **g**: diferença estatística com DS (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intraperitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de ι -carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de ι -carragenina; DCal: grupo diabético com administração de ι -carragenina e tratado com insulina.

Em relação ao músculo SO, os grupos não-diabéticos com intervenção na articulação do tornozelo (salina ou carragenina) tiveram a mesma perda de massa muscular em relação aos grupos C e Ci, sugerindo que a intervenção na articulação foi mais importante do que a natureza das substâncias injetadas (Figura 12).

Todos os grupos diabéticos apresentaram perda de massa em relação aos grupos C e Ci, sendo que o grupo DCa apresentou a maior perda de massa muscular quando comparado aos demais grupos. O tratamento com insulina no grupo diabético e inflamado (DCal) amenizou a perda de massa do músculo SO quando comparado ao grupo DCa, sugerindo que o tratamento com insulina apesar de não ser capaz de manter

a massa igual aos grupos C e Ci, é capaz de minimizar a sua perda em relação a inflamação na diabetes, assim como observado no músculo TA. Além disso, a inflamação com carragenina parece ter maiores efeitos sobre a perda de massa no músculo de ratos diabéticos quando comparado aos seus efeitos no músculo de ratos não-diabéticos.

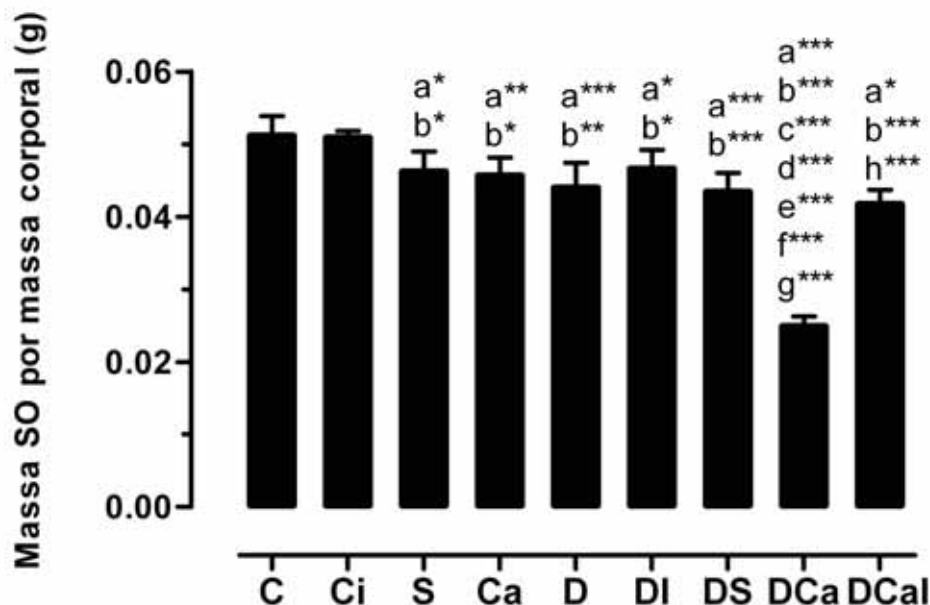


Figura 12. Massa do músculo SO dos diferentes grupos experimentais 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ. Resultados normalizados pela massa corporal final de cada animal. Valores apresentados em médias \pm DP, onde **a** representa diferença estatística com o grupo C; **b**: diferença estatística com Ci; **c**: diferença estatística com S; **d**: diferença estatística com Ca; **e**: diferença estatística com D; **f**: diferença estatística com DI; **g**: diferença estatística com DS e **h**: diferença estatística com DCa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intrapenitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de ι -carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de ι -carragenina; DCaI: grupo diabético com administração de ι -carragenina e tratado com insulina.

5.4 Área de Secção Transversa (AST)

A figura 13 mostra uma intensa atrofia das fibras musculares dos músculos TA nos grupos diabéticos, assim como nos grupos que tiveram alguma intervenção no tornozelo com carragenina ou soro, quando comparados ao grupo C. A atrofia das fibras musculares foi também confirmada pela diminuição da AST nos grupos S e Ca não-

diabéticos em relação a C e Ci (Figura 14). Nos grupos diabéticos também foi observada uma diminuição da AST em relação a C e Ci. O grupo D apresentou a mesma diminuição que os grupos DS, DCa, DCaI. Torna-se importante observar que como não houve diferença entre os grupos não-diabéticos S e Ca, assim como entre os grupos diabéticos DS, DCa e DCaI, a diminuição na AST deve ser dependente da distensão da cápsula articular tanto pela salina quanto pela carragenina.

Além disso, o tratamento com insulina não foi capaz de influenciar a recuperação da AST no grupo DI em relação ao grupo D, nem entre os grupos DCaI e DCa.

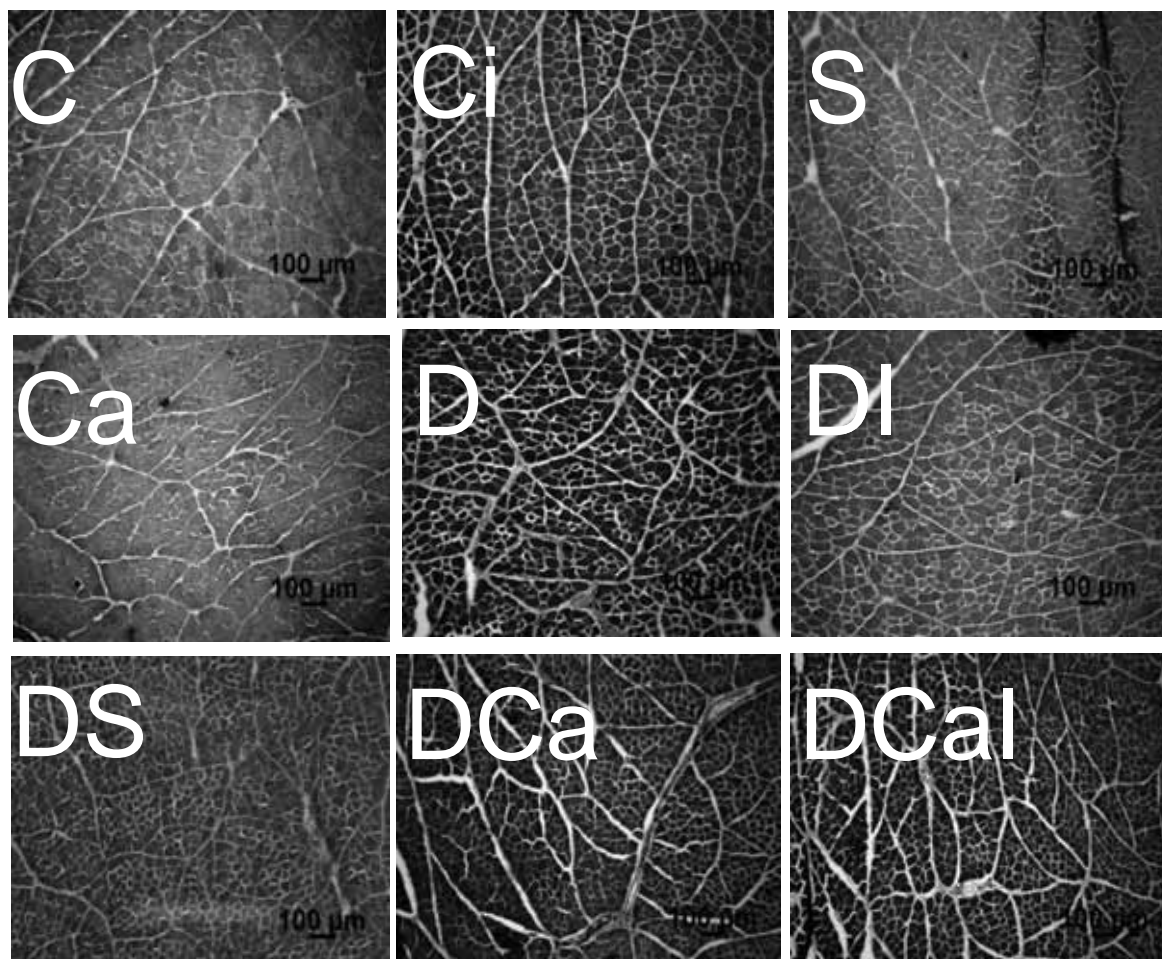


Figura 13. Cortes transversais das fibras musculares dos músculos TA corados com azul de toluidina. Observe a atrofia das fibras musculares dos músculos TA dos grupos diabéticos (D, DS, DCa e DCaI), principalmente dos grupos DS, DCa e DCaI. Barra, 100 μ m.

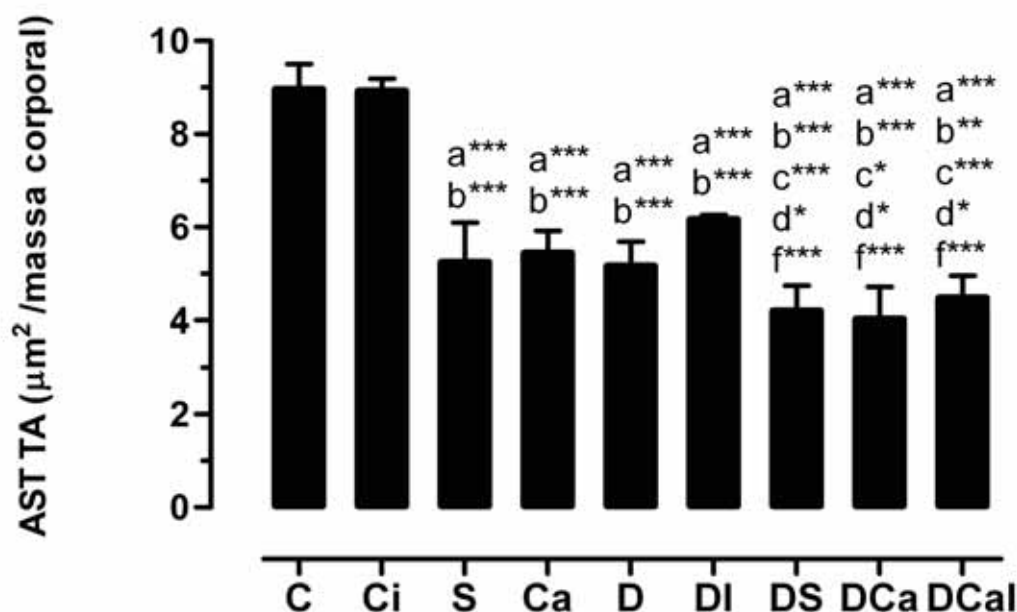


Figura 14. Área de Secção Transversa das fibras do músculo TA dos diferentes grupos experimentais, 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ. Resultado normalizado pela massa corporal de cada animal. Resultados são média e desvio padrão, onde **a**: representa diferença estatística com o grupo C; **b**: diferença estatística com Ci; **c**: diferença estatística com S; **d**: diferença estatística com Ca e **f**: diferença estatística com DI (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intraperitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de ι -carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de ι -carragenina; DCaI: grupo diabético com administração de ι -carragenina e tratado com insulina.

Inicialmente foi proposta a análise da AST também do músculo SO, mas não houve massa muscular suficiente para sua realização, sendo dessa forma priorizada a análise dos níveis de CK e da expressão gênica neste músculo.

5.5 Expressão Gênica no músculo TA

Analisando a Figura 15, observa-se que a distensão da cápsula da articulação tíbio-társica aumentou a expressão gênica da atrogina-1 nos grupos S, Ca, DS e DCa em relação ao C, Ci, D e DI. Observa-se ainda que para o período avaliado, os grupos D e DI não sofreram alteração da expressão da atrogina-1. Além disso, o tratamento com insulina foi capaz restabelecer a expressão da atrogina-1 no grupo DCaI, em relação ao grupo DCa.

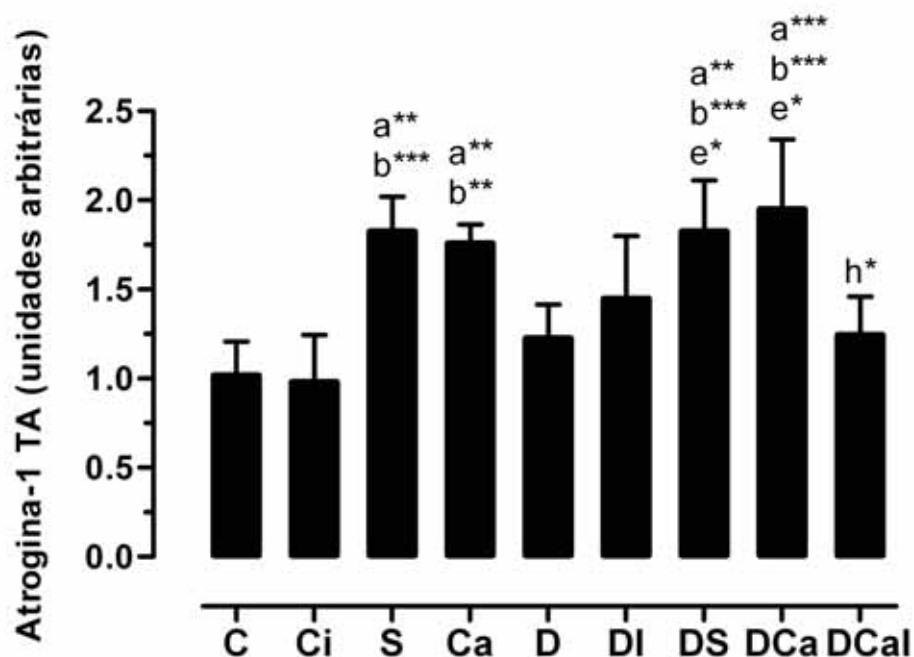


Figura 15. Expressão gênica da atrogina-1 no músculo TA dos diferentes grupos experimentais, 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ. Resultados são média e desvio padrão, onde **a** representa diferença estatística com o grupo C; **b** diferença estatística com Ci; **c** diferença estatística com S; e **d** diferença estatística com D; **h** diferença estatística com DCa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intraperitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de ι -carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de ι -carragenina; DCal: grupo diabético com administração de ι -carragenina e tratado com insulina.

Em relação a expressão gênica do MuRF-1, houve um aumento de sua expressão nos grupos S e Ca quando comparado aos grupos C e Ci (Figura 16). Nos ratos diabéticos, houve aumento nos grupos DI, DCa e DCal, mostrando que o tratamento com insulina não minimizou a expressão gênica do MuRF-1. Nota-se que apenas a administração de carragenina aumentou a expressão de MuRF-1 nos grupos diabéticos.

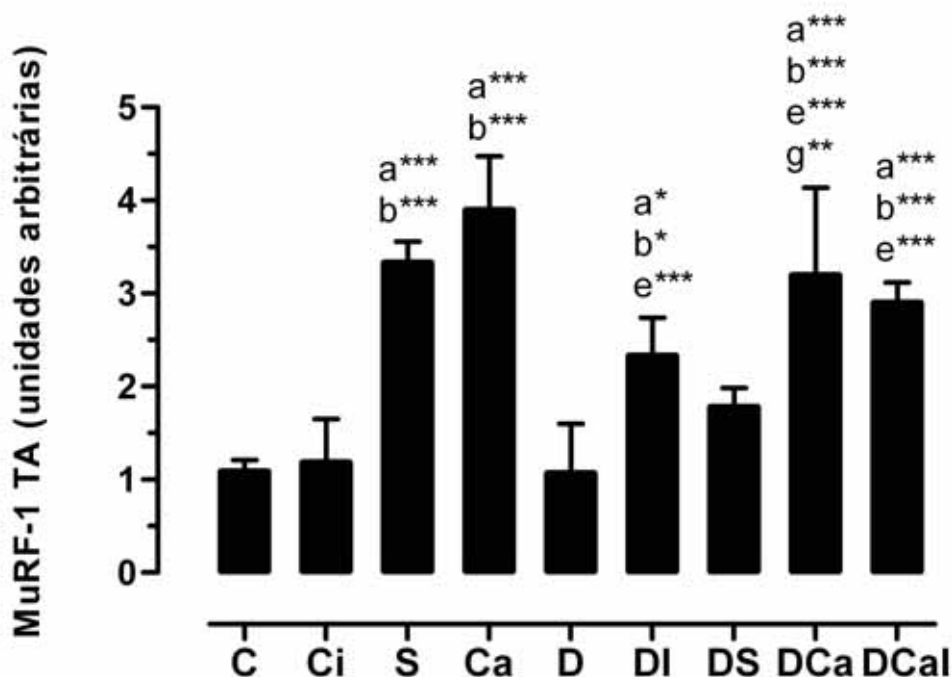


Figura 16. Expressão gênica do MuRF-1 no músculo TA dos diferentes grupos experimentais, 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ. Resultados são média e desvio padrão, onde **a** representa diferença estatística com o grupo C; **b** diferença estatística com Ci; **c** diferença estatística com S; **d** diferença estatística com Ca; **e** diferença estatística com DS (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intraperitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de ι -carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de ι -carragenina; DCaI: grupo diabético com administração de ι -carragenina e tratado com insulina.

5.6 Expressão Gênica no músculo SO

Os resultados mostraram um aumento da expressão da atrogina-1 nos grupos S e Ca quando comparados aos grupos C e Ci, sendo que a maior expressão foi observada no grupo Ca em relação ao grupo S (Figura 17). Nos grupos diabéticos, houve aumento apenas no grupo DCa, comparado aos grupos C, Ci, D, DI, DS e DCaI. Além disso, observou-se que apenas a administração de carragenina aumentou a expressão da atrogina-1 e o tratamento com insulina foi capaz minimizar sua expressão.

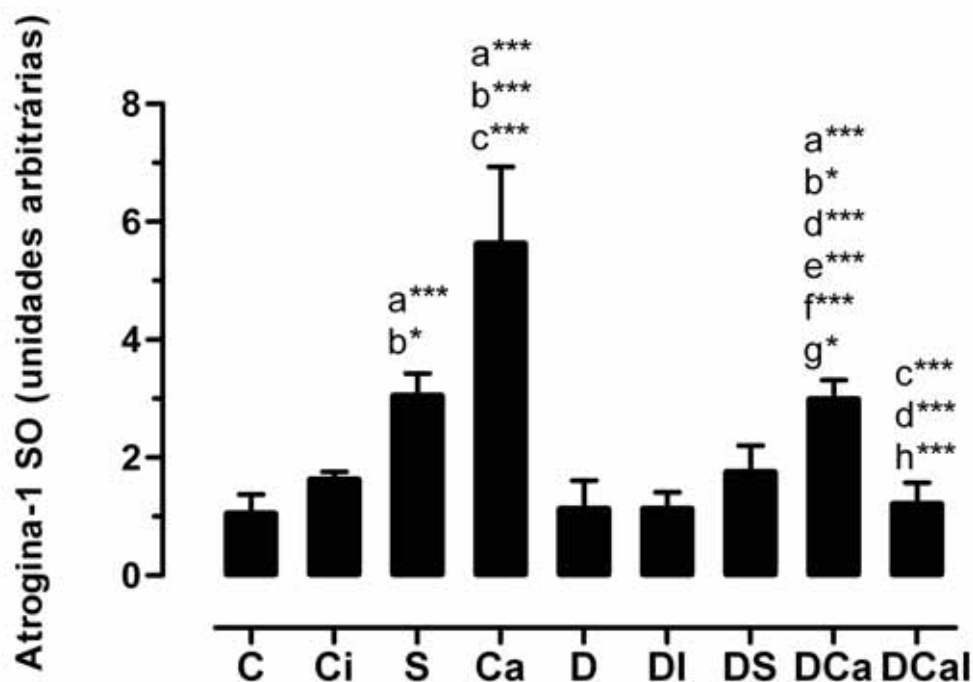


Figura 17. Expressão gênica do atrogina-1 no músculo SO dos diferentes grupos experimentais, 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ. Resultados são média e desvio padrão, onde **a** representa diferença estatística com o grupo C; **b** diferença estatística com Ci; **c** diferença estatística com S; **d** diferença estatística com Ca; **e** diferença estatística com D; **f** diferença estatística com DI; **g**: diferença estatística com DS; **h**: diferença estatística com DCa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intraperitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de ι -carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de ι -carragenina; DCaI: grupo diabético com administração de ι -carragenina e tratado com insulina.

A expressão gênica do MuRF-1 aumentou apenas no grupo Ca em relação aos grupos C, Ci e S, e no grupo DCa em relação aos grupos C e D (Figura 18). Esses resultados mostram que a inflamação aumenta a expressão desse gene, tanto no músculo de ratos diabéticos como não-diabéticos. O tratamento com insulina foi capaz de reverter sua expressão no grupo DCaI.

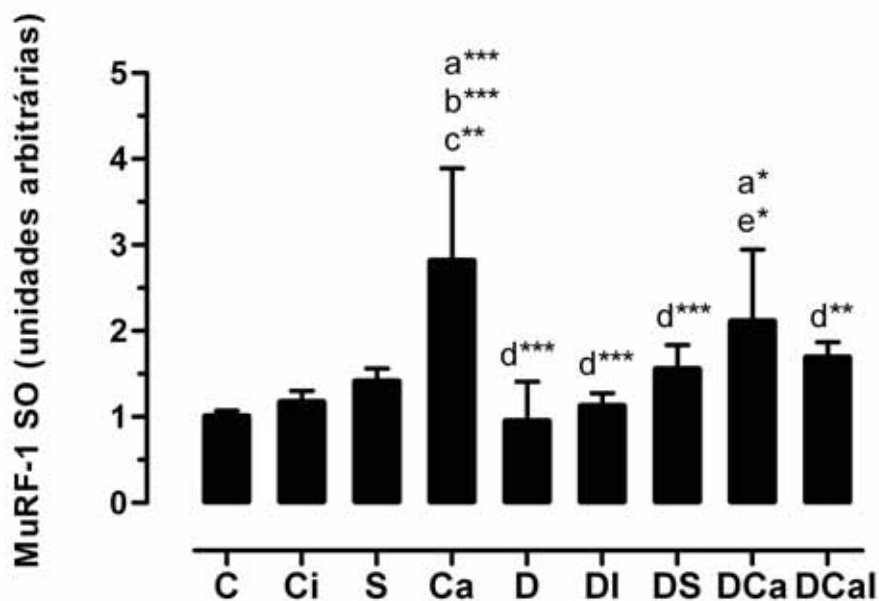


Figura 18. Expressão gênica do MuRF-1 no músculo SO dos diferentes grupos experimentais, 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ. Resultados são média e desvio padrão, onde **a** representa diferença estatística com o grupo C; **b** diferença estatística com Ci; **c** diferença estatística com S; **d** diferença estatística com Ca; **e** diferença estatística com D (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intraperitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de ι -carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de ι -carragenina; DCaI: grupo diabético com administração de ι -carragenina e tratado com insulina.

5.7 Volume

A Tabela II apresenta os valores dos volumes iniciais (pré-inflamação) e finais (pós-inflamação) dos tornozelos direitos de todos os grupos experimentais. Constatou-se aumento significativo ($p < 0,05$) no volume após 72h da intervenção (salina ou carragenina) na articulação do tornozelo nos grupos S, Ca, DS, DCa e DCaI. Esse resultado demonstra que a administração de carragenina ou salina na articulação do tornozelo dos ratos acarreta edema local, havendo distensão da cápsula articular.

TABELA II. Comparação do volume (média±desvio padrão) (ml) dos grupos.

PERÍODO	C	Ci	S	Ca	D	DI	DS	DCa	DCaI
0	2,08±0,10	2,00±0,06	1,92±0,10	2,04±0,17	1,60±0,13	1,70±0,18	1,4±0,20	1,60±0,29	1,60±0,30
72 h			1,94±0,10	2,63±0,17			1,5±0,15	2,6±0,41	2,82±0,49
p (0 Vs. 72h)			=0,005	=0,001			=0,0230	=0,003	=0,0001

Valores apresentados em médias ± DP. O valor de p apresentado é referente ao teste T pareado. Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intraperitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de t-carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de t-carragenina; DCaI: grupo diabético com administração de t-carragenina e tratado com insulina.

5.8 Creatina Cinase (CK)

Na avaliação da CK, este estudo não detectou alterações em sua atividade no músculo TA entre os grupos avaliados, como mostrado na Figura 19.

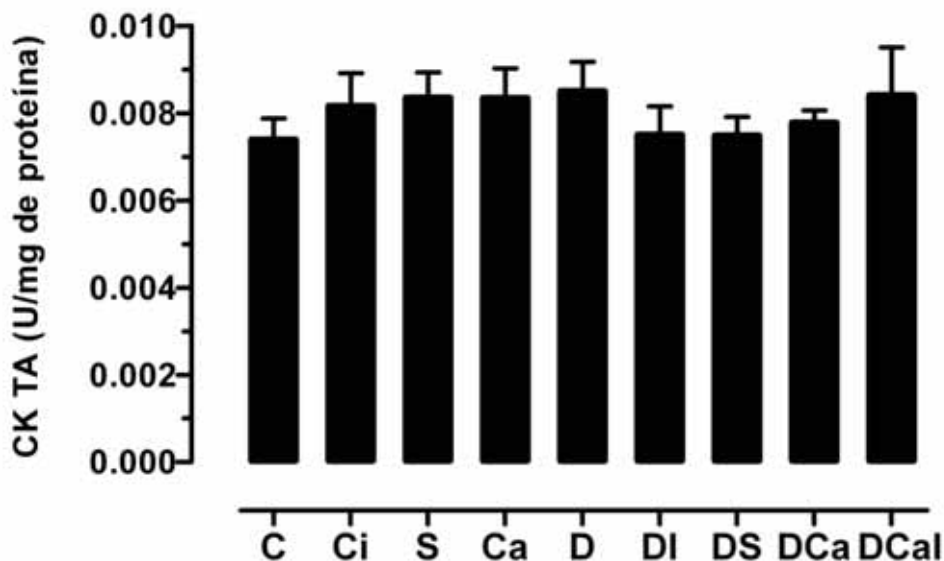


Figura 19. Níveis musculares da atividade de CK do músculo TA dos diferentes grupos experimentais, 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 10 dias após a injeção de STZ. Valores apresentados em médias \pm DP. Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intraperitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de ι -carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de ι -carragenina; DCal: grupo diabético com administração de ι -carragenina e tratado com insulina.

A Figura 20 apresenta os níveis da CK do músculo SO. Neste músculo, notou-se atividade menor apenas no grupo DCa em relação aos demais grupos avaliados ($p < 0,001$).

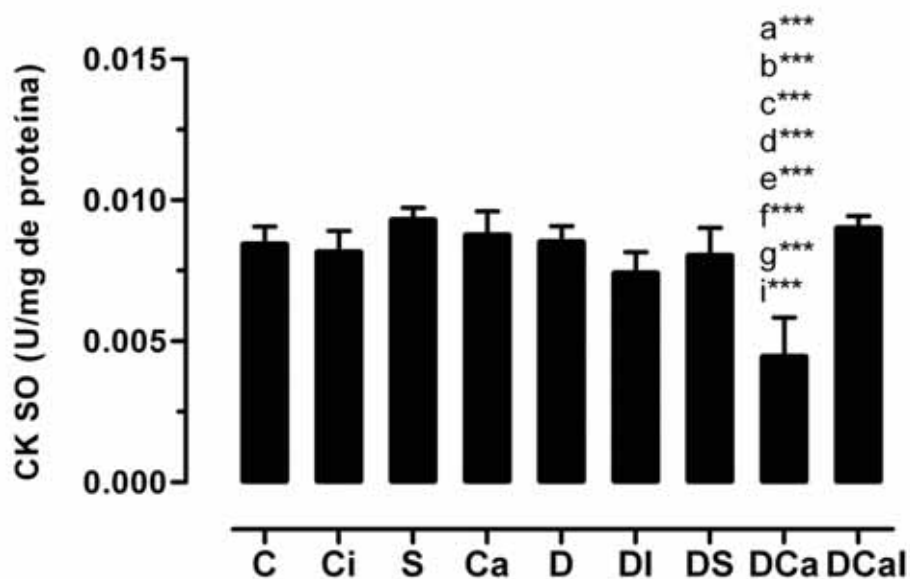


Figura 20. Níveis musculares de CK do músculo SO dos diferentes grupos experimentais, 3 dias após a administração de carragenina na articulação do tornozelo direito, e 13 dias após a injeção de STZ. Valores apresentados em médias \pm DP, onde **a** representa diferença estatística com o grupo C; **b**: diferença estatística com Ci; **c**: diferença estatística com S; **d**: diferença estatística com Ca, **e**: diferença estatística com D; **f**: diferença estatística com DI; **g**: diferença estatística com DS e **i**: diferença estatística com DCaI (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Sendo, C: grupo controle sem nenhuma intervenção; Ci: grupo não-diabético com administração intraperitoneal de citrato; S: grupo não-diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; Ca: grupo não-diabético com administração de ι -carragenina; D: grupo diabético sem intervenção na articulação do tornozelo; DI: grupo diabético tratado com insulina; DS: grupo diabético com administração de salina na articulação do tornozelo direito; DCa: grupo diabético com administração de ι -carragenina; DCaI: grupo diabético com administração de ι -carragenina e tratado com insulina.

Discussão

6.0 DISCUSSÃO

Este estudo encontrou um menor ganho de massa corporal e manutenção da hiperglicemia nos grupos de ratos diabéticos sem tratamento insulínico. Além disso, houve perda de massa muscular nos músculos TA e SO, demonstrando a ocorrência da atrofia causada pela inflamação e pelo diabetes. Assim como a perda de massa muscular houve diminuição da AST no TA e aumento da expressão gênica da atrogina-1 e MuRF-1 tanto no músculo TA quanto no SO. O volume das patas inflamadas revelou que houve edema provocado pela efusão e/ou inflamação da articulação. Entretanto, a atividade da CK não sofreu alteração no músculo TA, enquanto que no músculo SO apresentou diminuição em sua atividade apenas no grupo DCa.

A perda de massa muscular afetou os dois músculos analisados principalmente nos grupos diabéticos e que tiveram alguma intervenção da articulação do tornozelo, mostrando que os dois tipos de fibras (TA predominantemente tipo II e SO predominantemente tipo I) passaram pelo processo de atrofia, com alterações em suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com os estímulos a que são submetidas. O músculo SO apresentou uma perda de massa também no grupo S, mostrando ser esse músculo, em ratos não-diabéticos ou diabéticos, mais sensível a intervenção no tornozelo, seja por salina ou carragenina.

Analisando a AST do músculo TA, houve a confirmação da atrofia presente neste músculo submetido à efusão; diabetes ou inflamação da articulação. Aughsteen, e colaboradores (2006) também informaram diminuição da área de secção transversa nos músculos reto femoral e extensor longo digital após 4 semanas de diabetes, corroborando com este estudo, uma vez que estes dois músculos são constituídos por fibras do tipo II, assim como o músculo TA. Eles também encontraram a presença de área de inflamação e necrose das fibras nos dois músculos. Apesar de não realizada a AST no músculo SO, é notável a atrofia pela perda de sua massa muscular do mesmo.

Os resultados apresentados nesse trabalho confirmam a participação de vias de degradação protéica para o processo de atrofia, uma vez que foi observada a perda de massa muscular no SO e TA e, da AST do TA, além de um aumento na expressão gênica da

atrofina-1 e do MuRF-1 nos dois músculos, principalmente nos grupos de ratos que tiveram a articulação inflamada.

O aumento da expressão da atrofina-1 e do MuRF-1 deste estudo, intensificou a perda de massa nos dois músculos analisados e da área de secção transversa no músculo TA. Entretanto, a magnitude das respostas quanto à expressão gênica da atrofina-1 e do MuRF-1 foram diferentes nos músculos TA e SO, mostrando que o tipo de fibra está relacionado com a expressão de diversos genes no tecido muscular, como já demonstrado também em estudos anteriores (CARLSON et al, 1999; WHEELER et al., 1999; HUEY et al., 2001; CAI et al., 2004).

Em modelos de desuso, como a desnervação ou a suspensão, ocorre um aumento na expressão de atrofina-1, levando a uma significativa atrofia muscular, sendo tal dado bem descrito (ZHANG et al., 2006; SACHECK et al., 2007). Modelos de desuso afetam mais as fibras oxidativas, enquanto que em doenças sistêmicas as fibras mais afetadas são as glicolíticas de contração rápida, pois de acordo com Sacheck e colaboradores (2007) a atrofia das fibras de contração rápida ocorre primeiramente, devido ao maior tamanho dessas fibras, o que as tornam mais susceptíveis aos efeitos catabólicos dos hormônios adrenais circulantes devido a afecções sistêmicas.

Este estudo demonstrou aumento da atrofina-1 nos dois músculos analisados, entretanto os níveis de mRNA foram maiores no grupo Ca do músculo SO do que no mesmo grupo do músculo TA; relacionando assim o possível efeito inflamatório da carragenina com a perda de massa muscular.

Os estudos de GLASS (2005) e ZHANG e colaboradores (2006) demonstraram que a desnervação ou a imobilização provocam um aumento dos níveis de RNAm do MuRF-1 na primeiras 24 horas e posterior diminuição, podendo ter esse gene, uma importância em processos agudos, independente do modelo de atrofia utilizado. Estes estudos corroboram com estudo também desenvolvido no laboratório de Plasticidade que também avaliou a inflamação após 24h, entretanto, neste estudo houve aumento após 72h da inflamação, mas com um pico de expressão menor do que encontrado por Ramirez e colaboradores (2008), com análise feita após 24h da inflamação.

Shackeck e colaboradores (2007) fizeram um estudo com dois modelos de desuso e registraram um pico de expressão da atrofina-1 e do MuRF-1 no terceiro dia de

experimento. Eles observaram correlação desses picos da expressão gênica da ordem de 50 vezes para atrogina-1 e 20 vezes para MuRF-1, com perda de massa muscular do músculo gastrocnêmio; comparando estes dados com o da presente dissertação, é notável que a magnitude do aumento na expressão dos genes relacionados à atrofia possa ser um fator chave na redução da massa muscular e da AST das fibras musculares, contudo o aumento da expressão gênica foi muito maior no estudo de Shackeek e colaboradores (2007).

A expressão do MuRF-1 dos grupos inflamados nos dois músculos estudados (Ca e DCa), sugere que a expressão desse gene nessas condições estudadas é independente do tipo de fibra, embora o aumento tenha sido bem maior no músculo TA comparado com o músculo SO. Esse estudo encontrou aumento na expressão da atrogina-1 e MuRF-1 nos grupos Ca, DCa e DCaI do músculo TA e nos grupos Ca e DCa do músculo SO, que pode ser também explicado através da via do TNF α , uma vez que a injeção de ι -carragenina causa um processo inflamatório complexo, que envolve um grande número de mediadores, dentre eles a uma citocina inflamatória TNF α , que está envolvida na estimulação da quebra de proteína muscular (REID; LI, 2001; DOGRA et al., 2007). Os níveis séricos de TNF α encontram-se bastante aumentados após injeção de ι -carragenina no tornozelo de ratos. A ação catabólica do TNF α explica-se em parte, pela ativação da família de fatores de transcrição NFK β (JACKMAN; KANDARIAN, 2004), sendo que o principal mediador da atrofia muscular desta via é o p65. O p65 encontra-se inativo no citoplasma da célula e quando ativado é translocado até o núcleo, ligando-se em sítios específicos do DNA e regulando a expressão de MuRF-1 (ZHANG, 2006). Neste estudo, o aumento da expressão da atrogina-1 e do MuRF-1 dos grupos DS, DCa e DCaI contribuiu para produzir perda de massa e diminuição da AST das fibras musculares do TA direito, embora no músculo SO a perda de massa também tenha ocorrido de forma significativa nos grupos que tiveram intervenção na articulação do tornozelo.

Outra molécula sinalizadora que pode ser regulada e ativada através do TNF- α é o p38. Este é um membro da família MAPK de proteínas kinases, e é ativado pelo estresse e responde a uma variedade de estímulos, incluindo o estresse oxidativo e TNF- α , sendo um potencial sinalizador catabólico no músculo esquelético. O estudo de Li e colaboradores (2005) mostrou que o aumento da fosforilação do p38 aumentou os níveis de atrogina-1, uma vez que a elevação patológica do p38 favorece a degradação de proteínas musculares e

atrofia. Além disso, este estudo sugere que MAPK/p38 modula a sinalização PI3K/Akt/FoxO, diretamente ou indiretamente. Já o estudo de Koistinen e colaboradores (2003) viram que o diabetes tipo II é uma condição catabólica, onde ocorre a fosforilação do p38. Está bem descrito na literatura que o diabetes provoca estresse oxidativo, o que levaria a via MAPK/p38 a ativar os genes de atrofia. Portanto, além das vias conhecidas de degradação protéica, existem moléculas sinalizadores que estão envolvidas com a degradação de proteínas, como a p38 que possivelmente está ativada pelo TNF- α neste estudo, devido ao uso da carragenina para provocar a inflamação. É necessário ainda lembrar, que além do aumento de TNF- α há o estresse oxidativo nesse modelo experimental o, que é causado pela instalação do diabetes, e que também ativa a molécula p38, reforçando um papel importante dessa via nos resultados encontrados para a atrofia muscular através do aumento da expressão dos genes ativados pela FoxO, atrogina-1 e MuRF-1.

O fato de haver no músculo TA um aumento na expressão de genes de atrofia como a atrogina-1 em grupos tratados com insulina como ocorreu com DCaI no TA, e também aumento da expressão do MuRF-1 no DI e DCaI no músculo TA, mostra que a via de síntese protéica pode estar diminuída, uma vez que em condições catabólicas que interferem com o sinal IGF-I/insulina ocorre diminuição da fosforilação do FoxO (Forkhead Box-containing protein, O-subfamily) e aumento da expressão desses dois genes. A proteína FoxO também pode ter um impacto negativo sobre a síntese de proteínas com uma resposta exacerbada de efeitos fisiológicos da FoxO na degradação protéica (HESZELE; PRICE, 2004), uma vez que FoxO é um regulador da expressão da atrogina-1 e MuRF-1 no músculo esquelético. DEHOUX e colaboradores (2004) injetaram IGF-I em ratos diabéticos e observaram uma atenuação da expressão da atrogina-1 no músculo gastrocnêmio de ratos, sugerindo a regulação desse hormônio pelo IGF-I, além disso esse efeito inibitório é independente da glicemia, uma vez que os mesmos efeitos foram observados em ratos com hipoglicemia no mesmo estudo. Em vista que o IGF-I exerce papel tão importante quanto a insulina para a síntese protéica faz com que o dado do estudo de DEHOUX colabore com o resultado desse estudo, uma vez que a insulina exógena foi aplicada aos grupos com elevação da expressão dos genes de atrofia e mesmo assim eles responderam com maior degradação de proteínas.

A atrofia encontrada tanto na massa muscular do músculo TA e do músculo SO, quanto a diminuição da AST do TA, demonstraram que a atrofia pode ter ocorrido por duas hipóteses. Como no diabetes há diminuição do IGF-1 e de insulina, a via de síntese protéica está diminuída, sobressaindo a via de degradação protéica. Outra hipótese é que o pico da expressão gênica dos genes relacionados à atrofia atrogina-1 e MuRF-1, é anterior ao tempo analisado nesse estudo (72h de inflamação), o que reflete na perda de massa muscular, com níveis não muito elevados, como encontrado em estudo anterior feito por Ramirez e colaboradores (2008), onde ratos normais com 48h de inflamação apresentaram um aumento de 672% no TA e de 125% no SO dos níveis de MuRF-1.

Provavelmente, o diabetes e a inflamação interferem na via atrofica. Devido a destruição do pâncreas pelo diabetes, há pouca insulina, e poucos receptores tanto de IGF-1 quanto de insulina, fazendo com que a via de síntese protéica esteja diminuída. Devido a degradação dos receptores de membrana há a ativação das vias lisossomal, das calpaínas, das caspases, com o favorecimento da via de degradação protéica e inibição da via de síntese protéica através da comunicação Akt/FoxO. Ao mesmo tempo há a presença de inflamação, com fatores inflamatórios locais e sistêmicos, fazendo com que a via de degradação protéica esteja aumentada através da ativação do p38 e do NF-kB. Além disso, há o estresse oxidativo devido ao modelo de atrofia deste estudo, o desuso. Esse estresse oxidativo dispara a via das calpaínas com desarranjo do sarcômero e degradação pelo proteassoma. Assim, estes achados demonstram que existem alguns mecanismos que regulam diferentemente a plasticidade muscular na presença de diabetes, com o uso diminuído da pata e inflamação (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; GLASS, 2005; ZHANG, 2006).

Durante a realização dessa pesquisa, foi observado que os ratos deambulavam com restrição ao uso da pata com o tornozelo inflamado, provavelmente por dor, apoiando apenas a parte anterior da pata (parte dos dedos). Como a carragenina provoca hiperalgisia no lugar da lesão (SALVEMINI, et al., 1996), pode ter ocorrido uma diminuição do uso da pata inflamada por dor, com uma diminuição na atividade contrátil, contribuindo para a alteração na expressão gênica observada no presente estudo, pois o uso diminuído também estimula a expressão de genes relacionados à atrofia.

A injeção de salina não gera resposta inflamatória em ratos, com uma pequena dilatação dos vasos sanguíneos, presença de poucos eritrócitos e estrutura histológica normal da cartilagem (SARICAOGLU et al, 2008). Assim, as mudanças na expressão gênica observadas no TA dos grupos S e DS e no grupo S do músculo SO, podem ser conseqüências de uma Resposta Muscular Artrogênica (RMA) devida à efusão da articulação. A RMA é gerada por aumento da tensão no interior da cápsula articular que pode aumentar ou diminuir a excitabilidade dos motoneurônios α ($MN\alpha$) nos músculos funcionalmente relacionados à articulação acometida, embora sem lesão articular relacionada. A inibição da excitabilidade dos $MN\alpha$ em presença de efusão articular pode ser devida ao aumento da atividade dos corpúsculos de Ruffini de adaptação lenta localizadas na cápsula articular. Esta atividade aumenta o estímulo dos interneurônios inibitórios Ib, os quais inibem os motoneurônios alfa do músculo (PALMIERI et al., 2003 e 2004).

Estes resultados indicam que a efusão articular aguda regula a expressão de genes relacionados à atrofia em músculos normais e diabéticos. Além disso, pode ser considerado que os resultados encontrados nos grupos S e DS são principalmente relacionados à distensão capsular, pois o modelo de efusão articular permite a estimulação mecânica da articulação.

O processo inflamatório causado pela carragenina, assim como a efusão da articulação após 72h, causaram neste estudo, um edema local. Estudos anteriores mostraram um aumento do edema 24h após a aplicação de carragenina, diminuindo lentamente (FERREIRA, 2005; NISHIKORI et al., 2002; OMAR, 2002). Este resultado mostra que o edema persistiu até 72h, sendo que o mecanismo de indução (carragenina ou soro) não apresenta diferença, podendo o edema ocorrer devido à distensão da cápsula articular. O edema pode ter persistido por mais 72h devido ao processo crônico com presença de macrófagos que persistem até 4 semanas após a introdução da carragenina, como mostrado nos estudos de HONG e colaboradores (2002) e KEHLA e colaboradores (2000).

Este estudo não encontrou diferença estatística nos níveis musculares da enzima creatina cinase no músculo TA, havendo apenas diferença estatística significativa no músculo SO do grupo DCa. Esse resultado pode ser discutido pela hierarquia energética de

utilização do ATP, já que os músculos dispõem de três principais mecanismos de reposição de ATP pela glicólise, sendo eles a reserva de fosfocreatina, o metabolismo anaeróbico láctico, e a via cadeia respiratória, durante a realização de um exercício. Na condição de desuso, os estoques de fosfocreatina não são utilizados, uma vez que não há realização de esforço físico, como demonstra alguns estudos em que esta enzima têm sido relacionada principalmente em lesões musculares decorrentes da fase excêntrica do exercício, podendo permanecer aumentada no plasma sanguíneo em até 7 dias após a realização de um esforço (BRANCACCIO et al, 2007; BRUUNSGAARD et al, 1997). Nos grupos de ratos diabéticos que foram tratados com insulina os níveis de ATP conseguem se manter adequados para a realização da atividade muscular, com a entrada de glicose na célula. No entanto no músculo SO, de contração lenta e postural, e para o grupo DCa, ou seja, com insuficiência de insulina e com inflamação, a atrofia pode ter conduzido ao uso muito diminuído, pois os níveis de CK foram os únicos estaticamente menores.

Conclusão

7.0 CONCLUSÃO

Os grupos que tiveram alguma intervenção na articulação tíbio-társica direita mostraram aumento na expressão dos genes relacionados à atrofia nos investigados. Este estudo revelou que tanto a inflamação como a efusão da articulação tíbio-társica regulam a expressão de genes relacionados à atrofia nos músculos SO e TA, tanto de ratos não-diabéticos quanto em ratos diabéticos. Entretanto, a atividade da enzima creatina cinase não sofreu alteração no TA e somente o grupo DCa do músculo SO com diminuição da sua atividade. Portanto, os músculos de ratos diabéticos que tiveram a articulação inflamada respondem diferentemente e com maior intensidade à atrofia do que ratos normais.

Os resultados deste estudo têm relevância clínica e indicam a importância da intervenção fisioterapêutica (por exemplo, uso de TENS, exercícios de fortalecimento e para diminuir o edema local, concomitantemente ao uso do gelo) para amenizar os efeitos deletérios que a inflamação e a efusão articular aguda causam nos músculos TA e SO relacionados à articulação acometida, principalmente em animais diabéticos.

Referências Bibliográficas

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, T.; SCHEIN, P. S.; MCMENAMIM, M. G.; COONEY, D. A. Streptozotocin Diabetes Correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. **J. Clin. Invest.**, v.54, p. 672-77, 1974.

ARANY, Z.; LEBRASSEUR, N.; MORRIS, C.; SMITH, E.; YANG, W.; MA, Y.; CHIN, S.; SPIEGELMAN, B.M. The transcriptional coactivator PGC-1 β drives the formation of oxidative type IIX fibers in skeletal muscle. **Cell Metab.** v.5, p. 35-46, 2007.

AUGHSTEEN, A.A., KHAIR, A-M. B., SULEIMAN, A.A. Quantitative morphometric study of the skeletal muscles of normal and streptozotocin-diabetic rats. **J Pancreas.** 4: 382-389, 2006.

AKIMA H.; FURUKAWA T. Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial menisectomy. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.** 13:632-637, 2005.

BALDWIN KM, HADDAD F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. **J Appl Physiol.**1:345-57, 2001.

BEDOYA, F. J.; SOLANO, F.; LUCAS, M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA formation in pancreatic rat islets. **Experientia.** 52: 344-347, 1996.

BENNET, R. A. & PEGG, A. E. Alkylation of DNA in rat tissues following administration on streptozotocin. **Cancer Res.**41: 2786-2790, 1981.

BERCHTOLD, M.W., BRINKMEIER, H., AND MUNTENER, M. (2000). Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. **Physiol. Rev.**80: 1215–1265, 2000.

BODINE S.C., LATRES E., BAUMHUETER S., LAI V.K., NUNEZ L., CLARKE B.A., POUYMIROU W.T., PANARO F.J. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science.** 294:1704-1707, 2001.

BOFF S.R. A fibra muscular e fatores que interferem no seu fenótipo. **Acta Fisiatr.**, 15: 111-1169, 2008.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Ed. Evolve, 2006.

BRANCACCIO P; MAFFULLI N; LIMONGELLI FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **Br Med Bull.** 81:209-30, 2007.

- BRUTON A. Muscle Plasticity: Response to training and detraining. **Physiotherapy**.88:398-408, 2002.
- BRUUNSGAARD H; GALBO H; HALKJAER-KRISTENSEN J; JOHANSEN TL; MACLEAN DA; PEDERSEN BK. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. **J Physiol**.15: 833–841, 1997.
- CAI D.; FRANTZ J.D.; TAWA N.E.; MELENDEZ P.Q.; LIDOV H.; HASSELGREN G.W.; et al. IKK/betaNF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell**.; 119:285-98; 2004.
- CAO P.R.; KIM H.J.; LECKER S.H. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. **Int J Biochem Cell Biol**. 37:2088-2097, 2005.
- CARLSON C.J.; BOOTH F.W. AND GORDON S.E. Skeletal muscle myostatin RNAm expression is fiber0-type specific and increases during hindlimb unloading. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**. 277: 601-6, 1999
- CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**. 46: 419-426, 2002.
- CHONKAR, A.; HOPKIN, R.; ADEGHATE, E.; SINGH, A.J. Contraction and Cation Contents of Skeletal Soleus and EDL Muscles in Age-Matched Control and Diabetic Rats. **New York Academy of Sciences**..1084: 442-451, 2006.
- COMMITTEE REPORT. Report of expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. 1: S5-S20, 2003.
- COTRAN RS, KUMAR V, ROBBINS S, SCHOEN FJ. Patologia Estrutural e Funcional Robbins. 7 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.;43-83, 2000.
- COTTER, M.; CAMERON, N.E.; LEAN, D.R; ROBERTSON, S. Effects of long-term streptozotocin diabetes on the contractile and histochemical properties of rat muscles. **Q. J. Exp. Physiol**. 74:65-74, 1989.
- DEHOUX, M., BENEDEN, R.V., PASKO, N., LAUSE, P., VERNIERS, J., UNDERWOOD, L., KETELSLEGERS J-M., THISSEN, J-P. Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogin-1/MAFbx during fasting and diabetes. **Endocrinology**. 11, 4806-4812, 2004.
- DELFINO, V.D.A.; FIQUEIREDO, J.F.; MATSUO, T.; FAVERO,M.E.; MATNI, A.M.; MOCELIN, A.J. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J Bras Nefrol**. 24:31-6, 2002.
- DOGRA C., CHABGOTRA H., WEDHAS N., QIN X., KUMAR A. TNF-related inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting. **FASEB J**. 21:1857-69, 2007.

DOLAN, M.G.; MYEHASKIW, A.M.; MEDEL, F.C. Cool-water immersion and high-voltage electric stimulation curb edema formation in rats. **J Athl Train**;38:225-230, 2003.

ELEY H.L., TISDALE M.J. Skeletal atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. **Journal of Biological Chemistry**. 282:7087-7097, 2007.

FERNANDES, S.R.C.; FERNANDES, J.S.; TAVARES, J.S.; SILVA, R.A.N.B.; FRAGOSO, Y.D. Neuropatia Periférica Dolorosa no Diabetes Mellitus: Atualização Terapêutica. **Revista Neurociências**. 9: 91-102, 2001.

FERREIRA, F.R. Estudo comparativo de carragenanas comerciais Kappa, Iota e Lambda no processo inflamatório em ratos: edema intraplantar e pleurisia. Natal, 2005. Dissertação (mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

FERREIRA R., NUEPARTH M.J., MAGALHAES A., VITORINO R., AMADO F. Skeletal muscle atrophy increases cell proliferation in mice gastrocnemius during the first week of hindlimb suspension. **Eur J Appl Physiol**. 97:340-346, 2006.

FISCHER, L. J.; HAMBURGUER, S. Inhibition of insulin secretion from isolated pancreatic islets treated with dihydroxyfumarate. **Fed. Proc**. 38: 528, 1979.

FITZGERALD K., PIVA S., IRRGANG J., BOUZUBAR F., STARZ T. Quadriceps activation failure as a moderator of the relationship between quadriceps strength and physical function in individuals with knee osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**.15:40-48, 2004.

FLÜCK M., HOPPELER H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**.146:159-216, 2003.

FRIER, B.C.; NOBLE E.G.; LOCKE M. Diabetes-induced atrophy is associated with a muscle-specific alteration in NF- κ B activation and expression. **Cell Stress and Chaperones**. 13:287-296, 2008.

GOODNER, C. J. The pancreas. In: **Physiology and biophysics III**. 20^{ed}. Philadelphia: W.B. Saunders, cap. 9, p. 213-214, 1973.

GOMES M.D., LECKER S.H., JAGOE R.T., NAVON A., GOLDBERG A.L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc Natl Acad Sci USA**. 98:14440-14445, 2001.

GUILLOT C., STEINBERG J.G., DELLIAUX S., KIPSON N., JAMMES Y., BADIÉ M. Physiological, histological and biochemical properties of rat skeletal muscles in response to hindlimb suspension. **J Electromyogr Kines**. 1-7, 2006.

GLASS D.J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**.37:1974-84. 2005.

GRANADO M., PRIEGO T., MARTÍN A., VILLANÚA M.A., LÓPEZ-CALDERON A. Ghrelin receptor agonist GHRP-2 prevents arthritis-induced increase in E3 ubiquitin-ligating enzymes MuRF1 and MAFbx gene expression in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**.289: 1007–1014, 2005.

GRANKVIST, K.; MARKLUND, S.; TALJEDAL, I. B. Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan Diabetes. **Nature**. 294: 158-160, 1981.

GRIFFIN JW, NEWSOME LS, STRALKA SW, WRIGHT PE. Reduction of chronic posttraumatic hand edema: a comparison of high voltage pulsed current, intermittent pneumatic compression, and placebo treatments. **Phys Ther**. 5:279-286, 1990.

GOLDSPINK G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. **J. Anat**. 3:323-34. 1999.

GÜR H., ÇAKIN N. Muscle mass, isokinetic torque, and functional capacity in women with osteoarthritis of the knee. **Arch Phys Med Rehabil**. 84:1534-41, 2003.

GUTTRIDGE D.C. Signalling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**.7:443-50, 2004.

HARTREE, E.F. Determination of Protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry** 48, 422-427, 1972.

HARGREAVES, K. DUBNER, R. BROWN, F. FLORES, C. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**.1988;32:77-88.

HERR, R. R.; JAHNKE, H. K.; ARGOUDELIS, S. D. The structure of streptozotocin. **J.Am. Chem. Soc**.89: 4808-4809, 1967.

HERZOG W., LONGINO D., CLARK A. The role of muscles in joint adaptation and degeneration. **Langenbecks Arch Surg**. 288:305-315, 2003.

HESZELE M.F.; PRICE S.R.. Insulin-Like Growth Fator I: The Yin and Yang of Muscle Atrophy. **The Endocrine Society**.11: 4803-4805, 2004.

HICKEY, M.S.; WEIDNER, M.D.; GAVIGAN, K.E.; ZHENG, D.; TYNDALL, G.L.; HOUMARD, J.A. The insulin action-fiber type relationship in humans is muscle group specific. **The American Physiological Society**. E150- 4, 1995.

HIGAKI, Y.; HIRSHMAN, M.F.; FUJII, N.; LAURIE J. GOODYEAR, L.J. Nitric Oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. **Diabetes**. 50: 241-257, 2001.

HONG SK, HAN JS, MIN SS, HWANG JM, KIM YI, NA HS, YOON YW, HAN HC. Local neurokinin-1 receptor in the knee joint contributes to the induction, but not maintenance, of arthritic pain in the rat. **Neurosci Lett**. 322:21–24, 2002.

HOOD, D.A. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol**. 90:1137–1157, 2001.

HOPKINS J., PALMIERI R. Effects of ankle joint effusion on lower leg function. **Clin J Spor Med**. 14: 1-7, 2004.

HUEY K.A.; ROY R.; BALDWIN K.M. & EDGERTON R.V. Temporal effects of inactivity on myosin heavy chain gene expression in rat slow muscle. **Muscle and Nerve**. 24:517-26, 2001.

JACKAMAN R.W.; KANDARIAN S.C. The molecular basis of muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol**. 287: C834-843, 2004.

JOHANSSON, E. B. & TJALVA, H. Studies on the tissue-disposition and fate [14 C] streptozotocin with special reference to the pancreatic islets. **Acta Endocrinol**. 89: 339-351, 1978.

KANETO, H.; FUJII, J.; SEO, H.G.; SUZUKI, K.; MATSUOKA, T.; NAKAMURA, M.; TATSUMI, H.; YAMASAKI, Y.; KAMADA, T.; TANIGUCHI, N. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic β -cell. **Diabetes**. 44: 733-738, 1995.

KEHLA J, TREMPER TM, HARGREAVES KM. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. **Pain**. 85: 333-343, 2000

KOISTINEN, H.A., CHIBALIN, A.V., ZIERATH, J.R. Aberrant p38 mitogen-activated protein kinase signaling in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. **Diabetologia**. 46, 1324-1328, 2003.

KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; SOMMER, A.; RODRIGUEZ, M. L.; KOLBBALCHOFEN, V. Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**. 376: 179-185, 1995.

KU Z., YANG J., MENON V., THOMANSON D.B. Decreased polyosomal HSP-70 may slow polypeptide elongation during skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol**. 268:1367-1374, 1995.

KWON, N. S.; LEE, S. H.; CHOI, C. S.; KHOT, T.; LEE, H. S. Nitric oxide generation from streptozotocin. **FASEB. J.** 8:529-533, 1994.

LADNER K.J.; CALIGIURI M.A.; GUTTRIDGE D.C. Tumor Necrosis Factor-regulated Biphasic Activation of NF-Kb. **The Journal Biological Chemistry.** 24: 2294-2303, 2003.

LAWANDA, N. B., MCNEARNEYB, T., WESTLUNDA, K.N. Amino acid release into the knee joint: key role in nociception and inflammation. **Pain.** 86:69-74, 2000.

LECKER S.H., JAGOE R.T., GILBERT A., GOMES M., BARACOS V., BAILEY J E.T. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **FASEB.**18:39-51, 2004.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced Diabetes. **Diabetologia.** 51, 216–226, 2008.

LIEBER R. **Skeletal muscle structural, function, & plasticity.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002, 2nd edition.

LINDEHAMMAR H, LONDVALL B. Muscle involvement in juvenile idiopathic arthritis. **Rheumatology.** 43:1546-1554, 2004.

MACHADO J.; KRINSKI K.; ELSANGEDY H.M.; CIESLAK F.; LOPES G.; GOMES A.R.S. Vias de sinalização intracelular na atrofia muscular e no treinamento resistido. **Fisioter. Mov.** 22:383-93, 2009.

MANNA, T.D. Not every diabetic child has type 1 diabetes mellitus. **J Pediatr (Rio J).**;83:S178-183 2007.

MICHLOVITZ SL. Thermal Agents in Rehabilitation. 3 ed. Philadelphia. F.A. Davis Company. 30-54, 1996.

MIRÓ O., PEDROL E., CASADEMONT J., GARCÍA-CARRASCO M., SANMARTÍ R., CEBRIÁN M., GRAU J. Muscle involvement in rheumatoid arthritis: Clinicopathological study of 21 symptomatic cases. **Seminars in Arthritis and Rheumatism.** 25:421-428, 1996.

MURATA, M.; TAKAHASHI, A.; SAITO, I.; KAWANISHI, S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. **Biochem. Pharmacol.** 57: 881-887, 1999.

NANTEL, F., DENIS, D., GORDON, R., NORTHEY, A., CIRINO, M. METTERS, K.M., CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Br J Pharmacol.** 128: 853 – 859, 1999.

NISHIKORI., IRIE, K., SUGANUMA T., OZAKI M., YOSHIOKA T. Anti-inflammatory potency of FR 167653, a p38 mitogen-activated kinase inhibitor, in mouse models of acute inflammation. *European Journal of Pharmacology*. 451:327-33, 2002.

OLIVER, I.T. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem. J.* 115-122, 1955.

OMAR ME, ABDEL S. Modulation of inflammatory paw oedema by cysteamine in the rat. *Pharmacol Res.* 45, 4: 275-284, 2002.

OMOTE, K., KAWAMATA, T., NAKA YAMA, Y., YAMAMOTO, H., KAWAMATA, M., NAMIKI, A. Effects of a Novel Selective Agonist for Prostaglandin Receptor Subtype EP4 on Hyperalgesia and Inflammation in Monoarthritic Model. *Anesthesiology*. 97;170-176, 2002.

PALMIERI, R.M.; CHRISTOPHER, D. CORDOVA M., KINZEY S.; STONE, M.; KRAUSE A. The Effect of a simulated knee effusion on postural control in healthy subjects. *Arch Phys Med Rehabil.* 64:1076-9, 2003.

PALMIERI R.M., INGERSOLL C.D., HOFFMAN M.A., CORDOVA M.L., PORTER D.A., EDWARDS J.E. et al. Arthrogenic muscle response to a simulated ankle joint effusion. *Br J Sports Med.* 38:26-30, 2004.

PAP G., MACHNER A., AWISZUS F. Strength and voluntary activation of the quadriceps femoris muscle at different severities of osteoarthritic knee joint damage. *Journal of Orthopaedic Research.* 22:96-103, 2004.

PAPACCIO, G.; PISANTI, F. A.; FRASCATORE, S. Acetyl-homocysteine-thiolactone-induced increase of superoxide dismutase counteracts the effect of subdiabetogenic doses of streptozotocin. *Diabetes.* 35: 470-474, 1986.

PELIT, A.; ÖZAYKAN, M.D.; TULI, A.; DEMIRKAZIK, A.; EMRE, M.; GÜNAY, I. The effects of magnetic field on the biomechanics parameters of *Soleus* and *Extensor Digitorum Longus* muscles in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 10, 4, 2008.

PEPATO, M.T.; MIGLIORINI, R.H.; GOLDBERG, A.L.; KETTELHUT, I.C. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *American Physiological Society.* E340-47, 1996.

PETTE, D. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can. J. Appl. Physiol.* 27: 423-448, 2002.

PILEGAARD H, ORDWAY GA, SALTIN B, NEUFER PD. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 4:E806-14, 2000.

RALL, L.C.; ROUBENOFF R. Rheumatoid Cachexia: metabolic abnormalities, mechanism and interconnections. **Rheumatology**. 43:1219-23, 2004.

RAMIREZ C.R. Efeito da inflamação articular aguda sobre a morfologia e a expressão gênica dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos. 2008. Dissertação (mestrado em Fisioterapia) – Departamento de Fisioterapia – Universidade Federal de São Carlos.

REID, M.B.; LI Y-P. Cytokines and oxidative signaling in skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**. 2001;171:225-32.

SACCO, I.C.N.; SARTOR, C.D.; GOMES, A.A.; JOÃO, S.M.A.; CRONFLI, R. Avaliação das Perdas Sensorio-motoras do Pé e Tornozelo Decorrentes da Neuropatia Diabética. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. 11: 27-33, 2007.

SACHECK J.M., HYATT J.P., RAFFAELLO A., JAGOE R.T., ROY R.R., EDGERTON R.V. et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. **FASEB**. 21:140-155, 2007.

SAID, G. Focal and Multifocal Diabetic Neuropathies. **Arq Neuropsiquiatr.**, 65: 1272-1278, 2007.

SALVEMINI D, WANG Z, WYATT PS, BOURDON DM. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan – induced rat paw inflammation. **Br J Pharmacol**. 118: 829 – 838, 1996.

SANDLER, S.; WELSH, M.; ANDERSON, A. Streptozotocin-induced impairment of islet β -cell metabolism and its prevention by a hydroxyl radical scavenger and inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, 53: 392-400, 1983.

SNOW L.M.; THOMPSON L.V. Influence of Insulin and Muscle Fiber Type in N ϵ -(Carboxymethyl)-Lysine Accumulation in Soleus Muscle of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. 76: 227-234, 2009.

SARICA OGLU, F., DAL, D., ATILLA, P., ISKIT, A.B., TARHAN, O., ASAN E. et al. Effect of intraarticular injection of lornoxicam on the articular cartilage & synovium in rat. **Indian J Med Res**. 127, 362-5, 2008.

SATO, K.L.; MIGLIACCIO V.; CARMO, J.M.; OLIVETI, M.C.D.B.B.; FERREIRA, R.S.; FAZAN, V.P.S. Diabetes como Modelo de Neuropatia Autonômica. **Medicina**. 39: 28-38, 2006.

SCHEIN, P. S.; LOFTUS, S. Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. **Cancer Res**. 28:1501-1506, 1968.

SHAW, J.E., SICREE, R.A., ZIMMET, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**. 87: 4-14. 2010.

SLUKA KA. WESTLUND KN. Behavioral and immunohistochemical changes in the experimental arthritis model in rats. **Pain**. 55:367-377, 1993.

SIU P.M., PISTILLO E.E., ALWAYS S.E. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2005;289:1015-1026.

STOCKMAR C., LILL H., TRAPP A., JOSTEN C., PUNKT K. Fibre type related changes in the metabolic profile and fibre diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. **Acta Histochemica**. 108:335-342, 2006.

SUETTA C., AAGAARD P., MAGNUSSON S., ANDERSEN L., SIPILÄ S., ROSTED A. et al. Muscle size, neuromuscular activation, and rapid force characteristics in elderly men and women: effects of unilateral long-term disuse due to hip-osteoarthritis. **J Appl Physiol**. 102:942-948, 2007.

SURAMPUDI, P.N.; JOHN-KALARICKAL, J.; FONSECA, V.A. Emerging Concepts in the Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. **Mount Sinai School of Medicine**. 76:216-226, 2009.

TAN-NO K, NAKAJIMA T, SHOJI, T. NAKAGAWASAI O. NIJIMA F. Anti-inflammatory Effect of Propolis through Inhibition of Nitric Oxide Production on Carrageenin-Induced Mouse Paw Edema. **Biol Pharm Bull.**; 29:96-99, 2006.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **J. Clin. Pathol**. 22:158-161,1969.

UCHIGATA, Y.; YAMAMOTO, H.; KAWAMURA, A.; OKAMOTO, H. Protection by superoxide dismutase, catalase and poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxanstreptozotocin-induced islet DNA strand breaks an against the inhibition of proinsulin synthesis. **J. Biol. Chem**. 257: 6084-6088, 1982.

VIOLLET, B.; LANTIER, L.; DVEIN-LECLERC, J.; HÈBRAD, S.; AMOUYAL, C.; MOUNIER, R.; FORETZ, M.; ANDREELLI, F. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. **Front Biosci**. 14: 3380-3400, 2009.

WANG, Y., HUANG, C., CAO, Y., HAN, Y. Repeated administration of low dose ketamine for the treatment of monoarthritic pain in the rat. **Life Sciences**. 67: 261-267, 2000.

WELLER M.T.; SNYDER E.C.; PATTERSON M.N. E SWOAP S.L. An E-box within the MHC Iib gene is bound by MyoD and is regulated for gene expression in fast muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**. 199;276:1069-78.

WILLIAMS G., BARRANCE P., SNYDER-MACKLER L, BUCHANAN T. Altered quadriceps control in people with anterior cruciate ligament deficiency. **Medicine & Science in sport & Exercise.** 1089-1096, 2004.

YAMAMOTO, H.; UCHIGATA, Y.; OKAMOTO, H. DNA strand breaks in pancreatic islets “in vivo” administration of alloxan or streptozotocin. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 103: 1014-1020, 1981.

ZHANG P., CHEN X., FAN M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. **Medical Hypotheses.** 11: 1-12, 2006.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 31/2009

Interessado: CLARA MARIA PINHEIRO

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Projeto: Efeito da Inflamação Aguda do tornozelo sobre as características histológicas, a expressão gênica e níveis da creatina cinase nos músculos sóleo e tibial anterior de ratos diabéticos.

Parecer nº 04/2010 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Efeito da Inflamação Aguda do tornozelo sobre as características histológicas, a expressão gênica e níveis da creatina cinase nos músculos sóleo e tibial anterior de ratos diabéticos", apresentado pela pós-graduanda Clara Maria Pinheiro, orientada pelo Professor Doutor Iguatemy Lourenço Brunetti, do Departamento de Análises Clínicas, desta faculdade, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em julho de 2010.

Araraquara, 05 de março de 2010.


Prof.ª Dr.ª AURÉLUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP